

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
DOUTORADO EM AGRONOMIA-FITOTECNIA**

JEAN CARLOS DE ARAÚJO BRILHANTE

**APLICAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM SEMENTES DE FEIJÃO-
DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] NA ATENUAÇÃO DOS
EFEITOS DO ENVELHECIMENTO E DO ESTRESSE SALINO**

**FORTALEZA-CEARÁ
2011**

JEAN CARLOS DE ARAÚJO BRILHANTE

**APLICAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM SEMENTES DE FEIJÃO-
DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] NA ATENUAÇÃO DOS
EFEITOS DO ENVELHECIMENTO E DO ESTRESSE SALINO**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Agronomia-Fitotecnia, área de concentração Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

Orientador
Joaquim Enéas Filho
Professor Associado III

**FORTALEZA-CEARÁ
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- B866a Brilhante, Jean Carlos de Araújo.
 Aplicação de ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] na atenuação dos efeitos do envelhecimento e do estresse salino / Jean Carlos de Araújo Brilhante. – 2011.
 125 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Fortaleza, 2011.
 Área de Concentração: Fitotecnia.
 Orientação: Prof. Dr. José Enéas Filho.
1. Feijão-de-corda. 2. Salinidade. 3. Vitamina C. 4. Estresse salino I. Título.

JEAN CARLOS DE ARAÚJO BRILHANTE

**APLICAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM SEMENTES DE FEIJÃO-
DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] NA ATENUAÇÃO DOS
EFEITOS DO ENVELHECIMENTO E DO ESTRESSE SALINO**

Tese submetida à coordenação do curso de Pós-Graduação em Agronomia como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Agronomia, área de concentração Fitotecnia outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra a disposição dos interessados na Biblioteca Central desta Universidade. A transcrição de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que feita de acordo com as normas da ética científica.

Tese aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Joaquim Enéas Filho, Dr.

Universidade Federal do Ceará
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Professor Orientador

Sebastião Medeiros Filho, Dr.

Universidade Federal do Ceará
Departamento de Fitotecnia
Professor conselheiro

Alek Sandro Dutra, Dr.

Universidade Federal do Ceará
Departamento de Fitotecnia
Professor conselheiro

Theresa Christine Filgueiras Russo Aragão, Dra.

Universidade Estadual do Ceará
Campus da FECLESC
Professora conselheira

Alexandre Bosco de Oliveira, Dr.

Universidade Estadual do Piauí
Departamento de Ciências Agrárias
Professor conselheiro

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças em todos os momentos e a minha família, pelo amparo e carinho.

Aos meus pais Francisca Altamira Pires de Araújo e José Brilhante Neto e meus irmãos Jeyms e Jefferson pelo amor e compreensão.

Ao meu avô Augusto Fernandes de Araújo e à minha avó Terezinha Pires de Araújo que mesmo não estando mais neste plano, são responsáveis por eu ter chegado até aqui.

À minha tia Francisca Altair Pires de Araújo por tudo e algo mais.

Aos meus grandes amigos Auriélio, Paulinho e Karol que estão comigo em todos os momentos de alegria e tristeza.

Ao professor Joaquim Enéas Filho, por não ter sido apenas o meu orientador, mas principalmente, por ter me aturado em alguns momentos difíceis dessa jornada.

Ao professor Sebastião Medeiros Filho, pela sua disponibilidade e interesse em contribuir para revisão deste trabalho e também por ter cedido todo o espaço do laboratório de Análise de Semente para realização das análises e experimentos desta tese.

Ao professor Alek Sandro Dutra, pela sua disponibilidade e interesse em contribuir para a revisão deste trabalho.

A professora Theresa Christine F. Russo Aragão, pela amizade do tempo do mestrado e sua disponibilidade e interesse em contribuir para a revisão deste trabalho.

Ao professor Alexandre Bosco de Oliveira, pela amizade do tempo do mestrado e disponibilidade e interesse em contribuir para revisão deste trabalho, além de me ajudado na redação de artigos científicos.

Aos meus colegas de curso Michela Albuquerque Lima e Manoel Silva Amaro, pela amizade, e pela nossa ardorosa batalha durante todo o doutorado.

A todos os colegas do curso de Pós-graduação em Agronomia-Fitotecnia, com os quais convivi, guardarei eternas recordações.

A todos os colegas do Laboratório de Análise de Semente da UFC, em especial a José Wendney Lima e Silva pela grande colaboração nos experimentos de germinação que consta nesta tese.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal (LABFIVE II) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Victor e Jones.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de doutorado.

Enfim, a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigado.

"A persistência é o caminho do êxito."

(Charles Chaplin)

RESUMO

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar o efeito da aplicação exógena do ácido ascórbico na redução dos danos ocasionados pelo envelhecimento e salinidade em sementes de feijão-de-corda. Foram realizados três experimentos, sendo o material vegetal utilizado como modelo nestes experimentos sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], cultivar EPACE 10, disponíveis do Banco de Germoplasma de Feijão-de-corda da UFC. No primeiro experimento foram feitos testes preliminares para obtenção da melhor metodologia de aplicação do ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda. As sementes foram incubadas com 0,42 e 0,85 mM de ácido ascórbico em diferentes tempos de exposição (4h, 8h e 24h) através de dois diferentes métodos: I - Embebição em papel germitest na placa de petri e II - Submersão em solução no Erlenmeyer. Após a aplicação dos tratamentos foi quantificado nas sementes o teor de ácido ascórbico (AsA) e posteriormente comparado com o teor padrão de ácido ascórbico endógeno já existente nas sementes controle (0h). Foi observado que em todos os tratamentos analisados o teor de AsA endógeno das sementes de feijão-de-corda, foi maior que o das sementes controle, que não sofreram tratamento. À medida que foi aumentando o tempo de exposição das sementes, houve um aumento crescente no teor de ácido ascórbico das sementes, com diferença estatística significativa entre os tempos de exposição analisados, sendo o mais eficiente o de 24 h. Houve diferença significativa também nas concentrações exógenas utilizadas, sendo a de 0,85 mM a mais eficiente. Houve diferença significativa entre os métodos aplicados somente na concentração de 0,85 mM. No tempo de 24 h de exposição foi verificado que, apesar do valor numérico do método II ser superior ao do método I, não foi constatada diferença significativa entre os métodos de aplicação nesse tempo. Podemos então concluir a partir dos resultados apresentados que tanto o método de aplicação I como o II, com a concentração de 0,85 mM de ácido ascórbico por um período de 24 h foi a metodologia mais eficiente para a aplicação exógena de ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10. No segundo experimento, tendo já definido a metodologia de aplicação exógena, foi feita então a investigação do possível efeito do pré ou pós-tratamento com ácido ascórbico na atenuação dos efeitos danosos provocados pelo envelhecimento nas sementes de feijão-de-corda, através de parâmetros fisiológicos e bioquímicos. As sementes foram submetidas a quatro tratamentos: T1 - sementes não envelhecidas e não tratadas com ácido ascórbico (AsA), tratamento controle (SNE); T2 - sementes envelhecidas (45°C, 99% U.R., no escuro) e não-tratadas com AsA (SE); T3 - as sementes, antes do envelhecimento foram submetidas a um pré-tratamento com 0,85 mM de AsA (SE-Pré-T); T4 - as sementes, após o envelhecimento, foram submetidas a um pós-tratamento com 0,85 mM de AsA (SE-Pós-T). As sementes do T4 apresentaram massa fresca maior que as do controle (T1). Houve uma redução de quase 15% na germinação das sementes após o envelhecimento, evidenciado no tratamento T2. Porém, quando as sementes foram tratadas com a solução de ácido ascórbico após o envelhecimento T4 a porcentagem de germinação foi maior que o do controle (T1) em quase 13%. As sementes dos tratamentos T2 e T3 apresentaram um maior percentual de danos de membrana (35,16 e 36,82 $\mu\text{s cm}^{-1}\text{g}^{-1}$ semente respectivamente), avaliado pelo maior vazamento de eletrólitos (C.E), quando comparado com o controle T1 (17,84 $\mu\text{s cm}^{-1}\text{g}^{-1}$ semente). As sementes envelhecidas do tratamento T2 apresentaram um menor vigor, avaliado pelo vazamento de eletrólitos, que o controle T1. O T3 provocou resultados negativos nas sementes de feijão-de-corda, em todas as variáveis relacionadas com o vigor e a germinação. Entretanto, a aplicação exógena de solução de ácido ascórbico a 0,85 mM após o envelhecimento por 72 h nas sementes de feijão-de-corda (T4) amenizou os efeitos deletérios provocados pelo envelhecimento no vigor e na germinação dessas sementes. Estas melhorias observadas em T4 foram evidenciadas por um maior conteúdo de matéria fresca e seca, maior

integridade de membranas, menor peroxidação de lipídios, maior porcentagem de germinação, porcentagem de emergência de plântulas no campo, conteúdo de ascorbato e atividade da peroxidase do ascorbato (APX), quando comparado com o T3. Os resultados sugerem que a aplicação exógena de ácido ascórbico 0,85 mM nas sementes de feijão-de-corda após o envelhecimento artificial (pós-tratamento), pode atenuar seus efeitos deletérios provocados sobre o vigor e germinação dessas sementes. Finalmente, no terceiro experimento, foi investigado também o efeito da aplicação exógena de ácido ascórbico na aclimatação de sementes envelhecidas de feijão-de-corda ao estresse salino, também através de parâmetros fisiológicos e bioquímicos. As sementes foram envelhecidas por 72 h em câmara de envelhecimento acelerado (45 °C, 99% U.R., no escuro) e posteriormente foram semeadas em papel germitest embebido com: água desionizada (T2); NaCl a 100 mM (T3); ácido ascórbico a 0,85 mM (T4); NaCl a 100 mM + Ac. Ascórbico a 0,85 mM (T5) e o tratamento controle consiste de sementes não envelhecidas, embebidas com água desionizada (T1). Foram feitas coletas em três estádios morfofisiológicos, sendo avaliadas variáveis fisiológicas relacionadas ao vigor. O T2 e o T3 afetaram o vigor das sementes com reduções na massa, na integridade das membranas e na germinação. O T4 atenuou os efeitos provocados pelo envelhecimento na germinação e no vigor, apresentando um maior Índice de velocidade de emergência (IVE) e menor tempo médio de emergência (TME) e maior teor de água. O T3 e T5 atrasaram a mobilização de reservas quando comparado com o T1 e T4. O T5 reduziu a massa fresca, aumentou o vazamento de eletrólitos e retardou a germinação com um menor IVE e maior TME. A aplicação de ácido ascórbico, foi capaz de atenuar os efeitos provocados pelo envelhecimento, mas não foi capaz de atenuar os efeitos do NaCl nas sementes envelhecidas de feijão-de-corda. O estudo da relação entre o uso de antioxidantes naturais, com um possível revigoramento de sementes envelhecidas, utilizando o feijão-de-corda como modelo experimental, pode gerar estratégias de meios de potencializar as defesas antioxidativas e amenizar os efeitos de estresse em ambientes de armazenamento de sementes sob condições não controladas, principalmente em pequenas e médias propriedades rurais.

Palavras-chave: feijão-de-corda, envelhecimento, salinidade, ácido ascórbico e tolerância.

ABSTRACT

The main objective of this study was to evaluate the effect of exogenous application of ascorbic acid in reducing the damage caused by aging and salinity in cowpea seeds. Three experiments were conducted, and the plant material used as a template in these experiments, seeds of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], cultivate EPACE 10, available from the Germplasm Bank of cowpea of UFC. In the first experiment, preliminary tests were made to obtain the best methodology for the application of ascorbic acid in cowpea seeds. The seeds were incubated with 0.42 and 0.85 mM ascorbic acid at different exposure times (4h, 8h and 24h) using two different methods: (I) - Soaking in germitest paper in a petri dish and (II) - Drowning in solution in the Erlenmeyer. After applying the treatments were quantified in seeds, the ascorbic acid content and then compared to the standard content of endogenous ascorbic acid existing in the control seeds (0 h). It was observed that in all treatments examined, the endogenous AsA content of the seeds of cowpea was greater than that of control seeds, which have not undergone treatment. As has been increasing the exposure time of seeds, there was a steady increase in the ascorbic acid content of seeds, with a statistically significant difference between the exposure times examined, the most efficient of 24 h. There was a significant difference in the concentrations used exogenous, being 0.85 mM of the most efficient. There was no significant difference between the methods applied at a concentration of 0.42 mM, at a concentration of 0.85 mM. At 24 h of exposure, we observed that despite the numerical value of the method (II) is superior to the method (I), we found no statistically significant difference between application methods at that time then we can conclude from the results presented that both the method of application (I) or (II) with the concentration of 0.85 mM ascorbic acid for a period of 24 h was the most efficient methodology for the application of exogenous ascorbic acid in cowpea seeds, cultivate EPACE 10. In the second experiment, as defined the methodology of exogenous application was then made to investigate the possible effect of pre-or post-treatment with ascorbic acid in reducing the harmful effects caused by aging in the cowpea seeds, through physiological and biochemists. Seeds of cowpea rope were placed in accelerated aging chamber (45 °C, 99% RH in the dark). The seeds were subjected to four treatments: (T1) and aging seeds were not treated with ascorbic acid (AsA), control (SNE); (T2) and non-aged seeds treated with AsA (SE); (T3) seeds Before aging were subjected to a pretreatment with 0.85 mM AsA (SE-Pre-T); (T4) seeds, after aging, were subjected to a post-treatment with 0.85 mM AsA (Post-SE-T). The seeds of T4 showed higher fresh weight than the control (T1). There was a reduction of almost 15% seed germination after aging for 72 h, evidenced by the treatment (T2). However, when seeds were treated with ascorbic acid solution treatment (T4) the% germination was higher than in the control (T1) in almost 13%. Seed treatment (T2) and (T3) had a higher% of membrane damage (35.16 and 36.82), respectively, measured by increased electrolyte leakage (EC) when compared with the control (T1) (17.84). The aged seeds of treatment (T2) showed a smaller force, measured by electrolyte leakage, the control (T1). T3 caused negative results in the cowpea seeds with aging for 72 h in all variables related to the vigor and germination. However, exogenous application of ascorbic acid solution 0.85 mM after aging for 72 h in the cowpea seeds alleviated the harmful effects caused by aging vigor and germination of seeds. Evidenced by a higher content of fresh and dry weight, integrity of membranes, reduced lipid peroxidation, higher percentage germination, higher percentage of seedling emergence in the field, the higher content of ascorbate and APX activity increased when compared with the T3. The results suggest that exogenous application of 0.85 mM ascorbic acid in the cowpea seeds after artificial aging (after treatment), can mitigate their damaging effects on vigor and germination of these seeds. Finally, the third experiment, we investigated the effect of

exogenous application of ascorbic acid in acclimation of aged seeds of cowpea to salt stress also through physiological and biochemical parameters. Seeds were aged for 72 h in the accelerated aging chamber (45 °C, 99% RH in the dark). After germination were sown on paper soaked with (T2) deionized water (T3) 100 mM NaCl, (T4) and 0.85 mM ascorbic acid, (T5) at 100 mM NaCl + Ac. The 0.85 mM ascorbic acid and the control (T1), aging seeds with deionized water. Sampling was done in three stages morph physiologic, when variables related physiological effect. The T2 and T3 affect the vigor with mass reduction in membrane integrity and germination. The T4 attenuated effects caused by aging on the germination and vigor, presenting a higher emergence rate index (ESI) and lower mean emergence time (MET) and higher water content. The T3 and T5 delayed the mobilization of reserves compared with the T1 and T4. The T5 has reduced the fresh weight, increased electrolyte leakage and delayed germination with a largest ESI and smallest MET. The application of ascorbic acid, was able to mitigate the effects caused by aging, but was not able to mitigate the effects of NaCl in the aged seeds of cowpea. The study of the relationship between the use of natural antioxidants, with a possible revival of aged seeds, using the cowpea as a model, can generate media strategies to enhance antioxidative defenses and mitigating the effects of stress in storage environments seed under uncontrolled conditions, mainly in small and medium-sized farms.

Key words: cowpea, aging, salinity, ascorbic acid and tolerance.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Principais caminhos metabólicos que podem ocorrer percorridos durante a deterioração de sementes	Página 18
FIGURA 2	Sequência proposta de modificações ocorridas no desempenho de sementes durante o processo de deterioração (Fonte: Delouche, 2002).	Página 19
FIGURA 3	Relação entre o processo de deterioração e o poder germinativo das sementes no decorrer do tempo (Fonte: Delouche, 2002).	Página 19
FIGURA 4	(A) Câmara de envelhecimento acelerado (BOD) e (B) caixas gerbox para envelhecimento de sementes.	Página 24
FIGURA 5	A produção de ERO na resposta a fatores bióticos e abióticos de estresses nas plantas	Página 32
FIGURA 6	Mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de defesa das plantas ao estresse oxidativo.	Página 33
FIGURA 7	Mecanismos de defesa antioxidativa das plantas	Página 34
FIGURA 8	Ciclo do ascorbato-glutationa	Página 35
FIGURA 9	Estrutura química do L-ácido ascórbico	Página 37
FIGURA 10	Mecanismo de oxidação do L-ascorbato (MDHA = monodeidroascorbato, DHA = deidroascorbato)	Página 38
FIGURA 11	Esquema experimental para identificar a melhor metodologia de aplicação exógena de ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda.	Página 54
FIGURA 12	Diferentes métodos de aplicação exógena de ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda: (A) = Submersão em solução no Erlenmeyer e (B) = Embebição em papel germitest na placa de petri.	Página 54
FIGURA 13	Efeito da aplicação exógena de ácido ascórbico no aumento do teor endógeno existente nas sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, sob diferentes metodologias.	Página 55
FIGURA 14	Teste da condutividade elétrica a 25 °C por 24 h (A), fervura em banho Maria por 1 h para a determinação da % de danos de membranas (B) e aparelho de condutivímetro usado para as leituras de condutividade elétrica (C).	Página 63
FIGURA 15	Massa fresca (A), massa seca (B) e umidade (C) das sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos.	Página 70
FIGURA 16	Vazamentos de eletrólitos (A), % de danos de membranas (B) e peroxidação de lipídios (C) das sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos.	Página 73
FIGURA 17	Porcentagem de germinação das sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos.	Página 74
FIGURA 18	Teor de amido (A), açúcares solúveis totais (B), atividade enzimática amilásica total (C) e Atividade amilásica total específica (D) das	Página 76

	sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos.	
FIGURA 19	Teor de proteínas solúveis (A), atividade proteolítica (B) e teor de aminoácidos livres totais (C) das sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos.	Página 78
FIGURA 20	Conteúdo de ascorbato reduzido (A), atividade enzimática da ascorbato peroxidase (APX) (B) e atividade específica da ascorbato peroxidase (APX) (C) das sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos.	Página 79
FIGURA 21	Teste de emergência em condições de casa de vegetação: semeadura das sementes (A), bandeja contendo cada repetição de 25 sementes (B), visão do stand montado com a distribuição dos respectivos tratamentos (C) e soluções para irrigação com os respectivos tratamentos (D).	Página 85
FIGURA 22	Massa fresca (A), massa seca (B) e Umidade das sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos.	Página 87
FIGURA 23	Vazamento de eletrólitos (A), porcentagem de danos de membranas (B) e peroxidação de lipídios (C) nas sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos.	Página 90
FIGURA 24	Figura 24 – Teste de germinação nas sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos.	Página 91
FIGURA 25	Aspectos morfológicos da germinação do feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, no estágio E2 sob diferentes tratamentos.	Página 92
FIGURA 26	Aspectos morfológicos da germinação de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, no estágio E5 sob diferentes tratamentos.	Página 93
FIGURA 27	Emergência das plântulas de Feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, aos 10 dias após a semeadura, sob diferentes tratamentos.	Página 95
FIGURA 28	Massa fresca (A), massa seca (B) e teor de água das plântulas de Feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, aos 10 dias após a semeadura, sob diferentes tratamentos.	Página 96
FIGURA 29	Teor de amido (A), conteúdo de açúcares solúveis (B) e atividade amilásica nas sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos.	Página 99
FIGURA 30	Conteúdo de proteínas solúveis (A), atividade proteolítica (B) e conteúdo de aminoácidos livres (C) de sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos.	Página 101
FIGURA 31	Conteúdo de ascorbato reduzido (A) e atividade da peroxidase do ascorbato (APX) (B) em sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos.	Página 103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Tipos, natureza e locais de atuação de antioxidantes dentro da célula (Adaptado de Mittler, 2002)	Página 34
TABELA 2	Comparativo de área, produtividade e produção de Feijão-de-corda, safra 2008/2009 e safra 2009/2010.	Página 46
TABELA 3	Concentração endógena de ácido ascórbico (mg/100g) de sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, após serem incubadas com 0,42 e 0,85 mM de ácido ascórbico em diferentes tempos de exposição (4, 8 e 24 h) através de dois diferentes métodos: (I) - Embebição em papel germitest na placa de petri e (II) - Submersão em solução no Erlenmeyer. As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e letras maiúscula nas linhas, não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade).	Página 56
TABELA 4	Valores médios do índice de velocidade de emergência (IVE), emergência de plântulas (%) e tempo médio de emergência (TME) de sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a quatro diferentes tratamentos (SNE, SE, SE-Pré-T e SE-Pós-T).	Página 75
TABELA 5	Valores médios do índice de velocidade de emergência (IVE), emergência de plântulas (%) e tempo médio de emergência (TME) de sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a quatro diferentes tratamentos (SNE, SE, SE-Pré-T e SE-Pós-T). letras minúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente a 5%.	Página 97

LISTA DE ABREVIATURAS

BOD	BIOLOGICAL ORGANISM DEVELOPMENT
%DM	PERCENTUAL DE DANOS DE MEMBRANAS
RAS	REGRAS PARA ANÁLISES DE SEMENTES
IVE	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE EMERGÊNCIA
TME	TEMPO MÉDIO DE EMERGÊNCIA
TPG	TESTE PADRÃO DE GERMINAÇÃO
ERO	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO
C.E	CONDUTIVIDADE ELÉTRICA
AOSA	ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS
AAL	AMINOÁCIDOS LIVRES
AsA	ASCORBATO
APX	PEROXIDASE DO ASCORBATO
CAT	CATALASE
SOD	DISMUTASE DO SUPERÓXIDO
GSH	GLUTATIONA
GPX	PEROXIDASE DA GLUTATIONA
TPX	PEROXIDASE DA TIORREDOXINA
POX	PEROXIDASE DE FENÓIS
GLOase	L-GULONO-C-LACTONE OXIDASE
2-ODDs	ÁCIDO-2-OXO
GalUR	REDUTASE DO ÁCIDO D-GALACTURÔNICO
MDHA	MONODESIDROASCORBATO
DHA	DESIDROASCORBATO
TCA	ÁCIDO TRICLOROACÉTICO
TBA	ÁCIDO TILBARBITÚRICO
MF	MASSA FRESCA
MS	MASSA SECA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1. Armazenamento, envelhecimento e perda da viabilidade de sementes.....	15
1.2. Testes para avaliação do vigor e da viabilidade de sementes.....	22
1.3. O problema da salinidade no desempenho das sementes no campo.....	25
1.4. A produção de espécies reativas de oxigênio, a viabilidade e o envelhecimento de sementes.....	29
1.5. O mecanismo de resposta antioxidativa das sementes ao envelhecimento e a salinidade.....	31
1.6. O papel do ácido ascórbico no envigoramento de sementes.....	33
1.7. O modelo vegetal: sementes de feijão-de-corda.....	44
2. JUSTIFICATIVA E IMPORTÂNCIA DA PESQUISA.....	48
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS	49
3.1 Hipótese geral	49
3.2 Objetivo geral	49
3.3 Objetivos específicos	49
3.4 Estratégia experimental.....	49
4. <u>CAPÍTULO I</u> - “Identificação da melhor metodologia de aplicação exógena do ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE10”	51
4.1 Introdução	51
4.2 Material e Métodos.....	53
4.3 Resultados e discussão.....	55
4.4 Conclusão.....	58
5. <u>CAPÍTULO II</u> - “Efeitos do pré e pós-tratamento com ácido ascórbico na qualidade fisiológica de sementes de feijão-de-corda envelhecidas artificialmente”	59
5.1 Introdução	59
5.2 Material e Métodos.....	62
5.2.1 Determinação da massa fresca, massa seca e umidade das sementes.....	62
5.2.2 Teste de condutividade elétrica e integridade de membranas	63
5.2.3 Teste de germinação	64
5.2.4 Teste de emergência de plântulas	64
5.2.5 Açúcares solúveis e Amido.....	64
5.2.6 Aminoácidos livres	65
5.2.7 Proteínas solúveis	65
5.2.8 Atividade proteolítica.....	66
5.2.9 Atividade amilásica ($\alpha + \beta$ - amilase)	66
5.2.10 Atividade da peroxidase do ascorbato (APX - EC 1.11.1.11)	67
5.2.10 Conteúdo de ascorbato reduzido.....	67
5.2.11 Peroxidação de lipídios	67
5.3 Resultados e discussão.....	69
5.4 Conclusão.....	81
6. <u>CAPÍTULO III</u> - “Influência da aplicação exógena de ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda submetidas ao envelhecimento e a salinidade”	82
6.1 Introdução	82
6.2 Material e Métodos.....	83
6.3 Resultados e discussão.....	86
6.4 Conclusão.....	104
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Armazenamento, envelhecimento e perda da viabilidade de sementes

Os problemas de armazenamento de produtos agrícolas constituem objeto de estudo permanente, visando prolongar ao máximo a qualidade dos produtos armazenados, sejam eles semente ou grão para consumo. Evitando-se perdas desnecessárias nos grãos armazenados é possível minorar a fome no mundo. O prejuízo anual que a economia das nações em desenvolvimento sofre em consequência das perdas pós-colheita é muito grande. A causa mais frequente de perdas no armazenamento é o ataque de insetos, fungos e roedores. Ocorrem ainda perdas na qualidade intrínseca, como a aparência e o sabor, no caso do feijão para consumo, e, quando se trata das sementes, na sua capacidade para germinar e produzir uma planta vigorosa e sadia (VIEIRA & YOKOYAMA, 2000).

A característica mais marcante do envelhecimento dos seres vivos é o declínio funcional progressivo, incluindo a perda das respostas adaptativas ao estresse ao longo do tempo. A extrema complexidade desses mecanismos básicos naturais é o maior empecilho para entendermos o processo biológico irreversível associado ao envelhecimento. Para estudiosos da área, o envelhecimento é definido como um processo adaptativo, não causado somente por simples fatores ou processos, mas por um processo multifatorial modulado pela interação entre fatores genéticos da própria espécie e os fatores ambientais submetidos (YU & CHUNG, 2006).

Uma das principais correntes a cerca dos estudos sobre o envelhecimento, consideram o estresse oxidativo como um das causas que acentuam o processo de envelhecimento. O termo estresse oxidativo deriva significativamente da força básica que elícita a oxidação pelo poder oxidante, sendo o oxigênio essencial para o metabolismo aeróbio dos seres vivos. Estudos mostram uma forte evidência da relação entre o aumento de oxidantes e alterações estruturais e funcionais, em todos os níveis, molecular, celular, histológico, organizacional (MCDONALD, 1999).

Além disso, estudos recentes realizados ao nível molecular do estresse oxidativo mostraram uma alteração gênica durante o processo do envelhecimento, evidenciando a forte influência genética desse processo. Contudo, a acumulação de danos e a modulação genética são excelentes marcadores dos efeitos dos estresses, mas não são a causa direta do envelhecimento. A via mais direta para mostrar a casualidade entre o estresse oxidativo e o envelhecimento poderá ser a exploração do processo de envelhecimento na ausência do

estresse oxidativo, o que significa estar fora do oxigênio, uma prática impossível para os seres aeróbicos (YU & CHUNG, 2006).

As centenas de milhões de anos de processo de evolução têm ensinado que a vida aeróbica envolve extremos processos adaptativos para garantir a sobrevivência no ambiente com o oxigênio, ou seja, a regulação da homeostase do oxigênio. Desse modo, a longevidade de uma espécie depende do ajuste a esse ambiente oxidativo, da habilidade adaptativa. Uma das estratégias de sobrevivência nesse ambiente oxidativo talvez tenha sido a produção de mecanismos celulares protetores com o intuito de minimizar os danos oxidativos pela regulação da reatividade do radical livre. Sendo assim, as bases de sobrevivência dos seres vivos proveram sistemas de defesa antioxidativa (YU & CHUNG, 2006).

Os processos adaptativos aos estressores foram documentados em uma série de estudos, embora a exposição crônica ao estresse inicie ou acelere o envelhecimento fisiológico, estudos mostram uma resposta biológica bifásica. Sob condições primárias, o nível de estresse pode ser efetivo para induzir o organismo à adaptabilidade (YU & CHUNG, 2006). Em 1956, Harman sugeriu que os radicais livres produzidos durante a respiração aeróbica causam danos oxidativos acumulativos, resultando no envelhecimento e morte. Ele estabeleceu a relação entre os efeitos do envelhecimento e a radiação ionizante, incluindo metagênese, câncer, e graves danos celulares. Harman lançou a hipótese de que a geração de radicais endógenos de oxigênio ocorre *in vivo*, como produto redox químico enzimático, especulando que essas enzimas estão envolvidas diretamente na utilização do oxigênio molecular (BECKMAN & AMES, 1998).

A teoria do envelhecimento por radicais livres ganhou credibilidade com a identificação em 1969 da enzima superóxido dismutase (SOD) que forneceu a primeira evidência obrigatória da geração *in vivo* do ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$). O uso da SOD como uma ferramenta para localizar sítios subcelulares da geração de $O_2^{\cdot -}$ levou ao fortalecimento da teoria do radical livre, isto é, que as mitocôndrias são a principal fonte de oxidantes endógenos. Assim, a respiração intensa, associada com a geração de radicais de oxigênio, leva ao envelhecimento (BECKMAN & AMES, 1998).

O fenômeno do envelhecimento e a morte celular programada são estudados mais frequentemente em humanos ou em células animais. No entanto, as sementes de plantas superiores representam excelentes modelos para o estudo do envelhecimento, pois a perda da viabilidade pode ser facilmente induzida experimentalmente (KRANNER *et al.*, 2006). As condições ambientais utilizadas para o armazenamento de sementes tem se constituído um

sério problema, principalmente em regiões tropicais úmidas. Geralmente a viabilidade das sementes é perdida durante períodos prolongados de armazenamento.

Sementes ortodoxas são tolerantes a dessecação e podem ser armazenadas no estado seco, já as sementes recalcitrantes são extremamente sensíveis a dissecação (ROBERTS, 1973). Sementes ortodoxas são aquelas que podem ser armazenadas com menos de 10% de teor de água, mantendo sua longevidade, já as sementes recalcitrantes, não podem ser desidratadas para teores de água abaixo de 25-50% dependendo da espécie, pois perdem sua viabilidade. Portanto, o conhecimento do comportamento da semente em relação à perda de viabilidade é muito importante para quem vai trabalhar com armazenamento de sementes (VIEIRA & YOKOYAMA, 2000).

Danos letais podem ser induzidos pelo envelhecimento artificial em sementes ortodoxas, e pela desidratação em sementes recalcitrantes em condições de laboratório e os resultados podem ser assim avaliados por testes de germinação e vigor. A dinâmica da perda da viabilidade no estado seco e as bases das características biofísicas têm recebido muita atenção. A debilidade do estado vítreo do citoplasma, combinado com hidrólises de açúcares e o desencadeamento dos processos oxidativos, resultam em danos a lipídios, proteínas e DNA. Em particular os danos às macromoléculas são pontos fortes da ação ofensiva do estresse oxidativo (KRANNER *et al.*, 2006).

A fragmentação do DNA em fragmentos intranucleosomais é uma indicação da morte celular programada. Em sementes, essa fragmentação ocorre com o aumento intensivo da perda da viabilidade sugerindo que a morte durante o envelhecimento da semente no baixo estágio de hidratação (em sementes ortodoxas) ou durante a dessecação (em sementes recalcitrantes) leva a um controlado padrão de morte celular programada (KRANNER *et al.*, 2006).

A temperatura e a umidade do ar têm papéis fundamentais na determinação da longevidade das sementes durante o armazenamento. A umidade relativa alta combinada a uma temperatura elevada acelera o processo de deterioração de sementes (ABBA & LOVATO, 1999). A temperatura afeta a germinação total, a velocidade de germinação, a velocidade de absorção de água e as reações bioquímicas, que determinam todo o processo germinativo (BORGHETTI & FERREIRA, 2004).

O padrão de envelhecimento da semente é em geral descrito em termos de conteúdo de água durante o armazenamento (WALTERS, 1998). Quanto maior o número de ciclos de hidratação-secagem ao qual as sementes são submetidas, maior será a redução da germinação, sendo que estes efeitos deletérios aumentam com o período de hidratação

(WILLIANS, 1980). Diante disso, as condições ambientais para o armazenamento de sementes constituem um sério problema em regiões tropicais úmidas. Especialmente nessas condições, a viabilidade das sementes é perdida durante períodos prolongados de armazenamento, pois elas se deterioram e perdem sua habilidade de germinação.

A razão da deterioração de sementes varia entre as espécies (DHAKAL & PANDEY, 2001). Particularmente sementes de feijão são armazenadas na maioria das vezes sob condições ambientais não controladas e inadequadas (VIEIRA & YOKOYAMA, 2000). Embora a qualidade das sementes não possa ser melhorada durante o armazenamento, a preservação pode ocorrer quando as condições de conservação são favoráveis (COPELAND & McDONALD, 1995).

Muitas pesquisas têm sido conduzidas em prol do conhecimento da fisiologia do envelhecimento e deterioração das sementes, porém ainda não existem explicações definitivas (McDONALD, 1999). A partir da maturidade fisiológica das sementes diversos processos degenerativos, físicos, fisiológicos ou bioquímicos começam a ocorrer, caracterizando a deterioração (Figura 1). A constituição genética parece determinar a sensibilidade das sementes ao processo de deterioração em um determinado ambiente.

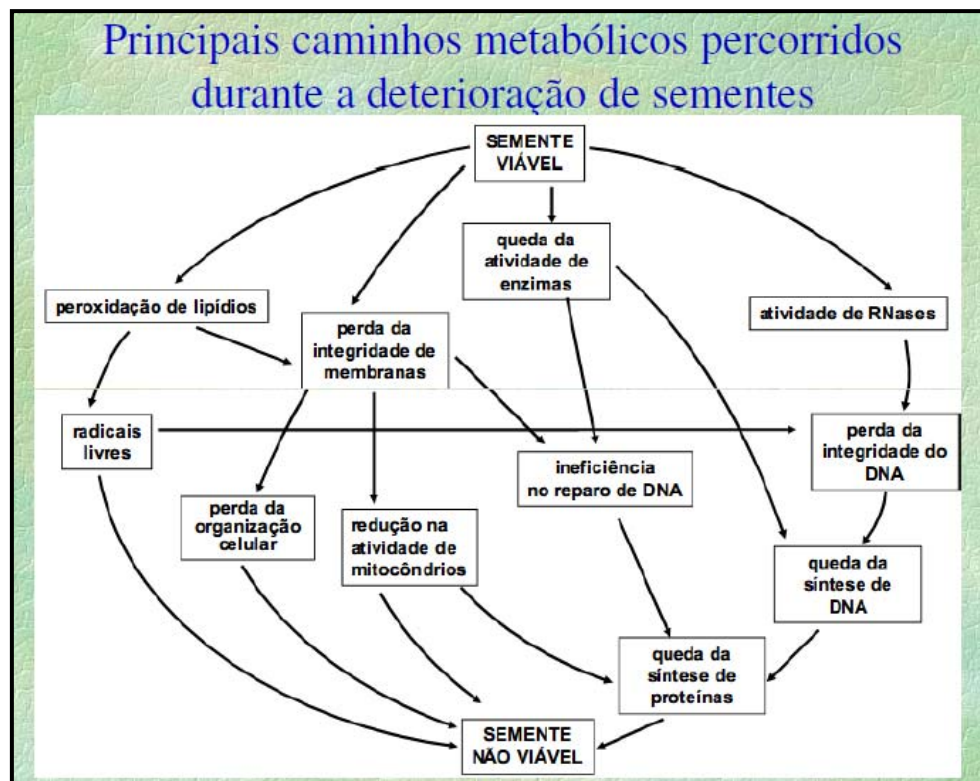


Figura 1 – Principais caminhos metabólicos que podem ocorrer percorridos durante a deterioração de sementes

(Fonte: Delouche, 2002).

Durante o processo de deterioração de sementes ocorrem: danos genéticos; perda da integridade das membranas celulares; peroxidação dos lipídios de membrana; lixiviação de solutos; mudanças na taxa de respiração; perda da compartimentalização celular; modificações na atividade enzimática e síntese protéica; atraso na germinação; redução do vigor das plântulas; aumento na susceptibilidade ao ataque de patógenos; redução no potencial de armazenamento; perda do potencial germinativo e morte da semente (BASAVARAJAPPA *et al.*, 1991; DELOUCHE, 2002) (Figura 2). Ou seja, não se podem avaliar todos os efeitos da deterioração das sementes somente pela diminuição da germinação, pois já ocorreu uma considerável deterioração, sem que haja necessariamente uma queda no poder germinativo da semente (Figura 3).



Figura 2 – Sequência proposta de modificações ocorridas no desempenho de sementes durante o processo de deterioração (Fonte: Delouche, 2002).

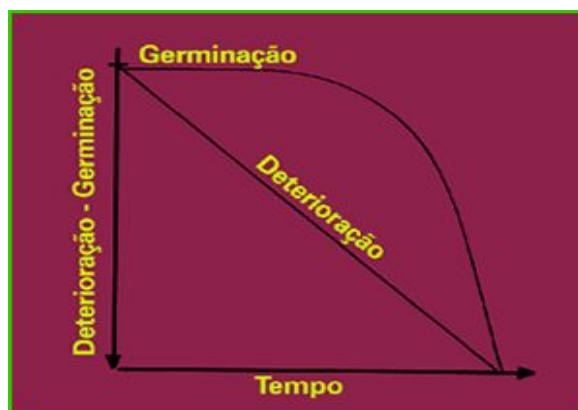


Figura 3 – Relação entre o processo de deterioração e o poder germinativo das sementes no decorrer do tempo (Fonte: Delouche, 2002).

A forma correta de estocar sementes de espécies economicamente importantes deve ser aquela na qual seja preservada a sua qualidade física, fisiológica e sanitária para posterior semeadura no campo (SILVEIRA, 1999). O armazenamento de sementes de feijão é feito, geralmente, em condições ambientais inadequadas, sendo a temperatura, a umidade relativa do ar, bem como fatores inerentes à própria semente, como o teor de água da semente, determinantes na longevidade das sementes (VIEIRA & YOKOYAMA, 2000).

O teor de água das sementes exerce influência acentuada e direta na longevidade destas, pois estimula a atividade metabólica do embrião (MACEDO *et al.*, 1999). As sementes têm natureza higroscópica e, dependendo das condições ambientais, podem ganhar ou perder água facilmente. Nesse processo de hidratação-desidratação, geralmente, ocorrem danos ao tegumento que resultam na redução na qualidade fisiológica (COPELAND & McDONALD, 1995). O armazenamento de sementes de feijoeiro com teor de água superior a 13% resultará em danos provocados por mudanças no metabolismo celular, como o aumento da atividade enzimática e respiratória das sementes, propiciando o desenvolvimento de fungos, que serão favorecidos pela alta temperatura (VIEIRA & YOKOYAMA, 2000).

Condições ambientais adversas durante o armazenamento resultam no envelhecimento das sementes que podem apresentar desde a redução da viabilidade até a completa perda do poder germinativo e vigor (BEWLEY & BLACK, 1994). Em função da desorganização das membranas celulares, as sementes tendem a reduzir seu vigor, o que pode ser verificado pelo aumento do vazamento de solutos durante o processo de embebição das sementes (MARCOS FILHO *et al.*, 1990; SALINAS *et al.*, 1998).

Sementes de feijão-de-corda em pequenas propriedades são armazenadas em garrafas de vidro, em recipientes com camadas de areia fina, latas de flandres e tambores de zinco. Nas médias e grandes propriedades, as sementes são armazenadas em tambores de zinco e silos metálicos (SANTOS *et al.*, 2003). As alternativas tecnológicas hoje disponíveis para uma melhor preservação das sementes baseiam-se na manutenção constante de ambientes refrigerados e atmosferas modificadas com a presença de gases, que atuam na redução dos processos metabólicos e na respiração dos grãos. Entretanto, essas condições são, na prática, complexas e caras, podendo sofrer com fatores do imprevisto, como a falta de energia ou vazamentos, inviabilizando muitas vezes a manutenção desses procedimentos (BRASIL, 2009).

