



**TÚLIO SILVA LARA**

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E  
METABÓLICAS EM SEMENTES DE  
TOMATE SUBMETIDAS A AGENTES  
CONDICIONANTES**

**LAVRAS-MG**

**2013**

**TÚLIO SILVA LARA**

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EM  
SEMENTES DE TOMATE SUBMETIDAS A AGENTES  
CONDICIONANTES**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Agronomia  
/Fisiologia Vegetal, área de  
concentração em Crescimento e  
Desenvolvimento de Plantas, para  
obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Amauri Alves de Alvarenga

**LAVRAS-MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Lara, Tulio Silva.

Alterações fisiológicas e metabólicas em sementes de tomate  
submetidas a agentes condicionantes/ Túlio Silva Lara – Lavras :  
UFLA, 2013.

67 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Amauri Alves de Alvarenga.

Bibliografia.

1. Condicionamento. 2. Sistema antioxidante. 3. Redutase nitrato.

I. *Lycopersicon esculentum*. Universidade Federal de Lavras. II.

Título.

CDD – 583.79041

**TÚLIO SILVA LARA**

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EM  
SEMENTES DE TOMATE SUBMETIDAS A AGENTES  
CONDICIONANTES**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Agronomia  
/Fisiologia Vegetal, área de  
concentração em Crescimento e  
Desenvolvimento de Plantas, para  
obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 22 de fevereiro de 2013

Dr. Fernanda Carlota Nery.....UFSJ

Dr. Jose Donizeti Alves.....UFLA

Dr. Amauri Alves de Alvarenga

Orientador

**LAVRAS-MG**

**2013**

## AGRADECIMENTOS

A Deus que nunca me abandonou, mesmo nas horas mais difíceis.

Aos meus pais, que abdicaram de muitas coisas para eu realizar meus sonhos, além do ensinamento de caráter e honestidade.

Ao meu irmão, que sempre estará ao meu lado.

Ao meu sobrinho, que trouxe a felicidade de volta para casa.

A minha namorada e amiga Thaís, que sempre esteve ao meu lado me escutando e apoiando.

Aos meus tios, em especial o tio Rogério, pela convicção de que você só realiza seus sonhos com esforço.

As minhas tias, em especial Wanir e Elizete pelas horas de descontração em Guapé.

Aos meus primos, em especial a Nathalia e a Taciane que se tornaram irmãs.

Aos meus avôs que lá de cima, estão vibrando com nossa vitória.

As minhas avós pelo exemplo de fé.

Aos amigos de Guapé, amigos de infância, amigos para o resto da vida.

Aos amigos da Rep. Balaio e Rep. Lobo Mau que se tornaram grandes amigos e irmãos.

Aos amigos de casa, pelo companheirismo.

À Dona Hilda, que se tornou uma pessoa muito especial.

Ao professor Amauri Alves de Alvarenga, pela minha orientação desde o começo da faculdade.

Aos professores Luiz Edson e Donizeti pela confiança em deixar usar seus laboratórios.

Aos amigos da Fisiologia Vegetal.

Aos amigos do laboratório (Sara, Amanda, Jean, Mariana, Lara, Tássia, Fernanda) sem vocês nada disso seria possível.

A todos que me apoiaram nesta conquista, tornando uma conquista de todos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Fisiologia Vegetal pela oportunidade.

