

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



DISSERTAÇÃO

**METABOLISMO ANTIOXIDATIVO PARA A CLASSIFICAÇÃO DE
LOTES DE SEMENTES QUANTO AO VIGOR**

Isabel Cristina Gouvêa de Borba

Pelotas, maio de 2013

ISABEL CRISTINA GOUVÊA DE BORBA

**METABOLISMO ANTIOXIDATIVO PARA A CLASSIFICAÇÃO DE
LOTES DE SEMENTES QUANTO AO VIGOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, com requisito parcial da obtenção do título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Dario Munt de Moraes

Co-orientadores: Dr^a. Juliana de Magalhães Bandeira

Dr^a. Patrícia Marini Madruga

Pelotas, maio de 2013

Dados Internacionais de Publicação (CIP)

B726m Borba, Isabel Cristina Gouvêa de
Metabolismo Antioxidativo Para Classificação de
Lotes de Sementes Quanto ao Vigor. / Isabel Cristina
Gouvêa de Borba; Prof. Dr. Dario Munt de Moraes,
orientador; Dra. Juliana de Magalhães Bandeira e Dra.
Patricia Marini Madruga, co-orientador. - Pelotas RS,
2013.
80 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (), Programa de Pós
Graduação em Fisiologia Vegetal Universidade Federal
de Pelotas, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas
RS, 2013.

1.Zea mays L.. 2.Enzimas antioxidantes.
3.Phaeseolus vulgares L.. 4.Qualidade Fisiológica.
5.Glycine max L. . I. Moraes, Prof. Dr. Dario Munt de
, orient. II. Madruga, Dra. Juliana de Magalhães
Bandeira e Dra. Patrícia Marini , co-orient. III.
Título.

CDD: 581.1

Catálogo na Fonte: Leda Cristina Peres Lopes CRB:10/2064

Banca examinadora:

Dr^a Juliana de Magalhães Bandeira

Dr^a Caroline Leivas Moraes

Dr Sidnei Deuner

Dra^a Claudete Miranda Abreu



*"A personalidade
é a média ponderada das experiências sofridas;
e a individualidade, a síntese das mesmas."*

De Rose

*Dedico a Deus, meus pais e especialmente a minha
Vô Celi e Jia Jânia Gouvêa que estão junto
ao mestre para guiar meus passos e caminhos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a Deus e a minha protetora Nossa Senhora de Guadalupe;

Aos meus pais Tristão Franklin Alves de Borba e Joana Maria Gouvea de Borba, por dedicarem toda a sua vida em me proporcionar àquilo que o destino infelizmente não lhes proporcionou;

Aos entes que perdi durante esta fase da minha vida, minha vó Celi Gouvea e tia Tânia Gouvea Bruno que sempre estiveram incansavelmente não só ao meu lado, mas ao lado dos meus primos na luta pela educação e aprimoramento estudantil, sem palavras a elas;

A todos os meus familiares cito alguns aqui: Dindos (Tio Hugo, Regina, Nilza e Terezinha), Tio Djalma, Tio Francisco, Tia Bete, Tia Nara... Meus primos amores: Carlinhos, Junior, Val, Tati, Denise, Laura e os demais que não são menos importantes, pois a família é enorme, que estão sempre ao meu lado sendo longe ou perto não só na busca do sucesso profissional, mas na lida de cuidar dos membros mais velhos de nossa família;

A minha segunda família, meus incansáveis amigos, irmãos de alma: Natália Silcor, Francine Sinnott, Letiene Diogo, Cristiane Garcia, Andrea Neves, Izane Bonel, Silvana Santos, Taís Santos, Raquel Massot e Mara Ritter;

A pessoa mais importante da minha vida Maria Eduarda o tesouro que me faz cada dia ir mais longe;

E as pessoas que sem o qual esta oportunidade e trabalho não seria possível:

Ao meu orientador, professor Dario Munt de Moraes, pela atenção, aprendizado, puxões de orelha conversas e devaneios muito produtivos;

As minhas co-orientadoras, que na verdade foram mais que isso, Juliana Bandeira e Patrícia Marini, por toda dedicação incansável, compreensão, aprendizado científico e pessoal;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal por todo o apoio;

A Banca examinadora pela contribuição e ensinamentos;

Aos melhores funcionários e estagiária que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho: Rudnei, Luiza e Ketrin que são mais que funcionários e estagiária são irmãos e amigos.

Aos meus colegas alguns ainda no Programa por todo esse período de companheirismo, amizade, ajudas e trocas de experiência: Carlos Davi, Camila, Dominique, Fernanda, Marília e claro Natália Silcor.

Aos funcionários: Ari pelas músicas em francês assobiadas no corredor pela manhã e meu apelido carinhosamente dado (paucha), A Sandra pelos abraços e risos logo pela manhã, ao patrimônio do curso, professor Nei Lopes por todas as conversas conselhos e puxões de orelha e ao professor Sidnei Deuner, por me receber para estágio um ano antes da minha aprovação e por ter apostado no meu empenho.

E por fim a todos aqueles que torceram e torcem por mim e que emitem todos os dias energias positivas para minha realização pessoal e profissional.

Muito Obrigado!

RESUMO

BORBA, Isabel Cristina Gouvêa de. Metabolismo Antioxidativo para a classificação de lotes de sementes quanto ao vigor. 2013, 80f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas.

O aumento da demanda por sementes de alta qualidade levou as empresas de tecnologia de sementes a aprimorarem suas técnicas visando associar os testes de germinação e vigor com as respostas das sementes no campo. Contudo, tais respostas podem ser influenciadas durante o processo de maturação e armazenamento, acarretando danos aos sistemas de membranas e levando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais podem levar a diminuição do vigor das sementes. Deste modo, a avaliação das enzimas do sistema antioxidativo pode se tornar uma alternativa enriquecedora para classificar lotes de sementes quanto ao vigor. A maioria dos trabalhos que analisam a atividade dessas enzimas relacionam suas respostas frente a influência de estresses abióticos em diferentes culturas, nesses casos o decréscimo da atividade enzimática remete sementes e plântulas de menor viabilidade e vigor, contudo, neste trabalho onde as sementes não foram submetidas a nenhum tipo de estresse a maior atividade dessas enzimas representaria a maior produção de EROs que, conseqüentemente, evidencia o início do processo deteriorativo, caracterizando o menor vigor das sementes. Diante disso, neste trabalho o objetivo neste trabalho foi diferenciar lotes de

sementes de milho, feijão e soja por meio da atividade das enzimas antioxidantes (SOD – superóxido dismutase, APX – ascorbato peroxidase e CAT – catalase) e verificar se estas enzimas detectam pequenas diferenças no vigor das sementes. Para isso, as sementes das três culturas foram submetidas aos testes padrão de qualidade fisiológica, como germinação, primeira contagem e índice de velocidade de germinação, comprimento e massa seca da parte aérea e raízes, condutividade elétrica e posteriormente, submetidas à análise da atividade de enzimas antioxidantes. Através dos resultados obtidos foi possível verificar que nos lotes das sementes de feijão e soja, que apresentaram alta heterogeneidade entre eles a atividade das enzimas do sistema antioxidativo não foi eficiente na separação dos lotes, contudo, nos lotes de sementes de milho que apresentaram elevada homogeneidade pelos testes padrão de qualidade fisiológica foi possível evidenciar diferença na atividade das enzimas das plântulas oriundas desses lotes de sementes, permitindo classificar os mesmos em diferentes níveis de vigor.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; *Phaseolus vulgaris* L.; *Glycine max* L.; Enzimas antioxidantes; Qualidade Fisiológica.

ABSTRACT

BORBA, Isabel Cristina Gouvêa de. Antioxidative metabolism to classify cultivated species seeds lots according to vigor. 2013, 80f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas.

The increased demand for high quality seeds led seed technology companies to improve their techniques aiming to associate germination and vigor with the responses of the seeds in the field. However, such responses may suffer several influences during storage and maturation process, bringing damage to the membranes' systems, leading to reactive oxygen species (ROS), which can diminish seed vigor. Thus, the antioxidative system enzymes may become an enriching alternative to classify seeds lots according to their vigor. Most works analyzing those enzymes activity report their responses related to the abiotic stress influence in different crops. In such cases, the decrease in the enzymatic activity point to seeds and seedlings with less vigor and viability. However, in this work, where the seeds were not submitted to any kind of stress, those enzymes higher activity expressed a higher ROS production, and that points to the beginning of the deterioration process, featuring lesser seeds vigor. Considering this, the work aimed to distinguish seeds lots of maize, beans and soybean through the antioxidative enzymes activity (SOD – superoxide dismutase, APX – ascorbate peroxidase and CAT - catalase), and relate them

to viability and vigor standard test to verify if those enzymes detect differences in vigor of seeds lots. For this, the seeds of the three crops were submitted to the physiological quality standard tests, such as germination, first count and germination speed index, length and dry mass of roots and shoots, electrical conductivity and antioxidative enzymes. Through the obtained results, it was possible to verify that in beans and soybean seeds lots, which presented high heterogeneity between them, the antioxidative system enzymes activity was not efficient to separate the lots. However, in the maize seeds lots that presented high homogeneity for the physiological quality standard tests, it was possible identifying differences in the enzymes activity in the seedlings derived from those seeds lots, allowing to classify them into different vigor levels.

Key-words: *Zea mays* L.; *Phaseolus vulgaris* L.; *Glycine max* L.; Antioxidant enzymes; Physiological quality.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1: Enzimas antioxidantes para a diferenciação do vigor de sementes de milho

Figura 1. (A) Germinação (G%), (B) primeira contagem de germinação (PCG%), (C) índice de velocidade de germinação (IVG) e (D) emergência de plântulas em casa de vegetação (E%) de três lotes de sementes de milho. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.....**40**

Figura 2. Condutividade elétrica (CE) de três lotes de sementes de milho, em três, seis e 24 horas de embebição. Letras distintas diferem estatisticamente entre si, em cada período de embebição, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.....**41**

Figura 3. (A) Comprimento e (C) massa seca de parte aérea (CPA e MSPA respectivamente) e (B e D) de raízes (CR e MSR, respectivamente) de três lotes de sementes de milho. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.....**42**

Figura 4. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) na parte aérea (A, C e E, respectivamente) e nas raízes (B, D e F, respectivamente) de três lotes de sementes de milho. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.....**43**

ARTIGO 2: Metabolismo antioxidativo para classificação de lotes de sementes de feijão quanto ao vigor

Figura 1. (A) Germinação (G%), (B) primeira contagem de germinação (PCG%), (C) índice de velocidade de germinação (IVG) e (D) emergência de plântulas em casa de vegetação (E%) de três lotes de sementes de feijão. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.....**51**

Figura 2. Condutividade elétrica (CE) de três lotes de sementes de feijão, em três, seis e 24 horas de embebição. Letras distintas diferem estatisticamente entre si, em cada período de embebição, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.....**52**

Figura 3. (A) Comprimento e (C) massa seca de parte aérea (CPA e MSPA respectivamente) e (B e D) de raízes (CR e MSR, respectivamente) de três lotes de sementes de feijão. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.....**53**

Figura 4. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) na parte aérea (A, C e E, respectivamente) e nas raízes (B, D e F, respectivamente) de três lotes de sementes de feijão. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.....**54**

ARTIGO 3: Enzimas antioxidantes para a classificação de lotes de sementes de soja quanto ao vigor

Figura 1. (A) Germinação (G%), (B) primeira contagem de germinação (PCG%), (C) índice de velocidade de germinação (IVG), (D) emergência (E%) e (E) índice de velocidade de emergência de plântulas em casa de vegetação

(IVE) de três lotes de sementes de soja. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.....76

Figura 2. Condutividade elétrica (CE) de três lotes de sementes de soja, em três, seis e 24 horas de embebição. Letras distintas diferem estatisticamente entre si, em cada período de embebição, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.....77

Figura 3. (A) Comprimento e (C) massa seca de parte aérea (CPA e MSPA respectivamente) e (B e D) de raízes (CR e MSR, respectivamente) de três lotes de sementes de soja. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.....78

Figura 4. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) na parte aérea (A, C e E, respectivamente) e nas raízes (B, D e F, respectivamente) de três lotes de sementes de soja. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.....79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	20
2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
ARTIGO 1: Enzimas antioxidantes para a diferenciação do vigor de sementes de milho.....	29
RESUMO.....	30
ABSTRACT.....	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
CONCLUSÃO.....	36

AGRADECIMENTOS.....	36
REFERÊNCIAS.....	36
FIGURAS.....	40
ARTIGO 2: Metabolismo antioxidativo para classificação de lotes de	
sementes de feijão quanto ao vigor.....	44
RESUMO.....	45
ABSTRACT.....	46
INTRODUÇÃO.....	46
MATERIAL E MÉTODO.....	48
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	50
CONCLUSÃO.....	55
AGRADECIMENTOS.....	55
LITERATURA CITADA.....	55
ARTIGO 3: Enzimas antioxidantes para a classificação de lotes de	
sementes de soja quanto ao vigor.....	61
RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	63

INTRODUÇÃO.....	64
MATERIAL E MÉTODOS.....	65
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÃO.....	70
AGRADECIMENTOS.....	70
REFERÊNCIAS.....	70
FIGURAS.....	76
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80

1 INTRODUÇÃO GERAL

A semente é um insumo agrícola muito importante por conter a potencialidade produtiva do vegetal, além de gerar uma das principais fontes de alimento para a população mundial, podendo ser consumida “in natura” ou na forma de produtos industrializados. Por este motivo, para manter a demanda de abastecimento são necessários avanços da tecnologia e aperfeiçoamento das técnicas agrícolas, as quais levarão ao aumento de incentivos para pesquisas na área de qualidade de sementes (RODRIGUES et al., 2009; FUCK et al., 2009).

Em um sistema de produção é comum o descarte de sementes que não se enquadrem no padrão de qualidade para comercialização, sendo que a viabilidade e o vigor das sementes são os principais fatores a serem considerados para a obtenção de melhores resultados econômicos e de conservação das espécies (AMARAL; PESKE, 2000). O aumento da demanda por sementes de alta qualidade levou as empresas de tecnologia de sementes a aprimorarem suas técnicas visando associar os testes de germinação e vigor com as respostas das sementes em campo (BENTO et al., 2010; PEGÔ et al., 2011).

A avaliação do potencial fisiológico de sementes é de fundamental importância nos programas de controle de qualidade, tendo em vista que é constituída de práticas destinadas a verificar o nível de satisfação do seu desempenho. A qualidade da semente se caracteriza pelo somatório de suas características genéticas, físicas, fisiológicas e sanitárias, as quais influenciam

a aptidão de originar uma planta vigorosa e, conseqüentemente, com maior capacidade produtiva (BINOTTI et al., 2008). A avaliação da qualidade fisiológica dispõe de testes que avaliam essas características, por meio de análises rápidas que permitem diferenciar as sementes em lotes de diferentes níveis de vigor, sendo que essas informações são de grande valia para o sistema de produção (SILVA et al., 2008).

A viabilidade é analisada através do teste de germinação que é realizado rotineiramente em laboratórios de análise de sementes e é conduzido em condições favoráveis de umidade, temperatura e substrato, o que permite expressar o máximo potencial da semente na produção de plântulas normais, contudo, é um teste pouco eficiente em diagnosticar diferenças na qualidade fisiológica entre lotes de sementes quando a finalidade é estimar o potencial dos mesmos a campo, onde as condições nem sempre são favoráveis (COIMBRA et al., 2009).

Já, os testes de vigor avaliam o potencial das sementes e o desenvolvimento rápido de plântulas em condições ambientais de campo, sendo que sementes identificadas como de maior vigor possibilitam a formação de um estande homogêneo (NUNES et al., 2008), visto que os testes de vigor sejam eles fisiológicos como, por exemplo, a primeira contagem de germinação e a emergência a campo, ou bioquímicos como a condutividade elétrica e atividade respiratória os mesmos são importantes ferramentas na análise de sementes, pois objetivam avaliar características específicas dos lotes podendo assim classificá-los para obtenção de mudas de qualidade.

Durante o processo de maturação da semente características como a umidade e a temperatura influenciam a qualidade fisiológica da mesma, o que pode acarretar danos no metabolismo enzimático. Prováveis danos podem desencadear deficiências no processo de germinação, ocasionar desuniformidade das plantas e, conseqüentemente, diminuição da produtividade. As condições de estresse em que as sementes e plântulas podem ser submetidas resultam em eventos integrados que podem ocorrer em níveis diferentes de desenvolvimento, ocasionando alterações morfológicas, anatômicas, celulares e bioquímicas que podem ser constatadas em diversos estádios de desenvolvimento da planta, em diferentes espécies, com duração e

intensidades distintas. Trabalhos são desenvolvidos no sentido de estudar as mudanças na atividade de enzimas durante o processo inicial de deterioração como enzimas envolvidas no processo de respiração celular (NOGUEIRA et al., 2005; COUTINHO et al., 2007; MARINI, et al., 2012; MARINI et al., 2013).