Como princípios gerais do armazenamento têm-se que: 1) o armazenamento não melhora a qualidade das sementes, apenas a mantém; 2) quanto maior a temperatura e a umidade do armazenamento, maior será a atividade metabólica da semente e com isso mais rápida sua deterioração; 3) a umidade é mais importante do que a temperatura, pois a umidade da semente é função da umidade relativa do ar e em menor escala, da temperatura; 4) o frio seco é a melhor condição para o armazenamento de sementes ortodoxas; 5) sementes imaturas e danificadas não resistem bem ao armazenamento, enquanto as maduras e intactas permanecem viáveis por mais tempo; 6) o potencial de armazenamento varia com a espécie vegetal (FLORIANO, 2004).

O armazenamento com umidade relativa alta e baixa temperatura é ideal para sementes recalcitrantes. Já as melhores condições para o armazenamento de sementes ortodoxas, como o feijão-de-corda são clima frio e seco. A longevidade das sementes armazenadas é influenciada principalmente pelos seguintes fatores: a) qualidade inicial da semente; b) teor de umidade da semente; c) tempo decorrido entre colheita e o armazenamento; d) tratamentos fitossanitários e térmicos aplicados; e) tipo de embalagem; f) temperatura do armazenamento; g) umidade relativa do armazenamento (FLORIANO, 2004).

Os primeiros efeitos deletérios do armazenamento na qualidade fisiológica das sementes de feijão são notados pela perda do vigor. Skowronski *et al.* (2004), medindo o vigor de sementes de feijão de diversas cultivares, identificaram perdas de vigor após seis meses de armazenamento e observaram que alguns genótipos armazenam melhor que outros. Por se tratar de um cultivo de pequenos agricultores, o armazenamento do feijão na propriedade rural tem sido frequentemente objeto de estudos.

Vieira *et al.* (2005) avaliaram a eficiência do armazenamento do feijão em tubos plásticos impermeáveis, construídos a partir do polietileno. Por possuírem a parede externa de cor branca, os fabricantes afirmam que parte dos raios solares é refletida, diminuindo assim seus efeitos deletérios ao produto. Os autores concluíram que o teor de umidade do feijão se mantém praticamente inalterado durante 90 dias de armazenamento nessas condições.

Várias são as razões para o produtor de feijão armazenar seu produto na fazenda. Um levantamento efetuado por Smith & Holman (2005) nos Estados Unidos identificou como principais razões para estocagem de sementes na fazenda o preço baixo de venda do produto no momento da colheita, a necessidade de guardar aquilo que não foi possível comercializar no momento da colheita e os custos do armazenamento em outro local. Todos os produtores entrevistados foram unânimes em afirmar que o armazenamento na fazenda é necessário para

garantir a rentabilidade do cultivo do feijoeiro. No mesmo levantamento, compradores intermediários e beneficiadores de feijão expressaram a preocupação com a qualidade do feijão armazenado na fazenda. Existem muitas evidências de que as condições ideais de armazenamento do feijão para ser utilizado como semente são similares às aquelas que proporcionam a melhor manutenção das qualidades tecnológicas do feijão para consumo.

1.2 Testes para avaliação do vigor e da viabilidade de sementes

Com o advento da agricultura moderna nas últimas décadas, o uso de sementes de alta qualidade fisiológica se tornou extremamente necessário. Sabe-se que o uso de sementes de alta qualidade fisiológica e sanitária é fundamental para a instalação e produção de uma cultura. A qualidade de um lote de sementes encerra atributos que determinam seu valor para a semeadura, sendo esses de natureza genética, física, fisiológica e sanitária (POPINIGIS, 1985). Destaca-se, entre estes, o potencial fisiológico, que pode ser diretamente responsável pelo desempenho das sementes no armazenamento e no campo.

Elegem-se como objetivos básicos da pesquisa sobre a vigor de sementes, tentativas para solucionar problemas como a resistência de sementes de alta qualidade às condições adversas de campo e, conseqüente, emergência de plantas e a produção. Essas pesquisas vêm procurando obter informações sobre o manejo dos lotes durante o beneficiamento e armazenamento das sementes, de modo a possibilitar a manutenção do alto vigor das sementes pelo maior período possível.

Com o intuito de melhor compreender o processo de deterioração e também prever o comportamento do produto no armazém, investigadores das áreas de sementes e tecnologia de alimentos vêm desenvolvendo testes para essa finalidade. Santos *et al.* (2003) identificaram uma alta correlação entre o teste de deterioração controlada e o teste de envelhecimento acelerado para sementes de feijão. Uma nova linha de pesquisa deveria correlacionar testes desenvolvidos para avaliar a qualidade da semente e verificar a possibilidade de utilizá-los para avaliar a deterioração do grão para consumo. Testes como o de envelhecimento acelerado e o de condutividade elétrica poderão prever também o tempo de cocção do feijão armazenado e sua tendência ao escurecimento (SANTOS *et al.*, 2003).

A indústria de sementes frequentemente exige decisões rápidas, referentes ao manejo durante a colheita, recepção, processamento, armazenamento e comercialização, de modo que a necessidade da redução no período destinado à avaliação da qualidade fisiológica das sementes é considerada uma prioridade para a pesquisa. Para avaliar a qualidade

fisiológica das sementes, diversos testes de vigor têm sido utilizados por empresas produtoras de sementes, visando garantir a comercialização de sementes com um excelente padrão de qualidade. Esses testes de vigor servem para discriminar características relacionadas à deterioração e a perda da viabilidade de lotes comerciais de sementes (ARAGÃO, 2007). Os testes de vigor são capazes de avaliar o grau de deterioração das sementes, constituindo uma ferramenta importante na avaliação da qualidade fisiológica de diferentes lotes de sementes comerciais (DUTRA *et al.*, 2006).

O teste padrão de germinação (TPG) é utilizado em laboratórios para avaliar o potencial fisiológico das sementes. Ele deve ser conduzido em condições favoráveis de temperatura, umidade e luminosidade para permitir ao lote expressar seu potencial máximo de produzir plântulas normais. No entanto, esse teste pode ser pouco eficiente para indicar o desempenho no campo, onde as condições ambientais nem sempre são ideais (MARCOS FILHO, 1999). A maior limitação do teste de germinação segundo Hamton & Tekrony (1995), é sua inabilidade para detectar diferenças de qualidade entre lotes com alta germinação. Por este motivo, tem sido desenvolvidos testes de vigor com o objetivo de identificar possíveis diferenças no potencial fisiológico de lotes que apresentam porcentagem de germinação semelhante, fornecendo informações complementares às obtidas no teste padrão de germinação.

Os testes de vigor são importantes para as tomadas de decisão no controle de qualidade de empresas produtoras de sementes, tendo em vista evitar o manuseio e a comercialização de sementes de baixa qualidade, ou fora dos padrões de qualidade (MARCOS FILHO, 1994). Eles têm sido bastante utilizados pelas empresas produtoras de sementes porque podem revelar pequenas diferenças na deterioração de sementes de lotes comerciais, fornecendo informações mais confiáveis.

O teste de envelhecimento acelerado (artificial), desenvolvido e aprofundado por Delouche & Baskin (1973), é um desses testes de vigor, sendo indicado e bastante utilizado para diferentes espécies vegetais em programas de controle de qualidade de muitas empresas produtoras de sementes. O princípio do teste é que, lotes de sementes com alto vigor manterão a sua viabilidade mesmo quando submetidas, durante curto período de tempo, a condições adversas de temperatura e umidade relativa do ar (Figura 4). Enquanto que os lotes de sementes com baixo vigor, terão a sua viabilidade reduzida, possibilitando assim essa separação de lotes de sementes que apresentam diferentes níveis de vigor (RODO *et al.*, 2000).

O envelhecimento acelerado é eficiente para avaliar o vigor de lotes de sementes de feijoeiro e acompanhar a sua variação durante o período de armazenamento (KRZYZANOWSKI *et al.*, 1982). Os testes de envelhecimento acelerado e de deterioração controlada têm como princípio a aceleração do processo de deterioração (ROSSETO & MARCOS FILHO, 1995). Lotes de sementes com percentuais de germinação semelhantes poderão apresentar diferentes níveis de deterioração (KRZYZANOWSKI & VIEIRA, 1999).

O envelhecimento acelerado reduz a viabilidade e o vigor das sementes em muitas espécies de importância econômica. O fenômeno é em parte devido a peroxidação de lipídios induzida pelo envelhecimento que potencialmente danifica membranas de células de sementes (SUNG & JENG, 1994). O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) também é frequentemente indicado como uma das causas da deterioração de sementes, gerando reações com ácidos graxos poliinsaturados, levando a peroxidação de lipídios e a destruição das membranas celulares (McDONALD, 1999). Além disso, o teste de envelhecimento acelerado as sementes mais úmidas mostram maior sensibilidade às condições de temperatura e de umidade relativa do ar, por apresentarem atividade metabólica intensificada sob estas condições de ambiente. Portanto, os efeitos do envelhecimento acelerado são mais acentuados em sementes com graus de umidade mais elevados (ROSSETO & MARCOS FILHO, 1995).

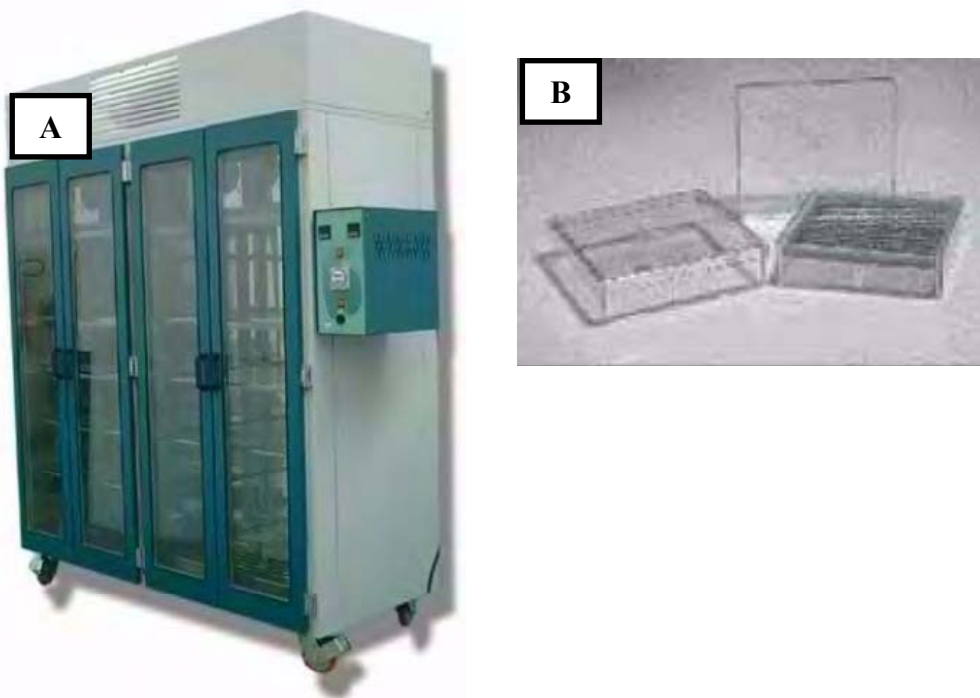


Figura 4 – (A) Câmara de envelhecimento acelerado (BOD) e (B) caixas gerbox para envelhecimento de sementes.

O teste de condutividade elétrica é também bastante utilizado como teste de vigor. Ele mede o vazamento de eletrólitos dos tecidos vegetais, dando uma idéia dos danos provocados pelo envelhecimento nas sementes (SALINAS *et al.*, 2001). Danos letais induzidos artificialmente pelo teste de envelhecimento acelerado nas biomoléculas e estruturas celulares podem ser avaliados também pelo teste de germinação, a partir da porcentagem de plantas anormais. O teste padrão de germinação é o procedimento oficial para avaliar a capacidade das sementes em produzir plântulas normais em condições favoráveis de campo, mas nem sempre revela diferenças de qualidade e de desempenho entre lotes de sementes, que podem se manifestar no armazenamento ou mesmo no campo (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). Daí a importância de se avaliar o vigor das sementes como complemento ao teste de germinação. Para isso, vários procedimentos têm sido usados; dentre eles o teste de condutividade elétrica, usando-se a solução de embebição das sementes.

O teste de condutividade elétrica (C.E) baseia-se no princípio de que com o processo de deterioração ocorre a lixiviação dos constituintes celulares das sementes embebidas em água devido à perda da integridade dos sistemas celulares. Assim, baixa condutividade significa alta qualidade da semente e alta condutividade, ou seja, maior saída de lixiviados da semente sugere o menor vigor desta (VIEIRA & KRZYZANOWSKI, 1999). A condutividade elétrica como teste de vigor é recomendado para sementes de ervilha e sugerido para soja (AOSA - Association of Official Seed Analysts, 2002). Marcos Filho *et al.* (1990) e Dias & Marcos Filho (1995) obtiveram distinção entre lotes de sementes de soja, usando-se o teste de condutividade elétrica. O teste da C.E mostrou-se eficiente também na distinção entre lotes de sementes de feijão-de-corda cv. Setentão e EPACE 10 (DUTRA *et al.*, 2006; DUTRA & TEÓFILO, 2007).

1.3 O Problema da salinidade no desempenho das sementes no campo

Sabe-se que no campo diversos fatores bióticos e abióticos podem afetar o desempenho das sementes, revertendo-se em possíveis perdas agrícolas, principalmente se essas sementes já tiverem a sua viabilidade afetada pelo armazenamento. Um desses fatores estressantes ocorridos em condições de campo é a salinidade do solo. Nesse contexto, as sementes oriundas de períodos prolongados de armazenamento em condições adversas perdem a sua viabilidade e quando chegam ao campo e se deparam com outros fatores de estresse, contribuem enormemente para o fracasso da produção agrícola mundial (VIEIRA & YOKOYAMA, 2000).

Atualmente, verifica-se um aumento no interesse da comunidade científica pelas respostas fisiológicas das plantas a condições de estresses ambientais, devido ao fato de muitos dos mecanismos utilizados ainda não serem completamente compreendidos. Uma vez entendidos as estratégias fisiológicas de reações aos estresses ambientais, estas poderão ser utilizadas como ferramentas nos programas de melhoramento vegetal, para a produção de plantas economicamente viáveis, que sejam tolerantes a esses estresses ambientais (BOR *et al.*, 2003).

A salinidade é um estresse abiótico que afeta a produtividade de uma grande variedade de culturas em todo o mundo (ASHRAF & FOOLAND, 2007; MUNNS & TESTER, 2008). Esse prejuízo ainda é mais expressivo nas regiões áridas e semiáridas do mundo, que apresenta inúmeros contrastes ambientais (PARIDA & DAS, 2004), incluindo o caso do Nordeste brasileiro que possui essas condições ambientais.

A tolerância à salinidade é um caráter poligênico com uma rede complexa de fatores bioquímicos, moleculares e processos fisiológicos que interagem fortemente com os fatores ambientais (FLOWERS, 2004; MUNNS *et al.*, 2006). Assim, a identificação e caracterização das variáveis fisiológicas que servirão de marcadores eficientes para avaliar a tolerância à salinidade em culturas de diferentes espécies estão ainda longe de serem alcançados (ASHRAF & HARRIS, 2004).

Uma das estratégias encontradas para o problema da salinidade é o aumento da tolerância ao sal das espécies agrícolas convencionais, apesar do baixo rendimento anual, ou o desenvolvimento de culturas tolerantes, através do melhoramento convencional e da engenharia genética (TESTER & DAVENPORT, 2003). No nordeste brasileiro, dos 1.600.000 km² de terra, cerca de 1.500.000 km² são caracterizados como insuficientes em água, constituindo o chamado “polígono das secas” (DANTAS *et al.*, 2002). Nessa região, a irrigação assume papel fundamental no progresso da agricultura. No entanto, a prática da irrigação aumenta as concentrações de sais na superfície do solo (DANTAS *et al.*, 2002). Como prova, estima-se atualmente que no mundo, 25% dos solos irrigados estão afetados por diferentes níveis de salinidade (RHOADES *et al.*, 2003). A incorporação de novas áreas irrigadas tende a aumentar o problema da salinização dos solos (PEREIRA *et al.*, 1985).

O nordeste brasileiro, além de possuir 20 a 25% da área irrigada com solos afetados por sais, principalmente os sódicos, a água armazenada nos lençóis freáticos, é predominantemente salina (HOLANDA & AMORIM, 1997). Um levantamento em 129 açudes desta região mostrou que o NaCl era o sal mais encontrado, com a concentração de Cl⁻ variando de 0 a 4.000 ppm ou 0 a 113 mM (WRIGHT, 1981). As plantas cultivadas nas

regiões tropicais e semiáridas estão sujeitas a condições ambientais adversas, dentre elas a deficiência hídrica, salinização dos solos e temperaturas extremas (PARIDA & DAS, 2004). O crescimento e a sobrevivência das plantas a condições de alta salinidade dependem da adaptação a baixos potenciais hídricos e altas concentrações de sódio. Três aspectos são relevantes na tolerância das plantas ao sal: (1) homeostase iônica, (2) desintoxicação e (3) controle do crescimento (ZHU, 2001).

O estresse salino pode inibir o crescimento das plantas e reduzir a produtividade das plantas pelo déficit hídrico, a toxicidade iônica e desequilíbrio nutricional provocado pelo mesmo (MUNNS, 2002). Altas concentrações de Na^+ perturbam a homeostase iônica intracelular levando à desorganização da membrana, a atenuação da atividade metabólica, e efeitos secundários que causam a inibição do crescimento levando à morte celular (ASHRAF, 2004; MANSOUR & SALAMA, 2004).

O déficit hídrico é o principal efeito do estresse salino, devido a redução do potencial hídrico da solução do solo, restringindo a absorção de água pelas raízes (MUNNS *et al.*, 2006). As plantas precisam manter o potencial hídrico da planta abaixo daquele do solo para continuar absorvendo água suficiente para a manutenção da turgescência e crescimento celular. Isso requer uma diminuição no potencial de solutos, quer pela absorção de solutos do solo ou pela síntese de solutos compatíveis metabolicamente (TESTER & DAVENPORT, 2003).

A salinidade afeta muitos aspectos do metabolismo, da anatomia e da estrutura das células vegetais (RAHMAN *et al.*, 2000). Essas reações são consideradas como estratégias adaptativas das plantas para a sobrevivência em ambientes salinos. O estresse salino causa atraso na germinação das sementes, bem como na porcentagem final de germinação (ZEINALI *et al.*, 2002). O estresse salino pode causar inúmeras mudanças no metabolismo das plantas. Dentre elas, a toxicidade iônica, o estresse osmótico e a produção de ERO, tais como o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radicais hidróxidos (HO^{\cdot}) que são os mais proeminentes (MITTLER, 2002). A produção de ERO é uma das mudanças bioquímicas característica durante o estresse salino. Quando as plantas são submetidas à salinidade, o balanço entre a produção de ERO e a atividade de oxidantes é perturbado, resultando muitas vezes em um estresse oxidativo (JUNGKLAND, 2005).

As ERO são altamente reativas e na ausência de alguns mecanismos de proteção podem modificar o metabolismo normal, ocasionando danos oxidativos nos lipídios, proteínas

e ácidos nucleicos (ASADA, 1999). As ERO causam também danos nas membranas celulares, podendo provocar a apoptose (LORETO *et al.*, 2001). A salinidade afeta negativamente o crescimento das plantas e a produtividade (REDDY *et al.*, 2004;. BAEK *et al.*, 2005;. AMOR *et al.*, 2005), principalmente devido o aumento de ERO causado pela salinidade, pode assim causar um estresse oxidativo resultando em danos celulares por oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (McKERSIE & LESHEM, 1994; PASTORI & FOYER, 2002; APEL & HIRT, 2004).

Quanto ao estresse hídrico nas plantas induzido pela salinização, provoca distúrbios no metabolismo do nitrogênio, como foi evidenciado no trabalho de Younis *et al.* (2009), que indicaram que o tratamento de germinação de favas com NaCl provocou uma diminuição na proteína total e aumento de N-amino solúveis totais quando comparado com plantas não tratadas. Isto pode ser atribuído a um aumento na proteólise, interrupção da síntese de proteínas, ou bem como o retardo nos processos de transaminação, que poderiam assim, resultar em um acúmulo de amônia (YOUNIS *et al.*, 1993).

Os estresses hídrico e salino são responsáveis tanto pela inibição quanto pelo atraso na germinação e no estabelecimento de plântulas (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1975; BEWLEY & BLACK, 1994). O efeito da salinidade sobre o estabelecimento de plântulas é mais visível do que sobre a germinação das sementes (HASSON & POLJAKOFF-MAYBER, 1980; PRISCO, 1987). Essa inibição do crescimento do eixo embrionário durante o estabelecimento da plântula pela salinidade é resultado tanto do atraso na mobilização de reservas (PRISCO & VIEIRA, 1976; GOMES FILHO & PRISCO, 1978; PRISCO *et al.*, 1981; GOMES FILHO *et al.*, 1983; PRISCO, 1987) como na desorganização da membrana, comprovado pelo aumento do vazamento de eletrólitos do eixo embrionário (PRISCO, 1987).

O decréscimo na germinação e da emergência das plântulas, como resultado do aumento da concentração de NaCl no ambiente da semente, tem sido mostrado por vários autores (VILLAGRA, 1997; CONY & TRIONE, 1998; CHARTZOULAKIS & KLAPAKI, 2000; MURILLO-AMADOR & TROYO-DIEGUEZ, 2000; MURILLO-AMADOR *et al.*, 2001). Também foi mostrado que a inibição da emergência da radícula é principalmente devido a uma diminuição no gradiente de potencial hídrico entre o ambiente externo e as sementes (ENÉAS FILHO *et al.* 1995).

1.4 A produção de espécies reativas de oxigênio, a viabilidade e o envelhecimento de sementes

As espécies reativas de oxigênio (ERO), contrastando com o oxigênio atmosférico, são altamente tóxicas, podendo levar à destruição de biomoléculas e estruturas celulares (MITTLER, 2002; ARAGÃO, 2007; CAVALCANTI et al., 2007). As ERO são encontradas em todos os sistemas biológicos, como produtos parciais do metabolismo aeróbico, sendo produzidas nas células vegetais tanto em condições metabólicas normais, como sob situações de estresse (BUCHANAM & BALMER, 2005).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o O_2 sofre redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O_2 . Normalmente a redução completa do O_2 ocorre nas mitocôndrias, e a reatividade das ERO é neutralizada com a entrada de quatro elétrons. Durante esse processo se formam intermediários reativos, tais como o $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} e H_2O_2 (FERREIRA & MATSUBARA, 2003). Em plantas as reações que envolvem o metabolismo normal como fotossíntese e respiração são fontes potenciais de ERO. Também nos peroxissomos, durante o aumento de estresse abiótico há um aumento de ERO durante a fotorespiração (FOYER & NOCTOR, 2005). Além disso, ocorre a produção durante a morte celular programada e a defesa contra patógenos. Outros estresses também ocasionam o aumento de ERO, tais como o estresse por seca e dessecação, estresse salino, choque térmico, metais pesados, radiações UV, poluentes atmosféricos, estresse mecânico e excesso de luz (MITTLER, 2002).

As ERO têm sido estudadas largamente no campo da fisiologia de sementes, sendo particularmente ressaltado o estudo da sua relação com a perda do vigor e da viabilidade de sementes durante prolongado armazenamento. O acúmulo de ERO é frequentemente indicado como a primeira causa da deterioração de sementes, gerando reações com ácidos poliinsaturados, levando a peroxidação de lipídios e a destruição das membranas celulares (McDONALD, 1999; APEL & HIRT, 2004; FOYER & NOCTOR, 2005).

A peroxidação de lipídios, uma consequência da reação dos lipídios que compõem a membrana celular, principalmente os poliinsaturados, com o $O_2^{\cdot-}$, resultando em radicais livres e peróxidos instáveis (VIEIRA & CARVALHO, 1994; ARAGÃO, 2007), tem sido citado como o maior responsável pelo envelhecimento de sementes (PRIESTLEY, 1986; McDONALD, 1999). O radical $O_2^{\cdot-}$ é uma das formas mais reativas, podendo agir como oxidante ou redutor, podendo oxidar enxofre, ácido ascórbico ou NADPH, além de ser capaz de reduzir o citocromo *c* e íons metálicos, afetando a atividade de metalo-proteínas. No

entanto, ele não consegue atravessar as membranas biológicas e é prontamente dismutado a H_2O_2 (FOYER & NOCTOR, 2005).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é moderadamente reativo e possui uma relativa longa vida celular que pode atravessar distâncias consideráveis de seu local de produção, pois pode difundir-se livremente através das membranas biológicas por alguns tipos de aquaporinas. Dessa forma a produção nos cloroplastos e mitocôndrias afeta outros compartimentos celulares, sendo assim, considerado também um importante sinalizador intracelular, tendo papel central em várias vias de sinalização, tais como a resposta hipersensitiva, que leva a tolerância cruzada (FOYER & NOCTOR, 2000; BIENERT *et al.*, 2006). Além disso, o H_2O_2 pode também inativar enzimas, como as do ciclo de Calvin (BUCHANAM & BALMER, 2005), provocar danos aos ácidos nucléicos e proteínas e iniciar a peroxidação de lipídios (NEILL *et al.*, 2002).

A deterioração das sementes durante o envelhecimento acelerado está intimamente relacionada com a atividade de várias enzimas removedoras de peróxidos e a peroxidação de lipídios. Em sementes de *Ginko biloba* L. houve um significável aumento da peroxidação de lipídios tanto no embrião quanto no endosperma durante o armazenamento (TOMMASI *et al.*, 2006). Em algodão, sementes envelhecidas artificialmente a 40°C e 100% de umidade relativa tiveram sua germinação decrescida, suas membranas deterioradas, sendo estes fatos correlacionados com a acumulação de peróxidos e a diminuição na atividade de enzimas antioxidantes (ANURADHA *et al.*, 2003).

As ERO podem provocar modificações em proteínas levando à perda da função e aumentando a taxa de degradação das proteínas oxidadas. Proteínas severamente oxidadas parecem ser substratos de difícil proteólise. A incapacidade de degradar proteínas extensivamente oxidadas pode contribuir para o acúmulo de agregados protéicos, que ocorre, sobretudo durante o processo de envelhecimento. Uma importante consequência biológica da oxidação das proteínas é a oxidação posterior do DNA pelos próprios peróxidos formados. Eles são capazes de clivar o DNA em experimentos realizados com plasmídeo. Desta forma, a geração inicial de peróxidos nas proteínas nucleares, tais como as histonas, pode promover um dano subsequente ao DNA, incluindo ligações cruzadas DNA - proteína e mutações (RONSEIN *et al.*, 2006).

1.5 O mecanismo de resposta antioxidativa das sementes ao envelhecimento e a salinidade

As plantas, como organismos sésseis, desenvolveram ao longo do curso evolutivo mecanismos intrínsecos de percepção de sinais externos que permitem suas respostas e sobrevivência às mais variadas condições ambientais (FUJITA *et al.*, 2006). O entendimento destes mecanismos, pelos quais as plantas ativam suas respostas de aclimação às novas condições que estão se impondo, é de fundamental importância biológica e é vital para um desenvolvimento contínuo de um melhoramento racional para aprimorar a resistência das culturas aos estresses abióticos (XIONG *et al.*, 2002).

Em plantas a salinidade causa tanto estresse iônico como osmótico. O estresse iônico é devido ao aumento da concentração de íons tóxicos, tais como o Na^+ e o Cl^- , no meio intracelular. Em adição a este estresse iônico, o estresse osmótico é provocado pela diminuição da disponibilidade de água para a planta, devido à diminuição do potencial hídrico do solo. Adicionalmente, tanto o estresse iônico como o osmótico provocados pela salinidade, podem causar estresse oxidativo (ZHU, 2001; FLOWERS, 2004; MUNNS *et al.*, 2006).

Os mecanismos para a resistência da planta aos efeitos específicos da salinidade são basicamente de dois tipos: os que minimizam a entrada de sal para a planta; e os que diminuem a concentração de sal no citoplasma (ZHU, 2001; MUNNS, 2005). As espécies vegetais diferem extensamente na resposta ao crescimento em condições de altas concentrações de sais, sendo extremamente importante a caracterização de mecanismos fisiológicos de tolerância ao sal. Esses mecanismos servem de base na seleção e melhoramento de plantas à salinidade (KORYO, 2003).

As plantas têm que reagir fisiologicamente pelo menos a quatro principais fatores que impedem o crescimento em ambientes salinos: (a) controle da taxa de crescimento e morfologia; (2) resistência ao déficit hídrico (redução do potencial hídrico); (3) regulação da entrada de CO_2 e H_2O pelos estômatos e (4) evitar a toxicidade iônica e o desequilíbrio nutricional (MUNNS, 1993; VOLKMAR *et al.*, 1998; MUNNS, 2002; KORYO, 2003; RENGASAMY *et al.*, 2003).

Para sobreviver, as plantas utilizam vias e componentes comuns durante a resposta a vários tipos de estresses diferentes (PASTORI & FOYER, 2002). Este fenômeno, conhecido por “tolerância cruzada”, permite à planta se adaptar/aclimatar a uma gama de estresses, após a exposição a um único estresse específico (PASTORI & FOYER, 2002). Vale ressaltar que, aos mecanismos utilizados para responder aos estresses ambientais, sob estas

circunstâncias, é dado o nome de “resposta cruzada” (KNIGHT & KNIGHT, 2001). As respostas cruzadas ocorrem quando duas ou mais vias de sinalização, de estressores diferentes, convergem para um mesmo ponto, ou em vias de sinalização que interagem, interferindo nas respostas, uma das outras, para atingir objetivos diferentes (SINGH *et al.*, 2002). O pré-condicionamento de plantas a determinados fatores de estresses constitui assim uma excelente ferramenta para a obtenção da tolerância a outros estresses abióticos como a seca e a salinidade em plantas (MAIA, 2004).

A resposta ao estresse oxidativo, decorrente de estresses abióticos, ocorre de maneira bifásica (ZHAO *et al.*, 2005). A ocorrência de dois momentos distintos de explosão oxidativa de plantas é bem documentada para estresses abióticos (SGHERRI *et al.*, 2007). O primeiro ocorre dentro de poucos minutos e é causado por mudanças no potencial redox do apoplasto, seguido do aumento da produção de ERO (FOYER & NOCTOR, 2005). A aclimatação das plantas aos estresses abióticos é frequentemente associada ao aumento dos níveis de ERO, tais como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e radicais hidroxilas (HO^{\cdot}) (MOLLER *et al.*, 2007) (Figura 5). Contudo, os mecanismos de explosão oxidativa causada por estresses abióticos, no tocante aos processos bioquímicos de respostas ainda não estão completamente esclarecidos (APEL & HIRT, 2004).

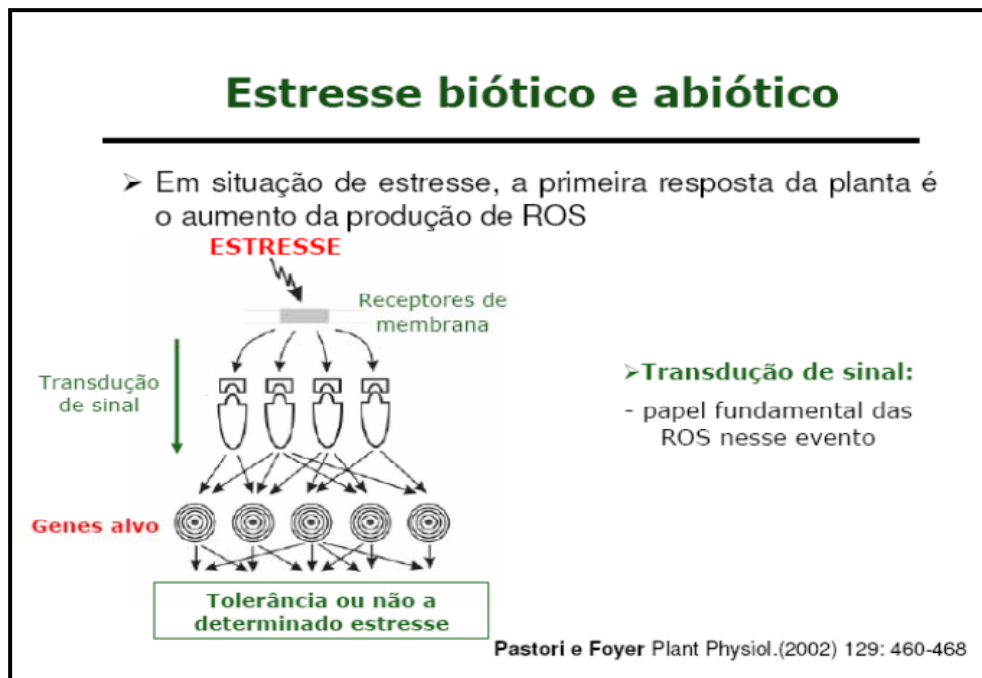


Figura 5 – A produção de ERO na resposta a fatores bióticos e abióticos de estresses nas plantas (Fonte: adaptado de Pastori & Foyer, 2002).

A célula vegetal e suas organelas – peroxissomos (DEL RIO *et al.*, 2006), cloroplastos (ASADA, 1999), e mitocôndrias (MOLLER *et al.*, 2007), contém diversos

sistemas enzimáticos e não enzimáticos para a remoção de ERO (APEL & HIRT, 2004; MOLLER *et al.*, 2007) (Figura 6 e 7, Tabela 1). O sistema de defesa oxidativa enzimática das plantas inclui diversas enzimas antioxidantes nos diferentes compartimentos celulares. Dentre as principais enzimas estão a dismutase do superóxido (SOD; EC 1.15.1.1), as peroxidases do ascorbato (APX; EC 1.11.1.1) e de fenóis (POX; EC 1.11.1.7) e as catalases (CAT; EC 1.11.1.6) que juntamente com outras enzimas do ciclo ascorbato-glutationa promovem a eliminação de ERO (CAVALCANTI *et al.*, 2007).

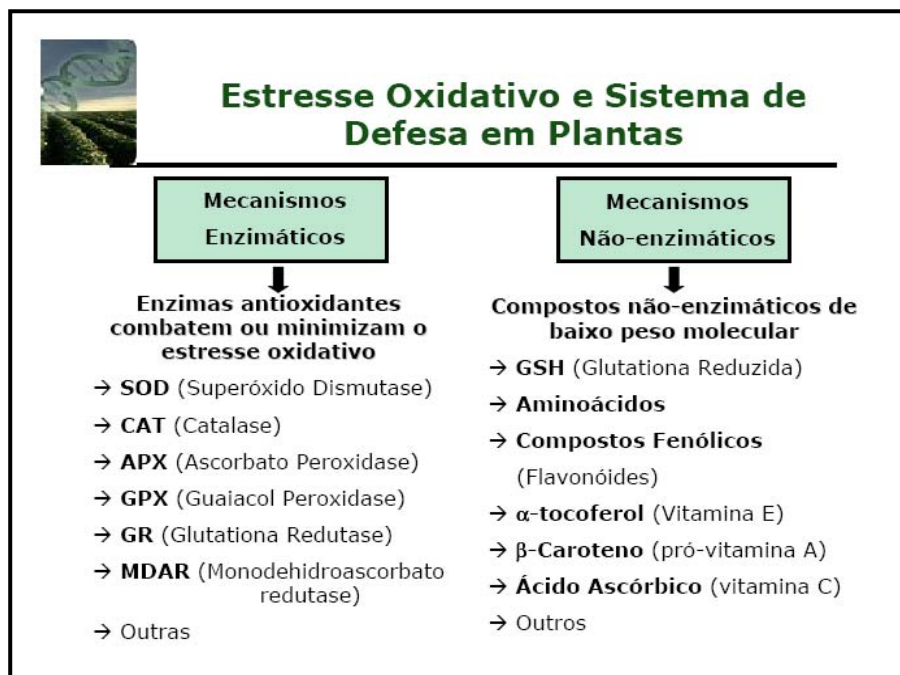


Figura 6 – Mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de defesa das plantas ao estresse oxidativo.

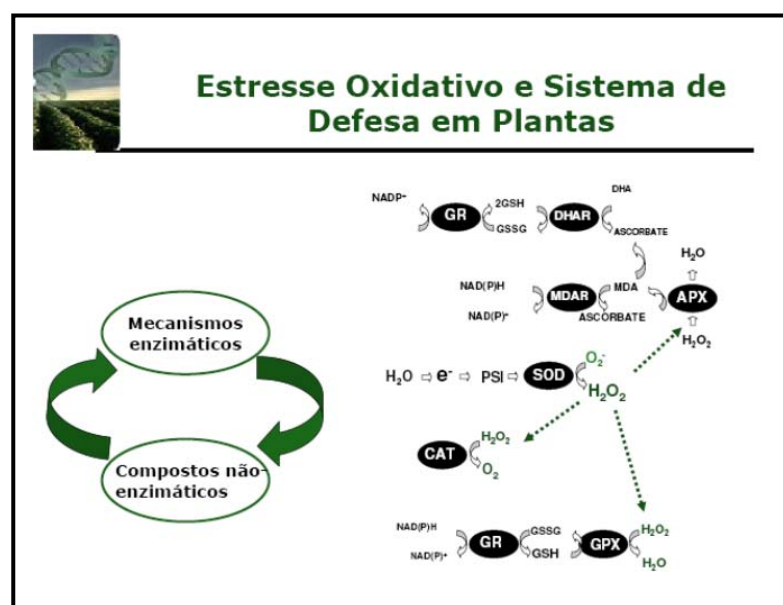


Figura 7 – Mecanismo de defesa antioxidativa das plantas

As APXs são consideradas as enzimas mais importantes na eliminação de H₂O₂ no citosol e cloroplastos (ASAI *et al.*, 2004). Elas utilizam o ascorbato como doador de elétrons específico para reduzir H₂O₂ à água. As izoenzimas de APX são distribuídas em pelo menos quatro compartimentos celulares distintos, no estroma e tilacóides dos cloroplastos; ligada a membrana; nos microcorpos, incluindo glioxissomos e peroxissomos; e no citosol (SHIGEOKA *et al.*, 2002; D'ARCY-LAMETA *et al.*, 2006). Há ainda isoformas de APX e outras enzimas do ciclo ascorbato-glutationa na mitocôndria (CHEW *et al.*, 2003).

Tabela 1 – Tipos, natureza e locais de atuação de antioxidantes dentro da célula (Adaptado de Mittler, 2002)

Mecanismo antioxidante	Enzima ou Composto orgânico	Local na célula	ERO
ENZIMÁTICO	Dismutase do Superóxido (SOD – EC 1.15.1.1)	Cloroplasto, citosol, mitocôndria, peroxissomos e apoplasto	•O ₂ ⁻
	Peroxidase do Ascorbato (APX – EC 1.11.1.11)	Cloroplasto, citosol, mitocôndria, peroxissomos e apoplasto	H ₂ O ₂
	Catalase (CAT – EC 1.11.1.6)	Peroxissomos	H ₂ O ₂
	Peroxidase da Glutationa (GPX – EC 1.11.1.9)	Citosol	H ₂ O ₂ e ROOH
	Peroxidases (POD – EC 1.11.1.7)	Parede, citosol e vacúolo	H ₂ O ₂
	Peroxidase da Tiorredoxina (TPX – EC 1.11.1.1)	Parede, citosol e mitocôndria	H ₂ O ₂ e ROOH
NÃO ENZIMÁTICO	Ácido ascórbico (AsA) Glutationa α-Tocoferol Carotenóides	Cloroplasto, citosol, mitocôndria, peroxissomos e apoplasto Peroxissomos e apoplasto Membranas Cloroplasto	•O ₂ ⁻ e H ₂ O ₂ H ₂ O ₂ •O ₂ ⁻ e H ₂ O ₂ •O ₂ ⁻

Danos oxidativos aos lipídios, proteínas e outros componentes celulares são considerados as maiores causas da deterioração de sementes armazenadas (MURTHY *et al.*, 2002). As sementes utilizam diversas estratégias para reverter os possíveis danos provocados pela deterioração em condições adversas de armazenamento, dentre elas destacam-se os mecanismos enzimáticos antioxidativos, como a síntese *de novo* ou o aumento da atividade das enzimas: catalase, peroxidase do ascorbato e dismutase do superóxido (MURTHY *et al.*, 2002).