Ao Conselho Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO

O condicionamento osmótico é uma técnica que pode ser utilizada para melhorar o desempenho germinativo das sementes. Objetivou-se identificar a influência de agentes condicionantes no metabolismo germinativo e no desempenho fisiológico de sementes de tomate. Sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv Santa Clara foram condicionadas em soluções de polietileno glicol 6000 (PEG) e nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) por 2, 4 e 6 dias. As soluções dos agentes osmóticos (v/v) foram: 100%PEG 2; 4 e 6 dias; 100%  $\text{KNO}_3$  por 2; 4 e 6 dias; e combinações de 50% PEG + 50% $\text{KNO}_3$  por 2; 4 e 6 dias, além da testemunha (sementes não condicionadas). Foram realizados dois ensaios, no primeiro analisou a atividade de algumas enzimas do sistema antioxidante e a atividade da redutase do nitrato e suas possíveis contribuições ao desenvolvimento germinativo. Já no segundo ensaio analisou a concentração de alguns carboidratos e sua possível contribuição ao desenvolvimento germinativo e ao desenvolvimento inicial das plântulas. No primeiro ensaio, o condicionamento osmótico com 100%  $\text{KNO}_3$  4 dias e 6 dias proporcionaram maior atividade da redutase do nitrato e da dismutase do superóxido. Além dos maiores índices de velocidade de emergência e formação de plântulas. No segundo ensaio, observou uma maior velocidade de germinação em condições ideais, de estresse hídrico e à baixa temperatura, nas sementes condicionadas independente do meio de incubação, em relação à testemunha. Também foram observadas menores concentrações de açúcar solúvel total em sementes condicionadas. Os condicionamentos em 100% $\text{KNO}_3$  4 e 6 dias apresentaram os maiores índices germinação, formação de plântula normal e emergência, além da maior atividade da redutase do nitrato e da dismutase do superóxido. Além disso, o condicionamento osmótico independente do soluto e do período de incubação aumentou o índice de velocidade de germinação em condições ideais, de estresse hídrico e à baixa temperatura, além disso, houve diminuição da concentração de açúcar solúvel total em sementes condicionadas de tomate.

Palavras-chave: Condicionamento. Redutase nitrato. Sistema antioxidante.

## ABSTRACT

Priming is a technique that can be used for better performance seed germination. This study aimed to identify the influence of conditioning agents on metabolism and physiological performance germination of tomato seeds. Seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv Santa Clara were placed in solutions of polyethylene glycol 6000 (PEG) and potassium nitrate (KNO<sub>3</sub>) for 2, 4 and 6 days. The solutions of osmagents (v / v) were: 100% PEG 2, 4 and 6 days; 100% KNO<sub>3</sub> by 2, 4 and 6 days, and combinations of 50% PEG + 50% KNO<sub>3</sub> by 2, 4 and 6 days, and the control (unprimed seeds). Two experiments were conducted; the first analyzed the activity of some enzymes of the antioxidant system and the activity of nitrate reductase and its possible contributions to the development germination. In the second trial examined the concentration of some carbohydrates and their possible contribution to the development germination and early seedling development. In the first test, priming with 100% KNO<sub>3</sub> 4 days and 6 days showed higher activity of nitrate reductase and superoxide dismutase. In addition to higher rates of speed and seedling emergence. In the second trial, observed a higher germination rate under ideal conditions, water stress and low temperature in seeds primed regardless of the incubation medium, in thier witness. We also observed lower concentrations of total soluble sugar in primed seeds. The conditioning in 100% KNO<sub>3</sub> 4 and 6 days with highest germination, formation of normal seedling emergence and, in addition to increased activity of nitrate reductase and superoxide dismutase. Furthermore, priming independent of solute and incubation increased the rate of germination speed under ideal conditions of low temperature and water stress, furthermore, decreased the total soluble sugar concentration in tomato seeds primed.

Keywords: Priming. Nitrate reductase. Antioxidant system.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1. Introdução Geral</b> .....	9
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
2.1 Condicionamento osmótico.....	12
2.2 Diferentes agentes osmóticos.....	122
2.3 Efeito do nitrato no metabolismo germinativo.....	13
2.4 Alterações no metabolismo das macromoléculas.....	14
2.5 Sistema antioxidante.....	15
<b>3. CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	17
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	18
<b>ARTIGO 1. Alteração no padrão enzimático de semente de tomate proporcionada pelo condicionamento osmótico</b> .....	24
<b>RESUMO</b> .....	25
<b>ABSTRACT</b> .....	26
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	27
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
<b>3. RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	33
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	43
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44
<b>ARTIGO 2. Influência do condicionamento osmótico na germinação de sementes de tomates sob diferentes condições ambientais</b> .....	49
<b>RESUMO</b> .....	50
<b>ABSTRACT</b> .....	51
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	52
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	54
<b>3. RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64