Em condições não favoráveis a planta produz espécies reativas de oxigênio (EROs), esses radicais livres referem-se a átomos que possuem um ou mais elétrons não pareados na sua órbita externa, o que então lhe conferem a identidade de agente com alta reatividade, sendo as principais EROs: o radical hidroxila (HO^\bullet), o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (JALEEL et al., 2007; PACHECO et al., 2007; BAILEY-SERRES; PEREIRA, 2010). As EROs se originam como subprodutos do metabolismo aeróbico e fotossintético que, quando em níveis compatíveis com a homeostase redox celular, são componentes de diversas vias de sinalização, mas ao serem submetidas a desequilíbrio ocasionam o início da peroxidação de lipídios, o avanço da degradação de membranas e posterior morte celular. A produção de EROs é um evento dinâmico que ocorre durante o desenvolvimento do vegetal em resposta aos estresses bióticos e abióticos. Por este motivo tem-se dado especial atenção aos danos celulares oxidativos causados pelo acúmulo destes radicais. Durante o processo de envelhecimento celular vegetal ocorre aumento na concentração de EROs endógena o que leva a uma série de mudanças fisiológicas causadas pelo estresse oxidativo (GARCIA, 2012).

O sistema antioxidante enzimático é de fundamental importância para aumentar a tolerância da planta a possíveis distúrbios ocasionados por fatores bióticos ou abióticos. Entretanto, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa no processo de detoxificação de EROs, composto por um conjunto de enzimas onde se destacam a superóxido dismutase (SOD), a ascorbato peroxidase (APX) e a catalase (CAT) (APEL; HIRT, 2004). Uma das EROs mais importantes é o $\text{O}_2^{\bullet-}$ pois é responsável por causar sérios danos às células, visto que o mesmo pode gerar o OH^\bullet podendo ser convertido pela SOD em H_2O_2 . Essa enzima é considerada peça chave neste processo, pois tem como função não só a conversão do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, mas também a

capacidade de controlar outras EROs, sendo encontrada principalmente nas mitocôndrias e cloroplastos (GARCIA, 2012; MAIA et al., 2012).

A catalase por sua vez converte o H_2O_2 em H_2O e O_2 , estando predominantemente presente nos peroxissomos. A principal enzima do ciclo ascorbato glutationa, a ascorbato peroxidase é também responsável pela decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 , sendo esta enzima amplamente encontrada em cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e ainda no citosol, apresentando alta afinidade pelo substrato (SOUZA, 2010).

Diante disso, para a sobrevivência das células, o equilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e a sua detoxificação através da atividade dessas enzimas é crucial, pois mesmo em concentrações mínimas estes radicais são considerados tóxicos para as células, podendo acarretar injúrias que desencadearão danos oxidativos durante o processo de formação da planta (RESENDE et al., 2003; BARREIROS et al., 2006; SAUTTER, 2008; NAKADA et al., 2010). Com intuito de neutralizar as EROs, estas enzimas atuam no sistema com o propósito de minimizar os primeiros sinais de estresse causados, como por exemplo, durante o armazenamento das sementes que pode levar ao início do processo deteriorativo.

Com este propósito a avaliação das enzimas do sistema antioxidativo se torna uma alternativa enriquecedora durante o processo inicial do desenvolvimento e germinação de sementes (TOMMASI et al., 2001), podendo ser utilizadas para classificação de lotes de sementes quanto ao vigor. Portanto, o objetivo neste trabalho foi diferenciar lotes de sementes de milho, feijão e soja por meio da atividade das enzimas antioxidantes e verificar se estas enzimas detectam pequenas diferenças no vigor das sementes.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, A. dos S.; PESKE, S. T. Testes para avaliação rápida da qualidade fisiológica de sementes de trigo. **Revista Brasileira de Agrobiologia**, Pelotas, v.6, n.1, p.12-15. 2000.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Oxford, v.55, p.373–399, 2004.

BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. **Annual Review of Plant Biology**, Oxford, v.59, p.313–339, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BENTO, S. R. S. de O.; SANTOS, A. E. O. dos; MELO, D. R. M. de; TORRES, S. B. Eficiência dos testes de vigor na avaliação da qualidade fisiológica de

sementes de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.32, n.4, p.111-117, 2010.

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

COIMBRA, R. de A.; MARTINS, C. C.; TOMAZ, C. de A.; NAKAGAWA J. Testes de vigor utilizados na avaliação da qualidade fisiológica de lotes de sementes de milho-doce (sh2). **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.9, p.2402-2408, 2009.

COUTINHO, W. M., SILVA-MANN, R., VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, C. F. MACHADO, J. C. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho submetidas a termoterapia e condicionamento fisiológico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.6, p.458-464. 2007.

FUCK, M. P.; BONACELLI, M. B. Sementes geneticamente modificadas: (in)segurança e racionalidade na adoção de transgênicos no Brasil e na Argentina. **Revista Ibero Americana de Ciência e Tecnologia Social**, Madri, v.4, n.12, p.9-30, 2009.

GARCIA, C. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze sob condições controladas de armazenamento. **Dissertação** (Mestrado em Ciências área de concentração Recursos Genéticos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

JALEEL, C. A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; GOPI, R.; SOMASUNDARUM, R.; PANNEERSELVAN, R. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative

stress, praline metabolism and indole alkaloid accumulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Netherlands, v.60, p.110-116, 2007.

MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. **Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz**, Piracicaba, 2005. 495p.

MAIA, J. M.; SILVA, S. L. F.; VOIGT, E. L.; MACÊDO, C. E. C. de; PONTE, L. F. A.; SILVEIRA, J. A. G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **Acta Botanica Brasilica**, Bahia, n.26, v.2, p.342-349, 2012.

MARINI, P.; MORAES, C. L.; MARINI, N.; MORAES, D. M. D.; do AMARANTE, L. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de arroz submetidas ao estresse térmico. **Revista Ciência Agronômica**, Ceará, n.43, v.4, p.722-730, 2012.

MARINI, P.; MORAES, C. L.; LARRÊ, C. F.; LIMA, M. C.; MORAES, D. M. D.; do AMARANTE, L. Indicativos da perda de qualidade de sementes de arroz sob diferentes temperaturas através da atividade enzimática e respiratória. **Iterciencia**, Caracas, n.1 v.38, p.54-59, 2013.

NAKADA, P. G.; OLIVEIRA, J. A.; MELO, L. C. de; SILVA, A. A. da; SILVA; P. A. da; PERINA; F. J. Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, n.3, v.32, p.042-051, 2010.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V.; BURITY, H. A. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.13, p.75-87, 2005.

NUNES, R. N.; NUNES, S. C. P.; FONSECA, P. G.; PEGO, R. G. Efeito da época de colheita, irrigação e permanência de sementes em solo seco no

desenvolvimento inicial de plântulas de *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.30, n.3, p.64-70, 2008.

PACHECO, A. C.; CUSTÓDIO, C. C.; MACHADO NETO, N. B.; CARVALHO, P. R.; PEREIRA, D. N.; PACHECO, J. G. E. Germinação de sementes de camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] e calêndula (*Calendula officinalis* L.) tratadas com ácido salicílico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, p.61-67, 2007.

PÊGO, R. G.; NUNES, U. R.; MASSAD, M. D. Qualidade fisiológica de sementes e desempenho de plantas de rúcula no campo. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.8, p.1341-1346, 2011.

PEREIRA, A. Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa* spp.). **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

RESENDE, M. L. V., SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.2, p.123-130, 2003.

RODRIGUES, V. O.; NASCIMENTO, A. L.; BRANDÃO, A. A.; BRANDÃO JUNIOR, D. S. Germinação de Sementes de Variedades de Mamona Produzidas na Região Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.4, n.2, p.3871-3874, 2009.

SAUTTER, C. K. Indução pós-colheita da síntese de revesratrol e de resistência de frutos a podridões. 79p. **Tese** (Doutorado) -Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

SILVA, B. M. da S.; CARVALHO, N. M. de. Efeitos do estresse hídrico sobre o desempenho germinativo da semente de faveira (*Clitoria fairchildiana* R.A.

Howard. - Fabaceae) de diferentes tamanhos. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.30, n.1, p.55-65, 2008.

SOUZA, K. R. D. de. Desenvolvimento de aerênquima e atividade enzimática em raízes de milho sob encharcamento. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2010.

TOMMASI, F.; PCIOLLA, C.; PINTO, M. C.; GARA, L. D. A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.52, n.361, p.1647-1654, 2001.

ARTIGO 1

**ENZIMAS ANTIOXIDANTES PARA A DIFERENCIAÇÃO DO VIGOR DE
SEMENTES DE MILHO**

(De acordo as normas da Revista Magistra)

Enzimas antioxidantes para a diferenciação do vigor de sementes de milho

Isabel Cristina Gouvêa de Borba¹; Andréa Bicca Noguez Martins¹; Juliana de Magalhães
Bandeira¹; Patrícia Marini¹; Dario Munt de Moraes¹

¹ Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Instituto de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal (PPGFV). Caixa Postal 354 CEP - 96010-900 - Pelotas-RS, Brasil. E-mail: isabel.gouvea.borba@gmail.com, amartinsfv@hotmail.com, bandeira_jm@hotmail.com, marinipati@gmail.com, moraesdm@ufpel.tche.br

Resumo: O processo de deterioração de sementes geralmente ocorre em lotes que tiveram maturação precoce ou que sofreram armazenamento inadequado. Nestes casos pode ocorrer a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e como as alterações causadas pela produção desses radicais nem sempre são detectáveis em análises de viabilidade e vigor, objetivou-se diferenciar lotes de sementes de milho por meio da atividade das enzimas antioxidantes e verificar se estas enzimas detectam pequenas diferenças no vigor das sementes. Para isso, foram utilizados três lotes de sementes de milho, as quais foram submetidas aos testes padrão de qualidade fisiológica de sementes, como germinação, primeira contagem e índice de velocidade de germinação, comprimento e massa seca da parte aérea e raízes e condutividade elétrica, além da análise da atividade de enzimas do sistema antioxidativo (superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase). Os resultados obtidos com os testes de porcentagem de germinação e emergência de plântulas em casa de vegetação apresentaram média de 99,46% e 98,33% respectivamente, o que não permitiu a classificação dos lotes de sementes de milho em diferentes níveis de vigor, assim como a maioria dos demais testes de vigor, com exceção dos testes de primeira contagem e índice de velocidade de germinação que classificaram os lotes de sementes em dois níveis de vigor. Contudo, estes resultados puderam ser comprovados com maior precisão através da análise da atividade das enzimas do sistema antioxidativo, classificando os lotes de sementes de milho em diferentes níveis de vigor. Portanto, conclui-se que a atividade das enzimas antioxidantes é eficiente para detectar diferenças tênues, não verificadas nos testes padrão de qualidade fisiológica, permitindo separar os lotes homogêneos de sementes de milho quanto ao vigor.

Palavras chave: *Zea mays* L, qualidade fisiológica, metabolismo antioxidativo.

Antioxidant enzymes for maize seeds differentiation

Abstract: The seeds deterioration process usually occurs in lots that had matured too early or where improper storage. In such cases an excessive production of reactive oxygen species (ROS) can occur, and as the changes caused by these radicals production are not always detectable in analyzes of viability and vigor, the aim was to differentiate maize seeds lots through the antioxidative enzymes activity, and relate them to the physiological quality standard tests to verify if these enzymes detect small differences in the seeds vigor. For this, we used three lots of maize seeds, which were subjected to seed quality

standard tests, such as germination, first counting and speed index of germination, length and dry mass of shoots and roots and electrical conductivity, besides the analysis of the antioxidative system enzymes activity (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and catalase). The obtained results from the germination tests and seedling emergence in greenhouse showed means of 99.46% and 98.33% respectively. It did not allow classifying the maize seeds lots in different vigor levels, as well as most of the other vigor tests, except for first counting tests and germination speed index, which classified the seed lots in two vigor levels. However, these results were proved more precisely through the analysis of the antioxidative system enzymes activity, classifying the seed lots at different vigor levels. Therefore, it was concluded that the antioxidative system enzymes activity is efficient to detect subtle differences not detected in physiological quality standard tests, allowing to separate maize seeds lots according to vigor.

Key words: *Zea mays* L., physiological quality, antioxidant metabolism.

Introdução

A espécie *Zea mays* L. pertencente à ordem Poales, é um dos cereais mais importantes do ponto de vista alimentício tanto para consumo humano como para o animal (Brachtvogel et al., 2012). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho segundo o Ministério da Agricultura (Caldarelli e Bacchi, 2012). De acordo com o sexto levantamento da CONAB, em 2012, o estado do Rio Grande do Sul produziu na safra 2011/2012 um total de 3,463 milhões toneladas. Frente a este cenário, o investimento em tecnologias de produção de sementes é prioridade, tornando-se assim, cada vez mais importante que as empresas produtoras de sementes invistam em programas de controle de qualidade onde a viabilidade e o vigor das sementes sejam os principais fatores a serem considerados, visando garantir a comercialização de sementes de alta qualidade (Bento et al., 2010).

As condições de umidade e temperatura nas quais as sementes estão submetidas durante o armazenamento, possivelmente podem interferir diretamente na sua qualidade fisiológica causando alterações degenerativas no seu metabolismo, desencadeando possível atraso na germinação, redução no crescimento das plântulas, lixiviação de solutos, mudanças na atividade enzimática, perda da compartimentalização celular e acúmulo de substâncias tóxicas, tais fatores podem acarretar problemas na produtividade das culturas (Corte et al., 2010; Silva et al., 2011). Contudo, tais parâmetros relacionados à deterioração de sementes nem sempre são detectados por testes básicos de viabilidade e vigor, sendo necessário análises mais sensíveis para classificar as sementes quanto a esta última característica.

A deterioração de sementes geralmente ocorre em lotes que tiveram maturação precoce ou que sofreram armazenamento inadequado. Nestes casos pode ocorrer a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2), e estes podem limitar o crescimento e desenvolvimento do vegetal (Carvalho et al., 2009; Forman et al., 2010). Entretanto, para conter os efeitos deletérios dessas EROs as plantas desenvolveram um complexo sistema antioxidante, que constitui a defesa primária contra esses radicais gerados em condições limitantes, como a enzima superóxido dismutase (SOD, EC

1.15.1.1) que catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , a ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) e a catalase (CAT, EC 1.11.1.6) que podem quebrar a molécula de H_2O_2 em H_2O e O_2 . Diante disso, o equilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade de acionar rapidamente o sistema de defesa antioxidante, provavelmente, refletirá na capacidade das plântulas em adaptar-se aos danos causados pela possível maturação precoce ou pelo mal armazenamento e a consequente deterioração das sementes, o que pode caracterizar sua maior tolerância (Carvalho et al., 2009; El-Shabrawi et al., 2010; Deuner et al., 2011).

Devido ao fato de que tais alterações nem sempre são possíveis de serem detectadas pelos testes padrão de viabilidade e vigor, levando em consideração que o dano celular leva à diminuição da germinabilidade (Kibinza et al., 2006), se torna uma alternativa enriquecedora avaliar a atividade de enzimas antioxidantes como forma de aprimorar as respostas destes testes, visto que estas análises poderiam demonstrar com maior sensibilidade o início de possíveis transformações degenerativas nas sementes e plântulas oriundos de diferentes lotes.

Diante do exposto, objetivou-se diferenciar lotes de sementes de milho por meio da atividade das enzimas antioxidantes e verificar se estas enzimas detectam pequenas diferenças no vigor das sementes.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Fisiologia de Sementes, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl). Foram utilizados três lotes de sementes de milho híbrido, classificados como L1, L2 e L3, obtidos da empresa Pionner, os quais foram submetidos ao teste padrão de germinação (G%), que foi realizado de acordo com as Regras de Análises de Sementes (Brasil, 2009), sendo conduzido com 200 sementes (quatro subamostras de 50 sementes) para cada repetição, totalizando quatro repetições para cada lote. O substrato utilizado foi rolo de papel especial para germinação (germitest[®]), umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a sua massa inicial e mantidos em germinador a 25°C e os resultados foram expressos em porcentagem de germinação.

A primeira contagem de germinação (PCG%) foi conduzida juntamente com o teste de germinação, sendo a primeira contagem para o milho realizada no quarto dia após a semeadura (DAS) e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais emitidas para cada lote (Brasil, 2009).

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi realizado conjuntamente com o teste de germinação, e as contagens diárias foram realizadas a partir da protrusão da radícula pelo tegumento da semente, até que o número de plântulas emersas permanecesse constante. O último dia de contagem para este teste foi o mesmo prescrito para o teste de germinação (sete dias) e o cálculo do IVG foi efetuado de acordo com Maguire (1962).

Para a emergência de plântulas (E%) as sementes foram semeadas em bandejas plásticas perfuradas, em casa de vegetação, utilizando como substrato areia lavada. Foram utilizadas 200 sementes (subdivididas em quatro subamostras de 50 sementes) para cada repetição, sendo quatro repetições para cada lote e os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas emergidas

após 21 DAS. O índice de velocidade de emergência (IVE) foi realizado, conjuntamente, com a emergência, até que o número de plântulas emersas permanecesse constante. O último dia de contagem para este teste foi o mesmo prescrito para o teste de emergência (21 dias) e o cálculo do IVE foi efetuado de acordo com Maguire (1962).