Entretanto, em sementes de algodão envelhecidas artificialmente, a atividade da APX decresceu progressivamente durante o curso do envelhecimento (GOEL *et al.*, 2003). Também em amendoim, o estudo do efeito do envelhecimento acelerado na germinação de sementes de dois cultivares mostrou que houve inibição da germinação, do estabelecimento de plântulas, ocorrendo um aumento na peroxidação de lipídios e decréscimo na atividade da APX (SUNG & JENG, 1994).

Existem também os protetores antioxidativos não enzimáticos como o ácido ascórbico (AsA), glutathiona (GSH), tocoferóis, flavonóides, alcalóides, carotenóides, hormônios e vitaminas, que participam ativamente do controle de ERO nas células (APEL & HIRT, 2004). A GSH é oxidada pelas ERO formando glutathiona oxidada (GSSG), enquanto o AsA é oxidado para monodesidroascorbato (MDA) e desidroascorbato (DHA). No ciclo glutathiona-ascorbato mostrado na figura 8 abaixo, o GSSG, MDA e DHA podem ser novamente convertidos em GSH e AsA para manter as ERO em concentrações suportáveis pela célula (APEL & HIRT, 2004).

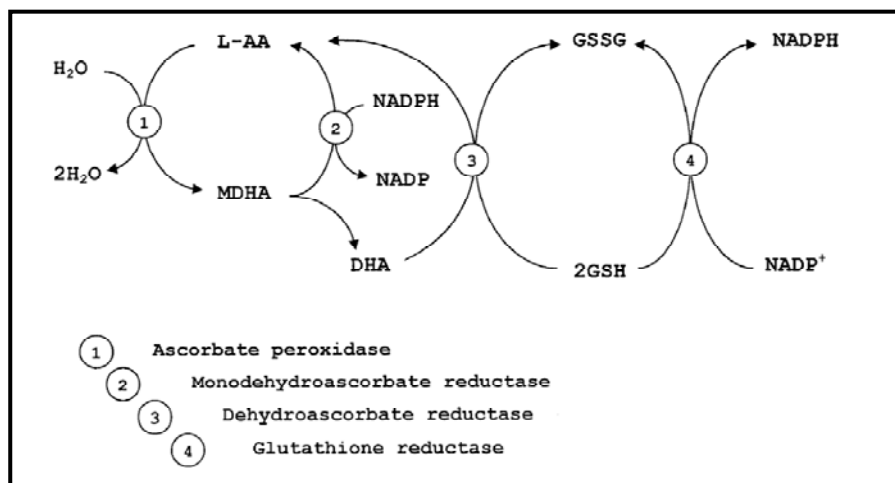


Figura 8 – Ciclo do ascorbato-glutationa (Fonte; Davey *et al.*, 2000)

Tanto o AsA como o GSH estão presentes em diversos compartimentos celulares, principalmente em cloroplastos, mitocôndrias e citosol (POTTERS *et al.*, 2002). O AsA participa de diversos processos celulares e, dentre esses, os mais importantes envolvem a proteção oxidativa (APEL & HIRT, 2004), a regulação da transição da fase G1 para S no ciclo celular (POTTERS *et al.*, 2002) e o controle do crescimento pelo alongamento das células (PASSARDI *et al.*, 2004). A GSH em células vegetais participa ativamente do metabolismo do enxofre, defesa antioxidante e remoção dos compostos xenobióticos (POTTERS *et al.*, 2002).

A síntese de AsA ocorre nas mitocôndrias, enquanto a da GSH pode ocorrer nos cloroplastos ou no citosol (NOCTOR & FOYER, 1998). Enzimas do sistema antioxidativo das plantas, ao interagirem com formas reduzidas destes dois compostos, proporcionam excelentes mecanismos de eliminação de ERO (CREISSEN *et al.*, 1999). Segundo Smirnoff *et al.* (2001) e Dipierro *et al.* (2005), o AsA tem sido classificado como componente chave do sistema antioxidativo em plantas, estando relacionado aos estresses bióticos e abióticos. A manutenção da concentração de AsA e GSH, em plantas submetidas a estresse, envolve a complexa interação entre síntese, degradação, transporte e armazenamento no interior das células (FOYER & NOCTOR, 2000).

Existe uma série de outros antioxidantes não enzimáticos que participam da defesa contra as ERO nos sistemas biológicos, como por exemplo: a vitamina E, a ubiquinona e outros compostos fenólicos de origem vegetal (APEL & HIRT, 2004). Além destes, há vários nutrientes essenciais de origem mineral, que participam do processo antioxidante em associação com as enzimas, dentre eles: zinco, cobre, manganês, selênio e ferro (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). As demais moléculas antioxidantes como flavonóides e carotenóides, ainda são poucos exploradas na literatura e os seus papéis efetivos na remoção de ERO em compartimentos subcelulares ainda merecem atenção (APEL & HIRT, 2004)

1.6 O papel do ácido ascórbico no envigorecimento de sementes

Os antioxidantes não enzimáticos, que ocorrem em altas concentrações em algumas plantas, tais como o ácido ascórbico (AsA), têm sido bastante utilizados em pré-tratamentos para a proteção e revigorecimento de sementes, aumentando assim o seu poder germinativo quando essas sementes são submetidas, tanto ao envelhecimento natural, como o artificial (CHHETRI *et al.*, 1993; POWELL *et al.*, 2000). Tem sido relatado na literatura, que o pré-tratamento com esses antioxidantes não enzimáticos, aumenta o vigor e com isso o potencial de armazenamento de sementes a condições adversas de temperatura e umidade (BASU, 1994; MAITY *et al.*, 2000).

O bioquímico húngaro Albert von Szent Györgyi tinha um grande senso de humor. Na primeira versão de seu trabalho, relatando a descoberta de um novo açúcar de seis carbonos de função desconhecida, nomeou esta molécula de ignose. Quando um revisor sugeriu mudar esse curioso nome, ele chamou de godnose (só Deus sabe). Só com o seu terceiro trabalho, ele mudou para um nome mais "científico", o ácido hexurônico (DE

TULLIO & ARRIGONI, 2003). Após a descoberta de que o ácido hexurônico tem propriedades antiescorbútica, ele foi então identificado, como vitamina C e, eventualmente após chamado de L-ácido ascórbico (AsA) (Figura 9) por Haworth e Szent Györgyi (SVIRBELY & SZENT- GYÖRGYI, 1932; DAVIES *et al*, 1991).

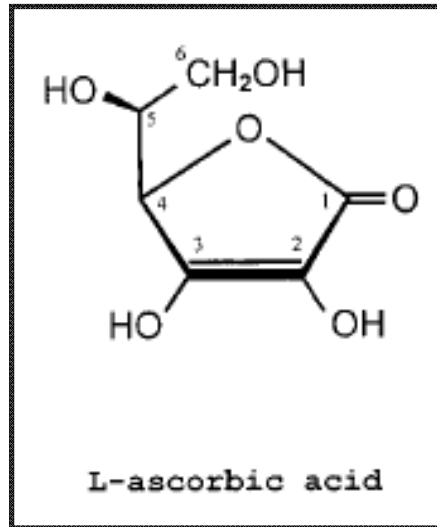


Figura 9 – Estrutura química do L-ácido ascórbico (Fonte: Davey *et al.*, 2000).

O L-ácido ascórbico pode ser oxidado ao radical monodesidroascorbato (MDHA), também conhecido por radical ascorbato livre, que *in vivo* pode ser reduzido pela enzima redutase do monodesidroascorbato (MDHAR, EC: 1.6.5.4) ou por reações de transferência de elétrons. Duas moléculas de MDHA podem espontaneamente produzir L-ácido ascórbico e desidroascorbato (DHA). O DHA é instável e pode sofrer uma hidrólise irreversível para ácido 2,3-dicetogulônico em solução aquosa (DAVEY *et al.*, 2000) (Figura 10).

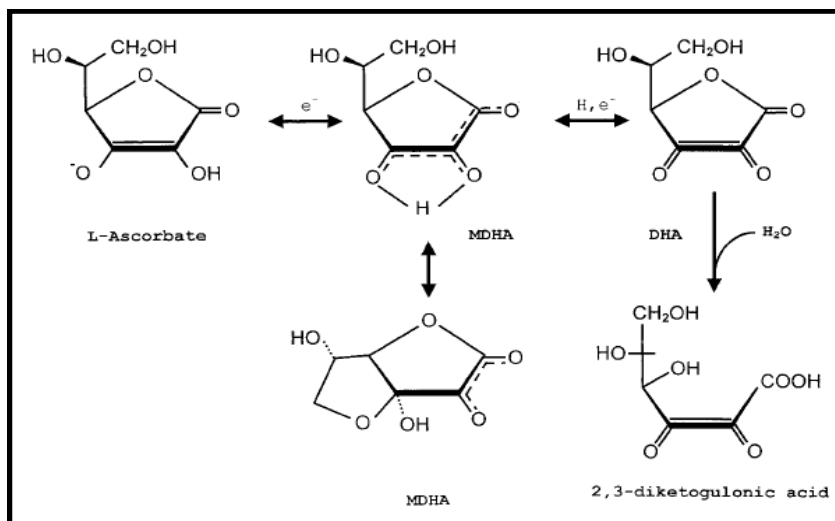


Figura 10 – Mecanismo de oxidação do L-ascorbato (MDHA = monodeidroascorbato, DHA = deidroascorbato) (Fonte: Davey *et al.*, 2000).

O AsA (vitamina C) é um dos mais importantes antioxidantes abundantemente encontrando em plantas. Geralmente, sua concentração é mais alta nas folhas do que em outras partes da planta, sendo de 5 a 10 vezes maior que a da glutathione (SMIRNOFF, 2000; SMIRNOFF, 2005). O AsA é hidrossolúvel e age contra os radicais livres como o oxigênio singlete, superóxido e peróxido de hidrogênio. O AsA é necessário *in vivo* também como cofator enzimático, sendo uma das mais impressionantes propriedades química do ascorbato, a sua habilidade para agir como agente redutor (doador de elétrons), participando ainda da regeneração da forma reduzida e antioxidante da vitamina E (DAVEY *et al.*, 2000; SMIRNOFF, 2000; GRIFFITHS & LUNEC, 2001; DE TULLIO & ARRIGONI, 2003).

O tratamento prévio das sementes com antioxidantes como o AsA tem aumentado o vigor e prolongado a armazenabilidade das sementes pela remoção dos “radicais livres”. Sementes pré-tratadas antes do envelhecimento com inibidores de caspases (proteínas relacionadas com a morte celular programada) têm sua viabilidade aumentada (KRANNER *et al.*, 2006). Estudos com sementes de algodão mostraram que a presença de antioxidantes como o ácido ascórbico protegeu a semente contra a peroxidação de lipídios e as ERO (McDONALD, 1999).

O papel do AsA como antioxidante tem sido mostrado por Müller-Moulé *et al.* (2003, 2004) que demonstrou que mutantes de *Arabidopsis* deficientes em AsA foram mais sensíveis ao ozônio, dióxido de enxofre ou a radiação UV-B. O estresse oxidativo induzido pela alta luminosidade em mutantes de *Arabidopsis* provocou o aumento da peroxidação de lipídios e da fotoinibição (MÜLLER-MOULÉ *et al.*, 2003, 2004). Com isso, altos níveis endógenos de AsA em plantas são necessários para conter o estresse oxidativo, bem como na regulação de outros processos do metabolismo da planta.

Já se tem evidências que o AsA endógeno pode ser aumentado pela aplicação exógena de ácido ascórbico no meio radicular bem como aplicação foliar ou pelo tratamento das sementes (CHEN & GALLIE, 2004). Apesar do papel de AsA de eliminar as ERO, ele está também envolvido na regulação da fotossíntese pela capacidade de controlar o movimento estomático (CHEN & GALLIE, 2004). O AsA é um importante co-fator de algumas enzimas ou complexos protéicos que estão envolvidas na regulação da fotossíntese (DAVEY *et al.*, 2000). Conforme esses autores o ácido ascórbico está envolvido também na floração e senescência vegetal e pode aliviar os efeitos adversos do estresse salino em tomate (SHALATA & NEUMANN, 2001) e trigo (AL-HAKIMI & HAMADA, 2001). A aplicação de ácido ascórbico nas raízes foi capaz de atenuar os efeitos adversos do estresse salino sobre o crescimento de trigo pelo aumento da capacidade fotossintética e na manutenção da

homeostase iônica, apesar desses efeitos ainda necessitarem de estudos futuros (ATHAR *et al.*, 2008).

Até recentemente, o AsA tem sido considerado quase que exclusivamente por suas propriedades antioxidantes (NOCTOR & FOYER, 1998), pois sabe-se que o AsA pode reagir com as ERO, em reações não-enzimáticas. É claro agora que o AsA também tem um papel fundamental em células animais e vegetais como cosubstrato necessário para a atividade de muitas desidrogenases dependentes de ácido-2-oxo (2-ODDs) (PASTORI *et al.*, 2003). Em plantas, existe uma grande lista de 2-ODDs que requerem AsA, incluindo as enzimas envolvidas com a biossíntese de flavonóides (BRITSCH *et al.*, 1993); as enzimas da síntese e degradação de giberelinas (HEDDEN & KAMIYA, 1997); a enzima chave na biossíntese de ácido abscísico (SEO & KOSHIBA, 2002) e a enzima do passo final para a síntese de etileno (KENDE, 1993). É conhecido que o sistema envolvido com o AsA passa por mudanças durante os diferentes estágios de desenvolvimento das sementes ortodoxas (ARRIGONI, 1994).

O AsA induz a progressão do ciclo celular nas células meristemáticas (LISO *et al.*, 1984; CITTERIO *et al.*, 1994). Um importante papel do AsA no controle da divisão celular, já foi proposto na literatura (ARRIGONI, 1994; POTTERS *et al.*, 2002.), embora o mecanismo molecular subjacente a este fenômeno, ainda não esteja tão claro. Noctor & Foyer (1998) sugere que o AsA controla o fase G1 do ciclo celular, provavelmente através da ativação de fatores de transcrição. Potters *et al.* (2000) mostraram que a relação AsA/DHA influencia na progressão do ciclo celular em cultura de células suspensas de tabaco, onde as células que se dividem ativamente, utilizam uma grande quantidade de AsA (LISO *et al.*, 1984).

A etapa de secagem é uma etapa crítica no desenvolvimento de sementes ortodoxas, e a sensibilidade à dessecação é uma questão fundamental na conservação de sementes (PAMMENTER & BERJAK, 1999). Entre os diferentes problemas que as sementes sofrem na dessecação, um é a geração de EROs (LEPRINCE *et al.*, 1994, 1996). Sabendo que o AsA é conhecido como um antioxidante, e a peroxidase do ascorbato é conhecida por catalisar a remoção de peróxido de hidrogênio, muita atenção então tem sido dada a seu possível envolvimento no mecanismo de defesa das sementes contra o estresse oxidativo durante a dessecação (DE GARA *et al.*, 2003). No entanto isso não é consistente com o fato de que ambos, isto é o conteúdo de AsA e a atividade de APX, decrescem durante o estágio de dessecação (ARRIGONI *et al.*, 1992; DE GARA *et al.*, 2003). O alto conteúdo da APX em cevada é associada com a fase de enchimento de grãos e que decresce durante a dessecação (FINNIE *et al.*, 2002). Em adição, BAILLY *et al.* (2001) relataram que a atividade da APX

em embriões isolados de sementes de *Phaseolus vulgaris* em diferentes estágios de desenvolvimento, é maior aos 40 dias após a antese (ou seja, antes do fim do acúmulo de massa seca) e em seguida, diminui progressivamente durante a dessecação, concomitante com um aumento significativo na atividade de outras enzimas antioxidantes (catalase e redutase da glutaciona).

Notavelmente, as sementes na fase seca, quando tem a atividade da APX elevada, não são capazes de germinar (BAILLY et al., 2001), sugerindo que a função desta enzima não está diretamente relacionada à tolerância à dessecação. Assim, os dados acima mencionados sugerem que o AsA e a APX não são essenciais para a dessecação, pois tanto o conteúdo de AsA como atividade de APX são altos em sementes sensíveis a dessecação e baixos durante a fase de dessecação de sementes tolerantes (TULLIO & ARRIGONI, 2003). Por isso, é mais razoável supor que outras moléculas antioxidantes, como a glutaciona, que é presente em altas concentrações em sementes ortodoxas (KLAPHECK, 1988), e enzimas, como catalase e glutaciona redutase (BAILLY et al., 2001), ou peroxirredoxinas (FINNIE et al., 2002) podem ser responsáveis pela proteção das sementes contra as ERO.

O mecanismo do AsA durante a germinação das sementes já foi investigado em diferentes espécies de plantas (KLAPHECK *et al.*, 1990;. ÇAKMAK *et al.*, 1993;. DE GARA *et al.*, 1997, 2000;. TOMMASI *et al.*, 2001, 2002). Ambos, o AsA e a atividade da APX, foram detectados em embriões retirados de sementes no intervalo de 12 a 24h após o início da embebição em trigo (DE GARA *et al.*, 1997), ervilha (PALLANCA & SMIRNOFF, 1999), milho (DE GARA *et al.*, 2000) e *P. pinea* (TOMMASI *et al.*, 2001), ou seja, antes da emissão da radícula, com mais aumentos posteriormente.

Pallanca & Smirnoff (1999) também observaram um aumento na atividade da oxidase do AsA durante a germinação de sementes de ervilha, e sugeriram que a oxidase do AsA pode estar relacionada à expansão da parede celular e emergência da radícula. Estes dados sugerem que o AsA é, provavelmente, envolvido não só na regulação da atividade de desidrogenases, mas também no controle da quantidade de peróxido de hidrogênio durante a germinação através da APX.

Atualmente, sabe-se que as células vegetais tem seu potencial redox tamponado devido a grandes quantidades de antioxidantes solúveis em água, incluindo o AsA (10-100mM) (NOCTOR & FOYER, 1998; FOYER & NOCTOR, 2003; HARTMANN *et al.*, 2003). Assim, é possível aumentar o conteúdo de AsA endógeno com a aplicação exógena de AsA nas raízes para proteger as plantas de danos oxidativos induzidos pelo sal por controlar o status redox da célula. A aplicação exógena de 100 mg L⁻¹ de AsA aumentou a atividade de

catalase e o nível endógeno de AsA sob condições de salinidade, favorecendo assim a diminuição de ERO. Isto reforça a visão que a desintoxicação de ERO produzidas durante o estresse salino pode ser mediada pela CAT e por processos redutivos envolvendo os principais tampões redox das células vegetais, AsA e GSH (NOCTOR & FOYER, 1998; NOCTOR *et al.*, 2002.; FOYER & NOCTOR, 2003). O aumento na tolerância ao sal, induzida pelo AsA, em plantas de trigo, foi devido a uma melhoria no sistema antioxidativo para a remoção eficaz de ERO e uma manutenção da homeostase iônica (MITTLER, 2002).

Recentemente, vários genes da via biossintética do AsA, foram introduzidos em plantas, através da engenharia metabólica, para elevar o nível endógeno de AsA. Entre eles, destaca-se um cDNA da L-gulono-c-lactone oxidase (GLOase) isolado de ratos em tabaco e alface (JAIN & NESSLER, 2000); um gene do desidroascorbato (DHAR) de humanos no tabaco (KWON *et al.*, 2003); o c-DNA da redutase do ácido D-galacturônico (GalUR) de morango em *Arabidopsis* e batata (AGIUS *et al.*, 2003; HEMAVATHI *et al.*, 2009), e um c-DNA de DHAR de trigo em tabaco e milho (CHEN *et al.* 2003).

O AsA está envolvido no sequestro de radicais livres enzimaticamente ou não enzimaticamente em plantas (SMIRNOFF , 1996). Evidências crescentes sugerem que a APX oferece resistência a vários estresses ambientais em plantas (MANO *et al.*, 2001.; KWON *et al.*, 2002). O aumento no nível de AsA em linhagens transgênicas foi diretamente correlacionado com sua habilidade em resistir a estresses abióticos. Resultado semelhante foi obtido em plantas transgênicas de batata expressando a redutase do ácido D-galacturônico (HEMAVATHI *et al.*, 2009).

A capacidade do AsA em interagir com as ERO, faz com que ele possa modular a tolerância das plantas aos vários estresses bióticos e abióticos (CONKLIN & BARTH, 2004). O aumento da tolerância de plantas transgênicas de tabaco com elevados níveis de AsA aos estresses salino e oxidativo, foi obtida com a superexpressão de DHAR (KWON *et al.*, 2003) e GalDH (TOKUNAGA *et al.*, 2005). A associação entre o ambiente salino e os níveis endógenos de enzimas antioxidantes tem sido relatada (LECHNO *et al.*, 1997; SHALATA & TAL, 1998). A super expressão do gene da GLOase reforçou os níveis basais de AsA em tubérculos de batata transgênica apresentando assim, uma melhor sobrevivência sob diferentes estresses abióticos (HEMAVATHI *et al.*, 2010).

A aplicação exógena ou o pré-tratamento com diferentes compostos antioxidantes dentre eles o ácido ascórbico tem sido considerado um eficiente método para aumentar a tolerância das plantas aos diferentes estresses abióticos, talvez mais do que o melhoramento genético de plantas e as técnicas de engenharia genética (ASHRAF & FOOLAD, 2005;

WAHID et al., 2007). Al-Hakimi & Hamada (2001), Shalata & Neumann (2001), e Khan et al. (2006) evidenciaram que o pré-tratamento de sementes com ácido ascórbico conferem tolerância aos estresses abióticos.

Younis *et al.* (2009) mostraram que o tratamento de sementes de fava com NaCl induziu um decréscimo de proteína e N-total associados com aumento nos níveis de aminoácidos solúveis quando comparado com sementes não tratadas. Isso pode ser atribuído a ativa proteólise, interrupção na síntese protéica, bem como o retardo nos processos de transaminação que podem resultar assim na acumulação de amônia (YOUNIS *et al.*, 1993). Younis *et al.* (2009) mostraram que o padrão de alterações nos aminoácidos, ácidos nucleicos e bandas protéicas extraídos de plântulas de fava indicaram um papel positivo do ácido ascórbico na atenuação dos efeitos danosos induzidos por NaCl e manitol.

A aplicação exógena de ácido ascórbico aumentou a porcentagem de germinação de sementes de fava, além de aumentar a capacidades das mudas em sobreviver aos efeitos tóxicos ou osmóticos, ao serem expostas a níveis altos de NaCl e manitol. Este notável efeito protetor do ácido ascórbico exógeno parece estar relacionado com sua atividade antioxidante, em vez de sua utilização como substrato orgânico para o metabolismo energético (SHALATA & NEUMANN, 2001). Assim, o ácido ascórbico tem um papel importante no sistema antioxidante de plantas, na fotossíntese, no transporte de elétrons transmembranar, e, possivelmente, na expansão de células (CONKLIN *et al.* 1996).

Khan & Srivastava (1998), estudando os efeitos interativos da salinidade e do ácido ascórbico sobre o crescimento e o metabolismo do nitrogênio na cultura do milho, constataram que 100 mM de NaCl inibiu o acúmulo de biomassa, a absorção e o conteúdo de amônia e a atividade da redutase do nitrato. Interessantemente, a aplicação do ácido ascórbico no meio salino, aumentou substancialmente os parâmetros anteriormente mencionados. A administração de 4 mM de ácido áscorbico no meio de cultura contendo NaCl ou manitol, conduziu a uma redução na cocentração de aminoácidos solúveis totais, nitrito e amônia, e um aumento nos conteúdos de nitrato, proteína, amido e N-total.

A utilização rápida do conteúdo de ascorbato e uma maior atividade de APX durante os primeiros estágios da germinação de diferentes espécies vegetais sob estresse salino e hídrico é uma estratégia desenvolvida na germinação de sementes de glicófitas para lidar com o aumento dos níveis de ERO durante esses estresses abióticos (DE GARA *et al.* 1997). Uma associação entre o ambiente salino ou seco e os níveis endógenos de antioxidantes ou enzimas antioxidantes, tem sido registrada em milho (JIANG & ZHANG, 2002), *Cassia angustifolia* (AGARWAL & PANDEY, 2004), *Sauzea rostrata*, e *Phaseolus*

vulgaris (JUNGKLANG, 2005), tomate (SHALATA & NEUMANN, 2001) e em beterraba açucareira (BOR *et al.*, 2003). Além disso, o sistema de defesa antioxidante de soja, respondeu diferentemente a 50 e 200 mM de NaCl aplicados. Aos 50 mM de NaCl, houve um aumento global das enzimas antioxidantes (APX, CAT, SOD e GR). Após o retorno das mudas do ambiente salinizado para um ambiente não salinizado (recuperação), as atividades das enzimas retornaram aos valores iniciais. Em 200 mM de NaCl houve uma diminuição na atividade de APX, CAT e GR de 30% a 100% em relação ao controle, enquanto que a SOD aumentou 19% em relação ao controle. Esses resultados sugerem que, sob estresse moderado, o aumento dos níveis das enzimas antioxidantes protege as mudas contra o estresse oxidativo, evitando assim a peroxidação de lipídios e proteínas (COMBA *et al.*, 2004).

As mudanças observadas em aminoácidos, proteínas, e em ácidos nucleicos (YOUNIS *et al.* 2009), bem como alterações no sistema antioxidante influenciadas por concentrações crescentes de NaCl ou manitol, isoladamente ou em combinação com 4 mM de ácido ascórbico, pareceram coincidir com as mudanças no potencial de germinação e nos parâmetros de crescimento. Sendo assim uma forte evidência de que a aplicação exógena de ácido ascórbico, um composto antioxidante, pode aliviar os danos ocasionados pelos fatores de estresse, NaCl e manitol.

Existem grandes diferenças entre as sementes recalcitrantes e ortodoxas. Na fisiologia de sementes ortodoxas a desidratação lenta induz o desaparecimento do sistema antioxidante ascorbato/APX nas sementes quiescentes e na transição do desenvolvimento para a germinação. Em sementes recalcitrantes, a secagem lenta faz com que ocorra uma perda completa da germinabilidade sob estas condições, ocorrendo apenas mudanças no sistema antioxidante ascorbato/APX (KERMODE, 1990).

1.7 O modelo vegetal: sementes de feijão-de-corda

A espécie vegetal *Vigna unguiculata* (L.) Walp., popularmente conhecida como feijão-de-corda ou feijão massacar (FREIRE-FILHO, 1988), tem sua origem ligada ao continente africano (RACHIE & RAWAL, 1976). Foi introduzido no século XVII, pelos colonizadores portugueses e pelos escravos africanos, provavelmente na Bahia (FREIRE-FILHO, 1988), em regiões tropicais, encontrando características edafoclimáticas distintas (quente/úmida na região norte e quente/seca na região nordeste) adequadas ao seu desenvolvimento (ARAÚJO *et al.*, 1984).

O feijão-de-corda é classificado taxonomicamente como uma *Angiopermae dicotyledonea*, pertencente à ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Papelinoideae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolinae*, gênero *Vigna*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (PADULOSI & NG, 1997). A espécie é fisiologicamente pertencente ao grupo das plantas de fotossíntese do tipo C3 (TAIZ & ZEIGER, 1991), além de ser predominantemente autógama (BLACKHURST & MILLER JR., 1980) e possuidora de ampla variabilidade genética e excelente potencial de produção e adaptação a fatores ambientais adversos (FREIRE-FILHO *et al.*, 2003).

Como glicófita, o feijão-de-corda também é sensível a salinidade (GREENWAY & MUNNS, 1980), embora bem adaptado às condições de temperaturas elevadas e seca ambiental, quando comparado com outras espécies agrícolas importantes (EHLERS & HALL, 1997). A cultura do feijão-de-corda é uma das mais importantes no nordeste brasileiro, principalmente no aspecto social, como geradora de empregos e garantia de reserva de subsistência. Representa também uma das principais fontes de proteínas de origem vegetal (23-25% em média) para a população nordestina e possui todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62%, em média), vitaminas e minerais (SANTOS, 2003).

Pelo seu valor nutritivo, o feijão-de-corda é cultivado principalmente para a produção de grãos, secos ou verdes, visando o consumo *in natura*, na forma de conserva ou desidratado. Também é utilizado como forragem verde, feno, ensilagem, farinha para alimentação animal e, ainda, como adubação verde e proteção do solo (ARAGÃO, 2007). No Brasil, o feijão-de-corda é cultivado predominantemente no sertão semi-árido da região Nordeste e em pequenas áreas na Amazônia. Representa 95% a 100% do total das áreas plantadas nos estados do Amazonas, Maranhão, Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte (MAIA, 1996).

Segundo levantamento da Conab (2010), a produção brasileira de feijão na safra 2009/2010 foi de 3,3 milhões de toneladas, o que manteve o país como o maior produtor mundial do grão. No último levantamento realizado pela Conab em março de 2011, estimou-se que a produção do feijão-de-corda poderá chegar a 3,71 milhões de toneladas, ou 11,80% maior que a temporada anterior. No que concerne ao Nordeste, o acompanhamento de safra da Conab, de setembro de 2010, mostra que a Região apesar de ter a maior área plantada do País, com 2.183 mil ha, possui apenas a terceira maior produção, cerca de 640 mil toneladas, fato esse explicado pela baixa produtividade, quando comparada com a de outras regiões. Onde 1.914 kg/ha foi a média de produtividade da região Centro Oeste, contra 354 kg/ha no Nordeste (CONAB, 2010; 2011).

Entre os estados nordestinos, a Bahia tem a maior produção, 333 mil toneladas, seguido dos estados de Pernambuco e Ceará, com 88,5 e 84,5 mil toneladas respectivamente. No Nordeste, a redução da safra 2009/10 em relação à 2008/09 foi de 28,9% na produção. Isso devido à estiagem que a região sofreu (Tabela 2) – (SENA, 2010).

Tabela 2 – Comparativo de área, produtividade e produção de Feijão-de-corda, safra 2008/2009 e safra 2009/2010.

REGIÃO/UF	ÁREA (Em mil ha)			PRODUTIVIDADE (Em kg/ha)			PRODUÇÃO (Em mil t)		
	Safra 08/09	Safra 09/10	Var%	Safra 08/09	Safra 09/10	Var%	Safra 08/09	Safra 09/10	Var%
NORTE	167,2	143,0	-14,5	844	573	-32,1	141,1	81,9	-42,0
NORDESTE	2.183,9	1.811,7	-17,0	413	354	-14,3	901,3	640,7	-28,9
MA	96,8	85,0	-12,2	458	329	-28,0	44,3	28,0	-36,8
PI	246,5	213,8	-13,3	256	159	-37,6	63,0	34,1	-45,9
CE	589,1	458,2	-22,2	270	184	-31,8	159,3	84,5	-47,0
RN	59,2	31,8	-46,3	390	252	-35,5	23,1	8,0	-65,4
PB	205,5	73,0	-64,5	390	51	-87,0	80,1	3,7	-95,4
PE	316,7	264,6	-16,5	432	334	-22,5	136,7	88,5	-35,3
AL	83,5	62,6	-25,0	460	540	17,4	38,4	33,8	-12,0
SE	35,8	42,6	19,0	559	634	13,5	20,0	27,0	35,0
BA	550,8	580,1	5,3	611	574	-6,0	336,4	333,0	-1,0
CENTRO OESTE	285,6	257,7	-9,8	1.658	1.914	15,5	473,4	493,2	4,2
SUDESTE	634,6	626,5	-1,3	1.493	1.552	3,9	947,7	972,1	2,6
SUL	876,5	738,0	-15,8	1.172	1.460	24,6	1.027,1	1.077,2	4,9
BRASIL	4.147,8	3.576,9	-13,8	842	913	8,5	3.490,6	3.265,1	-6,5

Fonte: Conab - Levantamento de setembro/ 2010.

De acordo com Cardoso (2000), o feijão-de-corda se desenvolve no semi-árido brasileiro, em geral, sob condições ambientais adversas, principalmente de deficiência hídrica, temperaturas elevadas e salinização dos solos. Além disso, a recente utilização da prática de irrigação em algumas áreas de produção vem aumentando consideravelmente os riscos de salinização dos solos devido a problemas com qualidade da água usada para irrigação e das altas taxas de evaporação da água do solo (CAVALCANTI, 2002).

Dentre os principais fatores que contribuem para a baixa produtividade do feijão-de-corda destacam-se: a situação econômica do produtor, sementes não melhoradas geneticamente, sementes armazenadas em condições inadequadas, ausência de preparo e correção do solo e a falta de manejo da cultura (CARDOSO, 2000). As sementes de feijão são armazenadas na maioria das vezes sob condições não controladas (VIEIRA & YOKOYAMA, 2000), contribuindo assim para a perda da viabilidade, principalmente devido ao estresse oxidativo favorecido nessas condições.

Estudos com feijão-de-corda demonstraram um aumento na atividade de enzimas antioxidantes durante o estresse salino, talvez com o intuito de se defender do estresse oxidativo (CAVALCANTI *et al.*, 2007; ARAGÃO, 2007). O teste do envelhecimento acelerado em sementes de feijão-de-corda constitui um eficiente teste de vigor para avaliar diferentes lotes de sementes de feijoeiro e acompanhar a sua variação durante a exposição e o período prolongado de armazenamento (SALINAS *et al.*, 2001).

A cultivar de feijão-de-corda EPACE 10, foi desenvolvida na extinta Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Ceará (EPACE), no ano de 1986, como parte integrante do programa de melhoramento do feijão-de-corda desenvolvido por esta instituição, sendo uma das mais utilizadas atualmente pelos agricultores (BARRETO *et al.*, 1996). A origem foi o cruzamento entre a Linha CNCx166-08 e Seridó * TVu 1888, tendo boa adaptação à agricultura de sequeiro, com hábito de crescimento indeterminado, um porte enramador, flor de cor violeta, vagem de cor amarela com comprimento médio de 21 cm, número de 15 sementes/vagem, sementes semi-esférica, cor do tegumento da semente marrom e um ciclo mediano em torno de 65-75 dias (BARRETO *et al.*, 1988; BARRETO, 2006). Um dos problemas desse cultivar de feijão-de-corda é o escurecimento progressivo do grão com o período prolongado de armazenamento, reduzindo seu valor comercial e aceitação pelo consumidor (BARRETO, 2006).

2. JUSTIFICATIVA E IMPORTÂNCIA DA PESQUISA

A partir do problema relatado, constata-se que a utilização de sementes de espécies superiores como modelo para o estudo do envelhecimento das células é bastante importante, devido à perda de sua viabilidade ser facilmente induzida experimentalmente. Sabe-se também que no campo diversos fatores bióticos e abióticos podem afetar o desempenho dessas sementes, revertendo-se em possíveis perdas agrícolas, principalmente se essas sementes já tiverem a sua viabilidade afetada pelo armazenamento.

Um desses fatores estressantes ocorridos em condições de campo é a salinidade do solo. As sementes oriundas de períodos prolongados de armazenamento em condições adversas perdem a sua viabilidade e quando chegam ao campo e se deparam com outros fatores de estresse, contribuem enormemente para o fracasso da produção agrícola mundial. Diante do exposto, tornam-se relevantes estudos que visem à obtenção de ferramentas que minimizem os efeitos danosos provocados pelo armazenamento inadequado de sementes com a finalidade de promover assim um melhor desempenho dessas sementes no campo, principalmente em condições adversas.

O estudo da relação entre o uso de antioxidantes naturais, com um possível revigoramento de sementes envelhecidas, utilizando o feijão-de-corda como modelo experimental, pode gerar estratégias de meios de potencializar as defesas antioxidativas e amenizar os efeitos de estresse em ambientes de armazenamento de sementes sob condições não controladas, principalmente em pequenas e médias propriedades rurais. É extremamente importante também a utilização desses antioxidantes no revigoramento dessas sementes que enfrentaram um armazenamento inadequado para que as mesmas possam ter uma melhor aclimação a possíveis estresses que venham enfrentar no campo, tais como a salinidade.

Não existe ainda na literatura nenhum estudo sobre o possível efeito de antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico, na melhoria da viabilidade de sementes de feijão-de-corda que foram submetidas ao armazenamento inadequado, e nem tampouco sobre o efeito desses antioxidantes em uma possível aclimação a condições ambientais de estresses abióticos, dentre eles o mais frequente na região nordeste do Brasil, o estresse salino.

Daí vem à justificativa da realização deste trabalho, visando à obtenção de resultados que possam ajudar na minimização dos efeitos danosos provocados pelo envelhecimento e pela salinidade, nas sementes, contribuindo assim para um melhor desempenho das sementes de feijão-de-corda no campo.

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese geral

A aplicação exógena de ácido ascórbico pode minimizar os danos provocados pelo envelhecimento e pela salinidade em sementes de feijão-de-corda?

3.2 Objetivo geral

O presente estudo tem como principal objetivo verificar os efeitos da aplicação exógena do ácido ascórbico na atenuação dos efeitos provocados pelo envelhecimento e pelo estresse salino em sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], cultivar EPACE 10.

3.3 Objetivos específicos

- a) Avaliar a melhor metodologia para aplicação exógena de ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda;
- b) avaliar tanto o efeito do pré, como do pós-tratamento com ácido ascórbico, na proteção e redução dos danos ocasionados pelo envelhecimento de sementes de feijão-de-corda, através de várias variáveis fisiológicas e bioquímicas;
- c) verificar o efeito da aplicação exógena de ácido ascórbico na proteção e redução dos danos ocasionados pelo envelhecimento e na aclimação ao estresse salino, em sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, através de variáveis fisiológicas e bioquímicas.

3.4 Estratégia experimental

Para se chegar aos objetivos propostos neste trabalho de tese, foram realizados três experimentos, sendo o material vegetal utilizado como modelo nestes experimentos, sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], cultivar EPACE 10, disponíveis do Banco de Germoplasma de Feijão-de-corda, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará (UFC), as quais foram selecionadas para multiplicação de material vegetal. Os experimentos e as análises foram conduzidos no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias e no Laboratório

de Fisiologia Vegetal do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências, ambos da UFC.

Cada experimento constitui um capítulo da tese. No primeiro capítulo, foram feitos testes preliminares para obtenção da melhor metodologia de aplicação do ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda, sendo então testadas, diferentes concentrações, tempos de aplicação e também métodos de aplicação. No segundo capítulo, após definido a melhor metodologia de aplicação exógena, foi feita então a investigação do possível efeito do pré ou pós-tratamento com ácido ascórbico na atenuação dos efeitos danosos provocados pelo envelhecimento artificial sementes de feijão-de-corda, através de parâmetros fisiológicos e bioquímicos. Finalmente, no terceiro capítulo, foi investigado também o efeito da aplicação exógena de ácido ascórbico na aclimação de sementes envelhecidas de feijão-de-corda ao estresse salino através de parâmetros fisiológicos e bioquímicos.

4. CAPÍTULO I - Identificação da melhor metodologia de aplicação exógena do ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE10

4.1 Introdução

A obtenção de altas produtividades na cultura do feijão-de-corda, não está estreitamente relacionada só com a utilização de variedades melhoradas e um manejo adequado da cultura, mas também com a qualidade das sementes colocadas à disposição do produtor. A qualidade de sementes está relacionada com o grau de pureza física e varietal, poder de germinação, vigor e seu estado fitossanitário. Com o advento da agricultura tecnificada nas últimas décadas, o uso de sementes de alta qualidade fisiológica, se torna extremamente necessário. É sabido que o uso de sementes de alta qualidade fisiológica e sanitária é fundamental para a instalação e produção de uma cultura.

A qualidade fisiológica tem sido um dos aspectos mais pesquisados nos últimos anos, em decorrência das sementes estarem sujeitas a uma série de mudanças degenerativas de origem bioquímica, fisiológica e física, após a sua maturação, as quais estão associadas com a redução do vigor (ABDUL-BAKI & ANDERSON, 1972). As sementes se deterioram facilmente quando enfrentam períodos prolongados de armazenamento, principalmente se as condições forem inadequadas. Entretanto, a velocidade e a sensibilidade das sementes à deterioração variam bastante dentre as espécies vegetais (SUBBA RAO *et al.*, 1996; DHAKAI & PONDEY, 2001).