## **CAPÍTULO 1 Introdução Geral**

## 1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) em 2009, foi por volta de 141 milhões de toneladas provenientes de aproximadamente 5 milhões de hectares (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION - FAO, 2010). O Brasil é o nono maior produtor mundial de tomate, com uma produção estimada aproximadamente de 4 milhões de toneladas em uma área de aproximadamente de 65.391 hectares (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2011). Um dos principais motivos para números tão expressivos é o aumento do crescimento do consumo, entre 1985 e 2005, a demanda mundial *per capita* de tomate cresceu cerca de 36% (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007).

Em conjunto ao crescimento da produção, o mercado de sementes de tomate também está em crescente expansão, representando cerca de 27% do total das sementes de hortaliças comercializadas no Brasil e gira uma quantia aproximadamente de 12 milhões de reais ao ano (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS - ABCSEM, 2009). Além disso, as exigências e a alta competitividade do mercado, por produtos de boa qualidade e diferenciados, estimulam as empresas a buscarem novas tecnologias, para produzirem sementes de qualidade. Partindo do pressuposto que, a qualidade das sementes representa o ponto inicial do desenvolvimento e a produtividade da lavoura.

Existem técnicas utilizadas para melhorar o desempenho das sementes em campo, bem como para melhorar a germinação sob condições adversas de temperatura e umidade (VARIER; VARI; DADLANI, 2010). Dentre as mais usadas atualmente destaca-se o condicionamento osmótico (*seedpriming*, *osmoconditioning*, *osmopriming*, *osmoticpriming*). Segundo Bradford (1986) e Heydecker e Gibbins (1978) a técnica se baseia na imersão das sementes em uma solução de baixo potencial osmótico, em que a absorção de água pela

semente é limitada, com isso, o processo germinativo não é concluído, somente iniciado.

Na técnica do condicionamento osmótico, muitas soluções podem ser utilizadas. Soluções salinas permitem uma melhor aeração da solução e é facilmente removido das sementes durante a lavagem, os íons presentes nessa solução são absorvidos pela semente. Solução inerte tem a vantagem de não penetrar nas sementes, porém não permite aeração uniforme da solução, além de apresentar certa dificuldade de remoção após o tratamento (NASCIMENTO, 2004).

Os principais benefícios proporcionados por essa técnica são os aumentos nas velocidades de germinação e emergência, além de aumentar a porcentagem de germinação, melhorar o vigor das plântulas e proporcionar quebra de dormência (VARIER; VARI; DADLANI, 2010). Os benefícios são provenientes de melhoras que ocorrem a nível celular: indução a replicação do DNA nuclear, acúmulo de  $\beta$ -tubulina e indução da montagem da rede de citoesqueleto microtubular (CASTRO et al., 2000; LANTERI et al., 2008). Além disso, proporciona uma melhora significativa no sistema antioxidante e diminui a concentração do malondialdeído (MDA) (CHEN; ARORA, 2011; EL-ARABY; HEGAZI, 2004; KIBINZA et al., 2011). Também ocorre uma maior expressão dos genes que codificam LEAs proteínas, *heat shock*, enzimas envolvidas na replicação do DNA, além de inibir ação de proteases (CORTEZ-BAHEZA et al., 2007) e causa mudanças no metabolismo de reserva e na homeostase celular (FAROOQ et al., 2010). Objetivou-se, determinar a influência dos agentes osmóticos no metabolismo germinativo e desempenho fisiológico de sementes de tomate condicionadas.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Condicionamento osmótico**

A técnica de condicionamento osmótico tem sido usada para proporcionar um aumento na velocidade da germinação, possibilitando a diminuição do tempo entre a semeadura e a última protrusão, além de aumentar a tolerância das sementes a condições desfavoráveis do ambiente durante a semeadura. Essa técnica se resume em uma absorção controlada de água pelas sementes, iniciando os processos metabólicos para a germinação, porém sem que haja a protrusão. O potencial osmótico da solução, na qual as sementes estão imersas controla a entrada de água na semente (BRADFORD, 1986; HEYDECKER; GIBBINS, 1978).