A condutividade elétrica (CE) foi realizada com quatro subamostras de 25 sementes para cada repetição, sendo quatro repetições para cada lote. Primeiramente foi determinada a massa das sementes, as quais foram colocadas em béquer com 80 mL de água deionizada e mantidas em germinador a 25°C. Após os períodos de três, seis e 24h de incubação, os recipientes foram retirados do germinador e, imediatamente submetidos às leituras em condutivímetro de bancada Schott LF613T, sendo os resultados expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ de sementes (Krzyzanowski, 1991).

O comprimento da parte aérea (CPA) e das raízes das plântulas (CR) foram obtidos pela média de 40 plântulas por lote, ao final do teste de germinação, sendo a medição do comprimento realizada com régua milimetrada e os resultados expressos em mm plântula⁻¹; a massa seca de parte aérea (MSPA) e das raízes das plântulas (MSR) também foi obtida ao final do teste de germinação após secagem em estufa a 70±2°C até obter massa constante e os resultados expressos em mg plântula⁻¹.

Para as análises das atividades antioxidantes, quatrocentos miligramas de parte aérea e raízes foram coletados após o teste de germinação e macerados com 10% de polivinilpirrolidona (PVPP) e homogeneizado em 1,5 mL do tampão de extração, constituído de fosfato de potássio (100 mM, pH 7,8), EDTA (0,1 mM) e ácido ascórbico (20 mM). Após centrifugação a 12.000 g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade das enzimas e para a quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis e Ries, 1977) em meio de reação contendo fosfato de potássio (50 mM, pH 7,8), metionina (14 mM), EDTA (0,1 μM), NBT (75 μM) e riboflavina (2 μM), acrescido de 50 μL do extrato enzimático, completando volume final de 2 mL com água destilada. As leituras foram realizadas a 560 nm levando em consideração que uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

A atividade da APX foi realizada segundo Nakano e Asada (1981), com modificações, por meio da avaliação da taxa de oxidação do ascorbato. O meio de reação, composto de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,0) e ácido ascórbico (0,5 mM), foi incubado a 37°C por 10 minutos. Antes de efetuar a leitura em espectrofotômetro a 290 nm, em intervalos de dez em dez segundos até completar 90 segundos, foi adicionado H₂O₂ (0,1 mM) e 25 μL do extrato enzimático, completando volume final de 2 mL com água destilada.

A atividade da CAT foi determinada conforme Azevedo et al. (1998), com modificações, estimada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, em intervalos de dez em dez segundos até completar 90 segundos, em meio de reação contendo fosfato de potássio (100 mM, pH 7,0) incubado a 37°C por 10 minutos, sendo adicionado H₂O₂ (12,5 mM) e 25 μL do extrato enzimático antes da leitura, completando volume final de 2 mL com água destilada.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados foram testados quanto a sua normalidade (Shapiro-Wilk) e posteriormente submetidos à análise de variância

($p \leq 0,05$), em caso de significância os resultados foram comparados pelo teste de média (Tukey) com 5% de probabilidade de erro pelo software WinStat Versão 2.0 (Machado e Conceição, 2007).

Resultados e Discussão

Quanto à viabilidade dos lotes de sementes de milho o teste de germinação não apresentou diferença significativa, sendo o valor médio entre os lotes de 99,46% (Figura 1A). O vigor, caracterizado pelos testes de primeira contagem e índice de velocidade de germinação apresentaram diferenças significativas entre os lotes, sendo possível diferenciar os lotes em dois níveis de vigor, onde o L2 apresentou maior vigor e o L1 menor (Figuras 1B e 1C, respectivamente). Em trabalhos realizados com sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (Zabot et al., 2013) e soja (*Glicine max* L.) (Dode et al., 2013) também foi possível separar os lotes através do teste de primeira contagem de germinação e em trabalhos com sementes de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ExR.E. Fries) (Santos e Rossetto, 2013) e coentro (*Coriandrum sativum* L.) (Pereira et al., 2013) a classificação dos lotes de sementes foi obtida pelo teste de índice de velocidade de germinação. O teste referente à emergência a campo não apresentou diferença significativa entre os lotes sendo o valor médio entre eles 98,33% (Figura 1D), este teste é considerado o teste de vigor que mais se aproxima das condições a campo (Guedes et al., 2009), desta forma, o alto potencial germinativo das sementes de milho confirmam a elevada qualidade fisiológica detectada para os três lotes de sementes, corroborando os resultados encontrados no teste de germinação (Figura 1A). O teste de índice de velocidade de emergência apresentou diferença significativa classificando os lotes em dois níveis diferentes de vigor sendo o L1 o de maior e o L2 e L3 os de menor vigor (Figura 1E). Em trabalho realizado com sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) também foi possível a separação dos lotes através do teste de IVE (Mattioni et al., 2012).

A condutividade elétrica não apresentou diferença significativa (Figura 2). Resultados semelhantes foram observados para o comprimento de parte aérea e raízes (Figuras 3A e 3B, respectivamente). Contudo, diferentemente destes resultados, em pesquisa realizada com sementes de canola (*Brassica napus* L. var. oleífera) foi possível classificar os lotes com a realização do teste de comprimento de plântulas (Milani et al., 2012).

Os resultados referentes à massa seca de parte aérea e raízes (Figuras 3C e 3D, respectivamente), da mesma forma que o CPA e CR, não apresentaram diferenças significativas. Porém, para MSPA e MSR numericamente, sementes oriundas do L2 apresentaram maior acúmulo de biomassa. Tal fator é possível, pois essas variáveis levam em consideração a produção de massa em relação à constituição dos tecidos de reserva das sementes, portanto tal diferença entre os resultados dessas variáveis e os demais testes de vigor deve-se ao fato de que algumas sementes mesmo apresentando alto grau de germinação, podem possuir plântulas com peso inferior. Por isso, o tamanho das sementes, os estádios iniciais de divisão celular e a constituição dos tecidos de reserva devem ser levados em consideração (Vanzolini et al., 2007; Guedes et al., 2009; Socolowski et al., 2011).

Diante dos resultados dos testes padrão de viabilidade e vigor dos lotes de sementes de milho, de forma geral não foi possível classifica-los quanto ao vigor, tendo em vista que os três lotes apresentaram elevado potencial fisiológico. Entretanto, através das análises enzimáticas foi possível identificar com

maior sensibilidade e possíveis diferenças no potencial fisiológico das plântulas oriundas dos lotes de sementes de milho.

A atividade da enzima SOD apresentou diferença significativa entre os lotes de sementes de milho para a parte aérea e raízes, apresentando menor atividade para os L1 e L2 (Figura 4A e 4B) o mesmo foi observado nas raízes onde o L1 apresentou menor atividade, este resultado contribui para reforçar a tendência destes lotes como o mais vigorosos apresentado pelos resultados dos testes de IVG, PCG e IVE (Figuras 1B, 1C e 1E respectivamente).

A atividade da enzima APX apresentou diferença significativa na parte aérea e nas raízes, evidenciando maior atividade para o L3 (Figuras 4C e 4D, respectivamente). Pelo fato da enzima APX possuir alta afinidade pelo H_2O_2 ela é capaz de eliminar de maneira mais eficaz esse radical durante o estresse oxidativo (Hasanuzzaman et al., 2012). Desta forma, é possível observar que os L1 e L2 possuem baixa atividade desta enzima tanto na parte aérea como nas raízes, demonstrando que estes lotes apresentam maior qualidade fisiológica por terem menor produção de EROs caracterizando menor desestruturação do sistema de membranas e conseqüentemente menor atividade do processo de deterioração das sementes oriundas desses lotes.

A CAT não apresentou diferença significativa na parte aérea das plântulas oriundas dos lotes de sementes de milho (Figura 4E), entretanto houve diferença significativa nas raízes, apresentando maior atividade dessa enzima nas plântulas oriundas do L3 e menor nas oriundas dos L1 e L2 (Figura 4F). Resultado este que pode ser explicado partindo do pressuposto de que lotes com maior vigor apresentam menor quantidade de radicais livres, como por exemplo, o radical H_2O_2 . Além disso, como a afinidade da CAT por este substrato é baixa, a mesma torna-se mais ativa somente quando ocorre acúmulo deste composto (Jaleel et al., 2009), sendo assim, lotes com maior vigor como é o caso dos L1 e L2 apresentaram menor produção deste radical e, conseqüentemente, menor necessidade de acionar o sistema de defesa enzimático.

A grande maioria dos trabalhos que analisam a atividade de enzimas antioxidantes (SOD, APX e CAT) relaciona a influência de estresses abióticos e bióticos em diferentes culturas. Nesses casos, a menor atividade dessas enzimas remetem a sementes e plântulas de baixa viabilidade e vigor (Demirkaya et al., 2010; Chauhan et al., 2011; Prodanović et al., 2012), contudo, são escassos os trabalhos que explorem a relação entre a qualidade fisiológica das sementes e a atividade dessas enzimas. Dessa forma, neste trabalho, onde as sementes não foram submetidas a nenhum tipo de estresse a maior atividade dessas enzimas remete maior produção de EROs que, conseqüentemente evidencia o início do processo deteriorativo, o que caracteriza baixo vigor das sementes (El-Shabrawi et al., 2010).

Portanto, ao comparar as análises enzimáticas observadas nas plântulas oriundas dos lotes de sementes de milho através das enzimas SOD, APX e CAT com os resultados de viabilidade e vigor, é possível pressupor que, de forma geral, estas variáveis estão relacionadas, indicando os L1 e L2 como os de melhor desempenho fisiológico e o L3 como de menor.

Conclusão

A atividade das enzimas do sistema antioxidativo (SOD, APX e CAT) é eficiente para detectar diferenças tênues, não verificadas em testes padrão de qualidade fisiológica, permitindo separar os lotes homogêneos de sementes de milho quanto ao vigor.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

Referências

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiology Plantarum**, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998.

BENTO, S. R. S. de O.; SANTOS, A. E. O. dos; MELO, D. R. M. de; TORRES, S. B. Eficiência dos testes de vigor na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 4, p. 111-117, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

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. 395p.

BRACHTVOGEL, E. L., PEREIRA, F. R. D. S., CRUZ, S. C. S., ABREU, M. L. D., BICUDO, S. J. População, arranjo de plantas uniforme e a competição intraespecífica em milho. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 6, n. 1, p. 348-359, 2012.

CARVALHO, L. F.; SEDIYAMA, C. S.; REI, S. M. S.; DIAS, D. C. F. S.; MOREIRA, M. A. Influência da temperatura de embebição da semente de soja no teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 41, p. 9-17, 2009.

CHAUHAN, D. S.; DESWAL, D. P.; DAHIYA, O. S.; PUNIA, R. C. Change in storage enzymes activities in natural and accelerated aged seed of wheat (*Triticum aestivum*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 81, n. 11, p. 1037-1040, 2011.

CALDARELLI, C. E.; BACCHI, M. R. P. Fatores de influência no preço do milho no Brasil. **Nova economia**, v. 22, n. 1, p. 141-164, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTOS-CONAB, **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2011/12**. Sexto Levantamento, Março/2012.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; LEITE, H. G.; PEREIRA, B. L. C.; GONÇALVES, J. F. C. Estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon braúna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 83-91, 2010.

DEMIRKAYA, M.; DIETZ, K. J.; SIVRITEPE, Ö. Changes in antioxidant enzymes during ageing of onion seeds. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, v. 38, n. 1, p. 49-52, 2010.

DEUNER, C.; MAIA, M. S.; DEUNER, S.; ALMEIDA, A.; MENEGHELLO, G. E. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 711-720, 2011.

DODE, J. de S.; MENEGHELLO, G. E.; TIMM, F. C.; MORAES, D. M.; de PESKE, S. T. Respiration test soybean seed as related of physiological quality. **Revista Ciência Rural**, v. 43, n. 2, p. 193 – 198, 2013.

EL-SHABRAWI, H.; KUMAR, B.; KAUL, T.; REDDY, M. K.; SILNGLA-PAREEK, S. L.; SOPORY, S. K. Redox homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification as markers for salt tolerance in Pokkali rice. **Protoplasma**, v. 245, n. 1-4, p. 85-96, 2010.

FORMAN, H. J.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Signaling functions of reactive oxygen species. **Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 835-842, 2010.

GIANNOPOLITIS, I.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; GONÇALVES, E. P.; VIANA, J. S.; de MEDEIROS, M. S.; de LIMA, C. R. Teste de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Erythrina velutina* Willd. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 4, p. 793-802, 2009.

HASANUZZAMAN, M.; HOSSAIN, M. A.; da SILVA, J. A. T.; FUJITA, M. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. In: Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies. **Springer Netherlands**, v. 15 p. 261-315, 2012.

JALEEL, C. A.; RIADH, K.; GOPI, R.; MANIVANNAN, P.; INES, J.; AL-JUBURI, H. J.; CHANG-XING, Z.; HONG-BO, S.; PANNEERSELVAM, R. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiology Plant**, v. 31, p. 427-436, 2009.

KIBINZA, S.; VINEL, D.; COME, D.; BAILLY, C.; CORBINEAU, F. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. **Physiologia Plantarum**, v. 128, n. 3, p. 496-506, 2006.

KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A. Relato dos testes de vigor disponíveis para grandes culturas. **Informativo ABRATES**, v. 1, n. 2, p. 15-50. 1991.

MACHADO, A. de A.; CONCEIÇÃO, A. R. **WinStat: sistema de análise estatística para Windows. Versão 2.0**, Pelotas: UFPEL/NIA. 2007.

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

MATTIONI, F., FIGUEIREDO, M. C. de, ALBUQUERQUE, J. M. F., GUIMARÃES, S. C. Vigor de sementes e desempenho agrônômico de plantas de algodão¹. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 1, p. 108-116, 2012.

MILANI, M.; de LEMOS M. N.; LOPES, S. J. Teste de condutividade elétrica para avaliação do potencial fisiológico de sementes de canola. **Revista Ceres**, v. 59, n. 3, p. 374-379, 2012.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.

PEREIRA, M. D.; FILHO, S. M. Suitability of electrical conductivity test for *Solanum sessiliflorum* seeds. **Revista Agrarian**, v. 5, n. 16, p. 93-98, 2012.

PEREIRA, M. F. S.; LINHARES, P. C. F.; MARACAJÁ, P. B.; de LIMA, G. K. L.; MEDEIROS, G. S. Composição nutricional de cultivares de coentro por ocasião do teste de emergência de plântulas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 5, p. 01-05, 2013.

PRODANOVIĆ, O.; PRODANOVIĆ, R.; ANOVIĆ PRISTOV, J. B.; MITROVIĆ, A.; RADOTIĆ, K. Effect of cadmium stress on antioxidative enzymes during the germination of *Serbian spruce* [*Picea omorika* (Panc.) Purkyne]. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 52, p. 11377-11385, 2012.

SANTOS, L. A. S. dos; ROSSETTO, C. A. V. Testes de vigor em sementes de *Crambe abyssinica*. **Revista Ciência Rural**, v. 43, n. 2, p. 233-238, 2013.

SILVA, R. P. da; TEIXEIRA, I. R.; DEVILLA, I. A.; REZENDE, R. C.; da SILVA, G. C. Qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max.* L.) durante o beneficiamento. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1219-1230, 2011.

SOCOLOWSKI, F.; VIEIRA, D. C. M.; TAKAKI, M. Massa das sementes de *Tecoma stans* L. Juss. ex Kunth (Bignoniaceae): efeitos na emergência e desenvolvimento de suas plântulas no sol e na sombra. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 2, p. 171-178, 2011.

VANZOLINI, S.; ARAKI, C. A. D. S.; SILVA, A. C. T. M.; NAKAGAWA, J. Teste de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 90-96, 2007.

ZABOT, L.; DUTRA, L. M. C.; GARCIA, D. C.; MENEZES, N. L. D.; LUDWIG, M. P. Temperatura e qualidade fisiológica no crescimento de plântulas de feijoeiro. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 14, n. 4, p. 14 2013.