Plantas com altos níveis de antioxidantes, enzimáticos ou não enzimáticos, de forma induzida ou constitutiva, podem aumentar a resistência a danos oxidativos nas células vegetais gerados por estresses bióticos e abióticos (BOR *et al.*, 2003; COMBA *et al.*, 2004). Tem sido relatado na literatura, que o pré-tratamento das sementes com antioxidantes não enzimáticos, aumenta o vigor e com isso o potencial de armazenamento dessas sementes a condições adversas de temperatura e umidade (MAITY *et al.*, 2000). Smirnoff (2000) sugere que o tratamento prévio das sementes com antioxidantes como o ácido ascórbico aumenta o vigor e prolonga a armazenabilidade das sementes devido principalmente a remoção de ERO.

O ácido ascórbico é um importante metabólito primário que tem funções de antioxidante, cofator enzimático e modulador da sinalização celular em uma ampla gama de processos fisiológicos, incluindo a biossíntese de parede celular, metabólitos secundários e

fitormônios, além de atuar na resistência a estresses, fotoproteção, divisão celular e crescimento (WOLUCKA *et al.*, 2005). Arrigoni & Detullio (2000) mostraram que a aplicação de ácido ascórbico exogeneamente, aumentou os níveis endógenos desse antioxidante devido a absorção por diferentes tecidos da planta. Chen & Gallie (2004) evidenciaram que o ácido ascórbico endógeno pode ser aumentado pela aplicação exógena de ácido ascórbico no meio radicular, bem como pela aplicação foliar ou pelo tratamento das sementes.

É evidente que a eficácia da aplicação exógena de ácido ascórbico depende da concentração e também do modo de aplicação (KHAN *et al.*, 2010). O pré-tratamento de sementes de *Brassica campestris* em solução de ácido ascórbico a 100 mg L⁻¹ aliviou os efeitos adversos do estresse salino sobre o crescimento. O ácido ascórbico na concentração de 50 mg L⁻¹ foi eficiente em promover o crescimento de nabo e tomate (MAKELA *et al.*, 1998). Por outro lado, a concentração de 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico foi a mais efetiva na redução dos efeitos da salinidade em arroz (JAYACHANDRAN *et al.*, 2000), berinjela (EL-TOHAMY *et al.*, 2008) e *Hibiscus rosa sineses* (EL-QUESNI *et al.*, 2009).

O pré-tratamento de sementes de trigo selvagem (*Agropyron elongatum* Host.) com solução de 300 mg L⁻¹ de ácido ascórbico foi capaz de aliviar os efeitos adversos do estresse salino na germinação (TAVILI *et al.*, 2009). Já no trigo cultivado (*Triticum aestivum* L.) a concentração de 100 mg L⁻¹ já se mostrou eficiente em melhorar o estabelecimento de plântulas sob estresse salino (KHAN *et al.*, 2006). Quando mudas de cafeeiro foram pulverizadas com 20 mM de ácido ascórbico foram observadas maiores condutância estomática e taxa transpiratória (DEUNER *et al.*, 2008). A aplicação de 2 mM de ácido ascórbico em meio de cultura *in vitro* foi eficiente em aumentar a massa seca e o conteúdo endógeno de ácido ascórbico em calos de alfafa (*Medicago sativa* L.) (ARAB & EHSANPOUR, 2006). Já em batata houve resultados promissores com 0,5 mM de ácido ascórbico tanto no pré-tratamento de plantas, como de calos *in vitro* (SAJID & AFTAB, 2009).

Em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) foram utilizadas altas concentrações de ácido ascórbico variando de 25 a 100 mM, ocorrendo efeitos fisiológicos positivos na defesa antioxidativa contra a ação adversa do estresse salino (DOLATABADIAN & SALEH JOUNEGHANI, 2009). Em canola a concentração eficiente de ácido ascórbico capaz de amenizar os efeitos da salinidade foi de 25 mM, com redução na peroxidação de lipídios e aumento nas atividades das enzimas antioxidativas (DOLATABADIAN *et al.*, 2008). A aplicação de 300 µM de ácido ascórbico foi capaz de minimizar os efeitos deletérios do

estresse salino na fotossíntese, conteúdo mineral, pigmentos fotossintéticos e integridade da membrana em plantas de girassol e milho (HAMADA & AL-HAKIMI, 2009). A aplicação foliar de solução de ácido ascórbico a 150 mg L^{-1} aumentou a tolerância a seca, pelo aumento das atividades de enzimas antioxidantes (APX, CAT, POX) em plantas de milho (DOLATABADIAN *et al.*, 2009). A aplicação exógena de 4 mM de ácido ascórbico promoveu o aumento da germinação e estabelecimento de plântulas de fava em condições de estresse provocado por NaCl e manitol (YOUNIS *et al.*, 2009). Estudos com sementes de algodão mostraram que a presença de antioxidantes como o ácido ascórbico protegeu a semente contra a peroxidação de lipídios e as ERO (McDONALD, 1999).

Apesar da demonstração da eficiência da aplicação do ácido ascórbico na defesa antioxidante em várias espécies vegetais, ainda não se tem na literatura, uma metodologia definida para aplicação exógena do ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda. O objetivo principal desse trabalho, portanto, foi determinar qual a melhor metodologia para a aplicação exógena de ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda para estudos futuros de envigoreamento de sementes.

4.2 Material e métodos

Foi utilizado como material vegetal utilizado foi sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], cultivar EPACE 10, obtidos a partir do Banco de Germoplasma do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Ceará (UFC). As sementes, obtidas do banco de germoplasma, foram selecionadas segundo critérios de tamanho, aparência e sanidade, a fim de homogeneizar as condições experimentais. A desinfecção das sementes foi feita por imersão das mesmas em solução de etanol 70% (v/v) com agitação por 30 s, seguida de três lavagens rápidas com água destilada esterilizada. Logo em seguida, as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio 0,2% (v/v) por 10 min, sendo lavadas posteriormente três vezes em água destilada estéril.

Com o intuito de verificar qual a melhor forma de aplicação exógena de ácido ascórbico (AsA) nas sementes de feijão-de-corda, para estudos posteriores com envigoreamento de sementes, foi elaborada a seguinte estratégia experimental (Figura 11): Em condições de laboratório, as sementes selecionadas e desinfetadas foram incubadas nas concentrações de 0, 75 e 150 mg L^{-1} de AsA, que correspondem a 0, 0,42 e 0,85 mM respectivamente, em diferentes tempos de exposição (4, 8 e 24 h) através de dois diferentes

métodos de aplicação (Figura 12): (I) - Embebição em papel germitest na placa de petri e (II) - Submersão em solução no Erlenmeyer.

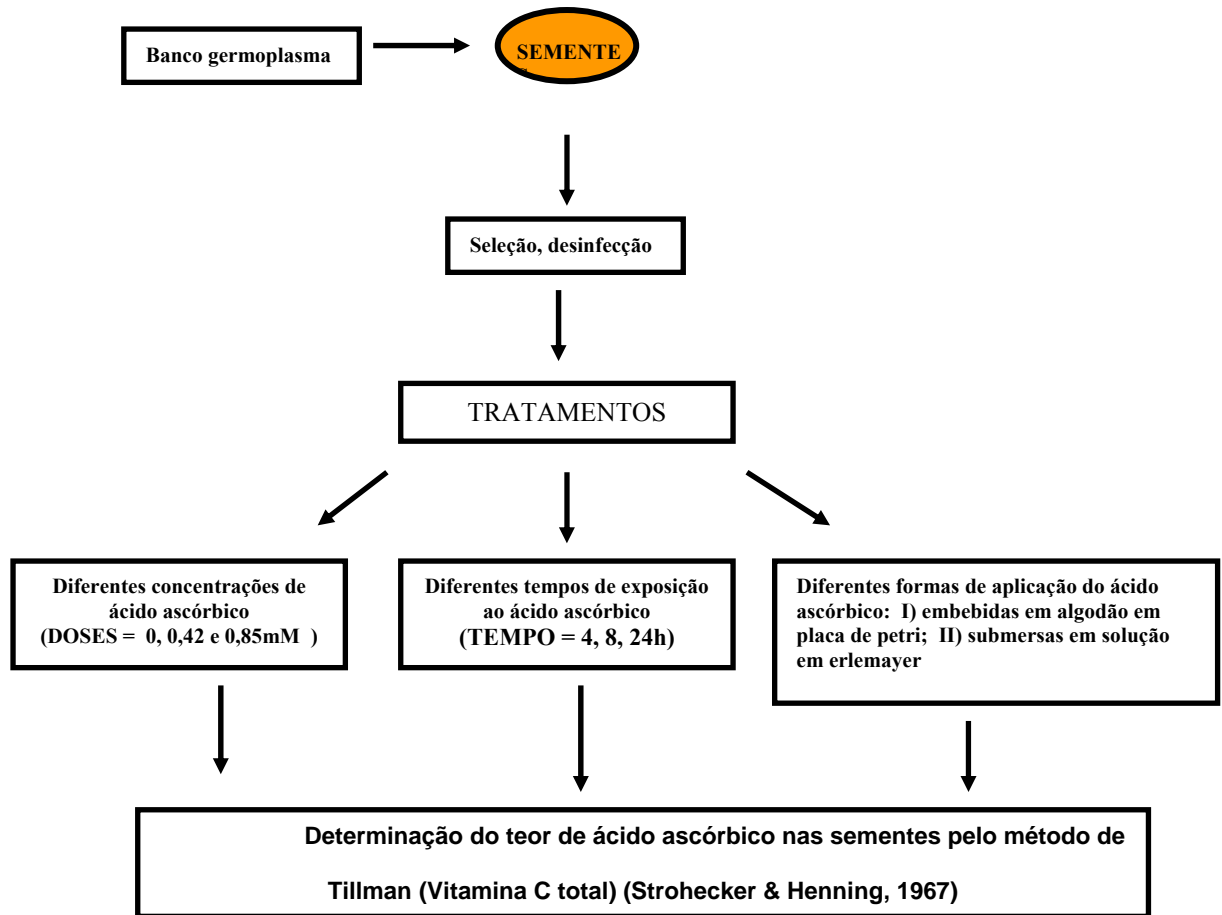


Figura 11 – Esquema experimental para identificar a melhor metodologia de aplicação exógena de ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda.

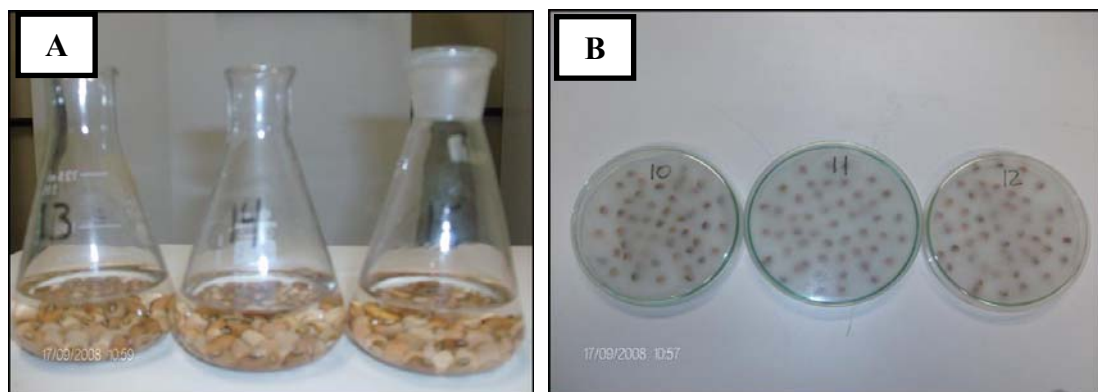


Figura 12 – Diferentes métodos de aplicação exógena de ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda: (A) = Submersão em solução no Erlenmeyer e (B) = Embebição em papel germitest na placa de petri.

Após a aplicação dos tratamentos acima mencionados, foi quantificado em cada um deles, o teor de AsA endógeno, pelo método de Tillman (Vitamina C total) (STROHECKER & HENNING, 1967) e depois feito a comparação com o teor padrão de AsA endógeno já existente nas sementes controle (0h), para avaliar qual foi o tratamento mais eficaz no aumento da concentração endógena do AsA nas sementes de feijão-de-corda. O delineamento foi o inteiramente casualizado, com um fatorial (2x3x2) +1, testando-se duas concentrações, três tempos de exposição e duas formas de aplicação com um tratamento adicional (sementes não tratadas), com três repetições cada. Os dados foram analisados estatisticamente, através da análise de variância pela significância do teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

4.3 Resultados e discussão

Através do método de Tilman (STROHECKER & HENNING, 1967) foi determinado o conteúdo endógeno de AsA nas sementes de feijão-de-corda. Nas sementes controle (0 h) que não foram tratadas com AsA, o conteúdo endógeno, obtido nas sementes, foi de aproximadamente 13,15 mg/100 g de sementes, como pode ser observado na Figura 13. Esse conteúdo é maior que de outras leguminosas como a ervilha (8 mg/100 g), porém menor do que em batata (17 mg/100 g) (DAVIES *et al.*, 1991).

Foi observado, que em todos os tratamentos analisados, o teor de AsA endógeno, quantificado nas sementes de feijão-de-corda, foi maior que o das sementes controle, que não sofreram tratamento com o antioxidante (Figura 13). Esses resultados comprovam que as sementes de feijão-de-corda foram hábeis em absorver o ácido ascórbico exógeno, como já evidenciado em outro estudo, onde o ácido ascórbico exógeno pode ser facilmente absorvido pelas sementes (CHEN & GALLIE, 2004).

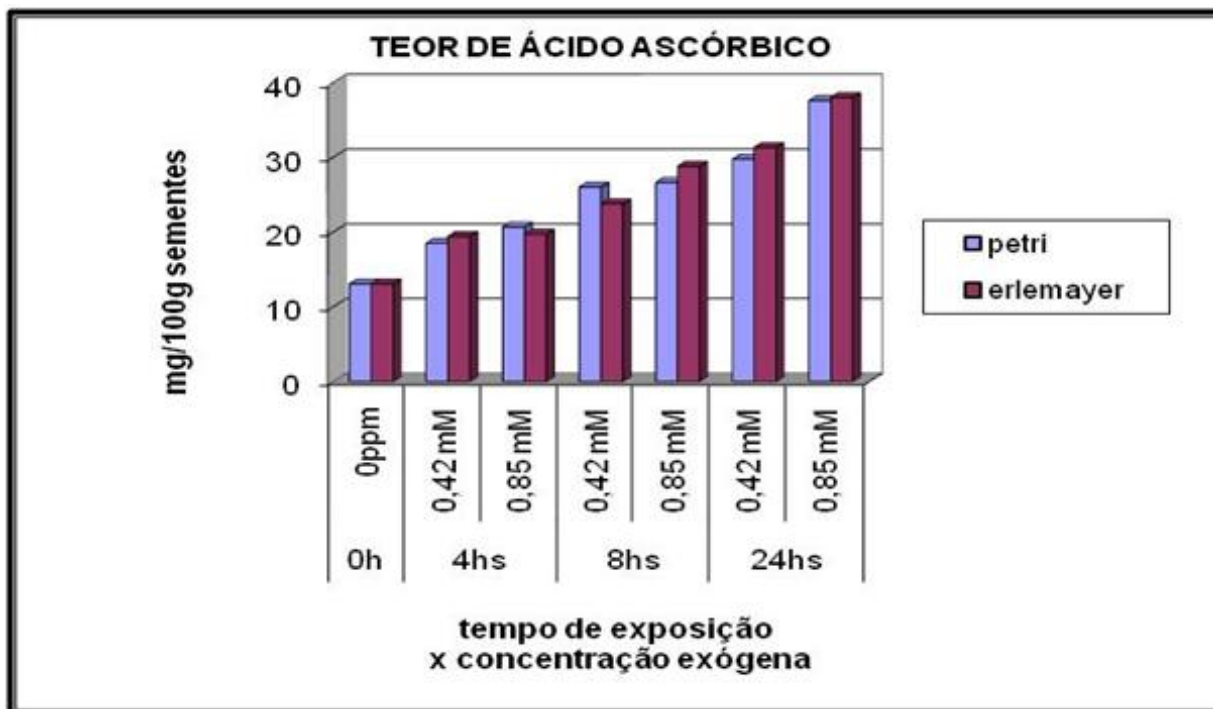


Figura 13 - Efeito da aplicação exógena de ácido ascórbico no aumento do teor endógeno existente nas sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, sob diferentes metodologias.

Esse estudo é promissor no que diz respeito à aplicação exógena de AsA nesta espécie vegetal e tem como intuito a obtenção de um protocolo eficiente para ser utilizados em estudos futuros de envigoramento de sementes. Al-Hakimi & Hamada (2001), Shalata & Neumann (2001) e Khan *et al.* (2006) evidenciaram que o pré-tratamento de sementes com ácido ascórbico conferem tolerância a diversos estresses abióticos. Já em estudos com aplicação exógena de ácido ascórbico em halófitas mostraram que a concentração mais eficiente, após 3h, foi a de 40 mM (KHAN *et al.*, 2006). Entretanto, em tomate, o tratamento por 24h, com uma concentração apenas de 0,5mM foi extremamente eficiente (SHALATA & NEUMANN, 2001). Em trigo, a concentrações exógena de ácido ascórbico que se mostrou eficaz foi a de 0,85 mM por um período maior de 2 meses de exposição (ATHAR *et al.*, 2008). No presente trabalho, as concentrações exógenas testadas de AsA nas sementes de feijão-de-corda, foram as de 75 e 150 mg.L⁻¹, que correspondem respectivamente, a 0,42 e 0,85 mM.

Foi verificado que houve aumento na concentração endógena de AsA nas sementes com o aumento do tempo de exposição (4 a 24 h) nas concentrações exógenas testadas, indiferentemente aos métodos de aplicação, onde houve diferença estatística significativa entre os tempos de exposição, independentemente dos métodos e da concentrações testadas (Tabela 3).

TABELA 3 – Concentração endógena de ácido ascórbico (mg/100 g) de sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, após serem incubadas com 0,42 e 0,85 mM de ácido ascórbico em diferentes tempos de exposição (4, 8 e 24 h) através de dois diferentes métodos: (I) - Embebição em papel germitest na placa de petri e (II) - Submersão em solução no Erlenmeyer.

TEMPO DE EXPOSIÇÃO (h)	MÉTODOS DE APLICAÇÃO EXÓGENA			
	MÉTODO I		MÉTODO II	
	Concentração exógena aplicada (mM)		Concentração exógena aplicada (mM)	
	0,42	0,85	0,42	0,85
4	18,48 cA	20,67 cA	19,42 cA	19,73 cA
8	26,00 bA	26,63 bA	23,80 bB	28,82 bA
24	29,76 aB	37,59 aA	31,32 aB	38,02 aA

*As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e letras maiúscula nas linhas, não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade..

Verificou-se que o maior conteúdo de AsA endógeno aconteceu após 24 h de exposição em ambos métodos e concentrações. Após 24 h de exposição o conteúdo endógeno de AsA aumentou quase cerca de 2,5 vezes, quando comparado com o tratamento controle (0 h) quando foi aplicado a concentração de 0,42 mM e cerca de 3 vezes na concentração de 0,85 mM em ambos os métodos testados (Tabela 3). A adição de ácido ascórbico exogeneamente aumentou os níveis do mesmo nos tecidos de plântulas de fava, confirmando, assim, os relatos de que as plântulas conseguem absorver o antioxidante exogeneamente (ARRIGONI *et al.*, 1997; SHALATA & NEUMANN, 2001).

Quando se leva em consideração a concentração exógena aplicada, no tempo de exposição de 24 h, observou-se diferença estatística entre as duas concentrações testadas, de modo que na maior concentração de AsA exógena (0,85 mM), o conteúdo endógeno das sementes foi maior em todos os tempos de exposição analisados (Tabela 3). Quando se verifica a influência dos dois métodos de aplicação exógena de AsA utilizados nas sementes de feijão-de-corda, no aumento endógeno de AsA, evidencia-se que houve diferença significativa em cada um dos métodos testados em relação aos tempos de exposição. Em ambos os métodos, houve um aumento progressivo no conteúdo de AsA endógeno em relação ao tempo de exposição (Tabela 3).

A absorção de uma solução exógena por uma semente pode diferir em relação ao método de aplicação (SHALATA & NEUMANN, 2001). Porém neste estudo, quando se compara os métodos (I) e (II) entre si, em cada um dos tempos de exposição analisados, verifica-se que somente existe uma diferença significativa entre os métodos no tempo de 8 h na concentração de 0,42 mM. No tempo de 24 h de exposição, foi verificado que apesar do valor numérico do método (II) ser superior ao do método (I), não foi constatada diferença estatística significativa entre os métodos de aplicação nesse tempo (Tabela 3). Porém quando se compara os métodos de aplicação com as concentrações utilizadas, verifica-se que houve uma diferença estatística significativa dentro de cada método (Tabela 3). Entretanto, quando se compara os métodos testados somente houve diferença significativa entre eles, na menor concentração exógena testada de AsA (0,42 mM), com valores superiores para o método I não tendo sido evidenciada diferença na maior concentração de 0,85 mM (Tabela 3).

Neste trabalho, os resultados mostraram que os dois métodos de aplicação testados não diferiram estatisticamente (Tabela 3) no tempo de 24 h de embebição, podendo qualquer um dos dois. Apesar desse fato o método (I) se torna um pouco mais complicado, devido o cuidado com a agitação constante da solução de embebição, visando promover a aeração em períodos superiores ao utilizado neste trabalho (24 h). Sendo assim, o método (II) foi mais viável, pois já pode ser aplicado no próprio meio de semeadura da semente, como no caso deste trabalho, o papel “germitest”. Este estudo então conseguiu definir o método mais apropriado para aplicação exógena do ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda.

4.4 Conclusão

Conclui-se que tanto o método de aplicação (I) como o (II), com a concentração igual a 0,85 mM de ácido ascórbico por um período de 24 h foi à metodologia mais eficiente para a aplicação exógena de ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10.

5. CAPÍTULO II - Efeitos do pré e pós-tratamento com ácido ascórbico na qualidade fisiológica de sementes de feijão-de-corda envelhecidas artificialmente

5.1 Introdução

A qualidade fisiológica de sementes tem sido um dos aspectos mais pesquisados nos últimos anos, em decorrência das sementes estarem sujeitas a uma série de mudanças degenerativas de origem bioquímica, fisiológica e física, após a sua maturação, as quais estão associadas com a redução do vigor (ABDUL-BAKI & ANDERSON, 1972). Na literatura, constata-se que os eventos rápidos mais estudados estão relacionados com os processos iniciais da sequência de deterioração como a degradação das membranas celulares e a redução das atividades respiratória e biossintética (BINOTTI *et al.*, 2008).

A cultura do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é importante no nordeste brasileiro, principalmente no aspecto social, como geradora de empregos e garantia de reserva de subsistência (SANTOS, 2003). As sementes de feijão-de-corda, principalmente em pequenas propriedades, são armazenadas de forma inadequada, contribuindo assim para a perda do vigor (VIEIRA & YOKOYAMA, 2000). Dentre os principais fatores que contribuem para a baixa produtividade do feijão-de-corda destacam-se: a situação econômica do produtor, sementes não melhoradas geneticamente, sementes armazenadas em condições inadequadas, ausência de preparo e correção do solo e a falta de manejo da cultura (CARDOSO, 2000). As sementes de feijão são armazenadas na maioria das vezes sob condições não controladas (VIEIRA & YOKOYAMA, 2000), contribuindo assim para a perda da viabilidade, principalmente devido ao estresse oxidativo favorecido nessas condições.

A obtenção de altas produtividades no feijoeiro não está estreitamente relacionada só com a utilização de variedades melhoradas e um manejo adequado da cultura, mas também com a qualidade das sementes colocadas à disposição do produtor. A qualidade está relacionada com o grau de pureza física e varietal, poder de germinação, vigor e seu estado fitossanitário. Assim, o aprimoramento dos métodos de análise da qualidade fisiológica das sementes de feijão, no sentido de oferecer maior segurança e precisão nos resultados obtidos de germinação e vigor das mesmas se torna importante (KIKUTI *et al.*, 2002).

O uso de sementes com potencial fisiológico elevado é fundamental na obtenção de resultados satisfatórios em culturas de expressão econômica. Avaliar a qualidade de um lote de sementes para estimar com que sucesso ele estabelecerá uma população adequada de plântulas em campo, sob uma ampla faixa de condições ambientais, é de grande importância para atingir alta eficiência na agricultura moderna (ARTHUR & TONKIN, 1991).

A tecnologia de sementes tem procurado aprimorar os procedimentos para avaliar a qualidade de sementes, com o objetivo de obter resultados que expressem o desempenho potencial de um lote, destacando-se em particular, os estudos relativos aos testes de vigor (VIEIRA *et al.*, 1994). O objetivo básico dos testes de vigor é a identificação de diferenças importantes na qualidade fisiológica entre lotes de sementes comercializáveis, principalmente, daqueles com poder germinativo semelhante. Daí, a importância da disponibilidade de testes que procuram avaliar o estado atual das sementes, por meio da determinação de parâmetros associados ao vigor. Existem também, testes dirigidos à avaliação do comportamento das sementes, quando submetidas a condições específicas de ambiente, geralmente, estressantes (BINOTTI *et al.*, 2008). O teste do envelhecimento acelerado em sementes de feijão-de-corda constitui um eficiente teste de vigor para avaliar diferentes lotes de sementes de feijoeiro e acompanhar a sua variação durante a exposição e o período prolongado de armazenamento (SALINAS *et al.*, 2001).

As ERO têm sido estudadas largamente no campo da fisiologia de sementes, sendo particularmente ressaltado sua relação com a perda do vigor e da viabilidade de sementes durante prolongado armazenamento. O acúmulo de ERO é frequentemente indicado como uma primeira causa da deterioração de sementes, gerando reações com ácidos poliinsaturados, levando a peroxidação de lipídios e a destruição das membranas celulares (McDONALD, 1999; APEL & HIRT, 2004; FOYER & NOCTOR, 2005).

Alternativas têm sido pesquisadas visando a melhoria do desempenho de lotes de sementes com qualidade fisiológica inferior, enquanto ainda não se tem um método adequado para a preservação das sementes durante o armazenamento convencional. Sementes utilizam diversas estratégias para reverter os possíveis danos provocados pela deterioração em condições adversas de armazenamento, dentre as quais se destacam os mecanismos enzimáticos antioxidativos (catalase, peroxidase do ascorbato e dismutase do superóxido) e também os protetores antioxidativos não enzimáticos tais como o ácido ascórbico. Esses antioxidantes não enzimáticos têm sido utilizados em pré-tratamentos para a proteção e envigoramento de sementes, com o intuito de aumentar assim o seu poder germinativo quando

essas são submetidas ao envelhecimento natural e artificial (CHHETRI *et al.*, 1993; POWELL *et al.*, 2000).

Foi verificado que o tratamento de sementes de oleaginosas com ácido ascórbico melhorou o potencial de germinação dessas sementes quando submetidas ao armazenamento prolongado (DOLATABADIAN & MODARRES SANAVY, 2008). Plantas com altos níveis de antioxidantes, enzimáticos ou não enzimáticos, de forma induzida ou constitutiva, podem aumentar a resistência a danos oxidativos nas células vegetais gerados por estresses bióticos e abióticos (BOR *et al.*, 2003; COMBA *et al.*, 2004). Assim, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de prolongar a armazenabilidade de sementes pela aplicação de antioxidantes às sementes (RAGHURAMULU & PURUSHOTHAM, 1991; ASCHERMANN-KOCH *et al.*, 1992; CHHETRI *et al.*, 1993). Técnicas de envigoramento de sementes e algumas técnicas de osmocondicionamento pré-semeadura, vêm sendo utilizadas, visando à uniformização do estande e maior rapidez na emergência de plântulas no campo (RAGHURAMULU & PURUSHOTHAM, 1991; CAMARGO, 1998).

O pré-tratamento das sementes com antioxidantes não enzimáticos, aumenta o vigor e com isso o potencial de armazenamento dessas sementes a condições adversas de temperatura e umidade (MAITY *et al.*, 2000). É sugerido que o tratamento prévio das sementes com antioxidantes como o ácido ascórbico aumenta o vigor e prolonga a armazenabilidade das sementes devido principalmente a remoção de ERO (SMIRNOFF, 2000). Entretanto, são escassos na literatura estudos sobre o efeito da aplicação de antioxidantes não enzimáticos, na melhoria da viabilidade e do potencial de armazenamento de sementes de grandes culturas, tais como o feijão-de-corda. O presente estudo, então, tem como objetivo, avaliar tanto o efeito do pré, como do pós-tratamento com ácido ascórbico, na proteção e redução dos danos ocasionados pelo envelhecimento de sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, através de várias variáveis fisiológicas e bioquímicas.

5.2 Material e métodos

As sementes selecionadas e desinfetadas, como descrito anteriormente (item 4.2) foram distribuídas e incubadas em caixas “gerbox” devidamente colocadas em câmara de envelhecimento artificial -BOD- (45°C, 99% U.R., no escuro) para promover o envelhecimento das mesmas por 72 h (DELOUCHE & BASKIN, 1973). As sementes foram submetidas a quatro tratamentos: (T1) sementes não envelhecidas e não tratadas com ácido ascórbico (AsA), tratamento controle (SNE); (T2) sementes envelhecidas e não-tratadas com

AsA (SE); (T3) as sementes, antes do envelhecimento foram submetidas a um pré-tratamento com 0,85 mM de AsA (SE-Pré-T); (T4) as sementes, após o envelhecimento, foram submetidas a um pós-tratamento com 0,85 mM de AsA (SE-Pós-T).

Após cada um dos tratamentos citados, foram analisadas as seguintes variáveis fisiológicas e bioquímicas: a) determinações das massas fresca e seca das sementes (BARBOSA, 2002); b) determinação do percentual de umidade das sementes segundo Slavick (1974). c) teste da condutividade elétrica (vazamento de eletrólitos e percentual de danos de membrana) segundo Blum & Ebercon (1981) e Vieira & Krzyzanowski (1999); d) teste de germinação (BRASIL, 2009); e) teste de emergência (BORGHETTI & FERREIRA, 2004); f) açúcares solúveis (DUBOIS *et al.*, 1956); g) teor de amido pelo método da antrona descrito por Hodge & Hofreiter (1962); h) aminoácidos livres (PEOPLES *et al.*, 1989); i) proteínas solúveis (BRADFORD, 1976); j) peroxidação de lipídios (HEATH & PACKER, 1968); l) atividade amilásica total (BERNFELD, 1955); m) atividade proteolítica (AINOUZ & FREITAS, 1991); n) ascorbato reduzido (LAW *et al.*, 1983; CÓRDOBA-PEDREGOSA *et al.*, 2003); o) atividade da peroxidase do ascorbato (APX) (MCKERSIE & LESHEM, 1994).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, contendo quatro tratamentos: **T1 (SNE), T2 (SE), T3 (SE-Pré-T) e T4 (SE-Pós-T)**, com quatro repetições cada. Os dados foram analisados estatisticamente, através da análise de variância pela significância do teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

5.2.1 Determinação da massa fresca, massa seca e umidade das sementes

A determinação da massa fresca foi feita logo após a aplicação dos tratamentos, através da pesagem em balança analítica, em seguida o material foi congelado em freezer - 80°C para a posterior liofilização. A massa seca foi obtida após a liofilização das amostras (BARBOSA, 2002). A umidade das sementes foi determinada segundo Slavik (1974), utilizando-se a seguinte relação: **UMIDADE = (MF – MS)/(MF) X 100 (%)**

5.2.2 Teste da condutividade elétrica e integridade de membranas

Foi usada a metodologia citada por Vieira & Krzyzanowski (1999) em quatro repetições de 25 sementes de cada tratamento, onde foram pesadas em balança analítica sendo colocadas em copos plásticos contendo 75 mL de água destilada. Em seguida, os copos foram

colocados em germinador a 25°C por 24h (Figura 14A) e logo depois se procedeu à leitura das soluções contendo os lixiviados das sementes em um aparelho condutivímetro DIGIMED CD 21 (Figura 14C), previamente calibrado.

Os resultados das leituras foram divididos pela massa das amostras e a condutividade foi expressa em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ de semente. Após leitura a 25 °C as amostras foram colocadas em Erlenmeyer em banho-maria como água fervente por 1 h (Figura 14B). Em seguida, foram feitas novas leituras no condutivímetro. A porcentagem de danos de membranas das sementes foi estimada pelo método de vazamento de eletrólitos descrito por Blum & Ebercon (1981) pela seguinte relação: $\%DM = (L_1/ L_2) \times 100$, onde L_1 representa a leitura de condutividade do extrato a 25 °C após 24 h de incubação e L_2 a leitura após a fervura em banho-maria por 1 h.

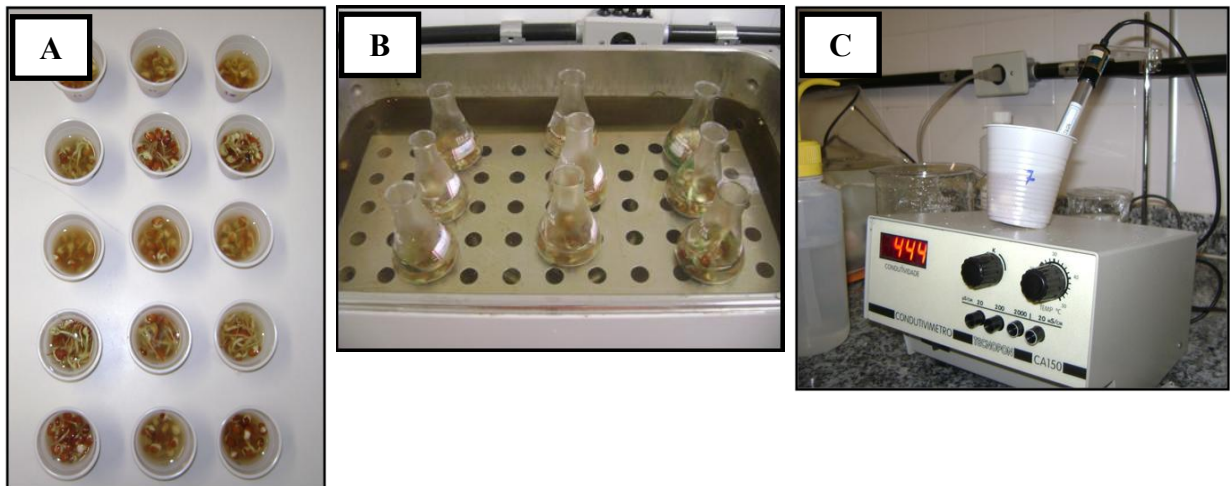


Figura 14 – Teste da condutividade elétrica a 25 °C por 24 h (A), fervura em banho Maria por 1 h para a determinação da % de danos de membranas (B) e aparelho de condutivímetro usado para as leituras de condutividade elétrica (C).

5.2.3 Teste de germinação

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento, semeadas em rolos de papel germitest, umedecidos com água o equivalente a 2,5 vezes a massa do do substrato seco e colocado para germinar a 25°C em uma BOD. As avaliações foram realizadas no 3° e 7° dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de germinação com base no numero de plântulas normais, segundo as Regra de Análise de Sementes (RAS) para esta espécie (BRASIL, 2009).

5.2.4 Teste de emergência de plântulas

Este teste foi conduzido conforme recomendado por Borghetti & Ferreira (2004). Para esta avaliação, quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento foram semeadas em canteiro de 10 x 1,0 m, com 10 cm de espaçamento entre as repetições. As irrigações foram feitas sempre que necessário, visando o fornecimento de água necessária para a germinação das sementes e emergência das plântulas. O teste foi avaliado oito dias após a semeadura, sendo computada a porcentagem de plântulas normais (% emergência de plântulas). Para a determinação do índice de velocidade de emergência (IVE), foram feitas contagens diárias das plântulas emergidas, a partir da instalação do teste de emergência até o décimo dia após a semeadura. Foram consideradas como emergidas as plântulas cujos cotilédones afloraram à superfície do solo (NAKAGAWA, 1999). O IVE foi calculado conforme Maguire (1962). O tempo médio de emergência (TME) obtido através de contagens diárias das plântulas emergidas até o décimo dia após a semeadura e calculado através de fórmula proposta por Labouriau (1983), com os resultados expressos em dias.

5.2.5 Açúcares solúveis e amido

Para a determinação dos teores de açúcares solúveis, foi utilizado o pó liofilizado de cada tratamento. Foram feitas duas extrações com 50 mg do pó e 5mL de etanol a 80% em banho-maria a 70 °C por 30 minutos, sendo logo após centrifugadas por 10 min a 3.000 g e separados os sobrenadantes. O precipitado foi armazenado para análises de amido. A partir da mistura dos dois sobrenadantes foi feita a reação para dosagem dos açúcares solúveis. A dosagem foi realizada espectrofotometricamente pelo método “fenol-sulfúrico”, descrito por Dubois *et al.* (1956). Com o precipitado armazenado foram feitas duas novas centrifugações por 10 min a 3.000 g, agora com ácido perclórico 30%, após o mesmo ter sido deixado sob agitação constante por 20 min. Do sobrenadante obtido procedeu-se a determinação de amido pelo método de antrona, descrito por Hodge & Hofreiter (1962).

5.2.6 Aminoácidos livres

O sobrenadante obtido da extração etanólica para a determinação de açúcares solúveis foi utilizado para a determinação da concentração de aminoácidos livres (AAL), segundo método descrito por Peoples *et al.* (1989), com algumas modificações feitas por

Brilhante (2003). Alíquotas de 0,1 mL do extrato foram colocadas em tubos de ensaio e acrescidas de 0,4 mL de água mille-Q. Em seguida 0,25 mL de uma solução tamponada, pH 5,0, contendo $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de citrato e 0,25 mL do reagente de ninhidrina (KCN $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e ninhidrina 5% em methoxy etanol) foram adicionados. Após misturar bem em vortex os tubos foram hermeticamente fechados e colocados em banho-maria fervente, onde permaneceram pelo tempo de 15 min. à temperatura de $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, a reação foi interrompida em banho de gelo, momento em que foram adicionados 1,5 mL de uma solução de etanol 50% (v/v). Após os tubos permanecerem por 20 minutos em temperatura ambiente foram feitas leituras em espectrofotômetro, a 570 nm, sendo os teores de aminoácidos livres, determinado com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de uma mistura padronizada de L – glutamina.

5.2.7 Proteínas solúveis

Amostras de 50 mg de material liofilizado foram incubadas com 1,3 mL de uma solução tampão (Tris-HCl $0,1 \text{ M}$ com CaCl_2 $2,6 \text{ mM}$ e PVP 1% pH 7,4) e submetidas à extração em agitador horizontal durante 2 horas. Em seguida, foram centrifugados a 15.000 g por 15 min, a 4°C . Logo após, os sobrenadantes foram coletados e determinadas a concentração de proteínas solúveis segundo o método descrito por Bradford (1976). Alíquotas de 0.1 mL foram coletadas do extrato e 2,5 mL do reagente de Bradford adicionado. Após 15 min em temperatura ambiente foram feitas leituras em espectrofotômetro, a 595 nm. A concentração de proteínas solúveis foi calculada com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de albumina soro bovino (BSA) (SIGMA).

5.2.8 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica (protease) foi medida segundo Ainouz & Freitas (1991). A extração foi feita com amostras de 100 mg de material liofilizado e a adição de 2 mL de tampão fosfato $0,02\text{M}$ com 10 mM de mercaptanol pH 7,6 em agitador horizontal por 2 h a 4°C e após, feita centrifugação a 15.000 g por 15 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Alíquotas de 1 mL do extrato enzimático foi adicionado a $500 \text{ }\mu\text{L}$ de azoalbumina 1 % em tampão fosfato $0,1 \text{ M}$ pH 6,0 e colocados em banho-maria a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h . Posteriormente, foram adicionados ao meio de reação $500 \text{ }\mu\text{L}$ de TCA 10% e feita uma nova centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. Em seguida, a 1,5 mL do sobrenadante foram adicionados $500 \text{ }\mu\text{L}$ de NaOH 2N. Depois foram

feitas leituras em espectrofotômetro a 440 nm. Uma unidade de atividade da protease foi definida como a quantidade da enzima necessária para aumentar 0,1 unidades de absorvância a 440 nm por cm^{-3} de extrato por h^{-1} (1 UA = 0,01 Absorvância).