O condicionamento atua nas fases I e II da germinação, possibilitando a semente ficar com um teor de umidade pouco abaixo daquele ideal para a protrusão radicular (POSSE et al., 2002). Com isso, os processos metabólicos iniciam antes do plantio, o que confere uma vantagem sobre as sementes não condicionadas. Além disso, o condicionamento proporciona uma absorção de água mais lenta e controlada do que na absorção em campo, logo, onde há um período maior de reparo das estruturas celulares (VARIER; VARI; DADLANI, 2010).

### **2.2 Diferentes agentes osmóticos**

Diferentes solutos podem ser utilizados no condicionamento osmótico, como polietileno glicol (PEG), nitrato de potássio ( $KNO_3$ ), fosfato de potássio ( $K_3PO_4$ ), fosfato de potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ), sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ), sulfato de manganês ( $MnSO_4$ ), cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), cloreto de sódio ( $NaCl$ ), nitrato de sódio ( $NaNO_3$ ), manitol, glicerol, entre outros. Todos

esses compostos são utilizados para ajustar o potencial osmótico da solução (NASCIMENTO, 2004).

Compostos salinos permitem uma melhor aeração da solução, e são facilmente removidos das sementes durante a lavagem. Em alguns casos, os íons provenientes dos sais são absorvidos pelas sementes afetando negativamente a germinação, por outro lado, essa absorção pode ativar rotas metabólicas que naturalmente não seriam ativas, o que pode favorecer a germinação (NAWAZ et al., 2012; PACE et al., 2012). Soluções inertes como o (PEG), tem a vantagem de não penetrar nas sementes, por ter alto peso molecular. Porém as soluções de PEG não permitem uma aeração uniforme. Além disso, o PEG apresenta certa dificuldade de remoção após o tratamento, além de ser um produto de custo elevado (NASCIMENTO, 2004).

No entanto, as soluções mais utilizadas são PEG e  $\text{KNO}_3$ , sendo que as diferenças nas respostas fisiológicas irão depender do tipo das soluções e da espécie. Chen e Arora (2011) e Kibinza et al. (2011) trabalharam com sementes de espinafre e girassol, respectivamente em solução de PEG. Já Arin et al. (2011) e Kissmann et al. (2011) trabalharam com sementes de cebola e jacarandá, respectivamente em solução de  $\text{KNO}_3$ . Em trabalhos com tomate essa preferência se mantém com Bocian e Hołubowicz (2008), Govinden-Soulangue e Levantard (2008) e Nawaz et al. (2012).

### **2.3 Efeito do nitrato no metabolismo germinativo**

O nitrato é uma importante fonte de nitrogênio para as plantas, mas também uma molécula de sinalização que controla vários aspectos do desenvolvimento da planta, inclusive a dormência em sementes (ALBORESI et al., 2005). O nitrogênio do solo está disponível para as plantas na forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônia ( $\text{NH}_4^+$ ) segundo Chen et al. (2009). O primeiro passo na assimilação do nitrogênio é feito pela redutase do nitrato, que utiliza o nitrato

como substrato e o reduz a nitrito, que por sua vez é reduzido à amônia, pela redutase do nitrito. Conseqüentemente, a amônia é utilizada na estrutura dos aminoácidos (MIFLIN; LEA, 1976).

No entanto, o nitrogênio está presente na planta em diferentes formas. Sendo nos aminoácidos onde se encontra a maior quantidade desse mineral. Logo, quanto maior a concentração de  $\text{NO}_3^-$  maior será a assimilação de nitrogênio em forma de aminoácidos, favorecendo um maior crescimento (CARDOSO et al., 2011).

O óxido nítrico (NO) é outro composto nitrogenado, proveniente do nitrato, o qual tem sido citado como uma importante molécula sinalizadora nas plantas (GUPTA; ABIR, 2011; JIN et al., 2009). Sua formação é proveniente da redução do nitrato a nitrito, o qual é reduzido a óxido nítrico nos complexos III ou IV ou AOX da cadeia transportadora de elétrons, especificamente quando a concentração do receptor de elétrons, o  $\text{O}_2$ , é baixa ou ausente. Outra via de formação é através da redutase do nitrato, que reduz o nitrato a óxido nítrico (BETHKE; BADGER; JONES, 2004; GUPTA et al., 2011; LEA et al., 2004).