Figuras

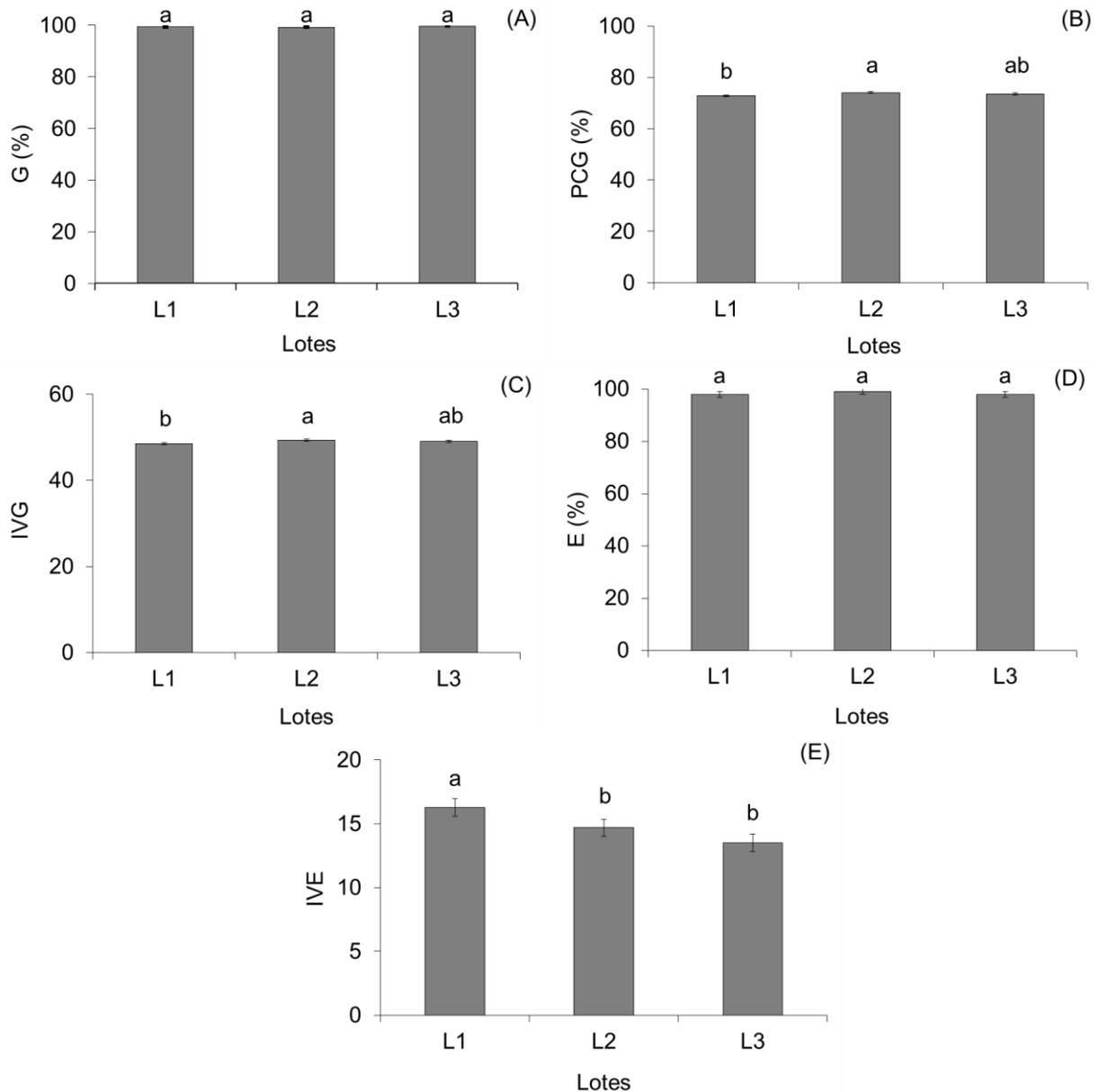


Figura 1 – (A) Germinação (G%), (B) primeira contagem de germinação (PCG%), (C) índice de velocidade de germinação (IVG), (D) emergência de plântulas em casa de vegetação (E%) e (E) índice de velocidade de emergência (IVE) de três lotes de sementes de milho. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

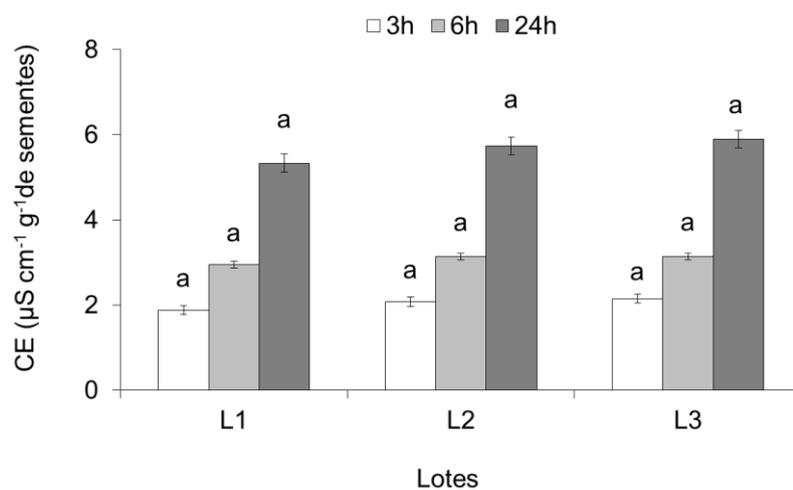


Figura 2 - Condutividade elétrica (CE) de três lotes de sementes de milho, em três, seis e 24 horas de embebição. Letras distintas diferem estatisticamente entre si, em cada período de embebição, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

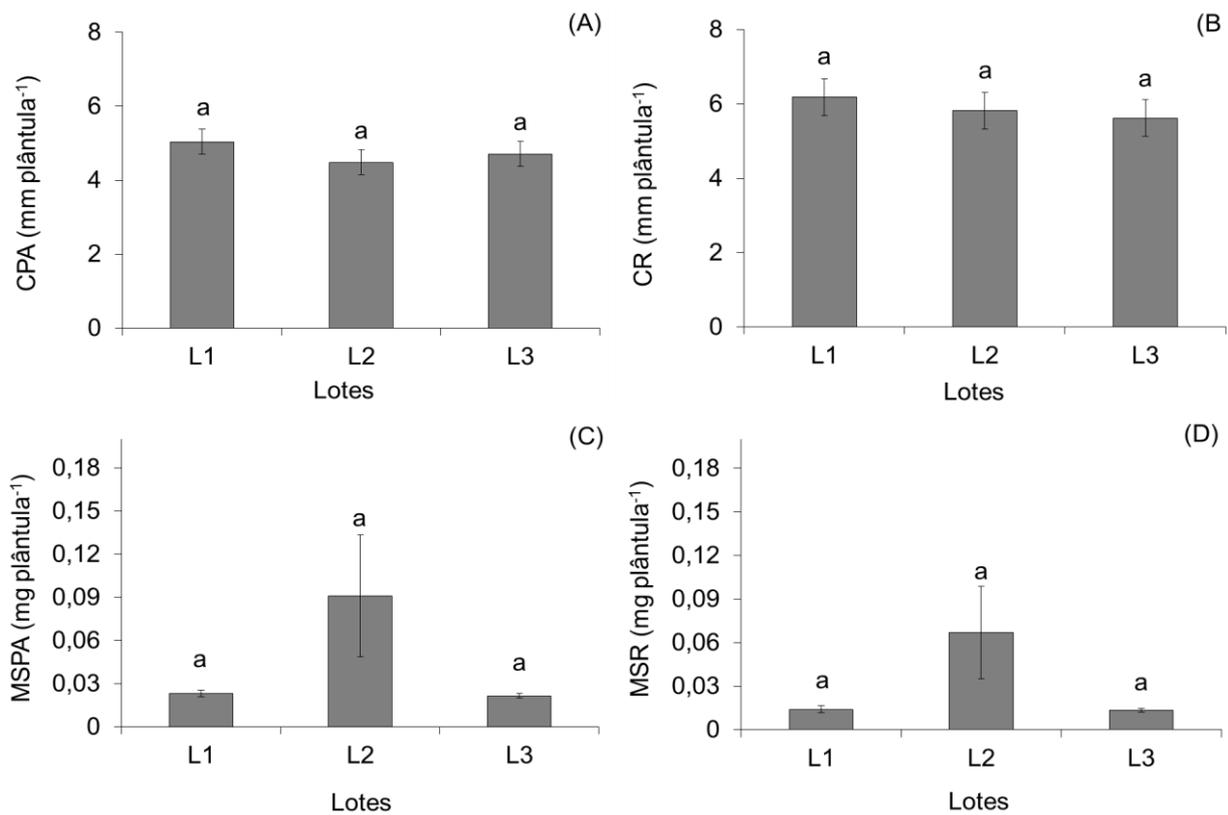


Figura 3 – (A) Comprimento e (C) massa seca de parte aérea (CPA e MSPA, respectivamente) e (B e D) de raízes (CR e MSR, respectivamente) de três lotes de sementes de milho. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

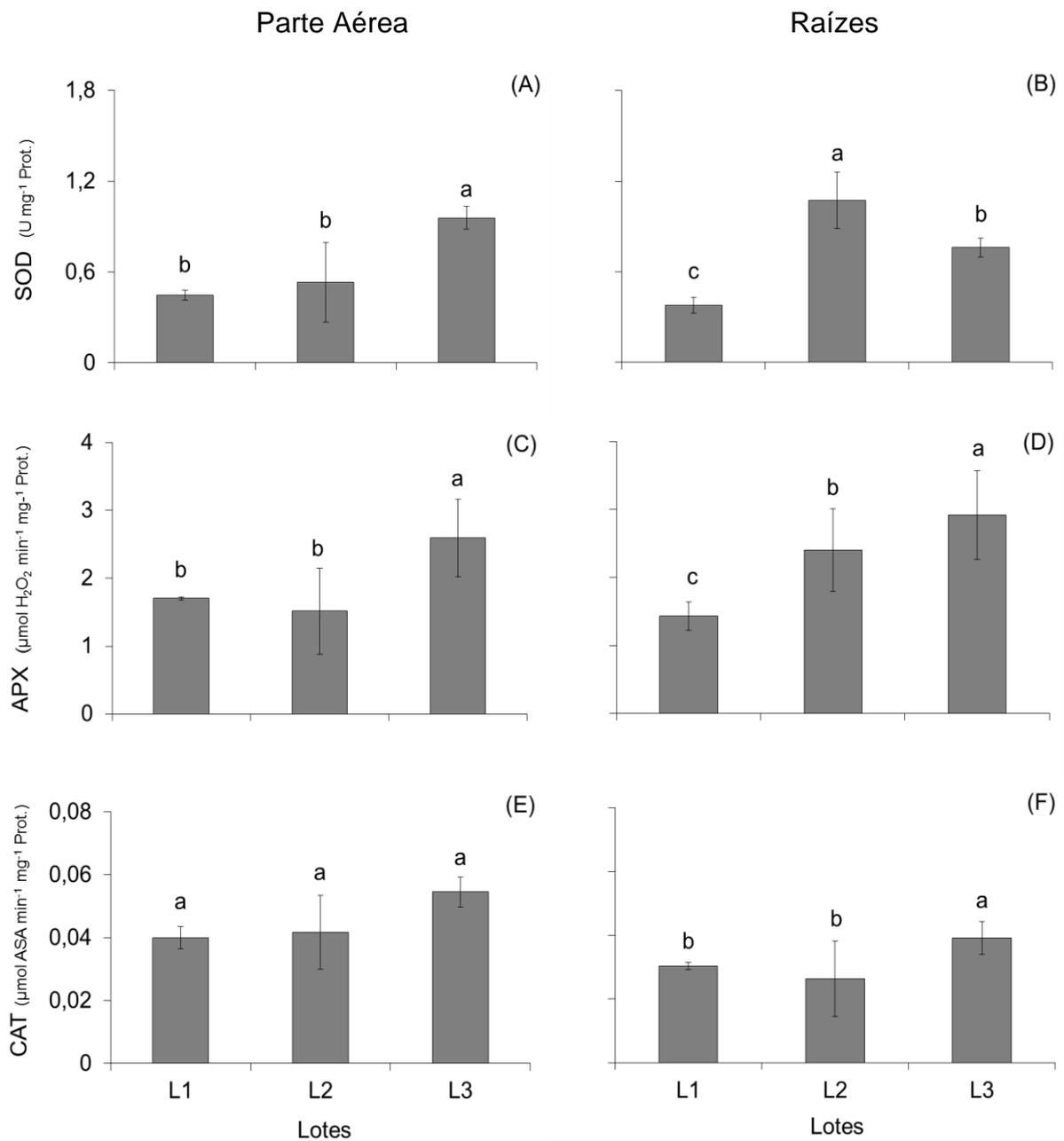


Figura 4 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) na parte aérea (A, C e E, respectivamente) e nas raízes (B, D e F, respectivamente) de três lotes de sementes de milho. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

ARTIGO 2

METABOLISMO ANTIOXIDATIVO PARA CLASSIFICAÇÃO DE LOTES DE SEMENTES DE FEIJÃO QUANTO AO VIGOR

(De acordo as normas da Revista Brasileira de Ciências Agrárias)

Metabolismo antioxidativo para classificação de lotes de sementes de feijão quanto ao vigor

Isabel Cristina Gouvêa de Borba¹; Andréa Bicca Noguez Martins¹; Patrícia Marini¹;
Juliana de Magalhães Bandeira¹; Dario Munt de Moraes^{1,2}

¹ Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Instituto de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal (PPGFV). Caixa Postal 354 – CEP - 96010-900 - Pelotas-RS, Brasil. E-mail: isabel.gouvea.borba@gmail.com; amartinsfv@hotmail.com; marinipati@gmail.com; bandeira_jm@hotmail.com; moraesdm@ufpel.tche.br

² Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq

Resumo – O objetivo neste trabalho foi diferenciar lotes de sementes de feijão por meio da atividade das enzimas antioxidantes e verificar se estas enzimas detectam pequenas diferenças no vigor das sementes. Para isso, três lotes de sementes de feijão foram avaliados quanto à qualidade fisiológica e análise da atividade de enzimas do sistema antioxidativo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os dados testados quanto a sua normalidade (Shapiro-Wilk) e, posteriormente, submetidos à análise de variância e teste de média ($p \leq 0,05$). Os resultados obtidos com os testes de qualidade fisiológica permitiram a classificação dos lotes de sementes de feijão em diferentes níveis de vigor. O lote três apresentou maior percentual germinativo (87,5%) e menor perda de eletrólitos no teste de condutividade elétrica tanto em três como em 24h de embebição ($0,21$ e $0,48 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ de sementes, respectivamente), resultados estes que, de maneira geral, permitiram separar os lotes de sementes de feijão em diferentes níveis de vigor. Já os resultados observados nas análises das enzimas do sistema antioxidante não apresentaram diferenças significativas entre os lotes. Portanto, conclui-se que a atividade das enzimas antioxidantes não é eficiente para separar lotes heterogêneos de sementes de feijão em diferentes níveis de vigor.

Palavras chave: *Phaseolus vulgaris* L., qualidade fisiológica, enzimas antioxidantes

Antioxidative metabolism for classifying bean seeds lots according to vigor.

Abstract – This work aimed to classify bean seeds lots through the antioxidative enzymes activity, relating them to the physiological quality standard tests, to verify if those enzymes can detect differences on seeds vigor. For this, three bean seeds lots were evaluated according to their physiological quality and their antioxidative system enzymes activity analysis. The experimental design was completely randomized, and the data tested for their normality (Shapiro-Wilk), and then subjected to variance analysis and average test ($p \leq 0.05$). The obtained results in the physiological quality tests allowed classifying the bean seeds lots in different vigor levels. The number three lot presented higher germination percentage (87.5%) and less electrolyte loss in the electrical conductivity test, both in three and 24 hours soaking (0.21 and $0.48 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ seeds, respectively). These results, in a general sense, allowed sorting out the bean seeds lots in different vigor levels. The observed results in the antioxidant system enzymes analysis showed no significant differences amongst all lots. Therefore, the conclusion is that the antioxidant enzymes activity is not efficient to classify bean seeds lots in different vigor levels.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L., qualidade fisiológica, enzimas antioxidantes

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) sendo que 13% da produção é certificada e o restante é dividido em espécies nativas produzidas por agricultores regionais (Botelho et al., 2010). Por ser uma leguminosa com alta fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras a mesma se classifica como um dos grãos mais consumidos mundialmente, somente no Brasil, onde o consumo chega a um total de 17,06 kg/habitante ao ano (Goes et al., 2011; Olivo et al., 2011). O sexto levantamento da CONAB em 2012 constatou que o Rio Grande do Sul produziu em média na primeira safra um total de 526,0 milhões de toneladas e na segunda safra 363,3 milhões de toneladas do grão.

Diante disso, visando alcançar resultados econômicos satisfatórios se faz necessário um sistema de produção que vise o máximo do controle de qualidade das sementes, onde análises pontuais no que concerne à viabilidade e o vigor sejam consideradas (Catão et al., 2010), tendo em vista que diversos fatores intrínsecos e extrínsecos podem afetar a qualidade das sementes durante o processo de maturação e armazenamento, desencadeando processos iniciais da sequência de deterioração e interferindo diretamente no seu vigor.

Variações na umidade e na temperatura podem causar alterações degenerativas no metabolismo das sementes como lixiviação de solutos, mudanças na atividade respiratória, no processo de produção de ATP, desestabilização da atividade enzimática e compartimentalização celular, síntese de RNA e proteínas e acúmulo de substâncias tóxicas, fatores esses que reduzem a produção final das culturas (Silva et al., 2011).

O processo de deterioração das sementes pode ocorrer, por exemplo, em lotes que tiveram maturação precoce ou que foram mal armazenados. Estas condições esta podem propiciar a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto (1O_2). O excesso de produção desses grupos funcionais é limitante para o crescimento e desenvolvimento vegetal, principalmente por oxidar lipídios de membranas e promover sua desestabilização (Apel e Hirt, 2004; Carvalho et al., 2009; Forman et al., 2010). Entretanto, para eliminar essas espécies reativas, as plantas apresentam um sistema enzimático antioxidante que constitui uma defesa primária contra os radicais livres gerados, como as enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) que catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , a ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) e a catalase (CAT, EC 1.11.1.6) que podem degradar a molécula de H_2O_2 em H_2O e O_2 (Gill et al., 2010).