5.2.9 Atividade amilásica ($\alpha + \beta$ - amilase)

Na determinação da atividade amilásica, a extração e a dosagem seguiram o método descrito por Bernfeld (1955), modificado por Khader (1992). Extraíram-se 0,1g de material liofilizado em 5 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M com CaCl_2 2,6 mM e PVP 1% pH 7,4. Após homogeneização, as amostras foram submetidas a centrifugação a 11.000 g, por 10 minutos. Todo o procedimento de extração foi realizado a 4 °C e o sobrenadante obtido constituiu o extrato enzimático. A 0,1 mL do extrato, adicionou-se 0,1 mL de amido solúvel 1% em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,4 e realizada posterior incubação a 37 °C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 0,2 mL de uma solução de TDNS 0,04 M em NaOH 1 M.. A partir daí, procedeu-se às leituras pelo método descrito por Miller (1959), portanto, determinou-se as atividades destas enzimas, pela capacidade de promover a hidrólise do amido. Os resultados da atividade enzimática foram expressos em mmol de maltose por grama de massa seca por minuto. Já a atividade específica foi expressa em mmol de maltose por miligrama de proteína por minuto.

5.2.10 Atividade da peroxidase do ascorbato (APX - EC 1.11.1.11)

A atividade da APX foi avaliada de acordo com McKersie & Leshem (1994). O ensaio consistiu em uma mistura de 50 μL do extrato enzimático, tampão fosfato a 50 mM , pH 6,0, EDTA a 0,1 μM , ascorbato a 0,5 mM e H_2O_2 a 1 mM em um volume total de 1,5 mL. A oxidação do ascorbato foi monitorada pela leitura em absorvância de 290 nm no momento da adição do H_2O_2 e 1 minuto após. A diferença na absorvância (ΔA_{290}) foi dividida pelo coeficiente de extinção molar do ascorbato ($2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e a atividade enzimática será expressa como μmol de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de MS e a atividade específica em μmol de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína, considerando que 2 moles do ascorbato são necessários para a redução de 1 mol de H_2O_2 .

5.2.10 Conteúdo de ascorbato reduzido

O conteúdo de ascorbato reduzido foi mensurado de acordo com Law *et al.* (1983) e Córdoba-Pedregosa *et al.* (2003). O procedimento de extração foi com uma amostra de 500 mg de material fresco macerados com 1,5 mL de TCA 1% (m/v). A suspensão foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos e o sobrenadante utilizado para os ensaios. Aliquotas de 500 μ L do extrato foram adicionados a 12,5 μ L de NaOH 5 M. A mistura foi então centrifugada a 3.500 g, por 2 minutos. O precipitado foi descartado e 200 μ L do sobrenadante foram adicionados a 200 μ L de tampão fosfato 150 mM, pH 7,4 e 200 μ L de água destilada. As amostras foram então misturadas em Vórtex e deixadas à temperatura ambiente por 30 segundos. Em seguida, 400 μ L de TCA 10%, 400 μ L de H₃PO₄ 44% (v/v), 400 μ L de Bpiridil 4% em etanol 70% e 300 μ L de FeCl₃ foram, nessa ordem, adicionados. Os tubos foram misturados vigorosamente e incubados a 37 °C por 45-60 minutos. As amostras foram então lidas em um espectrofotômetro, no comprimento de onda de 525 nm. O conteúdo de ascorbato reduzido foi calculado a partir de curva padrão de ascorbato e os dados foram expressos em μ mol g⁻¹ MS.

5.2.11 Peroxidação de lipídios

A peroxidação de lipídios foi mensurada pelo método de Heath & Packer (1968). Portanto, amostras de 50 mg de tecido liofilizado foram maceradas com 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1 % (m/v). A suspensão foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos e o sobrenadante utilizado para os ensaios. A mistura contendo 500 μ L do extrato mais 2 mL do reagente contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,5% (m/v), dissolvido em TCA a 20% (m/v) foi incubada em banho-maria fervente por 1 hora. As leituras foram realizadas nas absorvâncias de 532 e 660 nm. A segunda leitura foi subtraída da primeira para obtenção da leitura específica e a peroxidação de lipídios foi calculada através do coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa em nmol MDA-TBA g⁻¹ de MS.

5.3 Resultados e discussão

O envelhecimento acelerado tem sido eficiente para avaliar o vigor de lotes de sementes de feijoeiro e acompanhar a sua variação durante o período de armazenamento, visto que acelera o processo de deterioração das sementes (KRZYZANOWSKI *et al.*, 1982; MARCOS FILHO, 1999). Neste estudo o envelhecimento artificial por 72 h (T2) provocou uma redução significativa na massa fresca das sementes, aproximadamente 18% quando se compara com o controle (T1). Quando se fez um pré-tratamento das sementes de feijão-decorda com 0,85 mM de AsA, antes do envelhecimento, a redução foi somente de 8%, como observado no tratamento T3. Quando as sementes após as 72 h de envelhecimento foram tratadas com 0,85 mM de AsA (T4), a massa fresca das sementes foi quase duas vezes superior aquela do controle (T1) (Figura 15A).

Resultados semelhantes aos encontrados para massa fresca também foram observados para a massa seca das sementes, onde no T4 houve um aumento de aproximadamente duas vezes em relação ao controle (T1), já o envelhecimento por 72 h (T2) reduziu significativamente a massa seca das sementes em aproximadamente 16% (Figura 15B). Já é conhecido na literatura que a umidade relativa alta combinada a uma temperatura elevada existente na câmara de envelhecimento artificial, acelera o processo de deterioração das sementes, reduzindo assim sua massa total (ABBA & LOVATO, 1999).

Não houve modificações significativas, na umidade das sementes, nos tratamentos T1, T2 e T4. Entretanto foi observado que o tratamento T3 provocou um acentuado aumento no teor de água das sementes (Figura 15C). Isso talvez possa ser explicado, porque as sementes têm natureza higroscópica e, dependendo das condições ambientais nas quais são submetidas, podem ganhar ou perder água facilmente (COPELAND & McDONALD, 1995). Sendo assim, as condições de umidade elevada e alta temperatura condicionadas pelo envelhecimento artificial, talvez tenham interferido significativamente no teor de água das sementes do T3, pois o pré-tratamento com ácido ascórbico já foi como uma pré-embebição das sementes.

Foi observado também que houve um acentuado crescimento de fungos no T3 com o envelhecimento (dados não apresentados). Esse fato confirma que o armazenamento de sementes de feijoeiro com teor de água superior a 13% resultará em danos provocados por mudanças no metabolismo celular, como o aumento da atividade enzimática e respiratória das sementes, propiciando o desenvolvimento de fungos, que serão favorecidos pela alta temperatura (VIEIRA & YOKOYAMA, 2000).

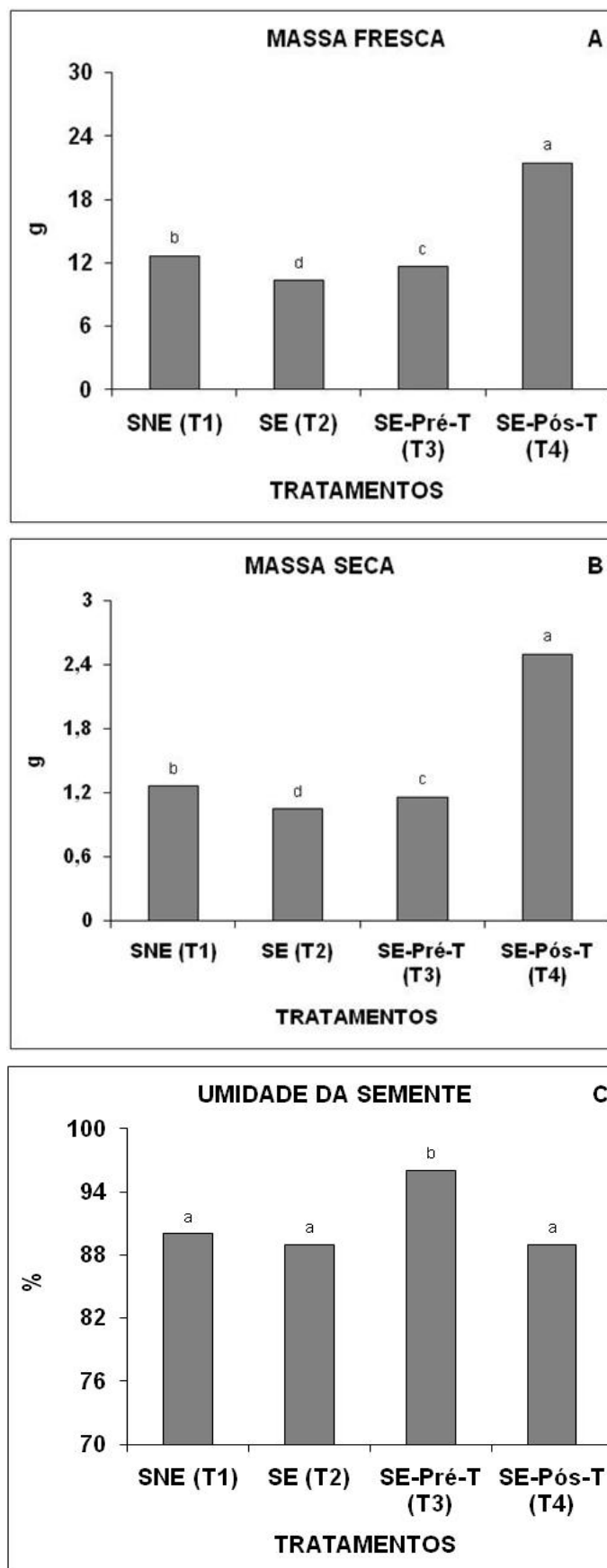


Figura 15 - Massa fresca (A), massa seca (B) e umidade (C) das sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos (SNE = Sementes não envelhecidas; SE = Sementes envelhecidas por 72 h; SE-Pré-T = sementes pré-tratadas com 0,85 mM de AsA e após envelhecidas por 72 h e SE-Pós-T = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 0,85 mM de AsA). Colunas seguidas pela mesma letra minúscula, nos diferentes tratamentos não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

O envelhecimento por 72 h provocou um maior vazamento de eletrólitos nas sementes do T2 ($51,81 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ de semente), comparado com o controle (T1), que foi de somente $39,96 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ de semente. Surpreendentemente, o T4 conseguiu igualar aos resultados apresentados pelo controle, não havendo assim diferença significativa entre esses tratamentos, tendo apresentando um menor vazamento de eletrólitos, quando comparado com o T2 (Figura 16A). Entretanto, o T3 apresentou um vazamento de eletrólitos superior até mesmo em relação ao T2, de $81,81 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ de semente (FIGURA 16A). Esses resultados corroboraram aos observados com o percentual de danos de membranas, que avalia a integridade das membranas celulares, onde os T2 e T3 apresentaram os maiores percentuais de danos nas membranas quando comparado com os demais tratamentos (Figura 16B).

Neste trabalho o teste da C.E também se mostrou eficiente na identificação dos danos provocados pelo envelhecimento nas sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, como já relatado em sementes de outras espécies vegetais (FERGUSON, 1995; SALINAS *et al.*, 2001). O teste da C.E mostrou-se eficiente também na distinção entre lotes de sementes de feijão-de-corda cv. Setentão e EPACE 10 (DUTRA *et al.*, 2006; DUTRA & TEÓFILO, 2007).

Do mesmo modo, quando se avaliou a integridade das membranas celulares, através da peroxidação de lipídios, os resultados mostraram que o envelhecimento por 72 h provocou um aumento de 51% no nível de peroxidação de lipídios do T2, em relação ao controle (T1). Esse aumento foi ainda maior no T3, de 80% em relação ao controle. Semelhantemente, em sementes de *Ginko biloba* L. houve um significável aumento da peroxidação de lipídios tanto no embrião quanto no endosperma durante o armazenamento (TOMMASI *et al.*, 2006). Um dos eventos iniciais da seqüência de deterioração das sementes durante o processo de envelhecimento é a degradação das membranas celulares (BINOTTI *et al.*, 2008), principalmente devido a peroxidação de lipídios induzida pelo envelhecimento que potencialmente danifica as membranas de tecidos de sementes (SUNG & JENG, 1994).

Neste trabalho foi observado que o envelhecimento das sementes por 72h (T2) provocou danos significativos nas membranas celulares das sementes de feijão-de-corda, como foi evidenciado por uma aumento significativo no vazamento de eletrólitos mostrado no teste da condutividade elétrica (C.E) e um maior nível de peroxidação de lipídios (Figura 16A e 16C). Em função da desorganização das membranas celulares, as sementes tendem a reduzir assim o seu vigor, o que pode ser verificado pelo aumento do vazamento de solutos durante o processo de embebição das sementes (MARCOS FILHO *et al.*, 1990; SALINAS *et al.*, 1998; VIEIRA & KRZYZANOWSKI, 1999).

De modo interessante, no T4 proporcionou uma redução na peroxidação de lipídios, atingindo valores próximos aos do controle (Figura 16C), resultado estes semelhantes ao observado com folhas de plantas de milho sob estresse hídrico pulverizadas com ácido ascórbico (DOLATABADIAN *et al.*, 2009). No entanto, embora na literatura existam resultados sobre o efeito inibitório do AsA sobre a peroxidação de lipídios, o mecanismo real desse efeito ainda não foi esclarecido (DOLATABADIAN *et al.*, 2008).

Estudos com sementes de algodão mostraram que a presença de antioxidantes como o ácido ascórbico protegeu a semente contra a peroxidação de lipídios e as ERO induzidas pelo envelhecimento (McDONALD, 1999). Em algodão, sementes envelhecidas artificialmente a 40 °C e 100% de umidade relativa tiveram suas membranas deterioradas, sendo isso correlacionado com o acúmulo de peróxidos e redução na germinação (ANURADHA *et al.*, 2003). O mesmo foi observado neste estudo, com a germinação das sementes do T2, onde houve uma redução significativa com o envelhecimento por 72 h (Figura 17).

No teste de germinação, que avalia o potencial de germinação das sementes, foi observado que o envelhecimento (T2) provocou uma significativa redução na porcentagem de germinação das sementes de feijão-de-corda, de quase 19%, quando se comparou com a germinação das sementes do T1. Essa redução foi mais drástica ainda no T3, equivalente a 35%. Já no T4, as sementes apresentaram uma porcentagem de germinação superior à observada no tratamento controle (Figura 17). Isso está de acordo com o verificado por Dolatabadian & Modarres Sanavy (2008), onde o tratamento de sementes de oleaginosas com ácido ascórbico melhorou o potencial de germinação dessas sementes quando submetidas ao armazenamento prolongado. Um importante papel do AsA no controle da divisão celular, já foi proposto na literatura (ARRIGONI, 1994; POTTERS *et al.*, 2002.), embora o mecanismo molecular subjacente a este fenômeno ainda não esteja tão claro.

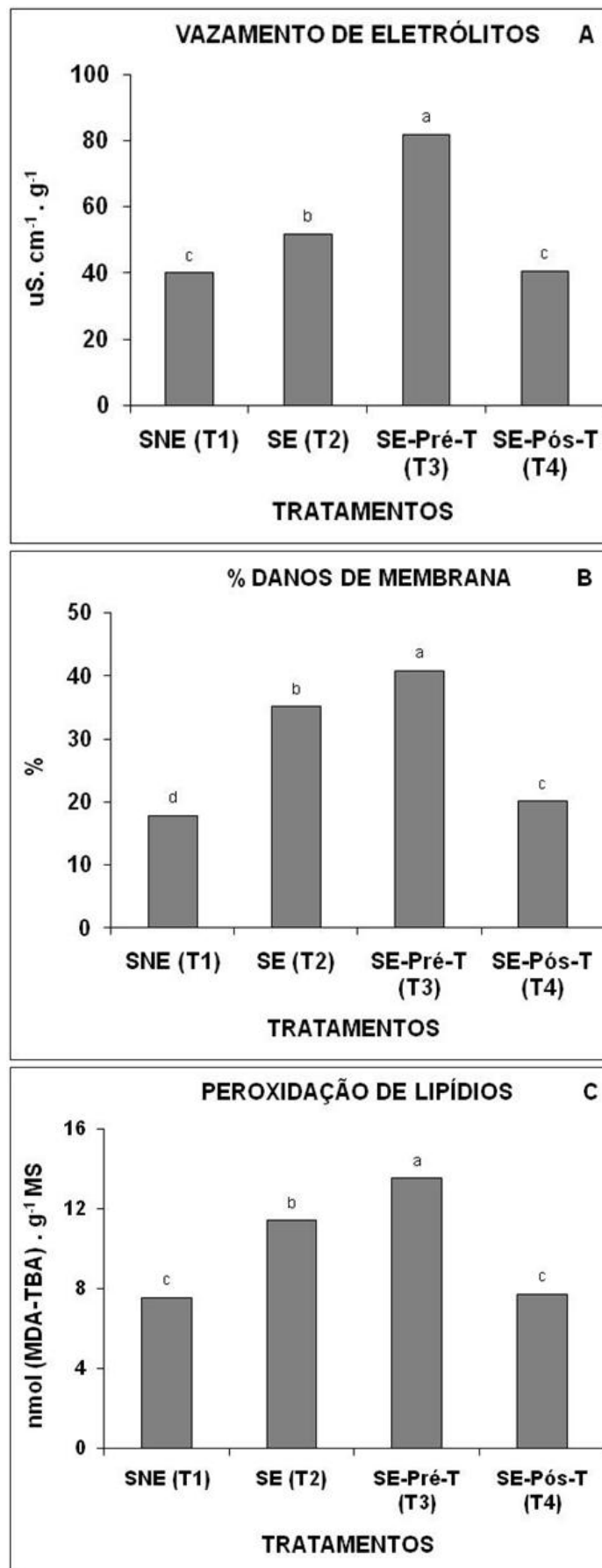


Figura 16 – Vazamentos de eletrólitos (A), % de danos de membranas (B) e peroxidação de lipídios (C) das sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos (SNE = Sementes não envelhecidas; SE = Sementes envelhecidas por 72 h; SE-Pré-T = sementes pré-tratadas com 0,85 mM de AsA e após envelhecidas por 72 h e SE-Pós-T = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 0,85 mM de AsA). Colunas seguidas pela mesma letra minúscula, nos diferentes tratamentos não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

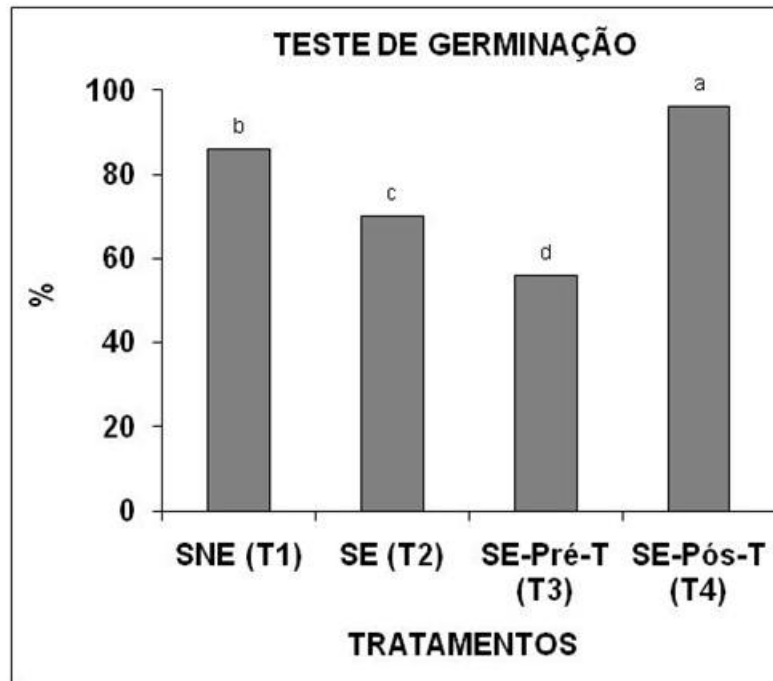


Figura 17 – Porcentagem de germinação das sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos (SNE = Sementes não envelhecidas; SE = Sementes envelhecidas por 72 h; SE-Pré-T = sementes pré-tratadas com 0,85 mM de AsA e após envelhecidas por 72 h e SE-Pós-T = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 0,85 mM de AsA). Colunas seguidas pela mesma letra minúscula, nos diferentes tratamentos não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os resultados do teste de emergência no campo mostraram que as sementes dos T2 e T3 apresentaram um menor índice de velocidade de emergência (IVE) (10,35 e 9,8, respectivamente), quando comparado com os das sementes dos tratamentos T1 e T4 (11,25 e 11,24, respectivamente). Portanto, houve um atraso na emergência das sementes de feijão-de-corda no campo, como mostrado em todos os índices avaliados do teste de emergência (% emergência, IVE e TME) com o envelhecimento nos T2 e T3 (Tabela 4). De acordo com Borghetti & Ferreira (2004), a deterioração das sementes provoca danos oxidativos nas reservas necessárias para o crescimento do eixo embrionário. A deterioração das sementes afeta a germinação total, a velocidade de germinação, a velocidade de absorção de água e as reações bioquímicas, que determinam todo o processo germinativo. Também já foi demonstrado por Dantas *et al.* (2005) que concentrações de NaCl acima da 50 mM afetam a germinação, vigor das sementes e o crescimento de plântulas de feijão-de-corda.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos T2 e T3 e nem entre os tratamentos T1 e T4 para a variável IVE. O mesmo foi observado com a porcentagem de emergência e o tempo médio de emergência das plântulas no campo (Tabela 4). Essa

influência positiva do ácido ascórbico na emergência das plântulas do T4, talvez possa ser explicado pelo fato do ácido ascórbico está envolvido, com diversos processos celulares e, dentre esses, a regulação da transição da fase G1 para S no ciclo celular (POTTERS *et al.*, 2002) e o controle do crescimento pelo alongamento das células (PASSARDI *et al.*, 2004).

Tabela 4 - Valores médios do índice de velocidade de emergência (IVE), emergência de plântulas (%) e tempo médio de emergência (TME) de sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a quatro diferentes tratamentos (SNE, SE, SE-Pré-T e SE-Pós-T).

TRATAMENTOS	Índice de Velocidade de Emergência-IVE	Emergência de Plântulas (%)	Tempo Médio de Emergência (dias)
T1 SNE	11,25 a	98 a	4,3 a
T2 SE	10,35 b	90 b	5,2 b
T3 SE-Pré-T	9,80 b	88 b	5,5 b
T4 SE-Pós-T	11,24 a	94 a	4,0 a
C.V. (%)	11,16	16,5	3,70

*As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

No presente trabalho, o estresse oxidativo gerado pelo envelhecimento acelerado por 72 h ocasionou mudanças em todas as variáveis bioquímicas avaliadas nas sementes de feijão-de-corda. Observou-se uma redução no teor de amido, aumento no teor de açúcares solúveis, maior atividade amilásica total, redução no conteúdo de proteínas solúveis, aumento no teor de aminoácidos livres e uma maior atividade proteolítica no T2 quando comparado com as sementes não envelhecidas do T1 (Figuras 18 e 19). É conhecido que as ERO geradas pelo estresse oxidativo provoca danos nas macromoléculas biológicas, tais como carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos (PASTORI & FOYER, 2002). Os danos oxidativos aos lipídios, proteínas e outros componentes celulares são considerados a maior causa da deterioração de sementes armazenadas (MURTHY *et al.*, 2002).

Foi verificado que as sementes do T2 apresentaram uma redução no teor de amido quando comparados com as sementes do T1. Essa redução foi mais evidente ainda no T3, de 9%. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os teores de amido das sementes provenientes do T4 e aqueles das sementes do tratamento controle (T1) (Figura 18A). Esses teores de amido foram correlacionados inversamente com os conteúdos de açúcares solúveis (AS) apresentados em todos os tratamentos analisados, onde, os T2 e o T3

apresentaram um maior conteúdo de AS e os T1 e T4 um menor conteúdo de AS (Figura 18B). Houve uma maior atividade amilásica nos tratamentos T2 e T3 quando comparado com os T1 e T4, tanto nos resultados expressos como atividade total, quanto nos de atividade específica (Figuras 18C e 18D).

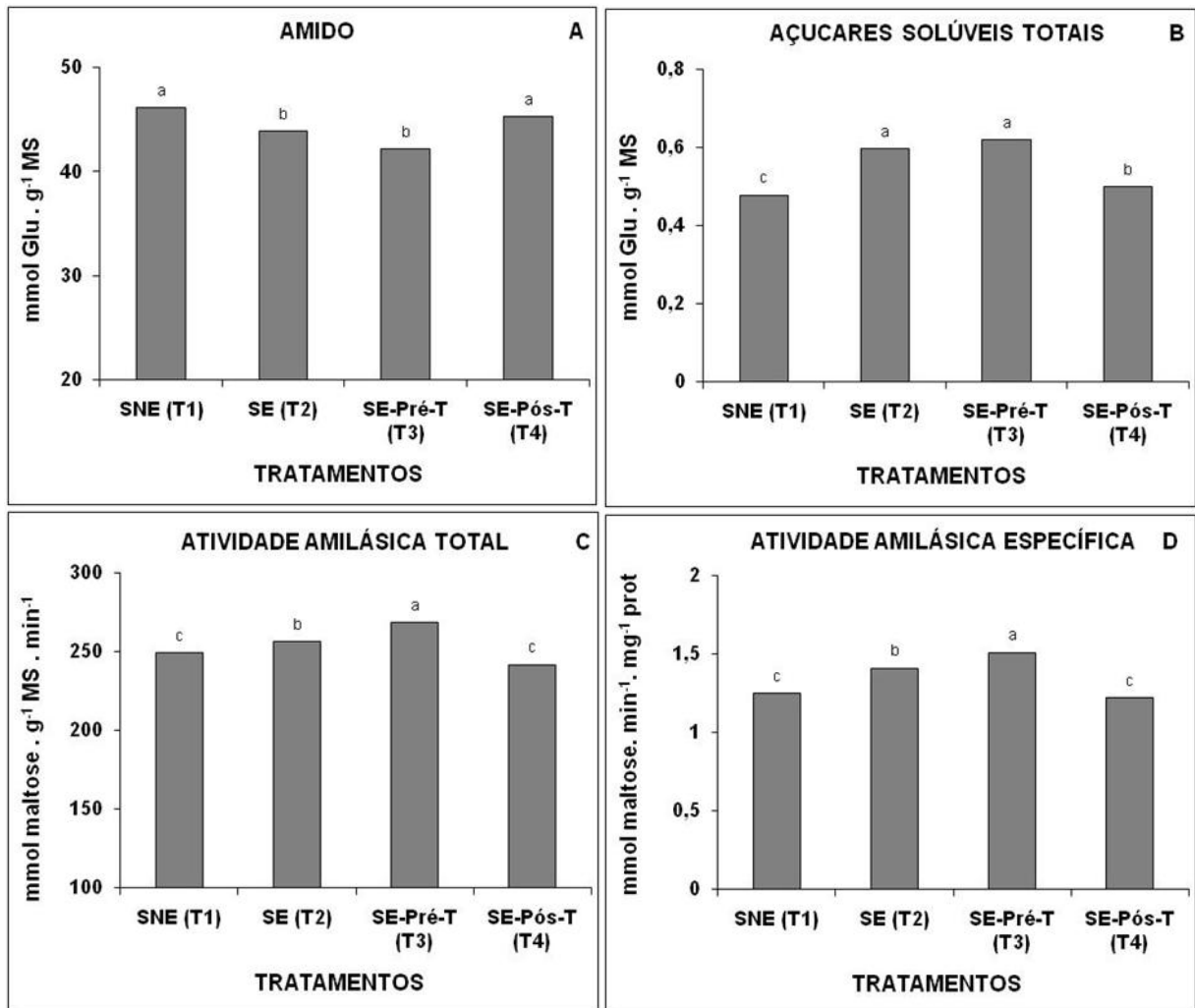


Figura 18 – Teor de amido (A), açúcares solúveis totais (B), atividade enzimática amilásica total (C) e Atividade amilásica total específica (D) das sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos (SNE = Sementes não envelhecidas; SE = Sementes envelhecidas por 72 h; SE-Pré-T = sementes pré-tratadas com 0,85 mM de AsA e após envelhecidas por 72 h e SE-Pós-T = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 0,85 mM de AsA). Colunas seguidas pela mesma letra minúscula, nos diferentes tratamentos não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

O envelhecimento das sementes de feijão-de-corda provocou uma maior degradação de proteínas, como observados nos T2 e T3, que apresentaram os menores conteúdos de proteínas solúveis (14%) em relação àquele do controle. Isso foi evidenciado por uma maior atividade proteolítica nos tratamentos T2 e T3 (Figura 19B). Porém, o mesmo não foi observado quando as sementes foram submetidas ao T4, onde o conteúdo de proteínas solúveis foi o mesmo que o das sementes do T1, não havendo diferença significativa entre esses tratamentos (Figura 19A). Os tratamentos T1 e T4 apresentaram uma menor atividade proteolítica (Figura 19B). Esses resultados de proteínas solúveis e atividade proteolítica foram correlacionados com os conteúdos de aminoácidos livres (AAL) apresentados em todos os tratamentos analisados, onde, os T2 e T3 apresentaram os maiores conteúdos de AAL e os T1 e T4 os menores. O conteúdo de AAL nos tratamentos T2 e T3 foi de 2,2 vezes superior àquele do T1 e de 1,4 vezes ao do T4 (Figura 19C).

O envelhecimento das sementes de feijão-de-corda por 72 h (T2) provocou uma redução no nível de ascorbato reduzido quando comparado com o controle. O mesmo aconteceu em maior intensidade no T3, onde a redução foi de 30% (Figura 20A). O T3 também provocou uma redução na atividade da APX em 21% comparada ao controle (Figura 20B). De maneira similar, em sementes de algodão envelhecidas artificialmente, a atividade da APX decresceu progressivamente durante o curso do envelhecimento (GOEL *et al.*, 2003). Também em amendoim, o estudo do efeito do envelhecimento acelerado na germinação de sementes de duas cultivares mostrou que houve inibição da germinação e estabelecimento de plântulas, ocorrendo um aumento na peroxidação de lipídios e decréscimo na atividade de APX (SUNG & JENG, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Neste estudo os níveis de ascorbato reduzido do T4 foram maiores que os do tratamento T1 (Figura 20A). A atividade da APX também foi superior no T4 quando comparada aos tratamentos T2 e T3, evidenciando assim uma maior defesa antioxidativa das sementes ao envelhecimento neste tratamento. A manutenção da concentração de AsA e a maior atividade das enzimas removedoras de ERO em sementes durante o armazenamento é fundamental para manter o seu potencial fisiológico (FOYER & NOCTOR, 2000).

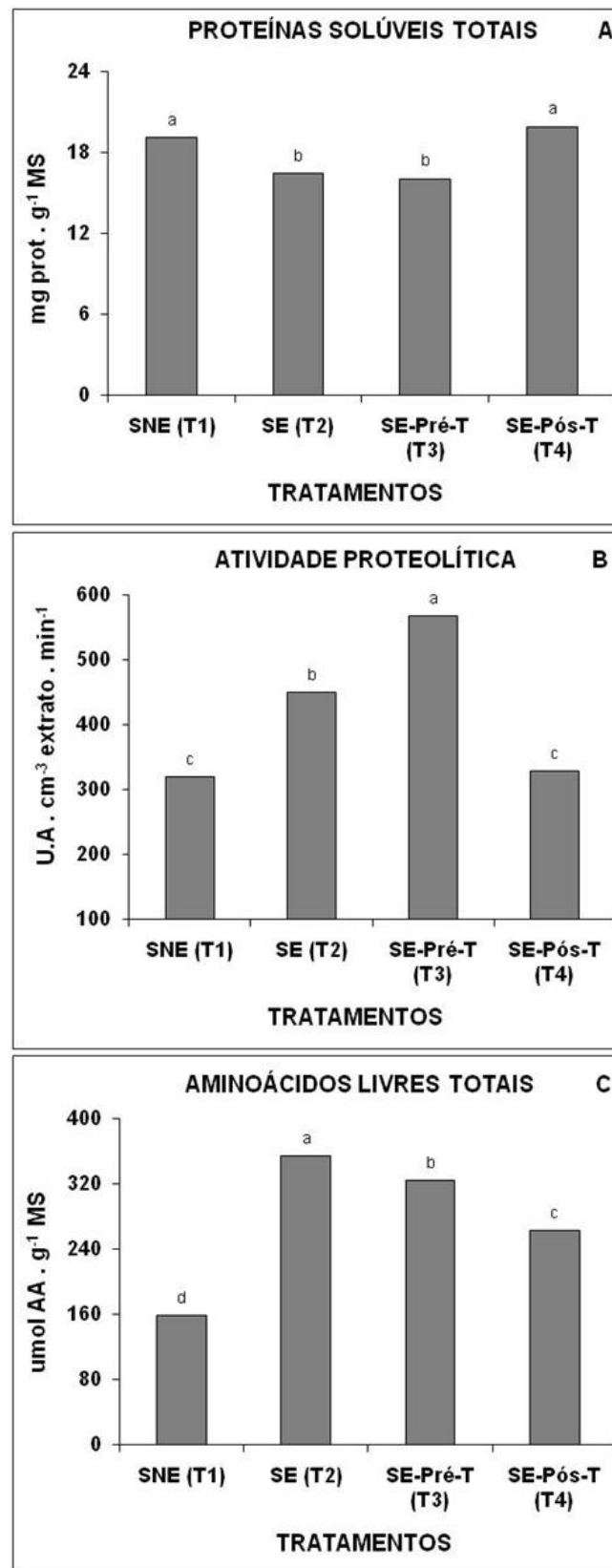


Figura 19 – Teor de proteínas solúveis (A), atividade proteolítica (B) e teor de aminoácidos livres totais (C) das sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos (SNE = Sementes não envelhecidas; SE = Sementes envelhecidas por 72 h; SE-Pré-T = sementes pré-tratadas com 0,85 mM de AsA e após envelhecidas por 72 h e SE-Pós-T = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 0,85 mM de AsA). Colunas seguidas pela mesma letra minúscula, nos diferentes tratamentos não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

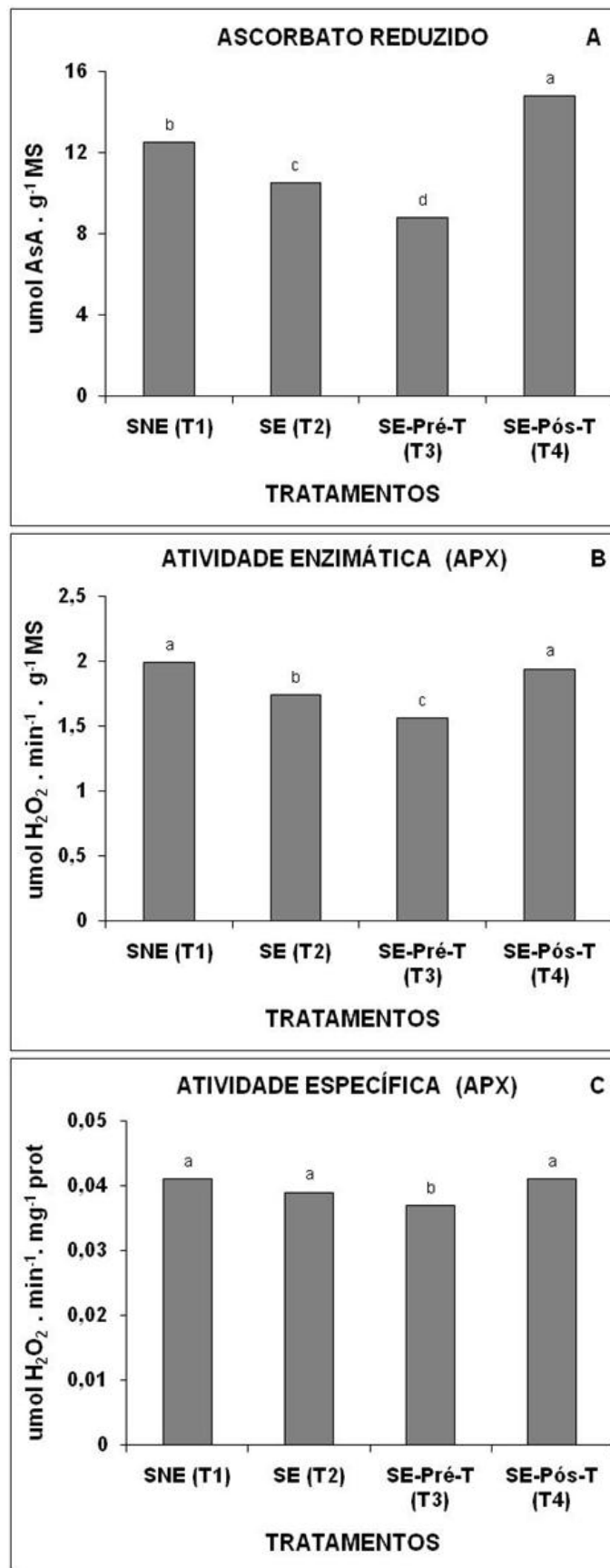


Figura 20 – Conteúdo de ascorbato reduzido (A), atividade enzimática da ascorbato peroxidase (APX) (B) e atividade específica da ascorbato peroxidase (APX) (C) das sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos (SNE = Sementes não envelhecidas; SE = Sementes envelhecidas por 72 h; SE-Pré-T = sementes pré-tratadas com 0,85 mM de AsA e após envelhecidas por 72 h e SE-Pós-T = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 0,85 mM de AsA). Colunas seguidas pela mesma letra minúscula, nos diferentes tratamentos não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

O T3 provocou resultados negativos nas sementes de feijão-de-corda com o envelhecimento por 72 h em todas as variáveis fisiológicas e bioquímicas relacionadas com o vigor e a germinação avaliadas neste estudo. Isso talvez possa ser explicado por um acentuado aumento no teor de água das sementes com o pré-tratamento com AsA observado nas sementes do T3 (Figura 14C). No teste de envelhecimento acelerado, as sementes mais úmidas mostram maior sensibilidade às condições de temperatura e de umidade relativa do ar, por apresentarem atividade metabólica intensificada sob estas condições de ambiente. Portanto, os efeitos do envelhecimento acelerado são mais acentuados em sementes com graus de umidade mais elevados (ROSSETO & MARCOS FILHO, 1995). Sendo assim, neste estudo, o T3 reduziu a germinação de sementes e a emergência de plântulas de feijão-de-corda, não sendo assim um tratamento indicado para melhoria da viabilidade dessas sementes armazenadas em condições inadequadas. Entretanto, a aplicação exogenamente de solução de ácido ascórbico 0,85 mM após o envelhecimento por 72 h nas sementes de feijão-de-corda amenizou os efeitos deletérios provocados pelo envelhecimento no vigor e na germinação dessas sementes. Esse fato foi evidenciado por um maior conteúdo de matéria fresca e seca, maior integridade de membranas, menor peroxidação de lipídios, maior porcentagem de germinação e maior porcentagem de emergência de plântulas no campo quando comparado com o T3 (Figuras 14, 15 e 16; Tabela 4).

5.5 Conclusão

A aplicação exógena de ácido ascórbico 0,85 mM nas sementes de feijão-de-corda após o envelhecimento artificial (pós-tratamento) atenua seus efeitos deletérios provocados no vigor e na germinação dessas sementes.

6. CAPÍTULO III - Influência da aplicação exógena de ácido ascórbico em sementes de feijão-de-corda submetidas ao envelhecimento artificial e à salinidade

6.1 Introdução

No campo diversos fatores bióticos e abióticos podem afetar o desempenho das sementes vegetais, revertendo-se em possíveis perdas agrícolas, principalmente se as mesmas já tiverem a sua viabilidade afetada pelas condições de armazenamento inadequadas (SUBBA RAO *et al.*, 1996; DHAKAI & PONDEY, 2001). A germinação de sementes é comumente inibida pelo aumento do nível de salinidade. O estresse oxidativo induzido pela salinidade resulta na inibição da germinação (AMOR *et al.*, 2005). A salinidade provocada pelo NaCl também pode afetar a germinação por facilitar a entrada de íons tóxicos, que podem provocar mudanças na atividade de certas enzimas e hormônios da semente (SMITH & COMB, 1991). Esses efeitos físico-químicos sobre as sementes parecem resultar em um ritmo mais lento da germinação e emergência. Ambos os efeitos osmóticos e tóxicos dos sais têm implicado na inibição da germinação de sementes (ALLEN *et al.*, 1986).

Cultivares de feijão-de-corda foram testadas para tolerância a salinidade e a seca através da germinação, emergência de plântulas e crescimento em soluções contendo NaCl e PEG, havendo uma redução no crescimento das plântulas em ambos os estresses impostos (MURILLO-AMADOR *et al.*, 2002). Em muitas espécies altas concentrações de NaCl, dificultam a embebição e a germinação das sementes (MURILLO-AMADOR & TROYO-DIÉGUEZ, 2000).