Liu et al. (2009) demonstraram que o acúmulo de NO na primeira etapa de embebição é benéfico para o rápido catabolismo de ABA e conseqüentemente quebra de dormência das sementes. Isso é devido à expressão do gene CYP707A2 que participa do catabolismo do ácido abscísico (ABA). Porém Matakias et al. (2009) demonstraram que o gene CYP707A2 também é responsável ao nitrato. Além dessas funções, o nitrato através do óxido nítrico, também estimula a atividade da dismutase do superóxido (SOD), que se trata de uma enzima primordial no sistema antioxidante (PEREIRA et al., 2010).

#### **2.4 Alterações no metabolismo das macromoléculas**

Os benefícios proporcionados pelo condicionamento podem ocorrer por várias razões, porém mudanças relacionadas ao conteúdo das macromoléculas

como os carboidratos em geral, proteínas e aminoácidos são eventos importantes durante o condicionamento osmótico (VARIER; VARI; DADLANI, 2010). As macromoléculas podem proporcionar aumento na tolerância a ambientes estressantes através da manutenção do potencial osmótico celular, na diminuição das Espécies Reativas de Oxigênio (EORs), manutenção da estabilidade das membranas e proteínas, além de fonte alternativa de energia (BOHNERT; SHEN, 1999) e controlar a expressão de vários genes (GUPTA; KAUR, 2005).

Segundo Nawaz et al. (2011) houve aumento na concentração de açúcar redutor, não redutor e solúvel total em sementes de tomate condicionadas, quando comparada com a testemunha. Ismail et al. (2005) também observaram, aumento no conteúdo de açúcar solúvel e aminoácidos. Já Braccini et al. (2000) observaram em sementes de soja, que o armazenamento causa redução nas proteínas, no entanto quando essas sementes passaram pelo condicionamento houve uma diminuição dessa queda.

## **2.5 Sistema antioxidante**

Outro benefício proporcionado pelo condicionamento é o aumento na eficiência do sistema antioxidante das sementes. Em relação aos antioxidantes as sementes possuem sistemas enzimáticos e não enzimáticos de defesa (CHEN et al., 2009). O sistema enzimático é composto pelas enzimas, catalase (CAT) e dismutase do superóxido (SOD) (KIBINZA et al., 2011). Ao passo que, o não enzimático é formado pelo ciclo do ácido ascórbico (AsA) e glutathiona reduzida (GSH), sendo que a peroxidase do ascorbato (APX), redutase do dehidroascorbato (DHAR), redutase do monodehidroascorbato (MDHA), redutase da glutathiona (GR) são enzimas-chave do ciclo (MA; CHEN, 2004).

Cada enzima tem uma função específica, como a SOD que atua na remoção do superóxido ( $O_2^-$ ), convertendo-o em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual pode ser convertido em água e oxigênio pela CAT (KIBINZA et al.,

2011). No ciclo ASA-GR, a APX catalisa a redução do  $H_2O_2$  em água com o AsA servindo como doador de elétrons (ZHANG et al., 2008). A DHAR utiliza os elétrons fornecidos pela GSH para reduzir o DHA em AsA, enquanto que o DHA é previamente produzido a partir do MDHA. Simultaneamente, GSH é oxidada em glutathiona dissulfeto (GSSG) pela DHAR e GSSG é então reduzida em GSH, pela ação da GR (GILL; TUTEJA, 2010).

A cadeia respiratória da mitocôndria é uma importante fonte de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Que estão presentes durante períodos de estresses naturais, como germinação, dessecação e envelhecimento (KIBINZA et al., 2011; SUN et al., 2011). O desequilíbrio entre a produção de EROs e o desaparecimento dos mesmos, pode levar a deterioração das sementes, processo chamado de estresse oxidativo (BAILLY, 2004). As principais espécies reativas são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e o radical hidróxido ( $\cdot OH$ ) (LI; LIU; ZANGH, 2010).