Devido ao fato de que as alterações em nível de membranas nem sempre são possíveis de serem detectadas por análises de viabilidade e vigor e, levando em consideração que o dano celular leva a diminuição da germinabilidade (Kibinza et al., 2006), o aumento da demanda por sementes de alta qualidade levou as empresas de tecnologia de sementes a aprimorarem suas técnicas visando associar os testes de geminação e vigor com as respostas reais das sementes em campo (Pegô et al., 2011). Assim, uma alternativa enriquecedora seria avaliar a atividade de enzimas

antioxidantes como forma de aprimorar as respostas destes testes, visto que estas análises poderiam demonstrar com maior sensibilidade o início de possíveis transformações degenerativas nas sementes e plântulas através da desestabilização das membranas celulares.

A análise da atividade de enzimas antioxidantes têm sido estudada para avaliar estresses bióticos e abióticos em diversas espécies como sementes e plântulas de alfafa (*Medicago sativa* L.) (Cakmak et al., 2010), cevada (*Hordeum vulgare* L.) (Mei e Song, 2010) e pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) (Cai et al., 2011). Entretanto, não há trabalhos que explorem a relação entre a qualidade fisiológica das sementes e a atividade dessas enzimas.

Diante do exposto, objetivou-se diferenciar lotes de sementes de feijão por meio da atividade das enzimas antioxidantes e verificar se estas enzimas detectam pequenas diferenças no vigor das sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Fisiologia de Sementes, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Foram utilizados três lotes de sementes de feijão classificados como L1, L2 e L3, cultivar BRS Guapo Brilhante, obtidas no Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado unidade Terras Baixas (CPACT-EMBRAPA/TB), os quais foram submetidos ao teste padrão de germinação (G%), que foi realizado de acordo com as Regras de Análises de Sementes (Brasil, 2009), sendo conduzido com 200 sementes (quatro subamostras de 50 sementes) para cada repetição, totalizando quatro repetições para cada lote. O substrato utilizado foi rolo de papel especial para germinação (germitest[®]), umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a sua massa inicial e mantidos em germinador a 25°C. Os resultados foram expressos em porcentagem de germinação. A primeira contagem de germinação (PCG%) foi conduzida juntamente com o teste de germinação, sendo a primeira contagem para o feijão realizada aos cinco dias após a semeadura (DAS) e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais emitidas para cada lote. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi realizado, conjuntamente, com o teste de germinação, e as contagens diárias realizadas a partir da protrusão da radícula pelo tegumento da semente, até que o número de plântulas emersas permanecesse constante. O último

dia de contagem para este teste foi o mesmo prescrito para o teste de germinação (nove dias) e o cálculo do IVG foi efetuado de acordo com Maguire (1962).

Para a emergência de plântulas (E%) em casa de vegetação as sementes foram semeadas em bandejas de plástico perfuradas, utilizando como substrato, areia lavada. Foram utilizadas quatro repetições de 200 sementes subdivididas em quatro subamostras de 50 sementes, para cada repetição e os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas emergidas.

A condutividade elétrica (CE) foi realizada com quatro subamostras de 25 sementes para cada repetição, sendo quatro repetições para cada lote. Primeiramente foi determinada a massa das sementes, as quais foram colocadas em béquer com 80 mL de água deionizada e mantidas em germinador a 25°C. Após os períodos de três, seis e 24h de incubação, os recipientes foram retirados do germinador, suavemente agitados e, imediatamente submetidos às leituras das amostras e da água deionizada em condutivímetro de bancada Schott LF613T, sendo os resultados expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de sementes (Krzyzanowski, 1991).

O comprimento da parte aérea (CPA) e das raízes das plântulas (CR) foi obtido pela média de 40 plântulas por repetição, ao final do teste de germinação, a medida de comprimento foi realizada com régua milimetrada e os resultados expressos em mm plântula⁻¹. A massa seca de parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR) das plântulas foram obtidas ao final do teste de germinação após secagem em estufa a 70±2°C, até a obtenção de massa constante e os resultados expressos em mg plântula⁻¹.

Para as análises das atividades antioxidantes, quatrocentos miligramas de parte aérea e raízes foram coletados após o teste de germinação e macerados com 10% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizados em 1,5 mL do tampão de extração, constituído de fosfato de potássio (100 mM, pH 7,8), EDTA (0,1 mM) e ácido ascórbico (20 mM). Após centrifugação a 12.000 g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade das enzimas e para a quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis e Ries, 1977) em meio de reação contendo fosfato de potássio (50 mM, pH 7,8), metionina (14 mM), EDTA (0,1 μM), NBT (75 μM) e riboflavina (2 μM), acrescido de 50 μL do extrato enzimático, completando volume final de 2 mL com água destilada. As leituras

foram realizadas a 560 nm levando em consideração que uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições de ensaio. A atividade da APX foi realizada segundo Nakano e Asada (1981), com modificações, por meio da avaliação da taxa de oxidação do ascorbato. O meio de reação, composto de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,0) e ácido ascórbico (0,5 mM), foi incubado a 37°C por 10 minutos e antes de efetuar a leitura em espectrofotômetro a 290 nm, em intervalos de dez em dez segundos até completar 90 segundos, foi adicionado H₂O₂ (0,1 mM) e 15 µL do extrato enzimático, completando volume final de 2 mL com água destilada. A atividade da CAT foi determinada conforme Azevedo et al. (1998), com modificações, estimada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, em intervalos de dez em dez segundos até completar 90 segundos em meio de reação contendo fosfato de potássio (100 Mm, pH 7,0) incubado a 37°C por 10 minutos, sendo adicionado H₂O₂ (12,5 mM) e 15 µL do extrato enzimático antes da leitura, completando volume final de 2 mL com água destilada.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados foram testados quanto a sua normalidade (Shapiro-Wilk) e posteriormente submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$), em caso de significância os resultados foram comparados pelo teste de média (Tukey) com 5% de probabilidade de erro pelo software WinStat Versão 2.0 (Machado e Conceição, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de feijão foram separadas em lotes pelo teste de germinação, onde o L3 apresentou maior porcentagem de germinação (87,5%), diferindo dos L1 (52,8%) e L2 (73,1%) (Figura 1A). Trabalho realizado com sementes de berinjela (*Solanum melongena* L.) também obteve a classificação dos lotes de sementes através do teste de germinação (Alves et al., 2012).

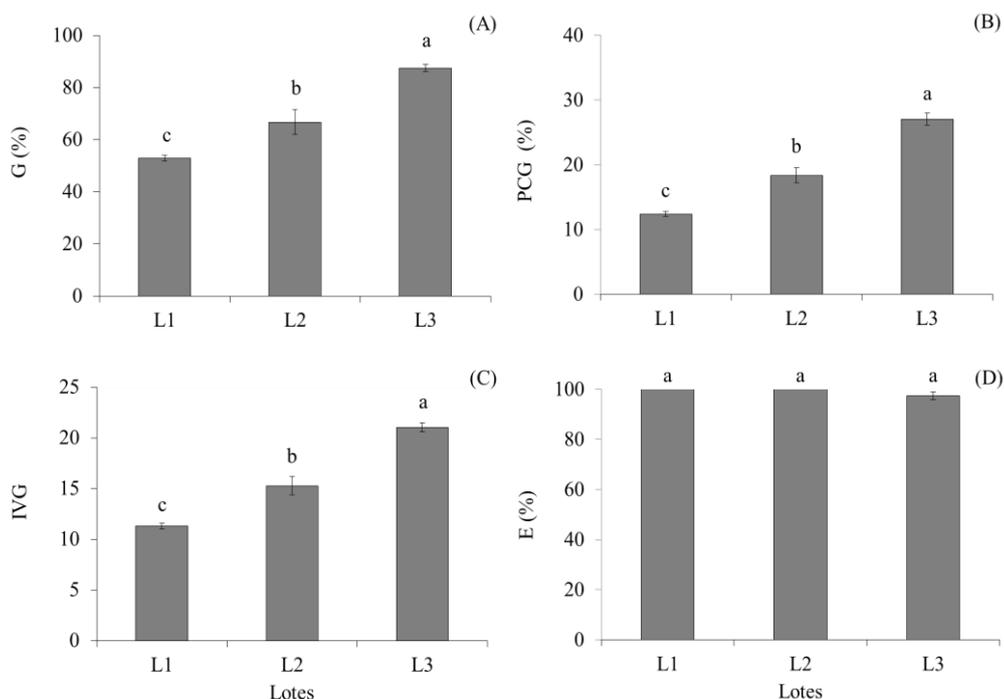


Figura 1. (A) Germinação (G%), (B) primeira contagem de germinação (PCG%), (C) índice de velocidade de germinação (IVG) e (D) emergência de plântulas em casa de vegetação (E%) de três lotes de sementes de feijão. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

Quanto ao vigor das sementes, representado pelos testes de primeira contagem de germinação e índice de velocidade de germinação, foi possível diferenciar os lotes de sementes de feijão em dois níveis, destacando o L3 como o mais vigoroso e os L1 e L2 como os de menor vigor (Figuras 1B e 1C). Em estudo realizado com sementes de pinhão-manso (*J. curcas*) também foi possível classificar os lotes com o teste de primeira contagem de germinação (Araujo et al., 2011). Da mesma forma, em trabalho realizado com sementes de feijão-miúdo (*Vigna unguiculata* L.) foi possível separar os lotes de sementes através do índice de velocidade de germinação (Aumonde et al., 2012). Em relação à emergência de plântulas em casa de vegetação não houve diferença significativa entre os lotes, apresentando em média 99,16% de plântulas emersas (Figura 1D), a qual foi superior ao teste de viabilidade (69,04%).

O teste de condutividade elétrica permitiu classificar os lotes em dois níveis de vigor, sendo o L2 o de menor vigor e os lotes L1 e L3 classificados como os de maior vigor durante os três períodos de embebição, caracterizando estes lotes como os de maior integridade do sistema de membranas, devido a menor perda de

eletrólitos durante os períodos de embebição (Figura 2) (Pereira e Martins Filho, 2012), resultados estes que corroboram com os resultados de vigor descritos anteriormente (Figuras 1B e 1C). Em trabalho realizado com sementes de gergelin (*Sesamum indicum* L.) também foi possível classificar os lotes com o teste de condutividade elétrica (Torres et al., 2009).

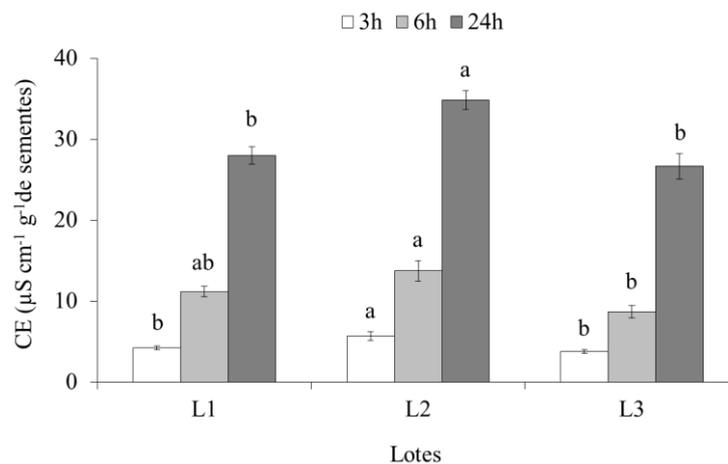


Figura 2. Condutividade elétrica (CE) de três lotes de sementes de feijão, em três, seis e 24 horas de embebição. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

As variáveis relacionadas aos testes de comprimento e massa seca de parte aérea e raízes não apresentaram diferenças significativas entre os lotes (Figura 3). As diferenças entre as respostas dessas variáveis em relação aos dados de crescimento e acúmulo de biomassa podem ser explicadas por levarem em consideração a medida de grandezas físicas. Dessa forma, nem sempre lotes de sementes com elevada porcentagem de germinação vão resultar em plântulas de maior crescimento, visto que estas características dependem do tamanho das sementes, do estágio inicial de divisão celular e da constituição dos tecidos de reserva das sementes (Vanzolini et al., 2007; Guedes et al., 2009; Socolowsk et al., 2011).

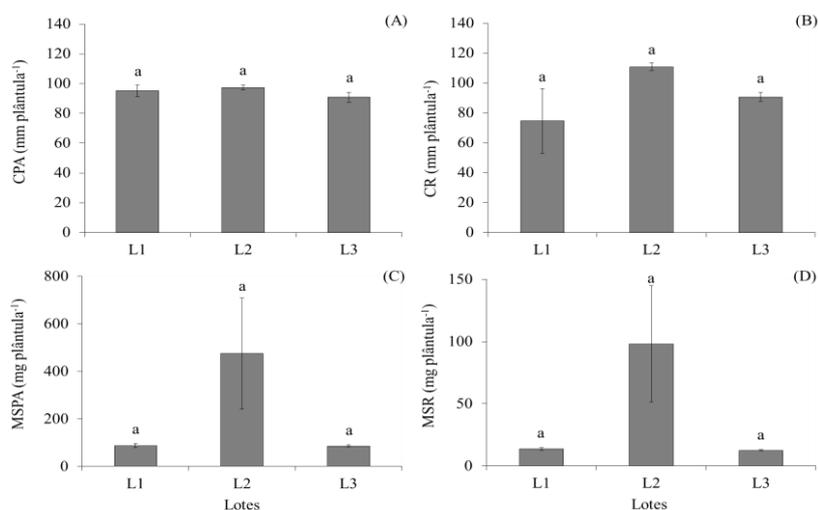


Figura 3. (A) Comprimento e (C) massa seca de parte aérea (CPA e MSPA, respectivamente) e (B e D) de raízes (CR e MSR, respectivamente) de três lotes de sementes de feijão. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

As enzimas SOD, APX e CAT não apresentaram diferenças significativas entre os lotes, demonstrando que não houve eficiência destas análises para classificar os lotes de sementes de feijão quanto ao vigor (Figura 4). Entretanto, ao analisar os gráficos, numericamente, foi possível observar diferenças sutis entre os lotes, evidenciando que o L3 apresentou menor atividade destas enzimas antioxidantes na parte aérea das plântulas (Figuras 4A, 4C e 4E). Esses resultados, portanto podem estar relacionados com o maior vigor das sementes oriundas do L3, demonstrando que as plântulas oriundas desse lote provavelmente apresentaram menor formação de EROs, o que, de maneira geral, é comprovado pelo maior vigor das sementes evidenciado pelos resultados referentes as análises de G, PCG, IVG e CE (Figuras 1A, 1B, 1C e 2).

Dentre as enzimas envolvidas na remoção de EROs a SOD é considerada a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos em níveis elevados (Gill et al., 2010), sendo assim, foi possível observar que a mesma apresentou menor atividade do L3 na parte aérea e do L1 e L3 nas raízes (Figura 4A e 4B).

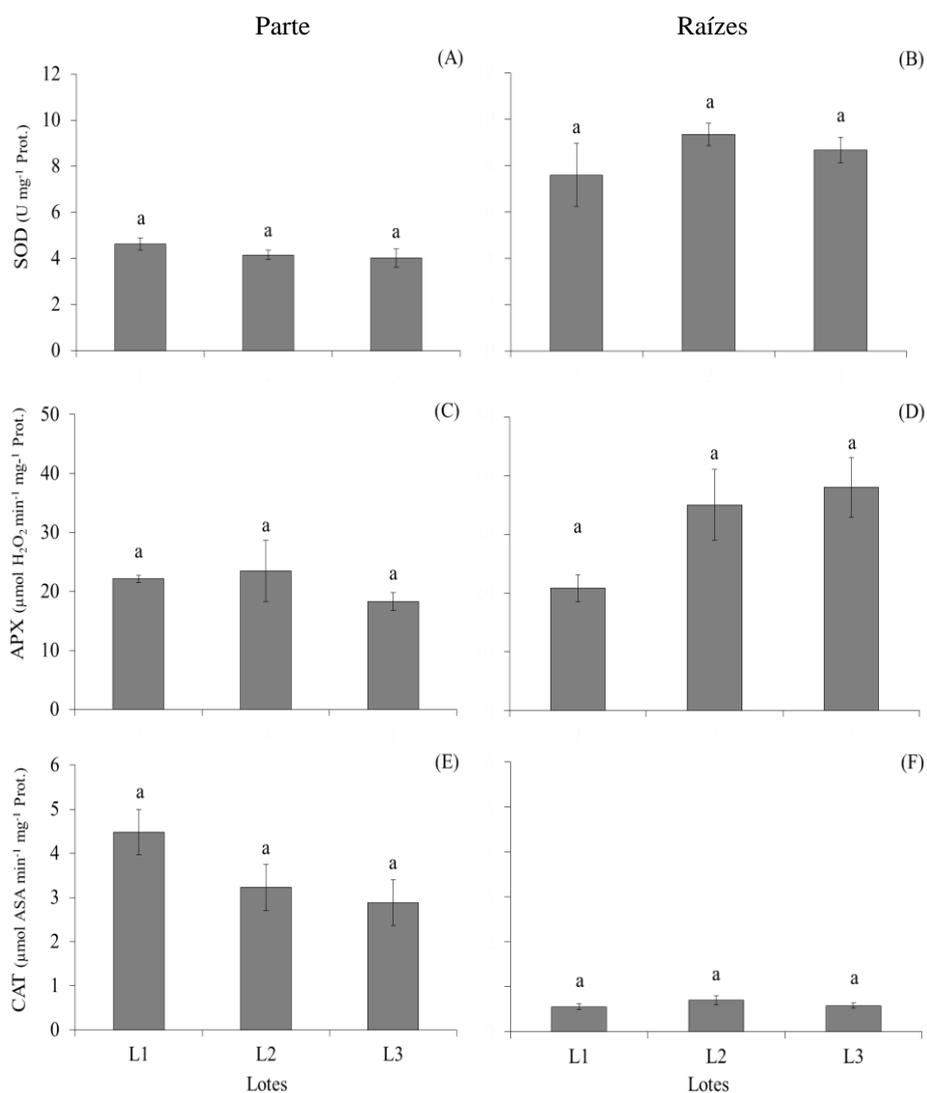


Figura 4. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) na parte aérea (A, C e E, respectivamente) e nas raízes (B, D e F, respectivamente) de três lotes de sementes de feijão. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

Devido à alta afinidade da enzima APX pelo H₂O₂ esta é capaz de eliminar radicais livres durante o estresse oxidativo de forma mais eficaz (Hasanuzzaman et al., 2012). Sendo assim, pelo fato do processo germinativo não ter sido tão traumático para a parte aérea das plântulas oriundas das sementes do L3, houve menor atividade desta enzima (Figura 4C) neste órgão, da mesma forma que observado para a atividade da SOD (Figuras 4A).