As plantas possuem dois mecanismos para limpeza do excesso de ERO, o mecanismo enzimático e o não-enzimático (RAHNAMA *et al.*, 2003; VAIDYANATHAN *et al.*, 2003). O mecanismo não-enzimático inclui pequenas moléculas, de natureza antioxidante, tais como poliaminas, polióis, alfa-tocoferol (vitamina E), carotenóides, glutathiona e o ácido ascórbico (ASHRAF & HARRIS, 2004; SAIRAM *et al.*, 2005).

O ácido ascórbico possui múltiplas funções no crescimento da planta, atuando na divisão celular, expansão da parede celular, e outros processos de desenvolvimento (SMIRNOFF, 1996; ASADA, 1999; CONKLIN, 2001; PIGNOCCHI & FOYER, 2003). O ácido ascórbico tem sido relatado como um componente importante na defesa antioxidante

dos efeitos adversos induzidos pela seca e pela salinidade (KHAN *et al.*, 2006; WANG & LI, 2006; HAMID *et al.*, 2008; ATHAR, *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009).

Estudos indicam que a aplicação de antioxidantes pode ser usada para regular o crescimento e promover a resistência ao estresse salino em várias espécies vegetais (SHALATA & PETER, 2001; GUNES *et al.*, 2005; KHAN, 2006, GUNES *et al.*, 2007). A aplicação de ácido ascórbico promoveu o crescimento e o rendimento de soja em condições de salinidade (SHETEAWI, 2007). A aplicação exógena de ácido ascórbico aumentou a porcentagem de germinação de sementes de fava e também a capacidade de sobrevivência de mudas aos efeitos tóxicos da exposição a altos níveis de NaCl (YOUNIS *et al.*, 2009). A aplicação de ácido ascórbico nas raízes foi capaz de atenuar os efeitos adversos do estresse salino sobre o crescimento de trigo pelo aumento da capacidade fotossintética e na manutenção da homeostase iônica (Athar *et al.*, 2008).

Apesar de existirem alguns trabalhos demonstrando a eficiência da aplicação do ácido ascórbico na defesa antioxidante em algumas espécies vegetais, ainda não existem estudos sobre o efeito desses antioxidantes não enzimáticos na melhoria da viabilidade ou envigoroamento de sementes de feijão de corda envelhecidas, numa possível aclimação a condições de estresses abióticos, tais como a salinidade. Este trabalho teve como objetivo principal verificar a influência da aplicação exógena de ácido ascórbico no vigor de sementes de feijão de corda envelhecidas submetidas ao estresse salino.

6.2 Material e métodos

As sementes selecionadas e desinfetadas como descrito anteriormente (item 4.2) foram distribuídas e incubadas em caixas “gerbox” devidamente colocadas em câmara de envelhecimento artificial –BOD- (45°C, 99% U.R., no escuro) para promover o envelhecimento das mesmas (DELOUCHE & BASKIN, 1973). As sementes foram retiradas após 72 h de envelhecimento artificial na câmara. Após o envelhecimento, as sementes foram semeadas em papel germitest embebido com: T2 - água desionizada; T3 - 100 mM de NaCl; T4 - 0,85 mM de ácido ascórbico e T5 - 100 mM de NaCl + 0,85 mM de ácido ascórbico. No tratamento controle (T1 - sementes não envelhecidas), a semeadura foi feita somente em água desionizada. Foram feitas coletas em três diferentes estádios de desenvolvimento morfofisiológicos do feijão-de-corda (E2= radícula menor que 5 cm; E5= radícula maior que 5 cm com hipocótilo saindo do papel e E8= radícula maior que 5 cm, com cotilédones saindo do papel, hipocótilo reto e folhas cotiledonares abertas) de acordo com Sousa *et al.* (2003).

Após cada um dos tratamentos citados, foram analisadas as seguintes variáveis fisiológicas e bioquímicas: a) determinações das massas fresca e seca (BARBOSA, 2002); b) determinação do percentual de umidade segundo método de Slavick, (1974); c) teste da condutividade elétrica (vazamento de eletrólitos e percentual de danos de membrana) segundo Vieira & Krzyzanowski (1999) e Blum & Ebercon (1981); d) teste de germinação (BRASIL, 2009); e) açúcares solúveis (DUBOIS *et al.*, 1956); g) teor de amido pelo método da antrona descrito por Hodge & Hofreiter (1962); h) aminoácidos livres (PEOPLES *et al.*, 1989); i) proteínas solúveis (BRADFORD, 1976); j) peroxidação de lipídios (HEATH & PACKER, 1968); l) atividade amilásica total (BERNFELD, 1955); m) atividade proteolítica (AINOUZ & FREITAS, 1991); n) ascorbato reduzido (LAW *et al.*, 1983; CÓRDOBA-PEDREGOSA *et al.*, 2003); o) atividade da peroxidase do ascorbato (APX) (MCKERSIE & LESHEM, 1994). Esses métodos já se encontram detalhados no item 5.2.

Foi realizado também o teste de emergência para avaliar o vigor das sementes em condições de casa de vegetação (Figura 21). As sementes foram semeadas em bandejas de 28 cm x 15 cm contendo areia lavada, em condições de casa de vegetação, com 25 sementes para cada repetição, sendo irrigadas sempre que necessário com os respectivos tratamentos anteriores já descritos (T1, T2, T3, T4, T5). Foram avaliados: a) a emergência das plântulas; b) o índice de velocidade de emergência (IVE); c) o tempo médio de emergência (TME); d) a massa fresca e seca das plântulas e e) teor de água das plântulas, segundo TEÓFILO *et al.* (2008). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições para cada tratamento. Os dados foram analisados estatisticamente, através da análise de variância pela significância do teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

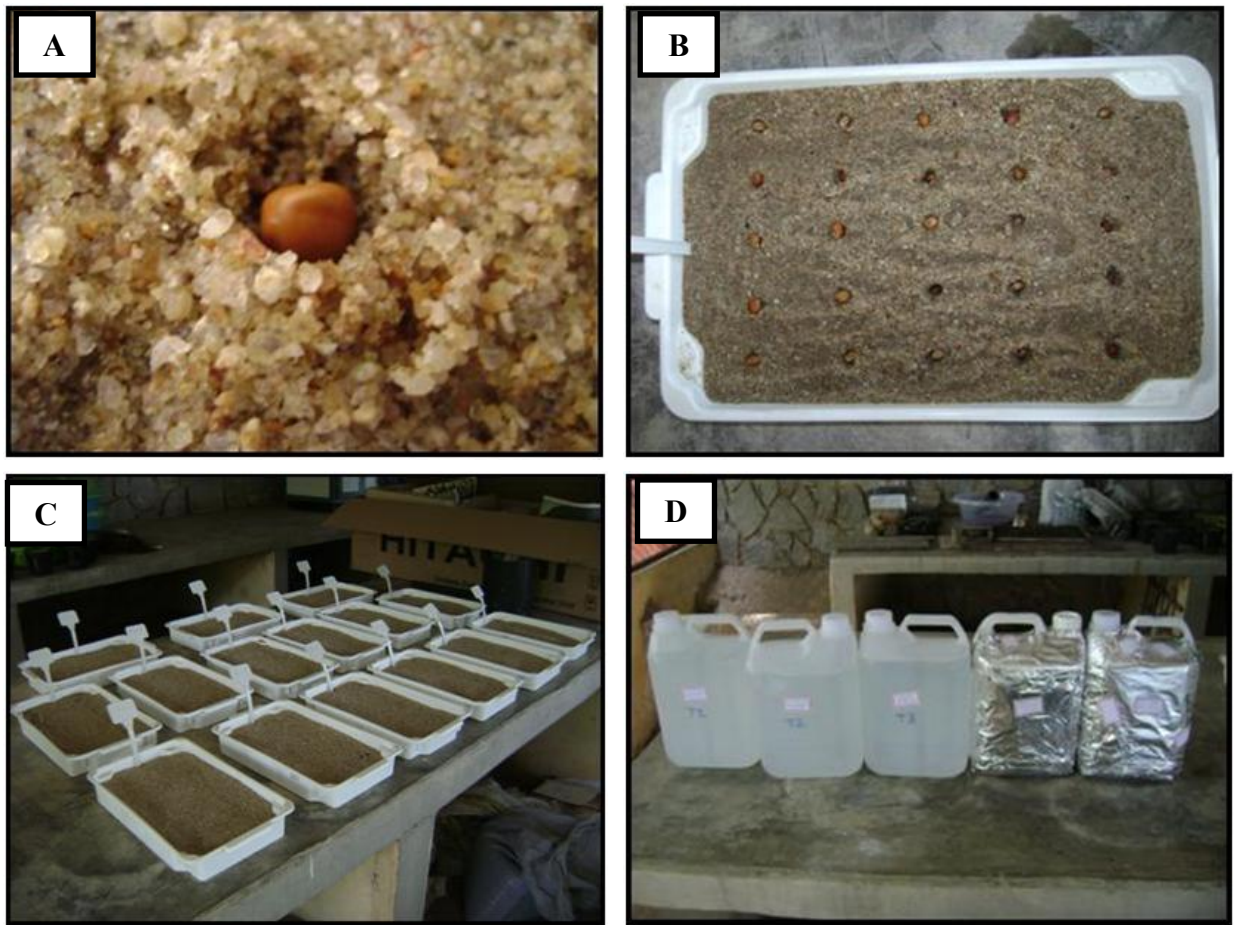


Figura 21 – Teste de emergência em condições de casa de vegetação: semeadura das sementes (A), bandeja contendo cada repetição de 25 sementes de feijão-de-corda (B), visão do stand montado com a distribuição dos respectivos tratamentos (C) e soluções para irrigação com os respectivos tratamentos (D).

6.3 Resultados e discussão

As sementes de feijão-de-corda são armazenadas na maioria das vezes sob condições não controladas contribuindo assim para a perda da sua viabilidade (VIEIRA & YOKOYAMO, 2000). Neste trabalho, o teste de envelhecimento acelerado por 72 h foi capaz de simular essas condições inadequadas de armazenamento nas quais as sementes de feijão-de-corda são submetidas e pode-se de verificar os efeitos negativos sobre os estádios morfofisiológicos da germinação estudados (E2, E5 e E8), através das variáveis fisiológicas e bioquímicas analisadas. O envelhecimento das sementes por 72 h provocou um retardo significativo na germinação das sementes do T2 principalmente nos estádios E2 e E5, como pode ser visualizado na Figura 22, quando comparado com o controle (T1). Isso foi correlacionado com as reduções das massas fresca e seca das sementes deste tratamento (Figuras 22A e 22B), corroborando com o fato já relatado por Dhakai & Pondey (2001), que o envelhecimento afeta a germinação das sementes.

As reduções das massas fresca e seca foram mais evidentes no estágio inicial de germinação (E2), sendo maiores que 22%, talvez por ser um momento crucial para haver a embebição da semente e, com isso, ativação do crescimento do embrião (MARCOS FILHO, 2005) e menos evidente nos estádios finais da germinação, E5 e E8, com reduções de 4,2% e 3,8%, respectivamente (Figuras 22A e 22B). Porém, essa redução na massa total não foi correlacionada com a umidade das sementes, que não sofreu variação significativa em nenhum dos estádios e tratamentos analisados (Figura 22C).

O envelhecimento das sementes também provocou uma redução no vigor das sementes de feijão-de-corda, aumentando significativamente o vazamento de eletrólitos e o percentual de danos de membrana, evidenciados pelo teste da condutividade elétrica (C.E), em todos os tratamentos e estádios estudados, quando comparado com o controle (Figuras 23A e 23B). DUTRA et al. (2006) mostraram que o teste da C.E em sementes de feijão-de-corda é eficiente para avaliação do seu potencial fisiológico (vigor). No presente estudo as sementes envelhecidas apresentaram um maior vazamento de eletrólitos e uma maior porcentagem de danos nas membranas celulares, evidenciado pela maior condutividade elétrica apresentada no T2 (Figuras 23A e 23B), pois segundo Vieira & Krzyzanowsky (1999), uma maior saída de lixiviados da semente sugere um menor vigor da mesma. Lin (1990) verificou que o decréscimo do vigor está diretamente associado ao aumento do vazamento de eletrólitos das sementes sugerindo uma relação íntima entre a deterioração das membranas e a redução no vigor.

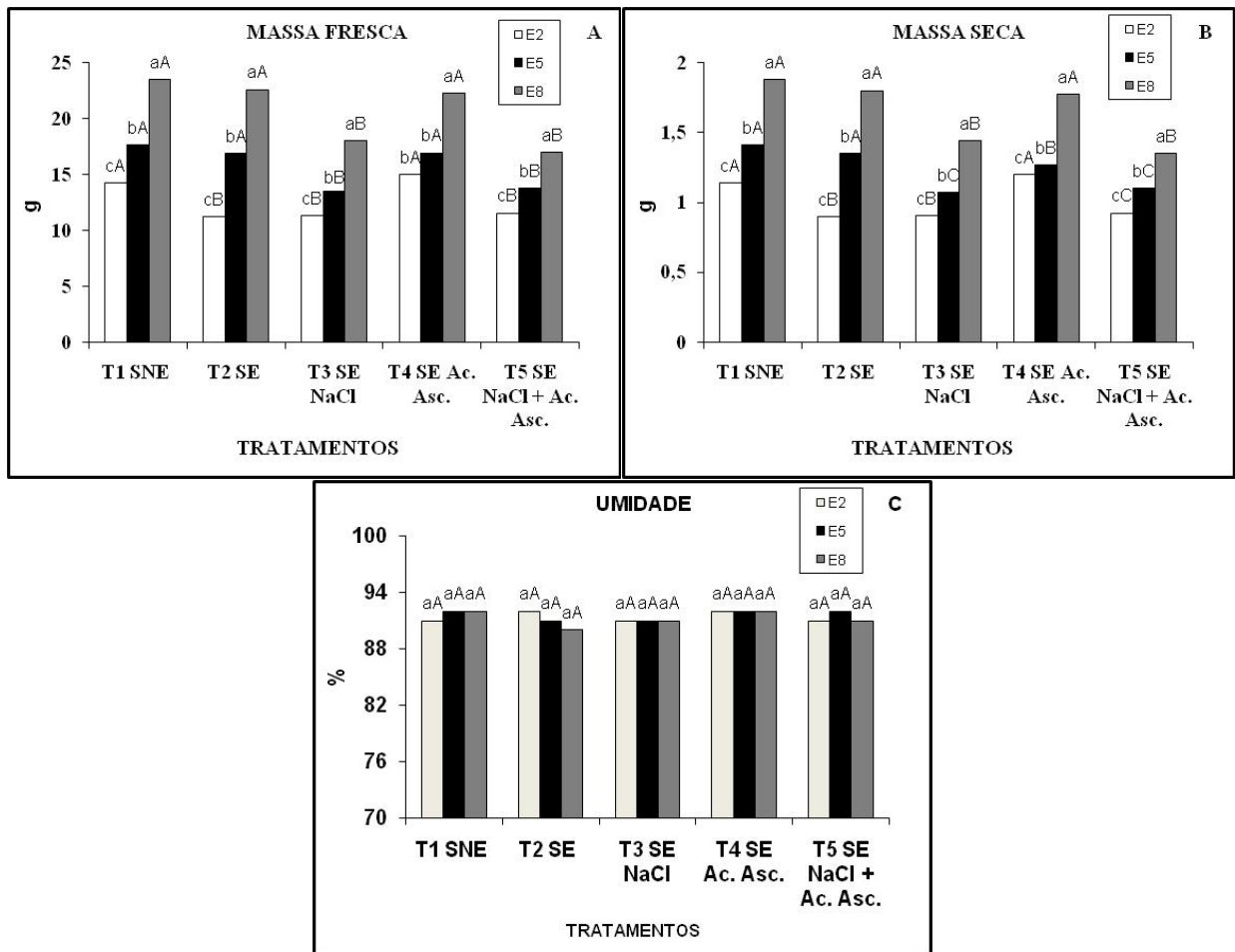


Figura 22 - Massa fresca (A), massa seca (B) e umidade das sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos (T1 SNE = Sementes não envelhecidas; T2 SE = Sementes envelhecidas por 72 h; T3 SE NaCl = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 100 mM de NaCl; T4 SE Ac. Ásc. = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 0,85 mM de ácido ascórbico; T5 SE NaCl + Ac. Ásc. = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 100 mM de NaCl + 0,85 mM de ácido ascórbico) em três diferentes estádios morfofisiológicos (E2, E5 e E8). Colunas seguidas pela mesma letra minúscula dentro de cada tratamento e com as mesmas letras maiúsculas nos diferentes tratamentos não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Foi observada uma correlação entre a perda de vigor das sementes com o aumento da peroxidação de lipídios no T2 em todos os estádios estudados, quando comparado com o controle (Figura 23C). Segundo Goel *et al.* (2003), a peroxidação de lipídios seria uma das principais causas da perda da viabilidade das sementes durante o envelhecimento. Neste estudo, o T2 foi capaz de atrasar a germinação em até 20%, reduzindo o vigor das sementes, representado pela primeira contagem do teste de germinação, quando comparado com o controle (Figura 24). Esse atraso na germinação foi também correlacionado com o aumento da peroxidação de lipídios neste tratamento, isso talvez seja explicado pela perda da integridade das membranas e inabilidade para a manutenção da fluidez das membranas, resultando assim na perda do potencial de germinação (CHANG & SUNG, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Mandhania *et al.* (2006) relatam que a peroxidação de lipídios é um indicio de danos oxidativos.

Os resultados também mostraram que, quando as sementes envelhecidas de feijão-de-corda foram postas para germinar em solução com 100 mM de NaCl (T3), também houve uma redução nas massas fresca e seca das sementes, sendo isso correlacionado com o atraso e redução na germinação, mostrados pelo vigor da primeira contagem e também pelo menor percentual de germinação (Figura 24). Segundo Amor *et al.* (2005), a germinação das sementes é comumente inibida pela salinidade, pois o estresse oxidativo induzido pela salinidade ocasiona danos celulares que resultam na inibição ou redução da germinação (AMOR *et al.*, 2005).

O T3 também provocou danos significativos às membranas celulares das sementes, pois houve um maior vazamento de eletrólitos que no T2 (Figuras 23A e 23B). Também se sabe que a salinidade provoca atraso na mobilização de reservas para o eixo embrionário das sementes e distúrbios nas membranas celulares (GOMES FILHO *et al.*, 1983; PRISCO, 1987) causando assim um atraso e redução na germinação das sementes. Houve também uma maior peroxidação de lipídios neste tratamento, correlacionando com uma maior porcentagem de danos de membranas e maior vazamento de eletrólitos (Figura 23). Já é conhecido que o NaCl pode ocasionar danos severos a integridade das membranas celulares em diversas espécies vegetais (HERNANDEZ *et al.*, 2001; SUDHAKAR *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Neste estudo, a aplicação exógena de 0,85 mM de ácido ascórbico nas sementes envelhecidas (T4) foi capaz de atenuar os efeitos deletérios provocados pelo envelhecimento no vigor e na germinação das sementes de feijão-de-corda, como se pode evidenciar pelo aumento das massas fresca e seca (Figuras 22A e 22B), por um menor vazamento de

eletrólitos (Figura 23A), uma menor porcentagem de danos de membranas (Figura 23B) e um menor nível de peroxidação de lipídios (Figura 23C), sendo isso correlacionado com um maior vigor na primeira contagem e maior porcentagem de germinação (Figura 24), atingindo em todos essas variáveis fisiológicas valores próximos aos do controle (T1) e bem superiores ao tratamento salino (T3). Houve diferenças significativa entre as variáveis fisiológicas relacionadas ao vigor e à germinação analisadas, entre o T4 e o T2 e T3 em todos os estádios analisados, o mesmo não ocorrendo com o T1, onde os resultados foram bastantes próximos (Figuras 22, 23 e 24).

Os resultados aqui mostrados corroboram com os já encontrados por outros autores demonstraram que o pré-tratamento de sementes com antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico pode aumentar o vigor e com isso o potencial de armazenamento dessas sementes a condições adversas de temperatura e umidade, principalmente aumentando seu poder germinativo no campo (BASU, 1994; MAITY *et al.*, 2000, POWELL *et al.*, 2000). Isso pode ser explicado pelo fato do ácido ascórbico, também estar ligado ao crescimento celular e envolvido no ciclo celular e outros mecanismos de crescimento e divisão celular, bem como também atua como co-fator para muitas enzimas antioxidativas importantes no processo germinativo (LEE & KADER, 2000).

Khan *et al.* (2006) relatam que um aumento no nível celular de antioxidantes como os ácidos salicílico e ascórbico, pode causar um aumento na tolerância a salinidade. Al-Hakimi & Hamada (2001), Barh *et al.* (2008) e Burguières *et al.* (2007) mostraram que a aplicação exógena do ácido ascórbico foi capaz de atenuar os efeitos adversos do NaCl pela melhoria no sistema de proteção antioxidante. Porém, no presente trabalho, foi observado que o ácido ascórbico não foi capaz de reduzir os efeitos tóxicos do NaCl a 100 mM, pois não houve diferença significativa entre os tratamentos T5 e T3 em todos os estádios e variáveis fisiológicas relacionadas ao vigor e a germinação analisadas (Figuras 22, 23 e 24).

Neste estudo foi evidenciado que o T5 proporcionou reduções na massa fresca (Figura 22A) e afetou a integridade das membranas (Figura 23) em todos os estádios morfofisiológicos estudados, além de atrasar e também reduzir a germinação das sementes de feijão-de-corda (Figura 24). Estes resultados divergiram dos observados por Younis *et al.* (2009), onde a aplicação exógena de ácido ascórbico aumentou a porcentagem de germinação de sementes de fava e também a capacidade de sobrevivência de mudas cultivadas sob altos níveis de NaCl. O atraso na germinação provocado pelos tratamentos T2, T3 e T5 foi mais evidente nos estádios E2 e E5 (Figuras 25 e 26).

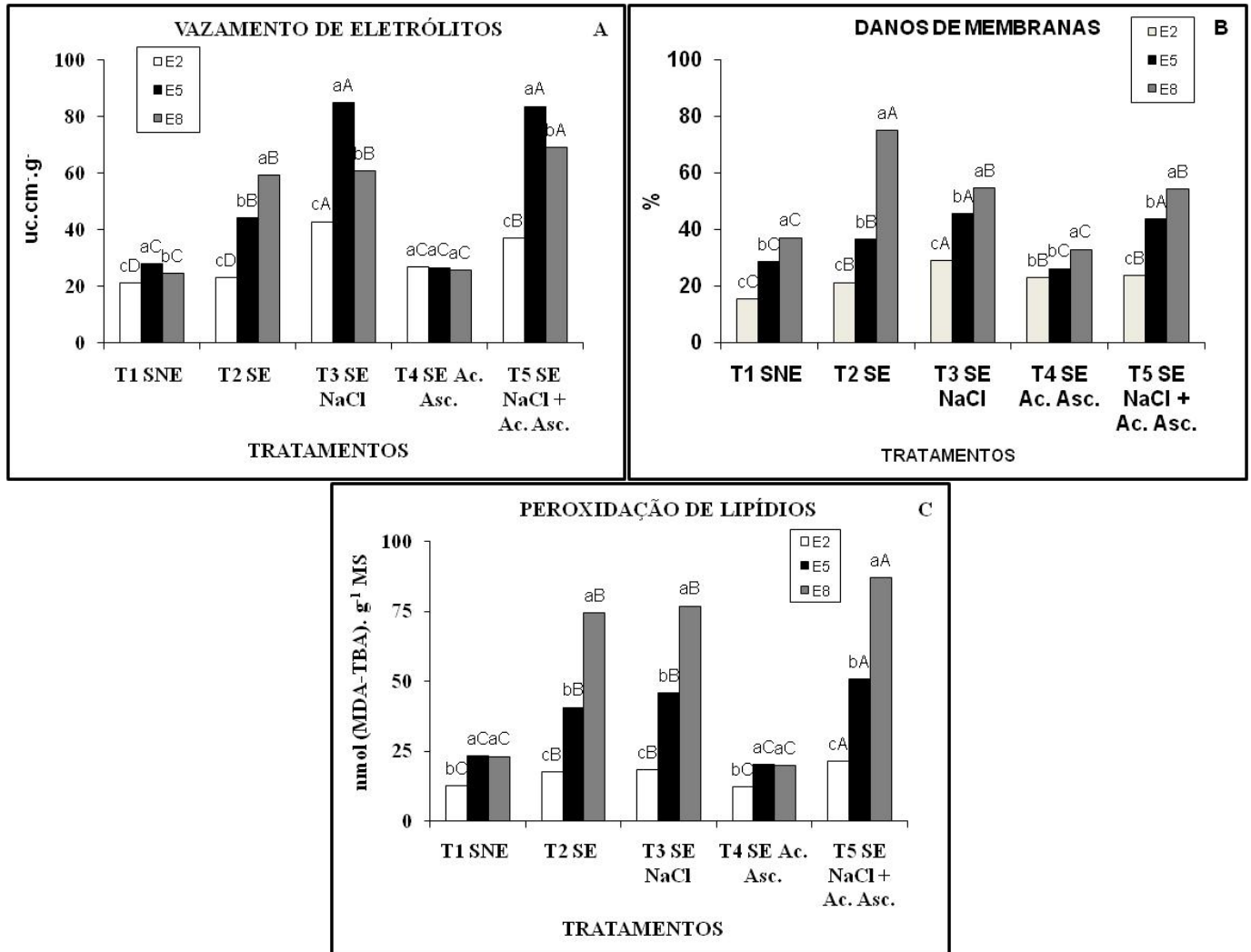


Figura 23 – Vazamento de eletrólitos (A), porcentagem de danos de membranas (B) e peroxidação de lipídios (C) nas sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos (T1 SNE = Sementes não envelhecidas; T2 SE = Sementes envelhecidas por 72 h; T3 SE NaCl = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 100 mM de NaCl; T4 SE Ac. Ásc. = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 0,85 mM de ácido ascórbico; T5 SE NaCl + Ac. Ásc. = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 100 mM de NaCl + 0,85 mM de ácido ascórbico) em três diferentes estádios morfofisiológicos (E2, E5 e E8). Colunas seguidas pela mesma letra minúscula dentro de cada tratamento e com as mesmas letras maiúsculas nos diferentes tratamentos não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

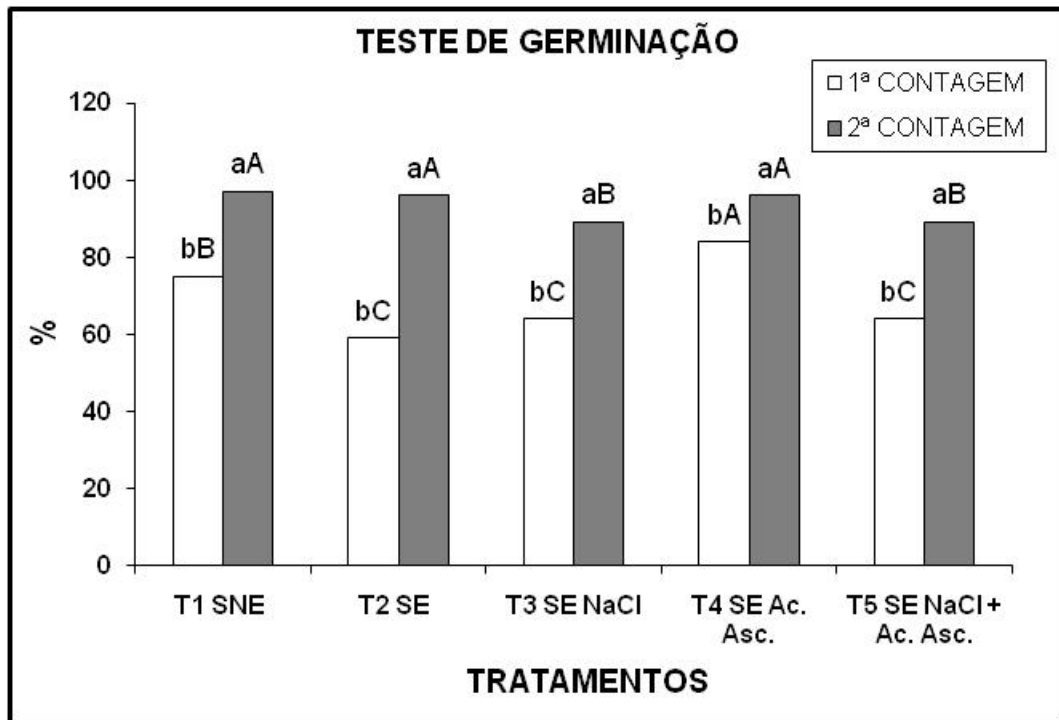


Figura 24 – Teste de germinação nas sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos (T1 SNE = Sementes não envelhecidas; T2 SE = Sementes envelhecidas por 72 h; T3 SE NaCl = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 100 mM de NaCl; T4 SE Ac. Ásc. = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 0,85 mM de ácido ascórbico; T5 SE NaCl + Ac. Ásc. = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 100 mM de NaCl + 0,85 mM de ácido ascórbico) após o estágio morfofisiológico E8. Colunas seguidas pela mesma letra minúscula dentro de cada tratamento e com as mesmas letras maiúsculas nos diferentes tratamentos não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

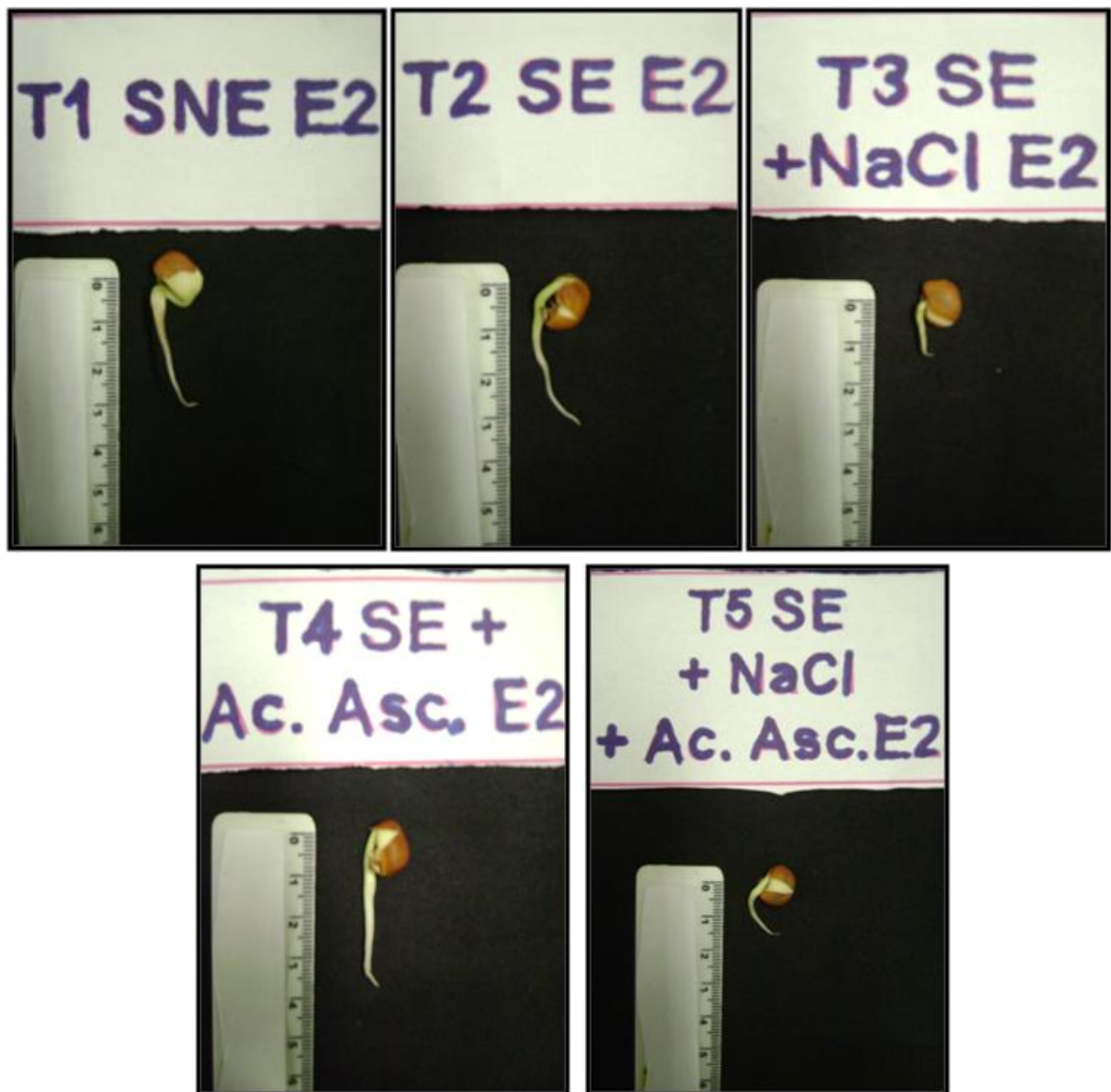


Figura 25 – Aspectos morfológicos da germinação do feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, no estágio E2 submetido a cinco tratamentos.

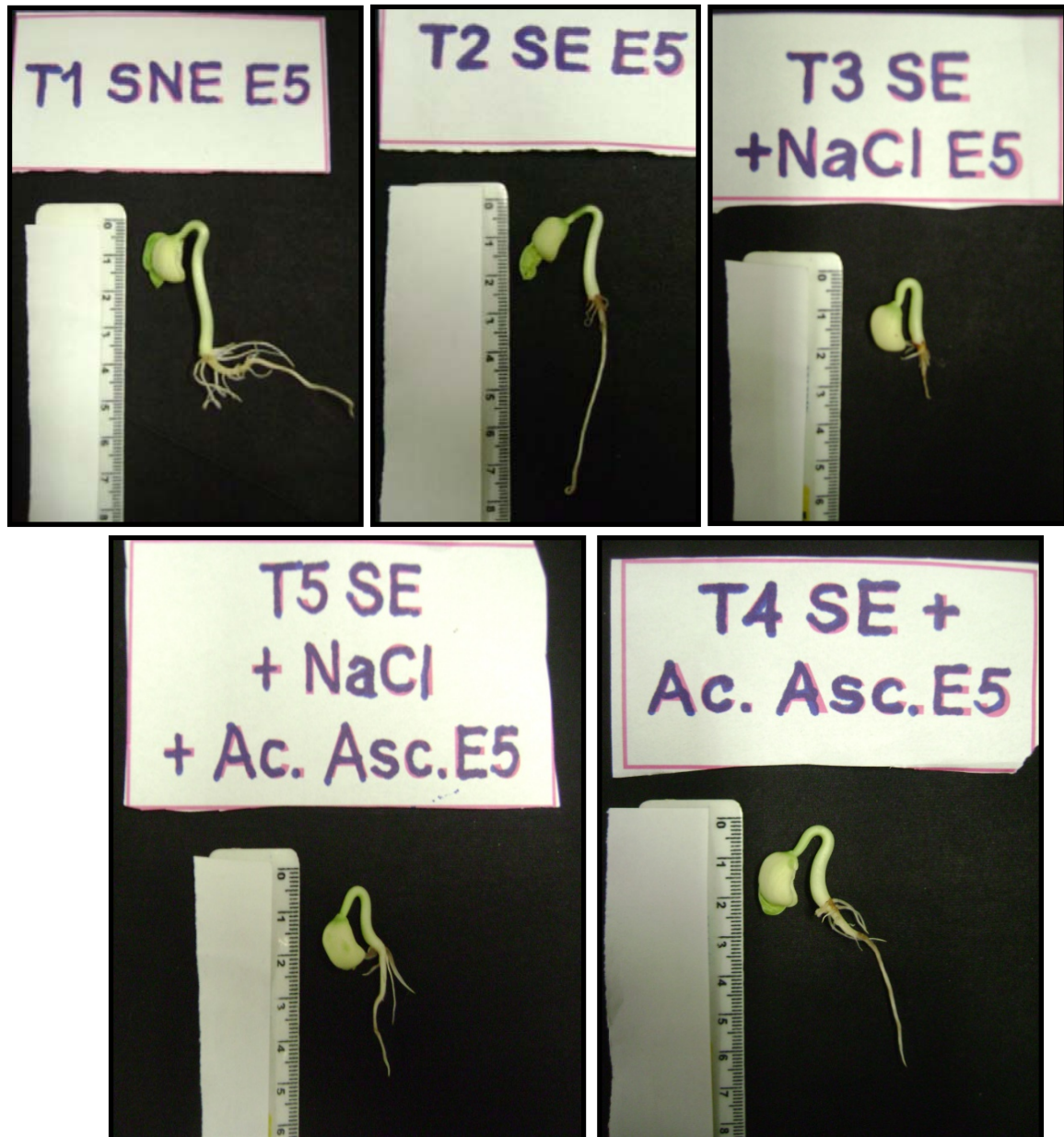


Figura 26 – Aspectos morfológicos da germinação de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, no estágio E5 submetido a cinco tratamentos.

No teste de emergência realizado em casa de vegetação simulando as condições de campo, o desempenho das sementes de feijão-de-corda foi seriamente afetado pelo envelhecimento por 72 h, ocasionando reduções nos parâmetros de crescimento avaliados. Observando os aspectos morfológicos das plântulas de feijão-de-corda aos 10 dias após a semeadura, fica evidenciado visualmente o atraso na emergência das plântulas nos T2, T3 e T5, sendo mais evidente no T5. Fica também evidenciado que a emergência das plântulas do T4 foi semelhante ao controle (T1) (Figura 27).

Os resultados mostraram que o envelhecimento sozinho (T2) foi capaz de reduzir os parâmetros de crescimento avaliados (massa fresca, massa seca e teor de água das plântulas) (Figura 28), corroborando com o que foi realtado por Marcos Filho (2005), onde o envelhecimento afetou a qualidade fisiológica de sementes. Os resultados do teste de emergência mostraram que a massa fresca das plântulas foi reduzida em mais de 11% no T2, e com maior intensidade no T3, em torno de 36%, quando comparado com o controle (T1) e 29% em relação ao T2. O T5 reduziu ainda mais a massa fresca das plântulas, em 60%, 55% e 37% em relação aos T1, T2 e T3, respectivamente (Figura 28A). Entretanto, no T4 a massa fresca das plântulas ficou com valor semelhante ao do T2 (Figura 28A).

Houve um declínio acentuado na massa seca das plântulas em todos os tratamentos quando comparado com o controle (T1), sendo mais acentuado no T5 (Figura 28B), mostrando mais uma vez que o antioxidante não atenuou os efeitos tóxicos do NaCl nas sementes envelhecidas artificialmente. O teor de água das plântulas acompanhou o que foi verificado anteriormente, onde foi verificado que o T3 e o T5 causaram uma redução de 5% e 9%, respectivamente. De modo interessante, não houve diferença significativa entre os tratamentos T1, T2 e T4 em relação ao teor de água das plântulas (Figura 28C). Isso pode ser explicado pelo fato de que no teste de envelhecimento acelerado as sementes absorvem água em ambiente relativamente quente e úmido (MARCOS FILHO, 2005), podendo assim, às vezes até apresentar conteúdo hídrico superior às sementes não envelhecidas.