Em sementes condicionadas foi observado melhoras no sistema antioxidante das sementes. Chen e Arora (2011), Kibinza et al. (2011) e Sun et al. (2011), juntamente com outros autores entre eles, Bailly et al. (2000) e Chiu, Chuang e Sung (2006), obtiveram um aumento significativo na atividade das enzimas SOD, CAT, APX e no ciclo AsA-GSH, além da diminuição do MDA.

### **3 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

O condicionamento osmótico é uma técnica que promove diversos benefícios a sementes, tanto metabólico com fisiológico, o que possibilita um melhor desempenho germinativo. Porém é uma técnica que precisa de mais estudo para definir quais os melhores meios de incubação, para determinadas espécies.

## REFERÊNCIAS

ALBORESI, A. et al. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 500-512, 2005.

ARIN, L. et al. Effects of different osmotic solutions on onion seed emergence. **African Journal of Agricultural Research**, Ekpoma, v. 6, n. 4, p. 986-991, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS. **Abcsem participa do IX curso sobre tecnologia de produção de sementes de hortaliças**. Disponível em: <<http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=41>>. Acesso em: 19 ago. 2012.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 2, p. 93-107, 2004.

BAILLY, C. et al. Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. **Seed Science Research**, Wallingford, v.10, n. 1, p. 35-42, 2000.

BETHKE, P. C.; BADGER, M. R.; JONES, R. L. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 2, p. 332-341, 2004.

BOCIAN, S.; HOŁUBOWICZ, R. Effect of different ways of priming tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds on their quality. **Journal of Natural Sciences**, Olsztyn, v. 23, n. 4, p. 729-739, 2008.

BOHNERT, H. J.; SHEN, B. Transformation and compatible solutes. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 78, p. 237-260, 1999.

BRACCINI, A. L. et al. Biochemical changes associated to soybean seeds osmoconditioning during storage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 433-447, 2000.

BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 5, p.1105-1112, 1986.

CARDOSO, S. M. et al. Fontes e parcelamento do nitrogênio em cobertura, na cultura do milho sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 6, n. 1, p. 23-28, 2011.

CASTRO, R. D. et al. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant physiology**, Minneapolis, v. 122, n. 2, p. 327-336, 2000.

CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). **Plant science**, Limerick, v. 180, n. 2, p. 212-220, 2011.

CHEN, L. et al. Effects of nitrogen forms on the growth , ascorbate-glutathione cycle and lipid peroxidation in developing seeds of vegetable soybean. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 4, n. 11, p. 1178-1188, 2009.

CHIU, K. Y.; CHUANG, S. J.; SUNG, J. M. Both anti-oxidation and lipid-carbohydrate conversion enhancements are involved in priming-improved emergence of *Echinacea purpurea* seeds that differ in size. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 220-226, 2006.

CORTEZ-BAHEZA, C. E. et al. A new LEA gene is induced during osmopriming of *Capsicum annuum* L. seeds. **International Journal of Botany**, New York, v. 4, n. 1, p. 99-106, 2007.

EL-ARABY, M. M.; HEGAZI, A. Z. Responses of tomato seeds to hydro- and osmo-priming, and possible relations of some antioxidant enzymes and endogenous polyamine fractions. **Egyptian Journal of Biology**, Ismailia, v. 6, p. 81-93, 2004.

FAROOQ, M. et al. Changes in nutrient-homeostasis and reserves metabolism during rice seed priming: consequences for seedling emergence and growth. **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v. 9, n. 2, 191-198, 2010.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. **Country information:** Brazil: agriculture sector. 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 21 ago. 2012.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GOVINDEN-SOULANGE, J.; LEVANTARD, M. Comparative studies of seed priming and pelleting on percentage and meantime to germination of seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **African Journal of Agricultural Research**, Ekpoma, v. 3, n. 10, p. 725-731, 2008.