A CAT é a enzima que possui alto potencial no processo de dismutação direta do H_2O_2 em H_2O e O_2 , sendo uma enzima indispensável para a desintoxicação de EROs durante condições de alta produção de radicais tóxicos (Garg et al., 2009). Embora não tenha sido evidenciada diferenças estatística em relação à atividade desta enzima entre os lotes, é possível verificar que numericamente na parte aérea houve menor atividade no L3 da mesma forma que a atividade da SOD e APX (Figura 4A e 4C). Na raízes das plântulas ocorreu o mesmo que para a SOD evidenciando os L3 e L1 como os de menor atividade enzimática (Figura 4F) corroborando, portanto com os resultados de viabilidade e vigor, os quais identificaram o L3 como de maior vigor (Figuras 1).

CONCLUSÃO

A atividade das enzimas antioxidantes (SOD, APX e CAT) não é eficiente para separar lotes heterogêneos de sementes de feijão quanto ao vigor.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

LITERATURA CITADA

Alves, C. Z.; Godoy, A. R.; Candido, A. C. da S.; Oliveira, N. C. de. Teste de condutividade elétrica na avaliação do potencial fisiológico de sementes de berinjela. *Ciência Rural*, v.42, n.6, p.975–980, 2012.

<<http://www.scielo.br/pdf/cr/v42n6/a17012cr5424.pdf>>

Apel, K.; Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, v.55, 373–399, 2004.

<<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>

>

Araujo, R. F.; Zonta, J. B.; Araújo, E. F.; Donzeles, S. M.; Costa, G. M. Teste de condutividade elétrica para sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). *Idesia (Arica)*, v.29, n.2, p.79-86, 2011. <<http://www.scielo.cl/pdf/idesia/v29n2/art10.pdf>>

Aumonde, T. Z.; Marini, P.; Moraes, D. M. de; Maia, M. de S.; Pedó, T.; Tillmann, M. A. A.; Villela, F. A. V. Classificação do vigor de sementes de feijão-miúdo pela atividade respiratória. *Iterciência*; v.37, n.1, p.55-58, 2012.
<http://www.interciencia.org/v37_01/55.pdf>

Azevedo, R. A.; Alas, R. M.; Smith, R. J.; Lea, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiology Plantarum*, v.104, p.280-292, 1998.
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1399-3054.1998.1040217.x/abstract>>

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. 395p.

Botelho, F. J. E.; Guimarães, R. M.; Oliveira, J. A.; Evangelista, J. R. E.; Eloi, T. de A.; Baliza, D. P. Desempenho fisiológico de sementes de feijão colhidas em diferentes períodos do desenvolvimento. *Revista Ciência e Agrotecnologia*, v.34, n.4, p.900-907, 2010. <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v34n4/v34n4a15.pdf>>

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, n. 1/2, p. 248-254, 1976. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>>

Cai, F.; Lan-Ju, M.; Xiao-Long, A.; Shun, G.; Lin, T.; Fang, C. Lipid peroxidation and antioxidant responses during seed germination of *Jatropha curcas*. *Journal of Agriculture and Biology*, v.13, p.25-30, 2011.
<http://www.fspublishers.org/ijab/past-issues/IJABVOL_13_NO_1/4.pdf>

Cakmak, I.; Atici, O.; Agar, G.; Sunar, S. Natural aging-related biochemical changes in alfafa (*Medicago sativa* L.) seeds stored for 42 years. *International Research Journal of Plant Science*, v.1, p.1-6, 2010.

<<http://interesjournals.org/IRJPS/Pdf/2010/July%202010/CAKMAK%20et%20al%20.pdf>>

Catão, H. C. R. M; Costa, F. M; Valadares, S. V.; da Rocha Dourado, E.; Junior, D. D. S. B.; Sales, N. D. L. P. Qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de milho crioulo produzidas no norte de Minas Gerais. *Ciência Rural*, n.10, p.2060-2066, 2010.

<<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=33119160001>>

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTOS-CONAB, Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2011/12 – Sexto Levantamento – Março/2012.

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_05_09_09_29_16_boletim_graos_maio_2013.pdf>

Carvalho, L. F.; Sedyama, C. S.; Rei, S. M. S.; Dias, D. C. F. S.; Moreira, M. A. Influência da temperatura de embebição da semente de soja no teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica. *Revista Brasileira de Sementes*, v.41, p.9-17, 2009.

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0101-31222009000100001&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>

Forman, H. J.; Maiorino, M.; Ursini, F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*, v.49, p.835-842, 2010.

<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi9020378>>

Garg, N.; Manchanda, G. ROS generation in plants: Boon or bane?. *Plant Biosystems*, v.143, n.1, p.81-96, 2009.

<<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11263500802633626>>

Guedes, R. S.; Alves, E. U.; Gonçalves, E. P.; Viana, J. S.; de Medeiros, M. S.; de Lima, C. R. Teste de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Erythrina velutina* Willd. Semina: Ciências Agrárias, v.30, n.4, p.793-802, 2009.

<<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewArticle/4074>>

Gill, S. S.; Tuteja, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, v.48, n.12, p.909-930, 2010. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942810001798>>

Giannopolitis, I.; Reis, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology, v.59, p.309-314. 1977.

<<http://www.plantphysiol.org/content/59/2/309.full.pdf+html>>

Goes, R. J.; Lopes, A. da S.; Filho, S. N. S.; Oliveira, G. Q. de. Qualidade fisiológica de sementes de feijão sob manejos de irrigação e doses de nitrogênio. Revista da FZVA, v.18, n.1, p.155-164. 2011.

<<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/view/9082>>

Hasanuzzaman, M.; Hossain, M. A.; da Silva, J. A. T.; Fujita, M. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. In: Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies. Springer Netherlands, v.15, p.261-315. 2012. <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-2220-0_8#page-1>

Kibinza, S.; Vinel, D.; Come, D.; Bailly, C.; Corbineau, F. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. Physiologia Plantarum, v.12, p.496-506, 2006.

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.2006.00771.x/full>>

Krzyzanowski, F. C.; França-Neto, J. B.; Henning, A. A. Relato dos testes de vigor disponíveis para grandes culturas. In: Informativo ABRATES, v.1, n.2, p.15-50.

1991. <<http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=ACERVO.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=053815>>

Machado, A. de A.; Conceição, A. R. WinStat: sistema de análise estatística para Windows. Versão 2.0. Versão 2.0. Pelotas: UFPEL/NIA. 2007.

Maguire, J. D. Speed of germination and in selection and evaluation for seedlings emergence and vigor. *Crop Science*, v.2, n.2, p.176-177, 1962.
<<https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/2/2/CS0020020176>>

Mei, Y.; Song, S. Response to temperature stress of reactive oxygen species scavenging enzymes in the cross-tolerance of barley seed germination. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, v.11, p.965-972, 2010. <<http://link.springer.com/article/10.1631/jzus.B1000147>>

Nakano, Y.; Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, v.22, p.867-880, 1981.
<<http://pcp.oxfordjournals.org/content/22/5/867.short>>

Olivo, F.; Tunes, L. M. de; Olivo, M.; Bertan, I.; Peske, S. Espessura do tegumento e qualidade física e fisiológica de sementes de feijão. *Revista Verde*, v.6, n.1, p.89–88, 2011.
< <http://gvaa.dominiotemporario.com/revista/index.php/RVADS/article/view/538>>

Pêgo, R. G.; Nunes, U. R.; Massad, M. D. Qualidade fisiológica de sementes e desempenho de plantas de rúcula no campo. *Revista Ciência Rural*, v.41, n.8, p.1341-1346, 2011. <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v41n8/a8311cr3948.pdf>>

Pereira, M. D.; Martins Filho, S. Suitability of electrical conductivity test for *Solanum sessiliflorum* seeds. *Revista Agrarian*, v.5, n.16, p.93-98, 2012.

<<http://www.cabdirect.org/abstracts/20123231439.html;jsessionid=DC72EB9441A5EE5999F8B738830B835B?gitCommit=4.13.29>>

Silva, L. B. da; Martins, C. C. Teste de condutividade elétrica para sementes de mamoneira. *Semina: Ciências Agrárias*, v.30, n.1, p.1043-1050, 2009.
<<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewArticle/4640>>

Silva, R. P. da; Teixeira, I. R.; Devilla, I. A.; Rezende, R. C.; da Silva, G. C. Qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* L.) durante o beneficiamento. *Semina: Ciências Agrárias*, v.32, n.4, p.1219-1230, 2011.
<<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/4731/8887>>.

Socolowski, F; Vieira, D. C. M; Takaki, M. Massa das sementes de *Tecoma stans* L. Juss. ex Kunth (Bignoniaceae): efeitos na emergência e desenvolvimento de suas plântulas no sol e na sombra. *Biota Neotropica*, v.11, n.2, p.171-178, 2011.
<<http://www.scielo.br/pdf/bn/v11n2/17.pdf>>

Torres, S. B; Medeiros, M. A; Tosta, M. S; Costa, G. M. M. Teste de condutividade elétrica em sementes de gergelim. *Revista Brasileira de Sementes*, v.31, n.3, p.070-077, 2009. <<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v31n3/a08v31n3.pdf>>

Vanzolini, S.; Araki, C. A. D. S.; Silva, A. C. T. M.; Nakagawa, J. Teste de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes*, v.29, n.2, p.90-96, 2007.
<<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v29n2/v29n2a12.pdf>>

ARTIGO 3

ENZIMAS ANTIOXIDANTES PARA A CLASSIFICAÇÃO DE LOTES DE SEMENTES DE SOJA QUANTO AO VIGOR

(De acordo as normas da Revista Brasileira de Sementes)

1 ENZIMAS ANTIOXIDANTES PARA CLASSIFICAR LOTES DE SEMENTES DE SOJA

2 Enzimas antioxidantes para a classificação de lotes de sementes de soja quanto ao
3 vigor

4 Isabel Cristina Gouvêa de Borba^{2*}, Andréa Bicca Noguez Martins², Juliana de Magalhães
5 Bandeira², Patrícia Marini², Dario Munt de Moraes²

6 **RESUMO:** O objetivo neste foi diferenciar lotes de sementes de soja por meio da atividade das
7 enzimas antioxidantes e verificar se estas enzimas detectam pequenas diferenças no vigor das
8 sementes. Para isso, foram utilizados três lotes de sementes de soja, as quais além de testes padrão
9 de qualidade fisiológica de sementes, como germinação, primeira contagem de germinação, índice
10 de velocidade de germinação, comprimento e massa seca da parte aérea e raízes e condutividade
11 elétrica, foi realizada a análise da atividade de enzimas do sistema antioxidativo (superóxido
12 dismutase, ascorbato peroxidase e catalase). Para o delineamento experimental os dados foram
13 testados quanto a sua normalidade (Shapiro-Wilk) e, posteriormente, submetidos à análise de
14 variância, e quando significativo foram testados pelo teste de média ($p \leq 0,05$). Os resultados obtidos
15 com os testes de qualidade fisiológica de sementes permitiram a classificação dos lotes de sementes
16 de soja em diferentes níveis de vigor. Não sendo possível observar o mesmo resultado nas análises
17 das enzimas do sistema antioxidante. Portanto, conclui-se que a atividade das enzimas antioxidantes
18 não é eficiente para separar lotes heterogêneos de sementes de soja em diferentes níveis de vigor.

19 Termos para indexação: *Glycine max* L., qualidade fisiológica, metabolismo antioxidativo.

20
21 ¹Submetido em _____. Aceito para publicação em _____.

22 ²Universidade Federal de Pelotas – UFPel, PPGFV – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia
23 Vegetal, Instituto de Biologia, Caixa Postal 354 -96010-900 - Pelotas-RS, Brasil.

24 *Autor para correspondência: isabel.gouvea.borba@gmail.com

1 ANTIOXIDATIVE ENZYMES TO CLASSIFY SOYBEAN SEEDS LOTS ACCORDING TO
2 VIGOR

3 **ABSTRACT:** The aim of this study was to classify soybean seeds lots through the antioxidative
4 enzymes activity and relate them to viability and vigor standard tests, to verify if those enzymes
5 detect small differences in the seeds vigor. For this, we used three soybean seeds lots, to which, in
6 addition to seed quality standard tests, such as germination, first germination counting, germination
7 speed index, length and dry mass of shoots and roots and electrical conductivity, it was performed
8 the analysis of the antioxidant enzymes system (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and
9 catalase) activity. For the experimental design, the data were tested for normality (Shapiro-Wilk),
10 and then subjected to variance analysis, and, when significant, they were tested by the average test
11 ($p \leq 0.05$). The obtained results from the seed quality tests allowed classifying the soybean seeds lots
12 in different vigor levels. It was not possible to notice the same result in the antioxidative system
13 enzymes analysis. Therefore, the conclusion is that the antioxidative system enzymes activity is not
14 efficient to classify soybean seeds lots according to vigor.

15 Index terms: *Glycine max* L., physiological quality, antioxidant metabolism.

INTRODUÇÃO

A soja é pertencente à família das Leguminosae, de grande importância nacional, sendo que ao final da década de sessenta passou a substituir o trigo nas regiões sul do país (Martins e Silveira, 2011). No estado do Rio Grande do Sul a última safra atingiu aproximadamente 20,39 milhões de toneladas (CONAB, 2012). Dessa forma, para a obtenção de melhores resultados econômicos e conservação das espécies é preciso dar atenção a um sistema de produção com controle de qualidade, onde a viabilidade e o vigor das sementes sejam os principais fatores a serem considerados (Bento et al., 2010).

Durante o processo de maturação ou no armazenamento, as condições de umidade e temperatura a que as sementes estão submetidas podem interferir diretamente na sua qualidade fisiológica como, por exemplo, a perda do seu vigor, que esta relacionada com os eventos iniciais da sequência de deterioração, os quais são evidenciados por vários fatores como atraso na germinação, redução no crescimento das plântulas, lixiviação de solutos, mudanças na atividade enzimática, perda da compartimentalização celular e acúmulo de substâncias tóxicas, processos que, acarretarão problemas na produtividade das culturas (Corte et al., 2010; Silva et al., 2011).

Contudo, estes parâmetros relacionados à deterioração de sementes nem sempre são detectados por testes básicos de viabilidade e vigor. Logo, tendo em vista que a demanda por sementes de alta qualidade é crescente, as empresas de tecnologia de sementes buscam aprimorar suas técnicas na tentativa de associar o resultado dos testes padrão de qualidade fisiológica com a resposta real das sementes em campo (Pegô et al., 2011).

A deterioração de sementes pode ocorrer em lotes que tiveram maturação precoce ou que foram mal armazenados e, nestes casos, geralmente é evidenciado a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais limitam o crescimento e desenvolvimento do vegetal (Carvalho et al., 2009; Forman et al., 2010), como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2). Entretanto, para conter os efeitos

1 deletérios dessas EROs as plantas desenvolveram um complexo sistema antioxidante, que constitui
2 a defesa primária contra esses radicais gerados em condições limitantes.(El-Shabrawi et al., 2010)
3 A exemplo temos as enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) que catalisa a dismutação
4 do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , a ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) e a catalase
5 (CAT, EC 1.11.1.6) que podem quebrar a molécula de H_2O_2 em H_2O e O_2 .(Deuner et al., 2011)

6 Portanto, o objetivo neste trabalho foi diferenciar lotes de sementes de soja por meio da
7 atividade das enzimas antioxidantes e verificar se estas enzimas detectam pequenas diferenças no
8 vigor das sementes.