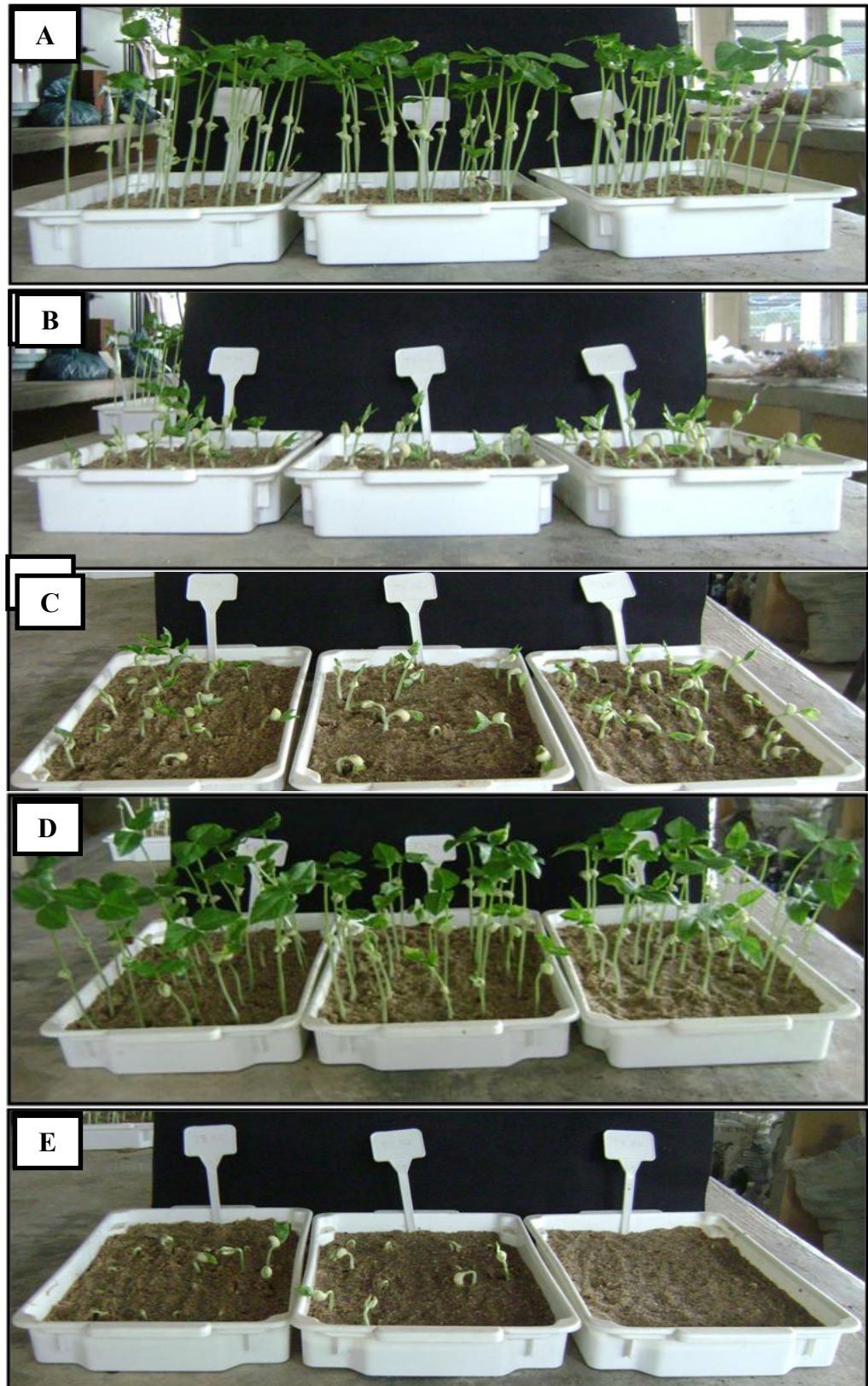


Figura 27 – Emergência das plântulas de Feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, aos 10 dias após a sementeira, sob diferentes tratamentos: (T1) tratamento controle – sementes não envelhecidas irrigadas com água desionizada (A); (T2) sementes envelhecidas irrigadas com água desionizada (B); (T3) sementes envelhecidas irrigadas com 100 mM de NaCl (C); (T4) sementes envelhecidas irrigadas com 0,85 mM de ácido ascórbico (D) e (T5) sementes envelhecidas irrigadas com 100 mM de NaCl + 0,85 mM de ácido ascórbico (E).

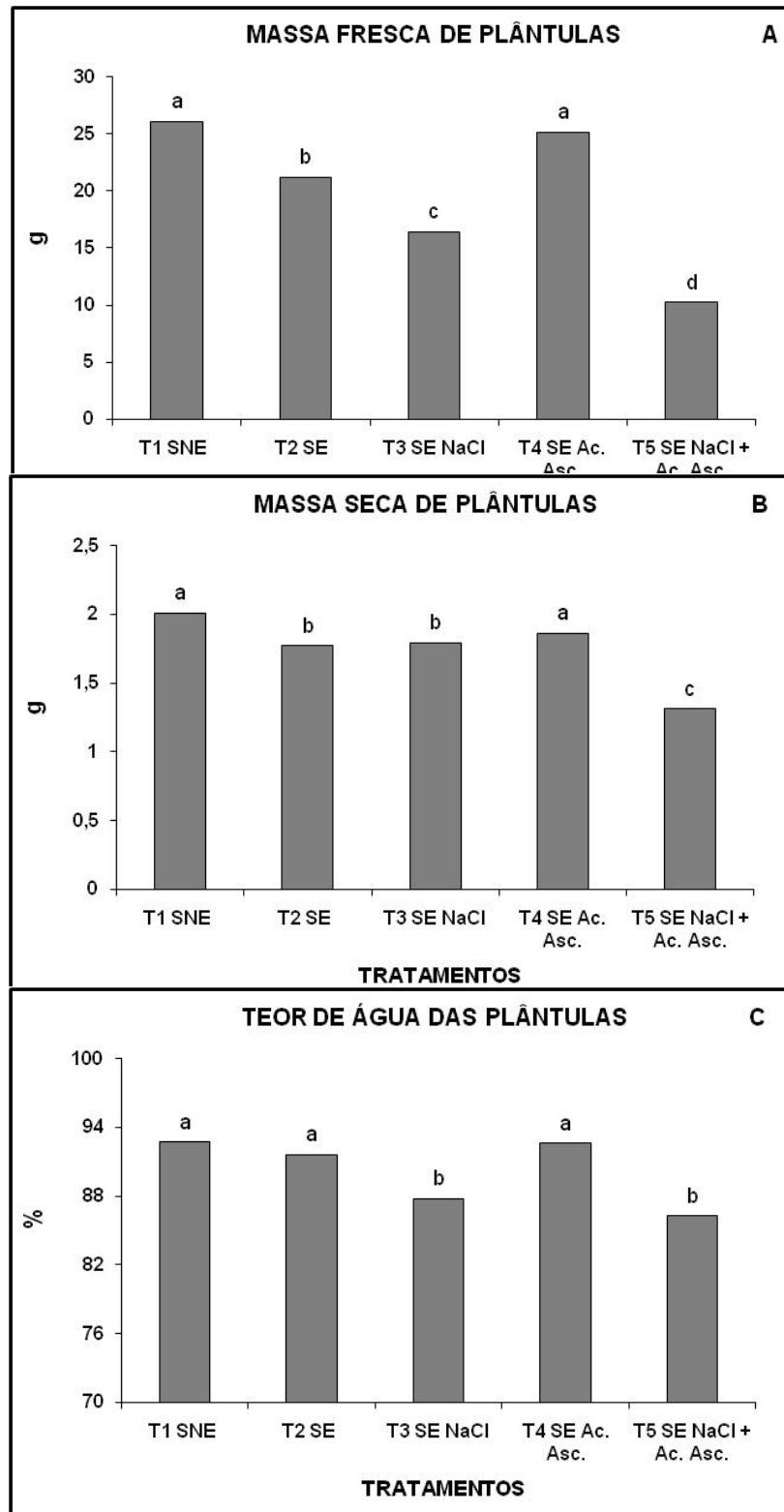


Figura 28 – Massa fresca (A), massa seca (B) e teor de água das plântulas de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, aos 10 dias após a semeadura, sob diferentes tratamentos: (T1) tratamento controle – sementes não envelhecidas irrigadas com água desionizada; (T2) sementes envelhecidas irrigadas com água desionizada; (T3) sementes envelhecidas irrigadas com 100 mM de NaCl; (T4) sementes envelhecidas irrigadas com 0,85 mM de ácido ascórbico e (T5) sementes envelhecidas irrigadas com 100 mM de NaCl + 0,85 mM de ácido ascórbico.

O T2 atrasou a germinação das sementes, apresentando um menor índice de velocidade de emergência (IVE) e um maior tempo médio de emergência (TME), e com valores numéricos de 23,81 e 5,25 dias, respectivamente, quando comparado com o controle (Tabela 5). O T3 atrasou ainda mais a emergência das plântulas oriundas das sementes envelhecidas, aproximadamente 36% em relação ao T2. Com relação ao T5, o atraso foi ainda mais drástico, com uma redução em torno de 72% em relação ao T2 (Tabela 5). Esses resultados referentes ao efeito do estresse salino na germinação e estabelecimento de plântulas dos T2, T3 e T5, são consistentes com os obtidos por Chartzoulakis & Klapaki (2000), que afirmaram que o crescimento reduzido em condições de estresse salino, se deve ao efeito do sal no atraso da germinação, principalmente devido à diminuição da embebição de água pelas sementes e atraso dos eventos associados como a mobilização de reservas das sementes.

Com relação à inibição do crescimento das plântulas, esses resultados são similares aos estudos de Eneas Filho *et al.* (1995), onde a concentração de 100 mM de NaCl foi suficiente para inibir o estabelecimento de plântulas de feijão-de-corda, sendo tais resultados similares aos de Prisco & Vieira (1976), Gomes Filho & Prisco (1978), e Prisco *et al.* (1981). Em muitas espécies altas concentrações de NaCl dificultam a embebição e a germinação das sementes (MURILLO-AMADOR & TROYO-DIÉGUEZ, 2000).

O T4 acelerou a emergência das plântulas oriundas das sementes envelhecidas, pois houve um aumento no IVE e um decréscimo do TME, atingindo resultados até mesmo superiores àquele do controle (Tabela 5). No tratamento T4 o percentual de emergência das plântulas foi de aproximadamente 93, sendo superior aos dos tratamentos T2 e T3, que tiveram 89% e 85%, respectivamente. O menor percentual de emergência de plântulas foi verificado no T5 com 48.

Tabela 5 - Valores médios do índice de velocidade de emergência (IVE), emergência de plântulas (%) e tempo médio de emergência (TME) de sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a quatro diferentes tratamentos (SNE, SE, SE-Pré-T e SE-Pós-T).

TRATAMENTOS	Índice de Velocidade de Emergência (IVE)	Emergência de Plântulas (%)	Tempo Médio de Emergência (TME) (dias)
T1 SNE	24,56 ab	98,66 a	4,98 a
T2 SE	23,81a	89,33 ab	5,25 a
T3 SE Nacl	15,21 bc	85,33 ab	4,19 b
T4 SE Ac. Asc.	26,31 a	93,33 a	5,32 a
T5 SE Nacl + Ac Asc.	6,52 c	48,00 b	3,48 c
C.V. (%)	17,16	18,96	3,79

*letras minúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente a 5%

Foi observado um aumento no conteúdo de açúcares solúveis com o passar dos estádios E2, E5 e E8 do feijão-de-corda em todos os tratamentos analisados. O conteúdo de açúcares solúveis foi significativamente maior nos T1, T2 e T4, quando comparado com os tratamentos T3 e T5 (Figura 29B). Isso foi correlacionado com o decréscimo acentuado no teor de amido nos T1, T2 e T4, o mesmo não ocorrendo na mesma intensidade nos T3 e T5 (Figura 29A). Do mesmo modo, a atividade amilásica foi superior nos T1, T2 e T4 e significativamente inferior nos T3 e T5 (Figura 29C). Isso contrasta com o observado por Uriyo (2000), onde o tratamento salino provocou um aumento na hidrólise do amido.

O envelhecimento das sementes por 72 h (T2) não causou mudanças na mobilização de açúcares para o eixo embrionário durante a germinação, pois apresentou resultados semelhantes aos observados pelo controle (T1). O mesmo foi observado no tratamento com ácido ascórbico (T4). Entretanto, o tratamento com NaCl a 100 mM ocasionou mudanças nessa mobilização, sendo mais acentuada no T5. Isso evidencia que o estresse salino (T3) atrasou a mobilização de açúcares para o eixo embrionário durante os estádios da germinação das sementes de feijão-de-corda, principalmente pelo decréscimo na atividade amilásica.

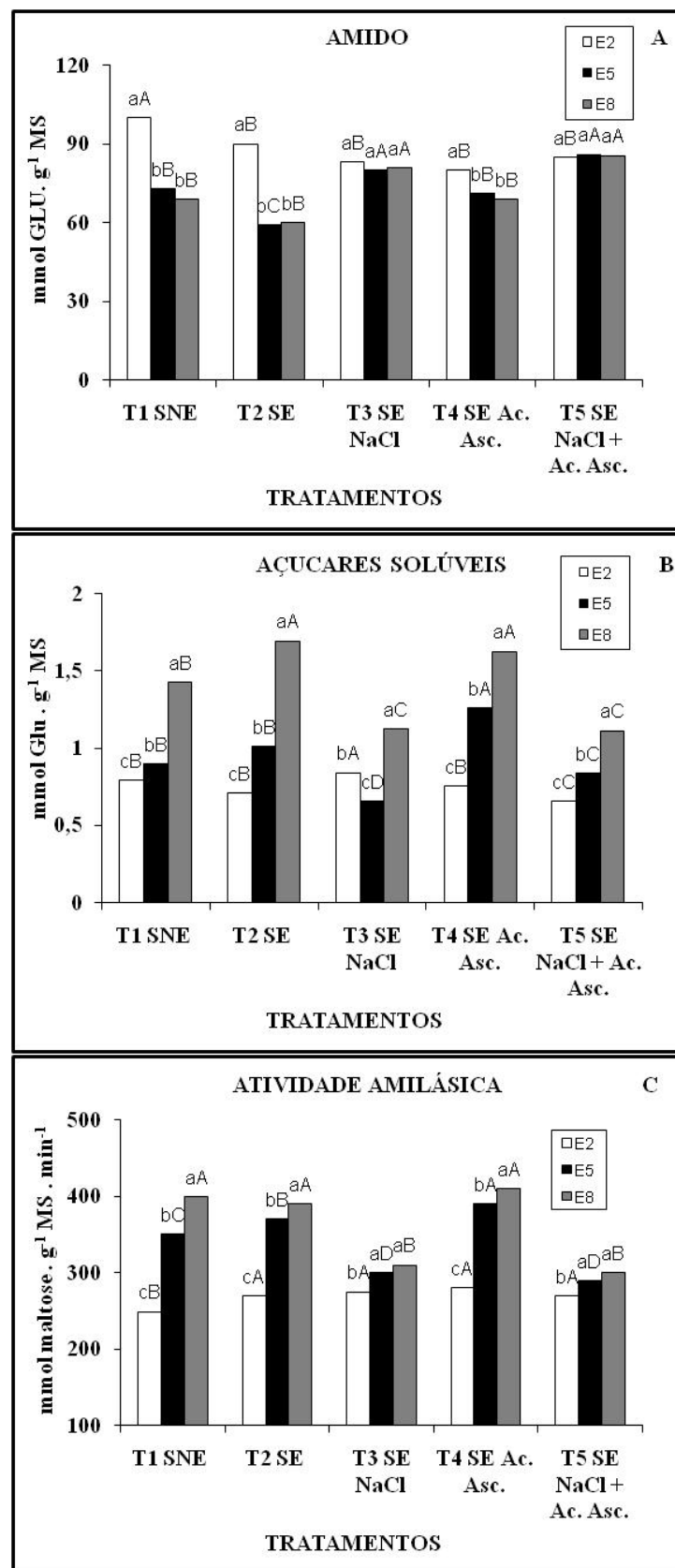


Figura 29 – Teor de amido (A), conteúdo de açúcares solúveis (B) e atividade amilásica nas sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos (T1 SNE = Sementes não envelhecidas; T2 SE = Sementes envelhecidas por 72 h; T3 SE NaCl = sementes envelhecidas por 72h e pós-tratadas com 100 mM de NaCl; T4 SE Ac. Ásc. = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 0,85 mM de ácido ascórbico; T5 SE NaCl + Ac. Ásc. = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 100 mM de NaCl + 0,85 mM de ácido ascórbico) em três diferentes estádios morfofisiológicos (E2, E5 e E8). Colunas seguidas pela mesma letra minúscula dentro de cada tratamento e com as mesmas letras maiúsculas nos diferentes tratamentos não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

O envelhecimento por 72 h (T2) e o tratamento salino combinados (T3) ou em conjunto com o AsA (T5) provocaram um decréscimo acentuado no conteúdo de proteínas solúveis nas sementes de feijão-de-corda, como mostra a Figura 30A. Esse decréscimo nesses tratamentos foi acompanhado pelo aumento da atividade proteolítica (Figura 30B). Shacter (2000) mostrou a existência de uma relação entre a oxidação e degradação de proteínas e o envelhecimento. A redução do conteúdo de proteínas em plantas sob estresse pode ser provavelmente devido aos efeitos danosos da geração de ERO nessas condições, ocasionando assim a oxidação de proteínas (DOLATABADIAN *et al.*, 2009). Entretanto, nos tratamentos T2 e T3 houve uma diminuição no conteúdo de aminoácidos livres (Figura 30C), sendo isso correlacionado com o aumento na atividade proteolítica e menor conteúdo de proteínas solúveis. Talvez essa diminuição do conteúdo de aminoácidos livres tenha sido devido a sua utilização como substrato energético em condições adversas. Interessantemente, o tratamento com ácido ascórbico (T4) reduziu a proteólise induzida pelo envelhecimento nas sementes de feijão-de-corda, apresentando um conteúdo de proteínas solúveis que não diferiu estatisticamente do controle (T1). A aplicação de 150 mg L⁻¹ de AsA aumentou o conteúdo de proteína das folhas de plantas de milho sob estresse abiótico (DOLATABADIAN *et al.*, 2009). Porém, o ácido ascórbico não atenuou os efeitos deletérios do NaCl sobre as proteínas, pois o T5 apresentou resultados semelhantes ao T3 (Figuras 30A e 30B).

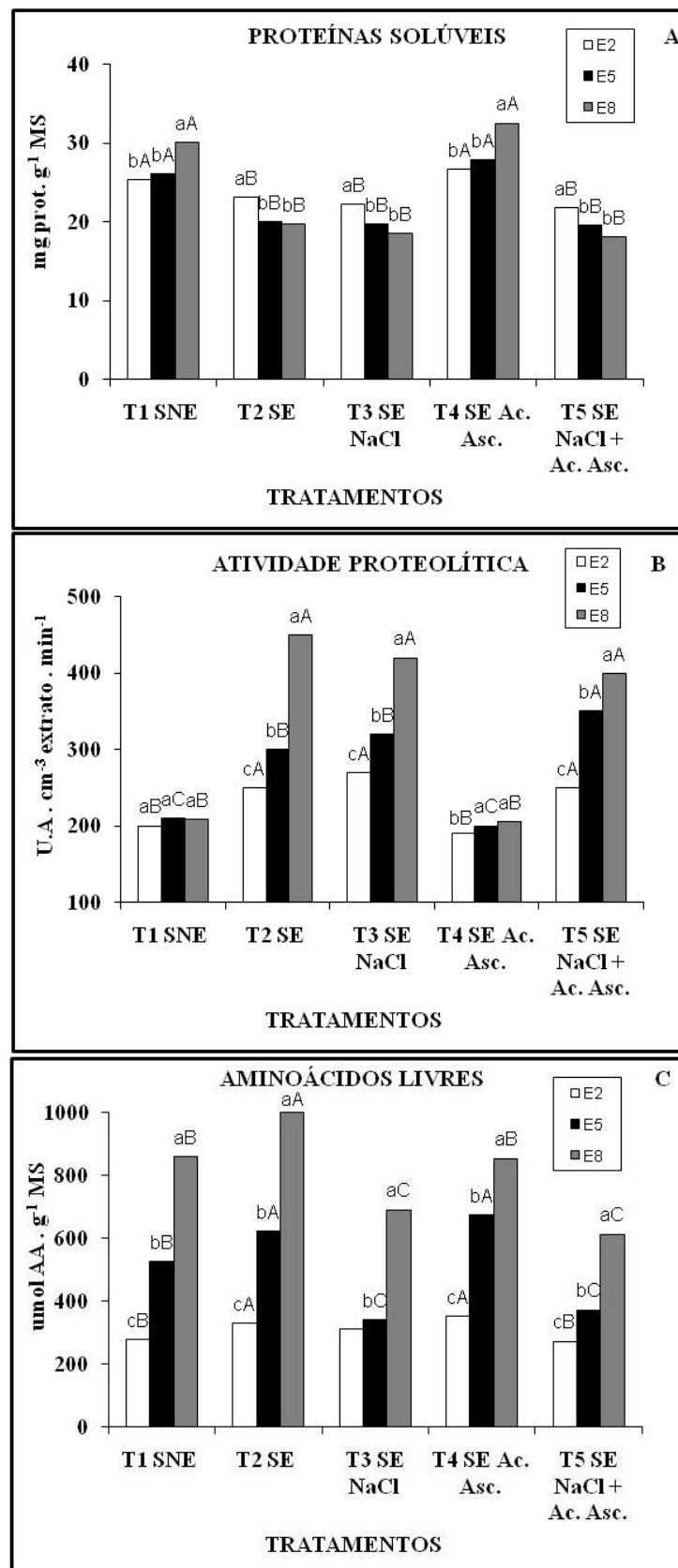


Figura 30 – Conteúdo de proteínas solúveis (A), atividade proteolítica (B) e conteúdo de aminoácidos livres (C) de sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos (T1 SNE = Sementes não envelhecidas; T2 SE = Sementes envelhecidas por 72 h; T3 SE NaCl = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 100 mM de NaCl; T4 SE Ac. Ásc. = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 0,85 mM de ácido ascórbico; T5 SE NaCl + Ac. Ásc. = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 100 mM de NaCl + 0,85 mM de ácido ascórbico) em três diferentes estádios morfofisiológicos (E2, E5 e E8). Colunas seguidas pela mesma letra minúscula dentro de cada tratamento e com as mesmas letras maiúsculas nos diferentes tratamentos não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

É conhecido que em condições de estresse oxidativo a biossíntese de ascorbato é induzida para proteger as biomoléculas dos danos oxidativos (Asada, 1999). Em nosso estudo, os T2, T3 e T5 provocaram decréscimo no conteúdo de ascorbato das sementes de feijão-de-corda em todos os estádios estudados (Figura 31A). Os mesmos tratamentos apresentaram uma menor atividade da APX (Figura 31B), ou seja, apesar da redução do conteúdo de ascorbato apresentado, o mesmo não propiciou um aumento na atividade da APX nestes tratamentos. Isso pode ser explicado, talvez porque não tenha sido possível recuperar a quantidade de ascorbato na forma reduzida (*turnover*) para manter a atividade da APX nessas condições de estresse como proposto por Noctor *et al.* (2002).

O tratamento com ácido ascórbico (T4) aumentou o conteúdo de ascorbato reduzido e também a atividade da APX em todos os estádios estudados (Figura 31). Isso comprovou o já demonstrado por Chen & Gallie (2004), onde o nível endógeno de AsA pode ser aumentado pela aplicação exógena de AsA nas raízes, folhas e também em sementes. Dolatabadian *et al.* (2009) verificou que a aplicação foliar de solução de ácido ascórbico a 150 mg L⁻¹ foi capaz de aumentar a tolerância à seca, pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes (APX, CAT, POX) em plantas de milho.

Neste estudo a aplicação exógena de ácido ascórbico nas sementes de feijão-de-corda atenuou os efeitos deletérios do envelhecimento em todos os parâmetros bioquímicos relacionados com o vigor e a germinação, apresentando uma maior mobilização de reservas para o eixo embrionário (açúcares e aminoácidos livres), menor proteólise e também melhor mecanismo antioxidante, comprovado pelo maior conteúdo de ascorbato e maior atividade da APX. Azarnivand *et al.* (2006) demonstraram que a germinação é uma fase crítica no ciclo de vida dos vegetais e a tolerância a salinidade na fase da germinação pode ser importante para o sucesso no estabelecimento e crescimentos das plantas em ambientes salinos. Entretanto, no presente estudo, a aplicação de ácido ascórbico não foi capaz de atenuar os efeitos do NaCl nas sementes, como evidenciado em todos os parâmetros bioquímicos avaliados.

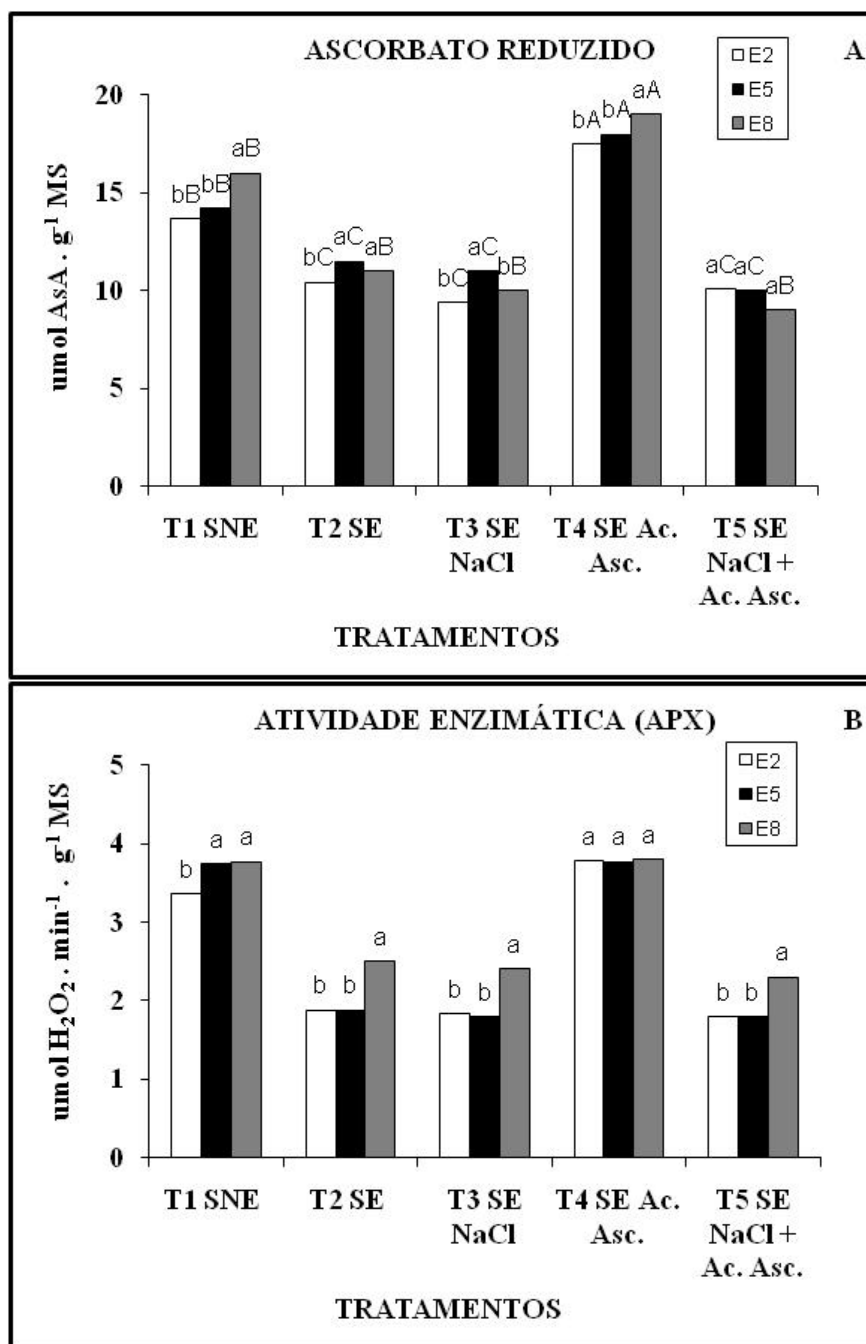


Figura 31 – Conteúdo de ascorbato reduzido (A) e atividade da peroxidase do ascorbato (APX) (B) em sementes de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, submetidas a diferentes tratamentos (T1 SNE = Sementes não envelhecidas; T2 SE = Sementes envelhecidas por 72 h; T3 SE NaCl = sementes envelhecidas por 72h e pós-tratadas com 100 mM de NaCl; T4 SE Ac. Ásc. = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 0,85 mM de ácido ascórbico; T5 SE NaCl + Ac. Ásc. = sementes envelhecidas por 72 h e pós-tratadas com 100 mM de NaCl + 0,85 mM de ácido ascórbico) em três diferentes estádios morfofisiológicos (E2, E5 e E8). Colunas seguidas pela mesma letra minúscula dentro de cada tratamento e com as mesmas letras maiúsculas nos diferentes tratamentos não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

6.4 Conclusões

A aplicação exógena de 0,85 mM de ácido ascórbico nas sementes envelhecidas de feijão-de-corda, cultivar EPACE 10, foi capaz de atenuar os efeitos deletérios provocados pelo envelhecimento nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos relacionados com o vigor e a germinação. A aplicação exógena de ácido ascórbico reduziu os efeitos deletérios do envelhecimento artificial na integridade das membranas, na peroxidação de lipídios, na germinação e emergência de plântulas e também na mobilização de reservas durante a germinação. Entretanto, o ácido ascórbico não foi capaz de atenuar os efeitos tóxicos do NaCl nas sementes envelhecidas. O estudo da relação entre o uso de antioxidantes naturais, com um possível revigoramento de sementes envelhecidas, utilizando o feijão-de-corda como modelo experimental, pode gerar estratégias de meios para potencializar as defesas antioxidativas e amenizar os efeitos do estresse em ambientes de armazenamento de sementes sob condições não controladas, principalmente em pequenas e médias propriedades rurais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBA, E.J.; LOVATO, A. Effect of seed storage temperature and relative humidity on maize (*Zea mays* L.) seed viability and vigour. *Seed science and technology*, v.27, p.101-114, 1999.
- ABDUL-BAKI, A.A. & ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOZLOWISKI, T.T. ed. *Seed biology*. New York: Academic Press, 1972. v. 2, p. 283-315.
- AGARWAL, S. AND V. PANDY. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biol. Plant*, 48: 550-560, 2004.
- AGIUS F, LAMOTHE RG, CABALLERO JL, BLANCO JM, BOTELLA MA, VALPUESTA V. Engineering increased vitamin C levels in plants by over-expression of a D-galacturonic acid reductase. *Nat Biotechnol* 21:177–181, 2003.
- AINOUZ, I.L.; BENEVIDES, N.B.; FREITAS, A.L.P. Proteolytic activities in seeds of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Biol Plant* 23: 133–140, 1981.
- ALLEN, S. G., A. K. DOBRENZ, AND P. G. BARTELS. Physiological response of salt-tolerance and nontolerant alfalfa to salinity during germination. *Crop Sci.* 26, 1004—1008, 1986.
- AL-HAKIMI, A.M.; HAMADA, A.M. Counteraction of salinity stress on wheat plants by grain soaking in ascorbic acid, thiamine or sodium salicylate. *Biol. Plant.* 44, 253–261, 2001.
- AMOR, N.B.; HAMED, K.B.; DEBEZ, A.; GRIGNON, C.; ABDELY, C. Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. *Plant Science*, v.168, p.889-899, 2005.
- ANURADHA, G.; KUMAR, A. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *Journal Plant Physiology*, v. 160, p.1093-1100, 2003.
- APEL, K. AND H. HIRT. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* v.55, p.373–399, 2004.
- ARAB L., EHSANPOUR A. The effects of ascorbic acid on salt induced alfalfa (*Medicago sativa* L.) in *in vitro* culture. *Biochemistry*, 18: 63-69, 2006.
- ARAÚJO, J.P.P. de; RIOS, G.P.; WATT, E.E.; NEVES, B.P. das; FAGERIA, N.K.; OLIVEIRA, I.P. de; GUIMARÃES, C.M.; SILVEIRA FILHO, A. *Cultura de caupi, (Vigna unguiculata (L.) (Walp.): descrição e recomendações técnicas de cultivo*. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1984. 82p. (EMBRAPA-CNPAP. Circular Técnica, 18).
- ARTHUR, T.J.; TONKIN, J.H.B. Testando o vigor da semente. *Inf. Abrates*, Londrina, v. 1, p. 38-41, 1991.

ASADA, K. The water–water cycle in chloroplasts, scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev of Plant Physiol and Plant Mol Biol.* v.50, p.601–639, 1999.

ASAI N., MATSUYAMA T., TAMAOKI M., NAKAJIMA N., KUBO A., AONO M., KATO T., TABATA, S.; SHIRANO, Y.; SHIBATA, D.; HAYASHI, H.; MULLINEAUX, P.M.; SAJI H. Compensation for lack of a cytosolic ascorbate peroxidase in an *Arabidopsis* mutant by activation of multiple antioxidative systems. *Plant Science*, v.166, n.6, p.1547-1554, 2004.

ASCHERMANN-KOCH, C.; HOFMANN, P.; STEINER, A. M. Presowing treatment for improving seed quality in cereals. I.Germination and vigour. *Seed Science and Technology*, Zürich, v. 20, n. 3, p. 435-440, 1992.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS (AOSA). Seed vigor testing handbook. Lincoln, 2002. 105p. (Contribution, 32).

ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, v.166, p.3-16, 2004.

ASHRAF, M. AND M.R. FOOLAD. Pre-sowing seed treatment– a shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. *Adv. Agron.* 88: 223-271, 2005.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of Glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* v.59, p.206-216, 2007.

ARAGÃO, T.C.F.R. Danos oxidativos e o envelhecimento de sementes de feijão caupi. 2007. 129 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

ARRIGONI, O., DE GARA, L., TOMMASI, F. AND LISO, R. Changes in the ascorbate system during seed development in *Vicia faba* L. *Plant Physiology* 99, 235–238, 1992.

ARRIGONI, O. Ascorbate system in plant development. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26, 407–419, 1994.

ARRIGONI O., CALABRESE G., DE GARA L., BITONTI M.B. AND LISO R. Correlation between changes in cell ascorbate and growth of *Lupinus albus* seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 150: 302-308, 1997.

ARRIGONI, O. AND DE TULLIO, M. C. The roll of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed function and un predicatable chemical reaction. *Plant Physiol.* 57:781-788, 2000.

ASADA, K. The water–water cycle in chloroplasts, scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev of Plant Physiol and Plant Mol Biol*, v.50, p.601–639, 1999.

ATHAR, H. R., KHAN, A., ASHRAF, M. Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. *Environmental and Experimental Botany*, 63, 224-231, 2008.

BAEK, M.L.I.; KIM, J.I.I.; CHUNG, B.Y.; KIM J.S.; LEE, I.S. Alleviation of salt stress by low dose gamma-irradiation in rice. *Biol. Plant.* v.49, n.2, p.273-276, 2005.

BAILLY, C., AUDIGIER, C., LADONNE, F., WAGNER, M.H., COSTE, F., CORBINEAU, F. AND CÔME, D. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of Experimental Botany* 52, 701–708, 2001.

BARBOSA, G.K.C. Efeito do NaCl na atividade galactosidásica de raízes de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Dissertação de mestrado, UFC, 2002, 73 p.

BARH, D.; SRIVASTAVA, H.C.; MAZUMDAR, B.C. Self fruit extract and vitamin-C improves tomato seed germination. *J. Appl. Sci. Res.* v.4, p.156-165, 2008.

BARRETO, P.D.; QUINDERÉ, M.A.W.; SÁ, M.F.P.; SANTOS, A.A. CNCx 698-128G - Linhagem de caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., com alto potencial de produção e adaptabilidade às diferentes condições de cultivo do Ceará. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI, 4., 1996, Teresina, PI. Resumos... Teresina: EMBRAPA-CPAMN, 1996. p.83-84. (EMBRAPA-CPAMN. Documentos, 18).

BARRETO, P. D. Recursos genéticos e programa de melhoramento de feijão-de-corda no Ceará: avanços e perspectivas 2006. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R.R.(Ed.). Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro. Petrolina, PE:Embrapa Semi-Árido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/caupinordeste.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2010.

BARRETO, D. P. D.; SANTOS, A. A. dos; QUINDERÉ, M.A.W.; VIDAL, J. C.; ARAÚJO, J. P. P.; WALT, E.E.; RIOS, G.P.; NEVES, B.P. EPACE-10: nova cultivar de caupi para o Ceará. Fortaleza: EPACE, 1988. Folder.

BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. *Seed science and technology*, v.19, n.2, p.279-286, 1991.

BASU, R.N. An appraisal of research on wet and dry physiological seed treatments and their applicability with special reference to tropical and sub-tropical countries. *Seed science technology*, v.22, p.107-126, 1994.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. Free Radical Theory of Aging matures. *The Physiological Reviews*, v.78, n.2, 1998.

BERNFELD, P. Enzymes of carbohydrate metabolism: amylases, α and β . In: COLWICK, S. P.; KAPLAN, N.O. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press, 1955. v. 1, p. 149-158.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Physiology of development and germination. Seeds, p.445, 1994.

BEWLEY, J. D. AND M. BLACK. Seeds Physiology of Development and Germination. Plenum Press, New York, 1994.

BIENERT, G.P.; SCHJOERRING, J.K.; JAHN, T.P. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*. v.1758, p.994–1003, 2006.

BINOTTI, F. F. S.; HAGA, K. I.; CARDOSO, E. D.; ALVES, C. Z.; SA, M. E.; ARF, O. Efeito do período de envelhecimento acelerado no teste de condutividade elétrica e na qualidade fisiológica de sementes de feijão. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 30, n. 2, p. 247-254, 2008.

BLACKHURST, H.T.; MILLER JUNIOR., J.C. Cowpea. In: WALTER, R.F., HADLEY, H.H. Hybridation of plants. Madison, 1980. p.327-337.

BLUM, A.; EBERCON, A. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Science*, Madison, v.21, n.1, p.43-47, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.

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

BRILHANTE, J.C.A. Respostas fisiológicas e acumulação de prolina em duas progênies de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) sob estresse salino. Fortaleza: UFC, 2003. 52p. Monografia de graduação.

BRITSCH, L., DEDIO, J., SAEDLER, H. AND FORKMANN, G. Molecular characterization of flavanone 3_ - hydroxylases. Consensus sequence, comparison with related enzymes and the role of conserved histidine residues. *European Journal of Biochemistry* 217, 745–754, 1993.

BOR, M.; OZDEMIR, F.; TURKAN, I. The effects of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris L.* and wild beet *Beta maritima L.* *Plant Science*, v.164, p.77-84, 2003.

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A.G. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, 2004.

BUCHANAN, B.B.; BALMER, Y. Redox regulation: a broadening horizon. *Annu Rev Plant Biol* v.56, p.187–220, 2005.

BURGUIERES, E.; McCUE, P.; KNOW, I.Y.; SHETTY, K. Effect of vitamin C and folic acid on seed vigour response and phenolic-linked antioxidant activity. *Bioresour Technology*, v. 98, p. 1393-1404, 2007.

CAKMAK, I., STRBAC, D. AND MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal of Experimental Botany* 44, 127–132, 1993.

CAMARGO, R. de. Condicionamento fisiológico de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). 1998. 108 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CARDOSO, B.B. Efeitos comparativos da salinidade sobre o metabolismo do nitrogênio em folhas e nódulos de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp.) inoculado com *Bradyrhizobium* sp. 2000. 98p. tese de doutorado, UFC.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2000. 424p.

CAVALCANTE, L.F. ; LIMA, R.L.S. ; SANTIAGO, R.D. ; CAVALCANTE, Í. H. L. ; ARAÚJO, F.A.R. Melhoria química e física de um solo salino sódico tratado com matéria orgânica e cultivado com leguminosas forrageiras. *Ciência Agrícola*, Rio Largo, v. 6, n. 1, p. 27-35, 2002.

CAVALCANTI, F.R.; LIMA, J.P.M.S.; FERREIRA-SILVA, S.L.; VIEGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *Journal of Plant Physiology*, v.164, p.591—600, 2007.

CHARTZOULAKIS, K., AND G. KLAPAKI. Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Scientia Hortic.* v.86, p.247—260, 2000.

CHANG, S.M.; SUNG, J.M. Deteriorative changes in primed sweet corn seeds during storage. *Seed Science Technology*, v.26, p.613-626, 1998.

CHARTZOULAKIS, K. AND G. KLAPAKI. Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Scientia Horticulturae*, 86: 247-260, 2000.

CHEN Z, TODD E, LING YJ, CHANG SC, GALLIE D.R. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3525– 3530, 2003.

CHEN, Z.; GALLIE, D.R. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell* 16, 1143–1162, 2004.

CHEW, O., WHELAN, J., AND MILLAR, A.H. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J. Biol. Chem.* 278, 46869–46877, 2003.

CHHETRI, D.R.; RAI, A.S.; BHATTACHARJEE, A. Chemical manipulation of seed longevity of four crop species in an unfavourable storage environment. *Seed science and technology*, Zurich, v.14, n.2, p.269-300, 1993.

CITTERIO, S., SGORBATI, S., SCIPPA, S. AND SPARVOLI, E. Ascorbic acid effect on the onset of cell proliferation in pea root. *Physiologia Plantarum* 92, 601–607, 1994.

COMBA, M.E.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Effect of salt stress on antioxidant defence system in soybean root nodules. *Aust J PlantPhysiol* 25:665–671, 2004.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, levantamento setembro 2010 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2010.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento, março 2011 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2011.

CONKLIN, P. L., E. H. WILLIAMS, and R. L. LAST. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9970-9974, 1996.

CONKLIN, P. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant, Cell and Environ.*v.24, p.383–394, 2001.

CONKLIN, P.L.; BARTH, C. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant Cell Environ* 27:959–970, 2004.

CONY, M. A., AND S. O. TRIONE. Inter- and intraspecific variability in *Prosopis flexuosa* and *P. chilensis*: seed germination under salt and moisture stress. *J. Arid Environ.* v.40, p.307—317, 1998.

COPELAND, L.O.; MCDONALD, M.B. *Seed Science and Technology*. New York: Chapman & Hall, 410p., 1995.

CORDOBA-PEDREGOSA MC, CORDOBA F, VILLALBA JM, GONZALEZ- REYES JA. Zonal changes in ascorbate and hydrogen peroxide contents, peroxidase and ascorbate-related enzyme activities in onion roots. *Plant Physiology* 131, 697–706, 2003.

CREISSEN, G.P., FIRMIN, J., FRYER, M., KULAR, B., LEYLAND, N., REYNOLDS, H., PASTORI, G., WELLBURN, F., BAKER, N., WELLBURN, A. AND MULLINEAUX, P. Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplast of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell*, 11, 1277–1291, 1999.

DHAKAL, M.R; PANDEY, A.K. Storage potential of niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) seeds under ambient conditions. *Seed science and technology*, v.29, p.205-213, 2001.

D'ARCY-LAMETA, A.; FERRARI-ILIOU, R.; CONTOUR-ANSEL, D.; PHAM-THI, A.T.; ZUILY-FODIL, Y. Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in cowpea leaves. *Annals of Botany*, v.97, p.133-140, 2006.

DANTAS, J.P.; MARINHO, F.J.L.; FERREIRA, M.M.M.; AMORIM, M. do S.N.; ANDRADE, S.I. de O.; SALES, A.L. Avaliação de genótipos de feijão-de-corda sob salinidade. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.6, n.3, p.425-430, 2002.

DANTAS, B.F.; RIBEIRO, L.S.; ARAGÃO, C.A. Physiological response of cowpea seeds to salinity stress. *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 27, nº 1, p.144-148, 2005.

DAVEY, M.W.; VAN MONATGU M, SANMATIN M, KANELIS A, SMIRNOFF N, BENZIE I.J.J, STRAIN J.J, FAVELL D, FLETCHER J. Plant L-Ascorbic Acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J.SCI Food Agric.* 80: 825–860, 2000.

DAVIES, M.B., AUSTIN, J. AND PARTRIDGE, D.A. *Vitamin C: Its chemistry and biochemistry*. Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 1991.

DE GARA, L., DE PINTO, M.C. AND ARRIGONI, O. Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum* 100, 894–900, 1997.

DE GARA, L., PACIOLLA, C., DE TULLIO, M.C., MOTTO, M. AND ARRIGONI, O. Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum* 109, 7–13, 2000.

DE GARA, L., DE PINTO, M.C., MOLITERNI, V.M.C. AND D'EGIDIO, M.G. Redox regulation and storage processes during maturation in kernels of *Triticum durum*. *Journal of Experimental Botany* 54, 249–258, 2003.

DE TULLIO, M.C.; ARRIGONI, O. The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. *Seed Sci. Res.* 13: 249-260, 2003.

DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed science and technology*, v.1, p.427-452, 1973.

DELOUCHE, J.C. Germinação, Deterioração e Vigor da Semente. *Revista SEED News*, v. 6, n. 6, 2002.

DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M.; CORPAS, F.J.; PALMA, J.M.; BARROSO, J.B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology*, v.141, p.330-335, 2006.

DEUNER, S.; ALVES, J.D.; FRIES, D.D.; ZANANDREA, I.; LIMA, A.A.; HENRIQUE, P.C.; GOULART, P.F.P. Hydrogen peroxide and ascorbic acid effects on antioxidant enzyme activity in coffee seedlings. *Revista Ceres* 55: 134-140, 2008.

DHAKAL, M.R; PANDEY, A.K. Storage potential of niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) seeds under ambient conditions. *Seed science and technology*, v.29, p.205-213, 2001.

DIAS, D. C. F. S.; MARCOS FILHO, J. Teste de vigor baseados na permeabilidade das membranas celulares: I. Condutividade elétrica. Informativo Abrates, v.5, n.1, p.26-36, 1995.

DIPIERRO, N.; MONDELLI D, PACIOLLA C, BRUNETTI G, DIPIERRO S. Changes in the ascorbate system in the response of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) roots to aluminium stress. J. Plant Physiol. 162: 529-536, 2005.

DOLATABADIAN, A.; MODARRES SANAVY, S.A.M. Effect of the Ascorbic Acid, Pyridoxine and Hydrogen Peroxide Treatments on Germination, Catalase Activity, Protein and Malondialdehyde Content of Three Oil Seeds Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj 36 (2) 2008, 61-66

DOLATABADIAN, A.; MODARRES SANAVY, S.A.M. Effect of the Ascorbic Acid, Pyridoxine and Hydrogen Peroxide Treatments on Germination, Catalase Activity, Protein and Malondialdehyde Content of Three Oil Seeds Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj 36 (2) 2008, 61-66

DOLATABADIAN, A., S. A. M. MODARRES-SANAVY, AND N. AHMADIAN-CHASHMI. The effects of foliar application of ascorbic acid (vitamin c) on antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and proline accumulation of canola (*Brassica napus* L.) under conditions of salt stress. J. Agron. Crop Sci. 194, 206–213, 2008.

DOLATABADIAN, A. AND R. J. SALEH JOUNEGHANI. Impact of exogenous ascorbic acid on antioxidant activity and some physiological traits of common bean subjected to salinity stress. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. 37(2): 165-172, 2009.

DOLATABADIAN, A.; MODARRES SANVY, S.A.M.; SHARIFI, M. Alleviation of Water Deficit Stress Effects by Foliar Application of Ascorbic Acid on *Zea mays* L.J. Agronomy & Crop Science, v.195, p.347-355, 2009.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Analytical Chemistry, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

DUTRA, A.S.; MEDEIROS FILHO, S.; TEÓFILO, E.M. Condutividade elétrica em sementes de feijão caupi. Revista Ciência Agronômica, Fortaleza-CE, v. 37, n. 02, p. 166-170, 2006.

DUTRA, A.S.; TEÓFILO, E.M. Envelhecimento acelerado para avaliar o vigor de sementes de feijão caupi Revista Brasileira de Sementes, vol. 29, nº 1, p.193-197, 2007.

ENEAS FILHO, J.; O. BRILHANTE DE OLIVEIRA NETO, J. TARQUINIO PRISCO, E. GOMES FILHO, AND C. MONTEIRO NOGUEIRA. Effects of salinity in vivo and in vitro on cotyledonary galactosidases from *Vigna unguiculata* (L.) Walp. during seed germination and seedling establishment. R. Bras. Fisiol. Veg. v.7, p.135—142, 1995.

EHLERS, J.D. AND A.E. HALL. Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Field Crops Res., 53: 187-204, 1997.

EL-TOHAMY, W. A.; EL-ABAGY, H. M. AND EL-GREADLY, N. H. M. Studies on the effect of putrescine, yeast and vitamin C on growth, yield and physiological response of

eggplant (*Solanum melongena*, L.) under sandy soil conditions. *Austr. J. Basic and Appl. Sci.*, 2(2):296-300, 2008.

EL-QUESNI FATMA E.M.; G. ABD EL-AZIZ, NAHED AND M. KANDIL MAGDA. Some studies on the effect of ascorbic and α -tocopherol on the growth and some chemical composition of *Hibiscus rosa sineses* L. *Ozean Journal of Applied Sciences*, 2(2): 159-167, 2009.

FERGUSON, J. An introduction to seed vigour testing. Seed vigour testing seminar. International seed association, p.1-9, 1995.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas ao sistema de defesa e estresse oxidativo. Artigo de revisão, 2003.

FINNIE, C., MELCHIOR, S., ROEPSTORFF, P. AND SVENSSON, B. Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley. *Plant Physiology* 129, 1308–1319, 2002.

FOYER, C.H. AND NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol*, v.146, p.359–88, 2000.

FOYER, C. H., AND G. NOCTOR. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* 119, 355–364, 2003.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, v. 17. p. 1866-1875, 2005.

FLORIANO, E.P. Armazenamento de sementes florestais. Caderno Didático nº 1, v., p.10, 2004.

FLOWERS, T.J. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v.55, p.307-319, 2004.

FREIRE-FILHO, F.R. Genética do caupi. In: ARAUJO, J.P.P. de; WATT, E.E., org. O caupi no Brasil. Brasília: EMBRAPA/IITA, 1988. cap.6, p.159-229.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; ROCHA, M.M.; LOPES, A.C.A. Adaptabilidade e estabilidade da produtividade de grãos de genótipos de caupi enramador de tegumento mulato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, p.591-598, 2003.

FUJITA, M.; FUJITA, Y.; NOUTOSHI, Y.; TAKAHASHI, F.; NARUSAKA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, v.9, p.436-442, 2006.

GOEL, A.; GOEL, A.K.; SHEORAN, I.S. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *J. Plant Physiol.* 160: 1093–1100, 2003.

GOMES FILHO, E., AND J. T. PRISCO. Effects of NaCl salinity in vivo and in vitro on the proteolytic activity of *Vigna sinensis* (L.) Savi cotyledons during germination. *R. Bras. Bot.* v.1, p.83—88, 1978.

GOMES FILHO, E.; PRISCO, J. T.; CAMPOS, F. A. P. AND ENEAS FILHO, J. Effects of NaCl salinity in vivo and in vitro on ribonuclease activity of *Vigna unguiculata* cotyledons during germination. *Physiol. Plant.* v.59, p.183—188, 1983.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual review of plant physiology*, v.30, p.149-155, 1980.

GRIFFITHS, H. R.; LUNEC, J. Ascorbic Acid in the 21st Century – More than a Simple Antioxidant *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v. 10, p. 173-182, 2001.

GUNES, A.; INAL, A.; ALPASLAN, M.; CICEK, N.; GUNERI, E.; ERASLAN, F.; GUZELORDU, T. Effects of exogenously applied salicylic acid on the induction of multiple stress tolerance and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.). *Archives of Agronomy and Soil Science*, v.51, p.687-695, 2005.

GUNES, A.; INAL, A.; ALPASLAN, M.; ERASLAN, F.; BAGCI, E.G.; CICEK, N. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology*, v.164, p.728-736, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine, v., p.543, 1989.

HAMADA, A.M. AND A.M.A. AL-HAKIMI. Exogenous ascorbic acid or thiamine increases the resistance of sunflower and maize plants to salt stress. *Acta Agronomica Hungarica*, 57(3), pp. 335–347, 2009.

HAMID, M.; ASHRAF, M.Y.; UR, R.K.I.; ARASHAD, M. Influence of salicylic acid priming on growth and some biochemical attributes in wheat grown under saline conditions. *Pak. J. Bot.* v. 40, p.361-367, 2008.

HAMPTON, J.G.; TEKRONY, D.M. Controlled deterioration test. *Handbook of vigour test methods*, v., p.70-78, 1995.

HARTMANN, T.N.; FRICKER, M.D.; RENNENBERG, H.; MEYER, A.J. Cell-specific measurement of cytosolic glutathione in poplar leaves. *Plant, Cell and Environment*, v. 26, p.965-975, 2003.

HASSON, E., AND A. POLJAKOFF-MAYBER. A germination of pea seeds exposed to stress. *Israel J. Bot.* v.29, p.98—104, 1980.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 125, 189–198, 1968.

HEDDEN, P. AND KAMIYA, Y. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 431–460, 1997.

HEMAVATHI, UPADHYAY CP, KO EY, NOOKARAJU A, KIM HS, HEUNG JJ, OH MO, REDDY AC, CHUN SC, KIM DH, PARK SW. Over-expression of strawberry D-galacturonic acid reductase in potato leads to accumulation of vitamin C with enhanced abiotic stress tolerance. *Plant Science*, v.177, n.5, p.659–667, 2009.

HEMAVATHI; UPADHYAYA, C.P.; AKULA, N.; YOUNG, K.E.; CHUN, S.C.; KIM, D.H, PARK, S.W. Enhanced ascorbic acid accumulation in transgenic potato confers tolerance to various abiotic stresses. *Biotechnol Lett*, v.32, p.321–330, 2010.

HERNÁNDEZ, J.A., M.A. FERRER, A. JIMÉNEZ, A. ROS-BARCELÓ AND F. SEVILLA. Antioxidant system and O_2^- / H_2O_2 production in the apoplast of *Pisum sativum* L. leaves: its relation with NaCl-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.* 127:817–831, 2001

HODGE, J.E.; HOFREITER, B.R. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: WILSTER, R.L.; WOLFROM, M.L. (eds.). *Methods in carbohydrates chemistry*. New York : Academic Press, 1962. v.1, p.380-394.

HOLANDA, J.S.; AMORIM, J.R.A. Qualidade da água para irrigação In: GHEYI, H.R.; QUEIROZ, J.E.; MEDEIROS, J.F. (ed.). *Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada*. Campina Grande: UFPB, 1997. Cap. 5, p.137-165.

JAIN, A.K.; NESSLER, C.L. Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Mol Breed* 6:73–78, 2000.

JAYACHANDRAN, M., P. RAJENDRAN AND M. THANGARAJ. Effect of growth regulators on growth and yield of wet season rice. *Madras. Agric. J.*, 87: 340-342, 2000.

JIANG, M.Y.; ZHANG, J.H. Role of abscisic acid in water stress induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Free Radic. Res.* 36(9): 1001-1015, 2002.

JUNGKLANG, J. Physiological and biochemical mechanisms of salt tolerance in *Sesbania rostrata* Brem. and Oberm. PhD thesis. University of Tsukuba, Tsukuba. 2005.

KERMODE, A.R. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Plant Sci* 9, 155-195, 1990.

KENDE, H. Ethylene biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44, 283–307, 1993.

KHADER, S. E. S. A. Effect of gibberellic acid and vapor guard on ripening, amylase and peroxidase activities and quality of mango fruits during storage. *Journal of Horticultural Science, Ashford*, v. 67, n. 6, p. 855-860, 1992.

KHAN, M.G. AND H.S. SRIVASTAVA. Changes in growth and nitrogen assimilation in maize plants induced by NaCl and growth regulators. *Biol. Plant.*, 41(1): 93-99, 1998.

KHAN, M.A.; AHMAD, M.Z.; HAMEED, A. Effect of sea salt and L-ascorbic acid on the seed germination of halophytes. *J. Arid Environ.* v.67, p.535-540, 2006.

KHAN, A.; IQBAL, I.; SHAH, A.; NAWAZ, H. AHMAD, F.; IBRAHIM, M. Alleviation of Adverse Effects of Salt Stress in Brassica (*Brassica campestris*) by Pre-Sowing Seed Treatment with Ascorbic Acid. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 7 (5): 557-560, 2010.

KIKUTI, A.L.P.; OLIVEIRA, J.A.; MEDEIROS FILHO, S.; FRAGA, A.C. Armazenamento e qualidade fisiológica de sementes de algodão submetidas ao condicionamento osmótico. *Ciência e Agrotecnologia*, v.26, n.2, p.439-443, 2002.

KLAPHECK, S. Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiologia Plantarum* 74, 727-732, 1988.

KLAPHECK, S., ZIMMER, I. AND COSSE, H. Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant and Cell Physiology* 31, 1005-1013, 1990.

KNIGHT, H.; KINIGHT, M.R. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science*, v.6, n.6, p.262-267, 2001.

KRANNER, I.; BIRTIC, S.; ANDERSON, K.M.; HUGH; PRITCHARD, W. Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free radical biology & medicine*, 2006.

KRZYZANOWSKI, F.C.H.; COSTA, J.D. SCOTT, C.A.; DA SILVEIRA, J.F. O envelhecimento precoce na avaliação de lotes de sementes de feijoeiro. *Revista Brasileira de Sementes*, v.4, n.1, p.45-58, 1982.

KRZYZANOWSKI, F.C.H.; VIEIRA, R.D. Deterioração controlada. Vigor de sementes: conceitos e testes. *ABRATES*, v., p. 218, 1999.

KORYO, H.W. Study of potential cash crop halophytes in a quick check system task. *Veg. Science*, v.38, p.5-17, 2003.

KWON, S.Y.; JEONG YJ, LEE HS, KIM JS, CHO KY, ALLEN RD. Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen mediated oxidative stress. *Plant Cell Environ* 25:873-882, 2002.

KWON, S.Y.; CHOI, S.M.; AHN, Y.O.; LEE, H.S.; LEE, H.B.; PARK, Y.M.; KWAK, S.S. Enhanced stress-tolerance of transgenic plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *J Plant Physiol* 160:347-353, 2003.

LABOURIAU, L.G. A germinação das sementes. Organização dos Estados Americanos. Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Série de Biologia. Monografia 24, 1983. 174p.

LAW, M.Y.; CHARLES, S.A.; HALLIWELL, B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. *Biochemical Journal*, v.210, n.3, p.899-903, 1983.

LECHNO, S.; ZAMSKI, E.; TEL-OR, E. Salt stress-induced responses in cucumber plants. *J Plant Physiol* 150:206–211, 1997.

LEE, S.K. & KADER, A.A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Post Harv Biol Technol.* v.20, p.207-220, 2000.

LEPRINCE, O., HENDRY, G.A.F. AND ATHERTON, N.M. Free radical processes induced by desiccation in germinating maize. The relationship with respiration and loss of desiccation tolerance. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 102B, 211–218, 1994.

LEPRINCE, O., HENDRY, G.A.F., ATHERTON, N.M. AND WALTERS- VERTUCCI, C. Free radicals and metabolism associated with the acquisition and loss of desiccation tolerance in developing seeds. *Biochemical Society Transactions* 24, 451–455, 1996.

LIN, S.S. Alterações na lixiviação eletrolítica, germinação e vigor da semente de feijão envelhecida sob alta umidade relativa do ar e alta temperatura. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.2, n.2, p.1-6, 1990.

LISO, R., CALABRESE, G., BITONTI, M.B. AND ARRIGONI, O. Relationship between ascorbic acid and cell division. *Experimental Cell Research* 150, 314–320, 1984.

LORETO, F.; VELIKOVA, V.; DI MARCO, G. Respiration in the light measured by CO₂ emission in CO₂ atmosphere in maize leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* v.28, p.1103–1108, 2001.

MACEDO, E.C.; GROTH, D.; SOAVE, J. Influência da embalagem do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de arroz. *Revista brasileira de Sementes*, v.21, n.1, p.65-67, 1999.

MANDHANIA, S., S. MADAN AND V. SAWHNEY. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. *Biol. Plant*, 227: 227–231, 2006.

MANO J, OHNO C, DOMAE Y, ASADA K. Chloroplastic ascorbate peroxidase is the primary target of methylviologen- induced photooxidative stress in spinach leaves: its relevance to monodehydroascorbate radical detected with in vivo ESR. *Biochem Biophys Acta* 1504:275–287, 2001.

MAIA, F. M. M. Composição e caracterização nutricional de três cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp: EPACE-10, Olho de ovelha e IPA-206. Fortaleza: UFC, 1996. 87p. Dissertação Mestrado.

MAIA, J.M. Efeitos aditivos e interativos de tratamentos de seca e NaCl na resposta antioxidativa de raízes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L.). Dissertação de mestrado, UFC, Fortaleza, CE, 126p, 2004.

MAKELA, P., K.M. JOKINEN, P. KONTTURI, S.P.E. PELTONEN AND S. SOMERSALO. Folier application of betaine and proline in improving plant abiotic stress glycinebetaine a novel product from sugar beet as an approach to increase tomato yield. *Ind. Crop. Prod.*, 7: 139-148, 1998.

MANSOUR, M.M.F. AND K.H.A. SALAMA. Cellular basis of salinity tolerance in plants. *Environ. Exp. Bot.*, v.52, p.113-122, 2004.

MARCOS FILHO, J.; SILVA, W.R.; NOVENBRE, A.D.C. Estudo comparativo de métodos para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, com ênfase ao teste de condutividade elétrica. *Pesquisa Agropecuária*, 1990.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: Vieira, R.D. & Carvalho, N.M. *Testes de Vigor em sementes*. FUNEP, v., p.164, 1994.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: Krzyzanowski, F.C.; Vieira, R.D.; França Neto, J.B. *Vigor de sementes: conceitos e testes*. ABRATES, p.1-24, 1999.

MARCOS FILHO, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. *The germination of seeds*. 2. ed. Oxford: Pergamon Press Ltda., 1975. 192p.

MAITY, S.; BANERJEE, G.; ROY, M.; PAL, C.; PAL, B.; CHAKRABARTI, D.; BHATTACHARJEE, A. Chemical induced prologation of seed viability and stress tolerance capacity of mung bean seedlings. *Seed science technology*, v.28, p.155-162, 2000.

MCDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed science thechnology*, v.27, p.177-237, 1999.

MCKERSIE, B.D.; LESHEM, Y.Y. *Stress and stress coping in cultivated plants* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London, 1994. 256 p.

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

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOLLER, I.M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, v.58, p.459-481, 2007.

MÜLLER-MOULÉ, P., GOLAN, T., NIYOGI, K.K., Ascorbate-deficient mutants of *Arabidopsis* grow in high light despite chronic hotooxidative stress. *Plant Physiol.* 134, 1163–1172, 2004.

MÜLLER-MOULÉ, P., HAVAUX, M., NIYOGI, K.K. Zeaxanthin deficiency enhances the high light sensitivity of an ascorbate-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133, 748–760, 2003.

MUNNS, R. Physiological process limiting plant growth in saline soils – some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.*, v.16, p.15-24, 1993.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* v.25, p.239-250, 2002.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.*, v.167, p.645-663, 2005.

MUNNS, R.; JAMES, R.A.; LAUCHLI, A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.*, v.57, p. 1025-1043, 2006.

MUNNS, R.; Tester, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* v.59, p.651–81, 2008.

MURILLO-AMADOR, B., AND E. TROYO-DIÉGUEZ. Effects of salinity on the germination and seedling characteristics of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] . *A. J. Exp. Agric.* v.40, p.433—438, 2000.

MURILLO-AMADOR, B.; TROYO-DIÉGUEZ, E.; LÓPEZ-CORTÉS, A.; JONES, H.G.; AYALA-CHAIREZ, F AND TINOCO-OJANGUREN, C.L. Salt tolerance of cowpea genotypes in the emergence stage. *A. J. Exp. Agric.* 41, 81—88, 2001.

MURILLO-AMADOR, B., A. LÓPEZ-CORTÉS, C. KAYA, J. LARRINAGA-MAYORAL AND A. FLORES HERNÁNDEZ. Comparative effects of NaCl and polyethylene glycol on germination, emergence and seedling growth of cowpea. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 188: 235-247, 2002.

MURTHY, U.M.N., LIANG, Y.H., KUMAR, P.P. AND SUN, W.Q. Non-enzymatic protein modification by the Maillard reaction reduces the activities of scavenging enzymes in *Vigna radiata*. *Physiologia Plantarum* 115, 213–220, 2002.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plantulas. In: KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANCA NETO, J.B. (Eds.). *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES, 1999. p.2.1 - 2.24.

NEILL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol.* 5:388–395, 2002.

NOCTOR, G., AND C. H. FOYER. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249–279, 1998.

NOCTOR, G., VELJOVIC-JOVANOVIC, S., DRISCOLL, S., NOVITSKAYA, L., AND FOYER, C.H. Drought and oxidative load in wheat leaves: A predominant role for photorespiration? *Ann. Bot. (Lond.)* 89, 841–850, 2002.

OLIVEIRA, A.B; GOMES-FILHO, E; ENEAS-FILHO, J; PRISCO, J. T; ALENCAR, N. L.M. Seed priming effects on growth, lipid peroxidation and activity of ROS scavenging enzymes in NaCl-stressed sorghum seedlings from aged seeds. *Journal of Plant Interactions (Print) JCR*, v. 11, p. 1-1, 2011.

PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B .B.; MOHAN, R.; DASHIELL, K. E; JACKAI, L. E. N., eds. *Advances in Cowpea Research*. Tsukuba; IITA JIRCAS, 1997. p.1-12.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B.; MITTRA, B. Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. *Trees*, v.18, p.167-174, 2004.

PASSARDI, P., D. LONGET, C. PENEL, AND C. DUNAND. The class III peroxidase in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* 65:1879-1893, 2004.

PASTORI, G. M., AND C. H. FOYER. Common components, networks, and pathways of reactive oxygen species-tolerance to stress the central role of ‘Redox’ and Abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol.* v.129, p.7460–7468, 2002.

PASTORI, G.M., KIDDLE, G., ANTONIW, J., BERNARD, S., VELJOVIC-JOVANOVIC, S., VERRIER, P.J., NOCTOR, G. AND FOYER, C.H. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell* 15, 939–951, 2003.

PALLANCA, J.E. AND SMIRNOFF, N. Ascorbic acid metabolism in pea seedlings. A comparison of Dglucosone, L-sorbosone, and L-galactono-1,4-lactone as ascorbate precursors. *Plant Physiology* 120, 453–461, 1999.

PAMMENTER, N.W. AND BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9, 13–37, 1999.

PEOPLES, M.B.; FAIZAH, A.W.; REAKASEM, B.; HERRIDGE, D.F. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. 76p, 1989.

PEREIRA, J.R.; VALDIVIESCO, C.R.; CORDEIRO, G.G. Recuperação de solos afetados por sódio através do uso de gesso. In: *Seminário sobre o uso de fosfogesso na agricultura*, 1, 1985, Brasília. Resumos...Brasília, 1985, p.85-105.

PIGNOCCHI, C. & FOYER, C. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signaling. *Curr Opin in Plant Biol.* v.6, p.379–389, 2003.

POPINIGIS, F. Fisiologia de sementes. ABEAS, v., p. 289, 1985.

POTTERS, G., HOREMANS, N., CAUBERGS, R.J. AND ASARD, H. Ascorbate and dehydroascorbate influence cell cycle progression in a tobacco cell suspension. *Plant Physiology* 124, 17–20, 2000.

POTTERS, G.; DE GARA, L.; ASARD, H.; HOREMANS, N. Ascorbate and glutathione guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol Biochem* 40: 537–548, 2002.

POWELL, A.A.; YULE, L.J.; JING, H.C.; GROOT, S.P.C.; BINO, R.J.; PRITCHARD, H.W. The influence of aerated hydration seed treatment on seed longevity as assessed by the viability equations. *Journal experimental botany*, v.51, p.2031-2043, 2000.

PRISCO, J. T. Contribuição ao estudo da fisiologia do estresse salino durante a germinação e estabelecimento da plântula de uma glicófita (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Tese de Professor Titular. Universidade do Ceará, Fortaleza, Brasil, 1987.

PRISCO, J. T., AND G. H. F. VIEIRA. Effects of NaCl salinity on nitrogenous compounds and proteases during germination of *Vigna sinensis* seeds. *Physiol. Plant.* v.36, p.317—320, 1976.

PRISCO, J. T., J. ENEAS FILHO, AND E. GOMES FILHO. Effect of NaCl salinity on cotyledon starch mobilization during germination of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seeds. *R. Bras. Bot.* v.4, p.63—71, 1981.

PRIESTLEY, D.A. Seed aging. Implications of seed storage and persistence in soil. Ithaca: Cornell University Press, 1986.

RACHIE, K.; RAWAL, K.M. Integrated approaches to improving cowpeas, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Ibadan: IITA, 1976. 36p. (Technical Bulletin, 5).

RAHMAN, M.S., T. MATSUMURO, H. MIYAKE AND Y. TAKEOKA. Salinity-induced ultrastructural alternations in leaf cells of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Prod. Sci.*, v.3, p.422-429, 2000.

RAGHURAMULU, Y.; PURUSHOTHAM, K. Effect of pre-storage and mid-storage treatments on the germination of coffee seeds. *Journal of Coffee Research*, v. 21, n. 1, p. 42-51, 1991.

REDDY, A. R.; CHIATANYA, K. V.; VIVEKANADAN, M. Drought induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* v.161, p.1189–1202, 2004.

RENGASAMY, P.; CHITTLEBOROUGH, D.; HELVAR, K. Root-zone salinity and plant-based solutions for dryland salinity. *Plant and Soil*, v.257, p.249-260, 2003.

RHOADES, J.D.; KANDIAH, A.; MASHALI, A.M. The use of saline waters for crop production- FAO irrigation and drainage paper 48. [S.I], 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/T0667E/t0667e08.htm#TopOfPage>

ROBERTS, E.H. Predicting the viability of seeds. *Seed science and technology*, v.1, p.499-514, 1973.

RODO, A.B.; PANOBIANCO, M. MARCOS FILHO, J. Metodologia alternativa do teste de envelhecimento acelerado para sementes de cenoura. *Scientia agrícola*, v.57, n.2, p.289-292, 2000.

ROSSETO, C.A.V.; MARCOS FILHO, J. Comparação entre os métodos de envelhecimento acelerado e de deterioração controlada para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de solja. *Scientia Agrícola*, v.52, n.1, p.123-131, 1995.

RONSEIN, G.E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G.R. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova*, v.29, p.563-568. 2006.

SAIRAM, R.K., SRIVASTAVA, G.C., AGARWAL, S., MEENA, R.C. Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plant.* 49, 85–91, 2005.

SAJID, Z.A AND AFTAB, F. Amelioration of salinity tolerance in *Solanum tuberosum* L. by exogenous application of ascorbic acid. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* 45:540–549, 2009.

SALINAS, A.R.; SANTOS, O.S.B.; VILLELA, F.A.; SANTOS FILHO, B.G.; SOUZA SOARES, L.A.; OLIVEIRA, M.F. Fisiologia da deterioração em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) durante o armazenamento. *Revista Científica Rural, Bagé*, v.3, n.2 p. 106-118, 1998.

SALINAS, A.R.; YOLDJIAN, A.M.; ROQUE; CRAVIOTO, M.Y.; BISARO, V. Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v.36, p.371-379, 2001.

SALINAS, A.R.; SANTOS, O.S.B.; VILLELA, F.A.; SANTOS FILHO, B.G.; SOUZA SOARES, L.A.; OLIVEIRA, M.F. Fisiologia da deterioração em sementes de soja (*Glycine Max* (l.) Merrill) durante o armazenamento. *Revista científica rural*, v.3,n.2, p.106-118, 1998.

SANTOS, A.P. Embrapa-Meio-Norte. Sistemas de produção, 2ISSN, 1678-8818. Versão eletrônica, 2003.

SEO, M. AND KOSHIBA, T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 7, 41–48, 2002.

SENA, J.V.C. Produção, área colhida e venda de feijão no nordeste. *Informe Rural, Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE*, Ano IV, n.º 22, dez, 2010.

SGHERRI, C.; QUARTACCI, M.F.; NAVARI-IZZO, F. Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess. *Journal of Plant Physiology*, v.164, p.1152-1160, 2007.

SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab. Rev.* 32, 307-326, 2000.

SHALATA, A. AND M.N. PETER. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. *J. Exp. Bot.*, 52: 2207–11, 2001.

SHALATA, A.; TAL, M. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiol Plant* 104:169–174, 1998.

SHALATA, A.; NEUMANN, P.M. Exogenous ascorbic acid (Vitamin C) increases resistance to salt tolerance and reduced lipid peroxidation. *J. Exp. Bot.* 364, 2207–2211, 2001.

SHETEAWI, S.A. Improving Growth and Yield of Salt-stressed Soybean by Exogenous Application of Jasmonic Acid and Ascobin. *Int. J. Agri. Biol.*, Vol. 9, No. 3, 2007

SHIGEOKA, S., ISHIKAWA, T., TAMOI, M., MIYAGAWA, Y., TAKEDA, T., YABUTA, Y., YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 53 (372), 1305–1319, 2002.

SILVEIRA, T.L.D. Regras de Armazenamento de sementes. Núcleo Sementes. Departamento de Fitotecnologia. Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria, 1999.

SINGH, K.B.; FOLEY, R.C.; OÑATE-SÁNCHEZ. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current opinion in plant biology*, v.5, p.430-436, 2002.

STROHECKER, R., HENNING, H.M. *Análisis de vitaminas*: métodos comprobados. Madrid: Paz Montalvo, 1967. 428p.

SKOWRONSKI, L.; GIÚDICE, M. P. del; BORÉM, A.; CARNEIRO, G.E.S.; DIAS, D.C.F. dos S.; CECON, P.R. Qualidade fisiológica de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) colhidas em diferentes estádios de maturação. *Revista Brasileira de Armazenamento*, Viçosa, MG, v. 29, n. 1, p. 45-50, 2004.

SLAVICK, B. Methods of studying plant water relations. New York, springer verlong, 1974. 449p.

SMIRNOFF, N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann Bot* 78:661–669, 1996.

SMIRNOFF, N.; CONKLIN, P.L.; LOEWUS, F.A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 437, 2001.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 229–235, 2000.

SMIRNOFF, N. Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway, engineering and functions. In: Smirnoff, N. (Ed.), *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, pp. 53–86, 2005.

SMITH, P.T. AND B.G. COMB. Physiological and enzymatic activity of pepper seeds (*Capsicum annum*) during priming. *Physiologia Plantarum*, 82: 71-78, 1991.

SMITH, J. A.; HOLMAN, A. S. On-farm storage of dry edible beans: a survey of Nebraska growers and storage guidelines. University of Nebraska Cooperative Extension EC99-794-B. Disponível em: <http://ianrpubs.unl.edu/fieldcrops/ec794.htm>. Acesso em: 10 dez. 2010.

SOUSA, M.F.; CAMPOS, F.A.P.; PRISCO, J.T.; ENÉAS-FILHO, J.; GOMES-FILHO, E. Growth and protein pattern in cowpea seedlings subjected to salinity. *Biologia Plantarum*, v.47, n.3, p.341-346, 2003.

SVIRBELY, J.L. AND SZENT-GYÖRGYI, A. Hexuronic acid as the antiscorbutic factor. *Nature* 129, 576, 1932.

SUBBA RAO, L.V; KUMAR, S.; VANISREE, G. Genetic variability for seedling characteristics among rice (*Oriza sativa* L.) cultivars. *Seed Research*, v.24, p.124-128, 1996.

SUNG, J.M.; JENG, T.L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. *Physiologia Plantarum*, v.91, p.51-55, 1994.

SUDHAKAR C, LAKSHMI A, GIRIDARAKUMAR S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science* 161: 613–619, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant physiology*. Califórnia: The Benjamin/Cummings Publishings Company, 1991. 565p.

TAVILI, A., S. ZARE AND A. ENAYATI. Hydropriming, ascorbic and salicylic acid influence on germination of *Agropyron elongatum* Host. seeds under salt stress. *Res. J. Seed Sci.*, 2: 16-22, 2009.

TEÓFILO, E.M.; DUTRA, A.S.; PITOMBEIRA, J.B.; DIAS, F.T.C.; BARBOSA, F.S. Potencial fisiológico de sementes de feijão caupi produzidas em duas regiões do estado do ceará. *Revista Ciência Agrônômica*, v.39, n.3, p.443-448, 2008.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na⁺ Tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Botany*, v.91, p.503–527, 2003.

TOMMASI, F.; PACIOLLAA, C.; DE PINTO, M.C.; DE GARA, L. Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in *Ginkgo biloba* L. *Seeds Plant Physiology and Biochemistry*, v.44, p.359-368, 2006.

TOMMASI, F., PACIOLLA, C., DE PINTO, M.C. AND DE GARA, L. A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *Journal of Experimental Botany* 52, 1647–1654, 2001.

TOMMASI, F., PACIOLLA, C., DE PINTO, M.C. AND DE GARA, L. Relationships between water levels and ascorbate peroxidase–ascorbate recycling enzymes in recalcitrant

and orthodox seeds. pp. 209–213 in Acosta, M.; Rodriguez Lopez, J.N.; Pedreño, M.A. (Eds) *Plant peroxidases, biochemistry and physiology*. Spain, University of Murcia, 2002.

TOKUNAGA, T.; MIYAHARA, K.; TABATA, K.; ESAKA, M. Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for L-galactono- 1,4-lactone dehydrogenase. *Planta* 220:854–863, 2005.

URIYO, M.G. Changes in enzymes activities during germination of cowpeas (*Vigna unguiculata*, cv. California blackeye). *Food Chemistry*. 73(1):7- 10, 2000.

VAIDYANATHAN, H., P. SIVAKUMAR, R. CHAKRABARTY AND G. THOMAS. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) – differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. *Plant Sci*. 165:1411-1418, 2003.

VILLAGRA, P. E. Germination of *Prosopis argentina* and *P. alata* seeds under saline conditions. *J. Arid Environ*. v.37, p.261—267, 1997.

VIEIRA, R.D. et al. Teste de vigor e suas possibilidades de uso. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). Teste de vigor em sementes. Jaboticabal: Funep/Unesp, 1994. p. 31-47.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Eds.) Testes de vigor em sementes. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.

VIEIRA, E. H. N; BASSINELLO, P. Z.; MELO, L. C.; MOREIRA, G. A.; PEIXITO, D.; GLODER, E. L. Avaliação da qualidade tecnológica do feijão armazenado em Silobolsa. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO – CONAFE, 8., 2005, Goiânia. Anais... Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. v. 2, p. 681-683. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 182).

VIEIRA, R. D., KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. cap.4, p.4.1-4.26.

VIEIRA, E.H.N.; YOKOYAMA, M. Colheita, processamento e armazenamento. In: Vieira, E.H.N.; Rava, C.A. Sementes de feijão- produção e tecnologia. Santo Antonio de Goiás: Embrapa arroz e feijão, p233-248, 2000.

VOLKMAR, K.M., Y. HU, and H. STEPPUHN. Physiological responses of plants to salinity: a review. *Can. J. Plant Sci*. v.78, p.19-27, 1998.

YOUNIS, M.E.; ABBAS, M.A.; SHUKRY, W.M. Plant growth metabolism and adaptation in relation to stress conditions. XV. Effects of salinity on growth and metabolism of *Phaseolus vulgaris*. *Biol Plant*, v.35, p.417–424, 1993.

YOUNIS, M.E.; HASANEEN, M.N.A.; KAZAMEL, A.M.S. Plant growth, metabolism and adaptation in relation to stress conditions. XXVII. Can ascorbic acid modify the adverse effects of NaCl and mannitol on amino acids, nucleic acids and protein patterns in *Vicia faba* seedlings? *Protoplasma*, v.235, p.37–47, 2009.

YU, B.P.; CHUNG, H.Y. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging mechanisms of ageing and development, v. 127, p.436-443, 2006.

WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed science res.* V.8, p.223-244, 1998.

WANG, W.B.; KIM, Y.H.; LEE, H.S.; KIM, K.Y.; DENG, X.P.; KWANK, S.S. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiol. Biochem.* v.47, p.570-577, 2009

WANG, L.J. & LI, S.H. Thermotolerance and related antioxidant enzyme activities induced by heat acclimation and salicylic acid in grape (*Vitis vinifera* L.) leaves. *Plant Growth Regulation.* v.48, p.137-144, 2006.

WAHID, A.; M PERVEENA, S GELANIA, S. M.A. BASRA. Pretreatment of seed with H₂O₂ improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. *Journal of Plant Physiology.* 164: 283-294, 2007.

WILLIAMS, R.D. Moisture stress and hydration-dehydration effects on hemp *Sesbania* (*Sesbania exaltada*) seed germination. *Weed Science, Lawrence*, v.28, n.2, p.487-492, 1980.

WOLUCKA, B.A.; GOOSSENS, A.; INZÉ, D. Methyl jasmonate stimulates the de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. *Journal of Experimental Botany* 56, 2527–2538, 2005.

WRIGTH, S. Alguns dados da física e da química das águas dos açudes nordestinos. *Boletim técnico/DNOCS, Fortaleza*, 39(1): p.21-31, 1981.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K. AND ZHU, J.K. Cell signaling during cold, drought and salt stress. *Plant Cell* 14 (suppl.), S165–S183, 2002.

ZEINALI, E.; SOLTANI, A.; GALESHI, S. Response of germination components to salinity stress in oil seed rape (*Brassica napus*L.). *Iranian J of Agric Sci*, v.33, p.137-145, 2002.

ZHAO, J.; DAVIS, L.C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, v.23, p.283-333, 2005.

ZHU, J.K. Plant salt tolerance. *Trends Plant Science*, v.6, p.66–71, 2001.