9 MATERIAL E MÉTODOS

10 A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Fisiologia de Sementes, do Departamento de
11 Botânica da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Foram utilizados três lotes de sementes de
12 soja classificados como L1, L2 e L3, cultivar NA 4990RG, obtidas da empresa Nidera Sementes
13 Ltda, e logo submetidas ao teste padrão de germinação (G%), que foi realizado de acordo com as
14 Regras de Análises de Sementes (Brasil, 2009), sendo conduzido com 200 sementes (quatro
15 subamostras de 50 sementes) para cada repetição, totalizando quatro repetições para cada lote. O
16 substrato utilizado foi rolo de papel especial para germinação (germitest[®]), umedecido com água
17 destilada na proporção de 2,5 vezes a sua massa inicial e mantidos em germinador a 25°C. Os
18 resultados foram expressos em porcentagem de germinação. A primeira contagem de germinação
19 (PCG%) foi conduzida juntamente com o teste de germinação, sendo a primeira contagem para a
20 soja realizada aos cinco dias após a semeadura (DAS) e os resultados expressos em porcentagem de
21 plântulas normais emitidas para cada lote. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi
22 realizado, conjuntamente, com o teste de germinação, e as contagens diárias foram realizadas a
23 partir da protrusão da radícula pelo tegumento da semente, até que o número de plântulas emersas
24 permanecesse constante. O último dia de contagem para este teste foi o mesmo prescrito para o teste
25 de germinação (oito dias) e o cálculo do IVG foi efetuado de acordo com Maguire (1962). Para a

1 emergência de plântulas (E%) em casa de vegetação as sementes foram semeadas em bandejas
2 plásticas perfuradas, utilizando como substrato areia lavada. Foram utilizadas quatro repetições de
3 200 sementes subdivididas em quatro subamostras de 50 sementes para cada repetição e os
4 resultados foram expressos em porcentagem de plantas emergidas após 21 DAS. O índice de
5 velocidade de emergência (IVE) foi realizado, conjuntamente, com a emergência de plântulas, até
6 que o número de plântulas emersas permanecesse constante. O último dia de contagem para este
7 teste foi o mesmo prescrito para o teste de emergência de plântulas e o cálculo do IVE foi efetuado
8 de acordo com Maguire (1962).

9 A condutividade elétrica (CE) foi realizada com quatro subamostras de 25 sementes para
10 cada repetição, sendo quatro repetições para cada lote. Primeiramente foi determinada a massa das
11 sementes, as quais foram colocadas em béquer com 75 mL de água deionizada e mantidas em
12 germinador a 25°C. Após os períodos de três, seis e 24h de incubação, os recipientes foram
13 retirados do germinador e, imediatamente submetidos às leituras em condutivímetro de bancada
14 Schott LF613T, sendo os resultados expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ de sementes (Krzyzanowski, 1991).
15 O comprimento da parte aérea (CPA) e das raízes das plântulas (CR) foi obtido pela média de 40
16 plântulas por repetição, ao final do teste de germinação, sendo a medida do comprimento realizada
17 com régua milimetrada e os resultados expressos em mm plântula^{-1} ; a massa seca de parte aérea
18 (MSPA) e das raízes das plântulas (MSR) também foram obtidas ao final do teste de germinação,
19 após secagem em estufa a $70\pm 2^\circ\text{C}$ até obter massa constante e os resultados expressos em mg
20 plântula^{-1} .

21 Para as análises das atividades antioxidantes, quatrocentos miligramas de parte aérea e raízes
22 foram coletados após o teste de germinação, macerados com 10% de polivinilpolipirrolidona
23 (PVPP) e homogeneizados em 1,5 mL do tampão de extração, constituído de fosfato de potássio
24 (100 mM, pH 7,8), EDTA (0,1 mM) e ácido ascórbico (20 mM). Após centrifugação, a 12.000 g por

1 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade das enzimas e para a
2 quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976).

3 A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul
4 de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis e Ries, 1977) em meio de reação contendo fosfato de
5 potássio (50 mM, pH 7,8), metionina (14 mM), EDTA (0,1 µM), NBT (75 µM) e riboflavina (2
6 µM), acrescido de 50 µL do extrato enzimático, completando volume final de 2 mL com água
7 destilada. As leituras foram realizadas a 560 nm levando em consideração que uma unidade da SOD
8 corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições
9 de ensaio.

10 A atividade da APX foi realizada segundo Nakano e Asada (1981), com modificações, por
11 meio da avaliação da taxa de oxidação do ascorbato. O meio de reação foi composto de tampão
12 fosfato de potássio (100 mM, pH 7,0) e ácido ascórbico (0,5 mM), estes foram incubados a 37°C
13 por 10 minutos. Antes de efetuar a leitura em espectrofotômetro a 290 nm, em intervalos de dez em
14 dez segundos até completar 90 segundos, foi adicionado H₂O₂ (0,1 mM) e 25 µL do extrato
15 enzimático, completando volume final de 2 mL com água destilada.

16 A atividade da CAT foi determinada conforme Azevedo et al. (1998), com modificações,
17 estimada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, em intervalos de dez em dez segundos até
18 completar 90 segundos, em meio de reação contendo fosfato de potássio (100 mM, pH 7,0)
19 incubado a 37°C por 10 segundos, sendo adicionado H₂O₂ (12,5 mM) e 25 µL do extrato enzimático
20 antes da leitura, completando volume final de 2 mL com água destilada.

21 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados
22 foram testados quanto a sua normalidade (Shapiro-Wilk) e, posteriormente, submetidos à análise de
23 variância ($p \leq 0,05$), em caso de significância os resultados foram comparados pelo teste de média
24 (Tukey) com 5% de probabilidade de erro pelo software WinStat Versão 2.0 (Machado e
25 Conceição, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de germinação permitiu separar os lotes das sementes de soja, evidenciando maior porcentagem de germinação para o L2 (97,50%) (Figura 1A). Em trabalho semelhante a este, com sementes de *Avena strigosa* Schreb., também foi possível classificar os lotes com o teste de germinação (Souza et al., 2010).

O vigor, caracterizado pelos testes de primeira contagem e índice de velocidade de germinação apresentaram diferenças significativas entre os lotes, evidenciando o L2 como o mais vigoroso (Figuras 1B e 1C). De forma semelhante, em trabalho realizado com sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) foi possível separar os lotes através deste teste (Souza et al., 2009) e em trabalho com sementes de rúcula (*Eruca sativa* Mill.) a classificação dos lotes das sementes foi obtida pelo teste de índice de velocidade de germinação (Pêgo et al., 2011).

Da mesma forma, houve diferença significativa para as variáveis emergência e índice de velocidade de emergência de plântulas, as quais evidenciaram o L2 como de maior vigor (Figuras 1D e 1E). Corroborando estes resultados o teste de condutividade elétrica (Figura 2) também permitiu classificar este lote como o mais vigoroso devido à menor perda de eletrólitos em todos os períodos de embebição, o que caracteriza maior integridade dos sistemas de membranas celulares (Pereira e Martins Filho, 2012).

De forma geral, em relação ao comprimento e massa seca da parte aérea e das raízes houve diferença significativa entre os lotes, sendo o L2 o de melhor vigor (Figura 3). Em pesquisa realizada com o objetivo de classificar lotes de sementes de soja foi evidenciado que o acúmulo de biomassa é capaz de expressar resultados mais sutis (Vanzolini et al., 2007).

Através de testes de viabilidade e vigor (germinação, primeira contagem de germinação índice de velocidade de germinação, emergência, condutividade elétrica, comprimento e massa seca de parte aérea e de raiz) também foi possível classificar lotes de sementes de feijão-miúdo (*Vigna*

1 *unguiculata* L.) (Aumonde et al., 2012), rúcula (*Eruca sativa* Mill.) (Pêgo et al., 2011) e aveia
2 branca (*Avena sativa* L.) (Cantos et al., 2011) quanto ao vigor.

3 Entre as enzimas envolvidas na remoção de possíveis espécies reativas de oxigênio (EROs)
4 a SOD é geralmente a primeira na linha de defesa contra o estresse oxidativo (Pompeu et al., 2008).
5 A atividade desta enzima apresentou diferença significativa entre os lotes de sementes de soja,
6 sendo que na parte aérea sua atividade foi menor no L1 e L2 (Figura 4A), o que pode ser explicado
7 devido a maior qualidade fisiológica expressada pelo L2 nas variáveis referentes às análises de
8 viabilidade e vigor, demonstrando a capacidade destas plântulas contornarem situações adversas
9 não tendo a necessidade de acionar o sistema de defesa. Além disso, a atividade desta enzima nas
10 raízes também evidenciou menor atividade nas plântulas oriundas do L2 (Figura 4B),
11 demonstrando, desta forma, que seu mecanismo de defesa antioxidante não precisou ser ativado de
12 forma tão intensa, enquanto que as plântulas oriundas dos L1 e L3 a atividade desta enzima foi mais
13 alta, visto que estes lotes foram considerados de vigor inferior nos testes padrão de viabilidade e
14 vigor e, provavelmente, possuem maior necessidade de acionar o sistema de defesa antioxidante
15 para contornar sua baixa qualidade.

16 A atividade da enzima APX não apresentou diferença significativa na parte aérea, nem nas
17 raízes (Figuras 4C e 4D) das plântulas de soja. Assim como a atividade da CAT não apresentou
18 diferença significativa na parte aérea (Figura 4E), ao contrário do que ocorreu nas raízes, onde os
19 L2 e L3 evidenciaram baixa atividade desta enzima (Figura 4F). Resultado este que pode ser
20 explicado partindo do pressuposto que lotes com maior vigor apresentam menor quantidade de
21 EROs, como por exemplo, o H_2O_2 . Além disso, como a afinidade da CAT por este substrato é
22 baixa, a mesma torna-se ativa somente quando ocorre acúmulo de H_2O_2 (Jaleel et al., 2009), sendo
23 assim, lotes com maior vigor, como é o caso do L2, possuem menor produção deste composto e,
24 conseqüentemente, a atividade da enzima CAT foi menor neste lote e lotes com baixo vigor
25 caracterizam maior necessidade de ativar o sistema de defesa, fato que foi observado neste trabalho

1 onde o L1, caracterizado como de baixo vigor, apresentou maior atividade da CAT nas raízes,
2 possivelmente por apresentar grande quantidade de H₂O₂.

4 **CONCLUSÕES**

5
6 A atividade das enzimas antioxidantes (SOD, APX e CAT) não é uma ferramenta eficiente
7 para separar os lotes de sementes heterogêneas de soja quanto ao vigor.

9 **AGRADECIMENTOS**

10 Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
11 (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo
12 suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

14 **REFERÊNCIAS**

15
16 AUMONDE, T. Z.; MARINI, P.; MORAES, D. M. de; MAIA, M. de S.; PEDÓ, T.; TILLMANN, M.
17 A. A.; VILLELA, F. A. V. Classificação do vigor de sementes de feijão-miúdo pela atividade
18 respiratória. *Iterciência*; v.37 n.1, 2012. <http://www.interciencia.org/v37_01/55.pdf>

19
20 AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to
21 transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-
22 type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiology Plantarum*, v.104, p.280-292, 1998.
23 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1399->

1 3054.1998.1040217.x/abstract;jsessionid=3FDCFDE940FFBEF2080942C18853592A.d04t04?deni
2 edAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>
3
4 BENTO, S. R. S. de O.; SANTOS, A. E. O. dos; MELO, D. R. M. de; TORRES, S. B. Eficiência
5 dos testes de vigor na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mulungu (*Erythrina*
6 *velutina* Willd.). *Revista Brasileira de Sementes*, v.32, n.4, p.111-117, 2010.
7 <<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v32n4/12.pdf>>
8
9 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes.
10 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Secretaria de Defesa Agropecuária*. Brasília:
11 MAPA/ACS, 2009. 395p.
12 <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/2946_regras_analise__sementes.pdf>
13
14 BRADFORD, M.M. A rapid an sensitive method for the quantitation of microgram quantities of
15 protein utilizing the principle of protein biding. *Analytical Biochemistry*, v.72, n.1/2, p.248-254,
16 1976. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>>
17
18 COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTOS-CONAB, Acompanhamento da Safra
19 Brasileira de Grãos 2011/12 – Sexto Levantamento – Março/2012.
20 <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_05_09_09_29_16_boletim_graos_maio](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_05_09_09_29_16_boletim_graos_maio_2013.pdf)
21 [_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_05_09_09_29_16_boletim_graos_maio_2013.pdf)>
22
23 CANTOS, A. A; TUNES, L. M; BARBIERI, A. P. P; TAVARES, L. C. Avaliação de testes de
24 vigor em sementes de aveia branca (*Avena sativa* L.). *Revista da FZVA*. v.18, n.2, p.1-11. 2011.
25 <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/viewFile/7591/7357>>.

1

2 CARVALHO, L. F., SEDIYAMA, C. S., REI, S. M. S, DIAS, D. C. F. S., MOREIRA, M. A.

3 Influência da temperatura de embebição da semente de soja no teste de condutividade elétrica para

4 avaliação da qualidade fisiológica. *Revista Brasileira de Sementes*, v.41, p.9-17, 2009.

5 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0101-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0101-31222009000100001&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)

6 [31222009000100001&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0101-31222009000100001&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>

7

8 CORTE, V. B., BORGES, E. E. L., LEITE, H. G., PEREIRA, B. L. C., GONÇALVES, J. F. C.

9 Estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon braúna* submetidas ao

10 envelhecimento natural e acelerado. *Revista Brasileira de Sementes*, v.32, n.1, p.083-091, 2010.

11 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0101-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0101-31222010000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)

12 [31222010000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0101-31222010000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>

13

14 DEUNER, C.; MAIA, M.S.; DEUNER, S.; ALMEIDA, A.; MENEGHELLO, G.E. Viabilidade e

15 atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino.

16 *Revista Brasileira de Sementes*, v.33, n.4, p.711-720, 2011.

17 <<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v33n4/13.pdf>>

18

19 EL-SHABRAWI, H.; KUMAR, B.; KAUL, T.; REDDY, M.K.; SILNGLA-PAREEK, S.L.;

20 SOPORY, S.K. Redox homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification as

21 markers for salt tolerance in Pokkali rice. *Protoplasma*, v.245, p.85-96, 2010.

22 <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00709-010-0144-6?LI=true>>

23

24 FORMAN, H. J.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Signaling functions of reactive oxygen species.

25 *Biochemistry*, v.49, n.5, p.835-842, 2010. <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi9020378>>

1

2 GIANNOPOLITIS, I.; REIS, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant*

3 *Physiology*, v.59, p.309-314. 1977. <<http://www.plantphysiol.org/content/59/2/309.full.pdf+html>>

4

5 JALEEL, C. A.; RIADH, K.; GOPI, R.; MANIVANNAN, P.; INES, J.; AL-JUBURI, H. J.;

6 CHANG-XING, Z.; HONG-BO, S.; PANNEERSELVAM, R. Antioxidant defense responses:

7 physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiology Plant*, v. 31,

8 p.427-436, 2009. <[http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11738-009-0275-6?LI=true#page-](http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11738-009-0275-6?LI=true#page-2)

9 2>

10

11 KRZYŻANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A. Relato dos testes de vigor

12 disponíveis para grandes culturas. *In: Informativo ABRATES*, 1991. p.15-50.

13 <[http://orton.catie.ac.cr/cgi-](http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=ACERVO.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=053815)

14 [bin/wxis.exe/?IsisScript=ACERVO.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=0](http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=ACERVO.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=053815)

15 [53815](http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=ACERVO.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=053815)>

16

17 MACHADO, A. de A.; CONCEIÇÃO, A. R. WinStat: sistema de análise estatística para Windows.

18 Versão 2.0. Versão 2.0. Pelotas: UFPEL/NIA. 2007. <<http://minerva.ufpel.edu.br/~amachado/>>

19

20 MAGUIRE, J. D. Speed of germination and in selection and evaluation for seedlings emergence

21 and vigor. *Crop Science*, v.2, n.2, p.176-177, 1962.

22 <<https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/2/2/CS0020020176>>

23

1 MARTINS, J. D.; RADONS, S. Z.; STRECK, N. A.; KNIES, A. E.; CARLESSO, R. Plastocrono e
2 número final de nós de cultivares de soja em função da época de semeadura. *Revista Ciência Rural*,
3 v.41, n.6, p.954-959, 2011. <<http://www.scielo.br/pdf/cr/2011nahead/a0611cr1914.pdf>>
4
5 NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in
6 spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, v.22, p.867-880, 1981.
7 <<http://pcp.oxfordjournals.org/content/22/5/867.short>>
8
9 PÊGO, R. G.; NUNES, U. R.; MASSAD, M. D. Qualidade fisiológica de sementes e desempenho
10 de plantas de rúcula no campo. *Revista Ciência Rural*, v.41, n.8, p.1341-1346, 2011.
11 <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v41n8/a8311cr3948.pdf>>
12
13 PEREIRA, M. D.; FILHO, S. M. Suitability of electrical conductivity test for *Solanum sessiliflorum*
14 seeds. *Revista Agrarian*, v.5, n.16, p.93-98, 2012.
15 <<http://www.cabdirect.org/abstracts/20123231439.html;jsessionid=63E2EA326F4620F3E7D6F2C>
16 C070793BB?gitCommit=4.13.29>
17
18 POMPEU, G. B.; GRATÃO, P. L.; VITORELLO, V. A. ;AZEVEDO, R. A. Antioxidant isoenzyme
19 responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. *Scientia Agrícola*, v.65, p.548-
20 552, 2008. <<http://www.scielo.br/pdf/sa/v65n5/a15v65n5.pdf>>
21
22 SILVA, R. P. da; TEIXEIRA, I. R.; DEVILLA, I. A.; REZENDE, R.C.; SILVA, G.C. Qualidade
23 fisiológica de sementes de soja (*Glycine max.* L.) durante o beneficiamento. *Semina: Ciências*
24 *Agrárias*, v.32, n.4, p. 1219-1230, 2011.
25 <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/4731/8887>>.
26

1 SOUZA, C. R. de; OHLSON, O. de C.; PANOBIANCO, M. Avaliação da viabilidade de sementes
2 de aveia branca pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*, v.32, n.4, 2010.
3 <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222010000400020>>.

4
5 SOUZA, L. A. de; CARVALHO, M. L. M. de; KATAOKA, V. Y; OLIVEIRA, J. A. de. Teste de
6 condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamona. *Revista*
7 *brasileira. sementes*, v.31, n.1, p.60-67, 2009.
8 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-31222009000100007&lng=en&nrm=iso)
9 [31222009000100007&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-31222009000100007&lng=en&nrm=iso)>. access on 12 Mar. 2013.
10 <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222009000100007>.

11
12 SOCOLOWSKI, F.; VIEIRA, D. C. M.; TAKAKI, M. Massa das sementes de *Tecoma stans* L.
13 *Juss. ex Kunth* (Bignoniaceae): efeitos na emergência e desenvolvimento de suas plântulas no sol e
14 na sombra. *Biota Neotropica*, vol.11, n.2, p.171-178, 2011.
15 <<http://www.scielo.br/pdf/bn/v11n2/17.pdf>>

16
17 VANZOLINI, S.; ARAKI, C. A. D. S.; SILVA, A. C. T. M.; NAKAGAWA, J. Teste de
18 comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. *Revista*
19 *Brasileira de Sementes*, v.29, n.2, p.90-96, 2007.
20 <<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v29n2/v29n2a12.pdf>>

21
22
23
24
25

FIGURAS

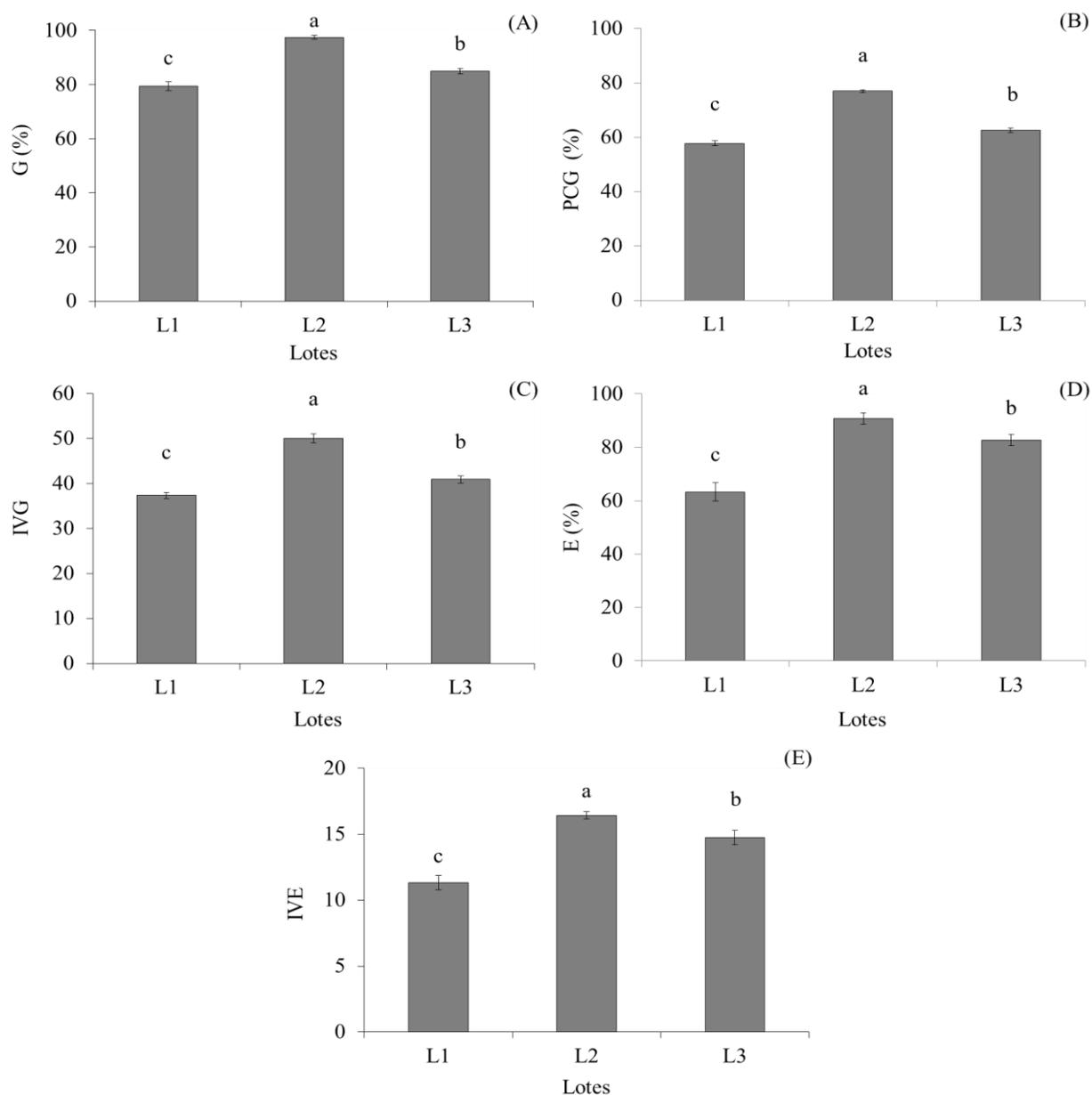
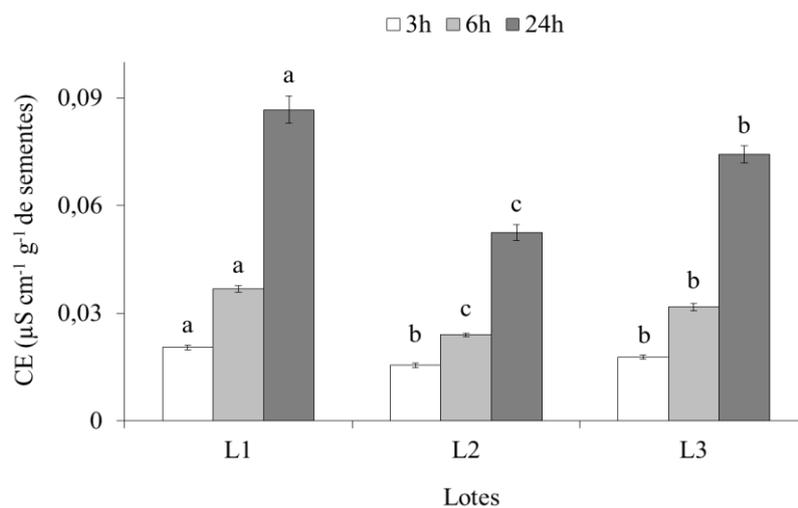
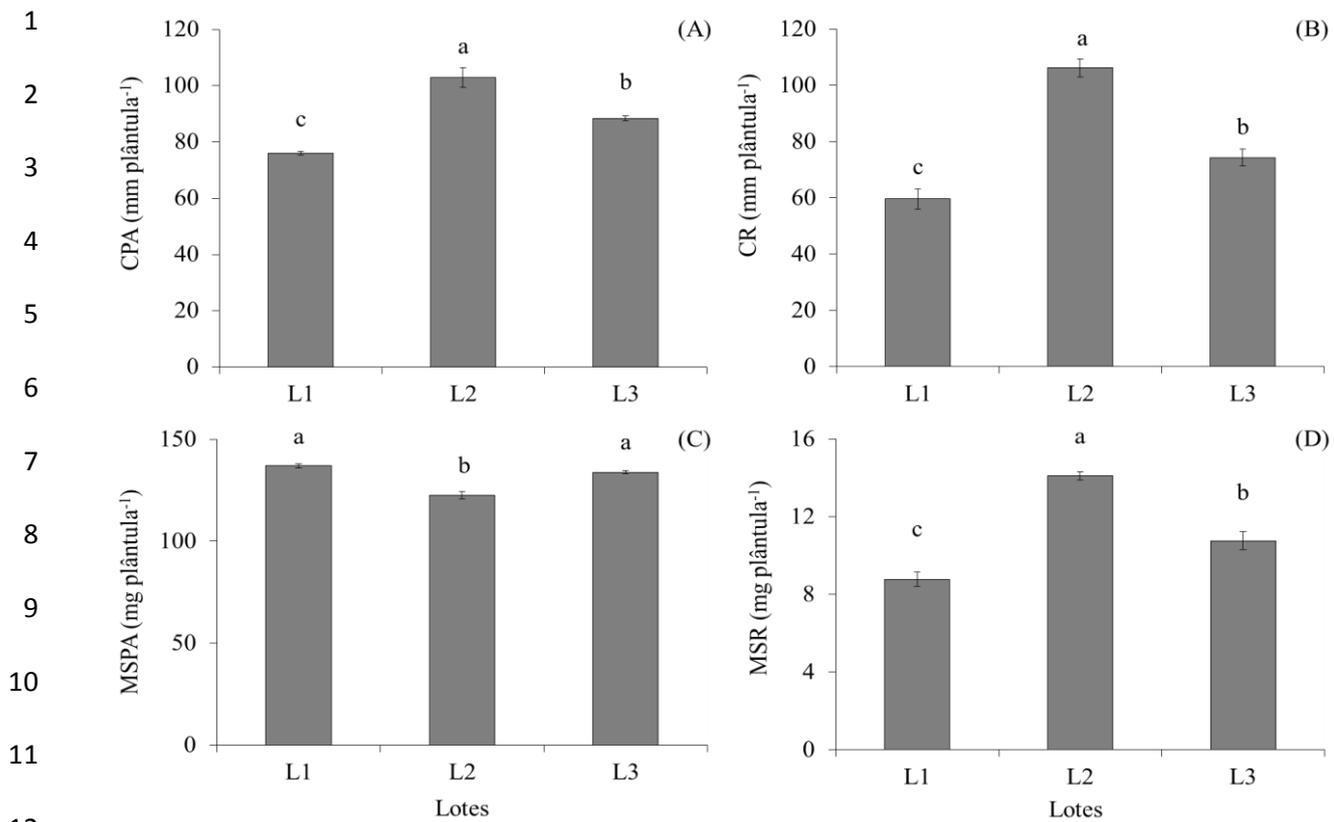


Figura 1 – (A) Germinação (G%), (B) primeira contagem de germinação (PCG%), (C) índice de velocidade de germinação (IVG), (D) emergência (E%) e (E) índice de velocidade de emergência de plântulas em casa de vegetação (IVE) de três lotes de sementes de soja. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.



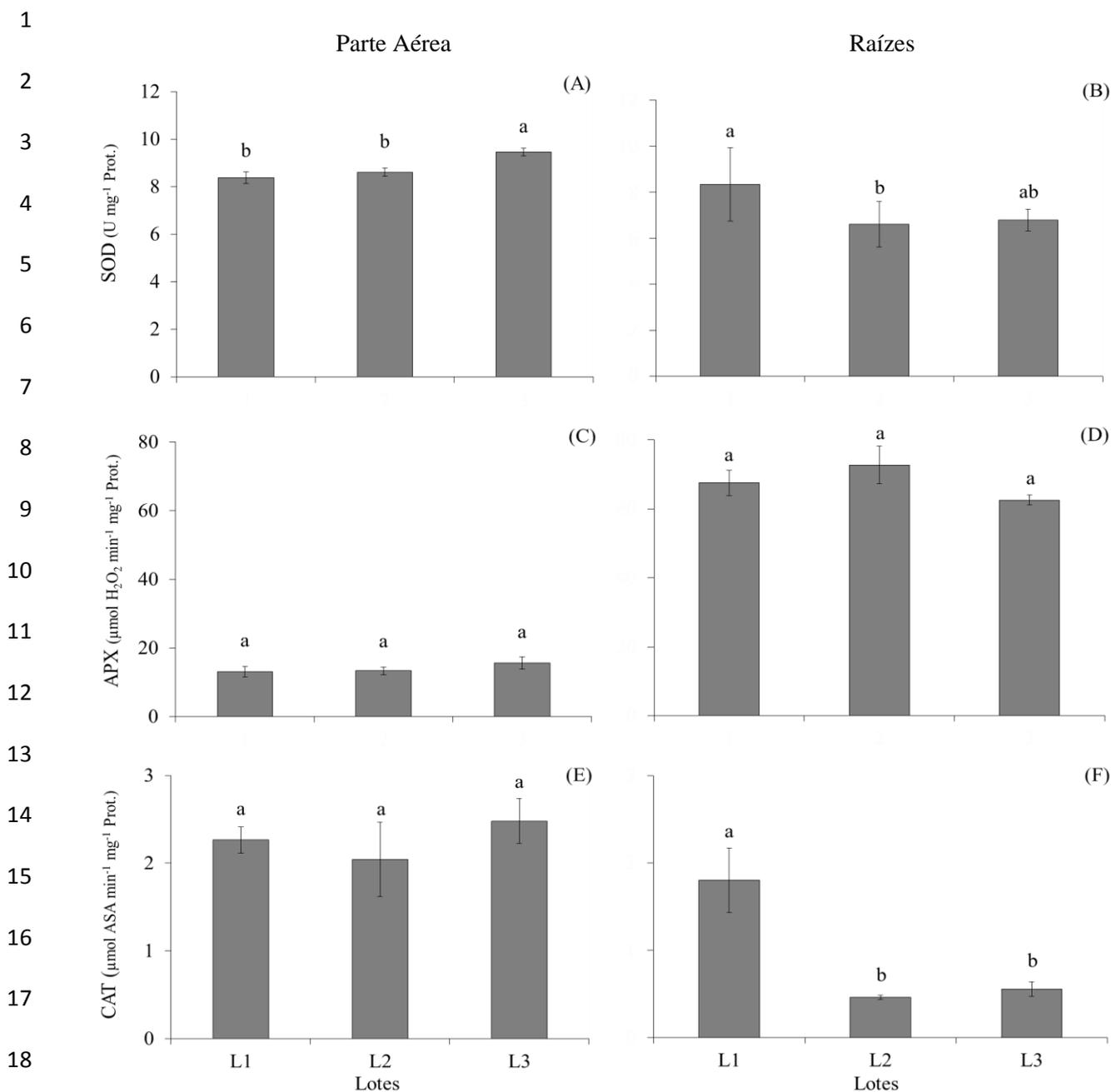
8 Figura 2 - Condutividade elétrica (CE) de três lotes de sementes de soja, em três, seis e 24 horas de
 9 embebição. Letras distintas diferem estatisticamente entre si, em cada período de embebição, pelo
 10 teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das
 11 médias de quatro repetições.

12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25



13 Figura 3 - (A) Comprimento e (C) massa seca de parte aérea (CPA e MSPA, respectivamente) e (B
 14 e D) de raízes (CR e MSR, respectivamente) de três lotes de sementes de soja. Letras distintas
 15 diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As
 16 barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25



20 Figura 4 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e
 21 catalase (CAT) na parte aérea (A, C e E, respectivamente) e nas raízes (B, D e F, respectivamente)
 22 de três lotes de sementes de soja. Letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de
 23 Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As barras representam o erro-padrão das médias de
 24 quatro repetições.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As respostas encontradas através da análise da atividade das enzimas antioxidantes são de grande valia, tendo em vista a ausência de estudos relacionados com a classificação de lotes de sementes quanto ao vigor, a fim de elucidar os processos iniciais da sequência de deterioração de sementes.

Além disso, através dos resultados obtidos foi possível verificar que, em lotes de sementes classificados através dos testes padrão de viabilidade e vigor, como tendo alta heterogeneidade, a atividade das enzimas do sistema antioxidativo (SOD, APX e CAT) não é eficiente na separação dos mesmos, contudo, quando os lotes de sementes apresentam elevada homogeneidade foi possível identificar alterações na atividade das enzimas permitindo distinguir os lotes de sementes.

Para que a análise da atividade das enzimas do sistema antioxidativo (SOD, CAT e APX) se torne uma ferramenta complementar e de identificação de pequenas diferenças na classificação de lotes de sementes quanto ao vigor, se faz necessário o emprego do teste de envelhecimento acelerado conjuntamente com a análise quantitativa de peróxido e peroxidação lipídica, para então assim, os lotes de sementes homogêneos poderem ser classificados e separados de forma comparativa e conclusiva.