GUPTA, K. J.; ABIR, U. I. The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: no reductase. **Mitochondrion**, Birmingham, v. 11, n. 4, p. 537-43, 2011.

GUPTA, K. J. et al. The emerging roles of nitric oxide (NO) in plant mitochondria. **Plant Science**, Limerick, v. 181, n. 5, p. 520-526, 2011.

HEYDECKER, W.; GIBBINS, B. M. The priming of seeds. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 83, p. 213-223, 1978.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home>>. Acesso em: 29 jan. 2013.

ISMAIL, A. I. et al. Optimization of priming benefits in tomato (*Lycopersicon esculentum* M.) and changes in some osmolytes during the hydration phase. **Asian Journal of Plant Sciences**, New York, v. 4, n. 6, p. 691-701, 2005.

JIN, C. W. et al. Differential regulatory role of nitric oxide in mediating nitrate reductase activity in roots of tomato (*Solanumly cocarpum*). **Annals of Botany**, London, v. 104, n. 1, p. 9-17, 2009.

KIBINZA, S. et al. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant science**, Limerick, v. 181, n. 3, p. 309-315, 2011.

KISSMANN, C. et al. Biorregulador e pré-condicionamento osmótico na germinação de sementes e no crescimento inicial da muda de carobinha. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 58-67, 2011.

LANTERI, S. et al. The effects of priming on nuclear replication activity and germination of pepper (*Capsicumannuum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 2, p. 81-87, 2008.

LEA, U. S. et al. Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in high nitrite excretion and NO emission from leaf and root tissue. **Planta**, Berlin, v. 219, n. 1, p. 59-65, 2004.

LIU, Y. et al. Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in Arabidopsis. **The New phytologist**, Cambridge, v.183, n. 4, p.1030-42, 2009.

LI, Y.; LIU, Y.; ZHANG J. Advances in the research on the AsA-GSH cycle in horticultural crops. **Frontiers of Agriculture in China**, Baoding, v. 4, n. 1, p. 84-90, 2010.

MATAKIADIS, T. et al. The arabidopsis abscisic acid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 149, n. 2, p. 949-960, 2009.

MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, New York, v. 15, n. 6, p. 873-885, 1976.

NASCIMENTO, W. M. **Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2004. 12 p. (Circular Técnica, 33).  
NAWAZ, A. et al. Effect of halopriming on germination and seedling vigor of tomato. **African Journal of Agricultural Research**, Ekapoma, v. 6, n. 15, p. 3551-3559, 2011.

NAWAZ, A. et al. Induction of salt tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds through sand priming. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v. 6, n. 7, p. 1199-1203, 2012.

PACE, R. et al. Germination of untreated and primed seeds in rapeseed (*Brassica napus* var. Oleifera DEL.) under salinity and low matric potential. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 48, n. 2, p. 238-251, 2012.

PEREIRA, B. L. C. et al. Influência do óxido nítrico na germinação de sementes de *Plathymenia reticulata* Benth com baixo vigor. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 88, p. 629-636, 2010.

POSSE, S. C. P. et al. Efeitos do condicionamento osmótico e da hidratação na geminação de sementes de pimentão (*Capsicum annuum* L.) submetidas à baixas temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 123-127, 2002.

SUN, H. et al. Ascorbate-glutathione cycle of mitochondria in osmoprimed soybean cotyledons in response to imbibitional chilling injury. **Journal of Plant Physiology**, Minneapolis, v. 168, n. 3, p. 226-32, 2011.

VARIER, A.; VARI, A. K.; DADLANI, M. The subcellular basis of seed priming. **Current Science**, Bangalore, v. 99, n. 4, p. 450-456, 2010.

ZHANG, Y. et al. Chilling acclimation induced changes in the distribution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidant system of strawberry leaves. **Agricultural Journal**, Bridgetown, v. 3, n. 4, p. 286-291, 2008.

**ARTIGO 1 Alteração no padrão enzimático de semente de tomate proporcionada pelo condicionamento osmótico**

## RESUMO

O condicionamento osmótico é uma técnica utilizada para melhorar o desempenho germinativo das sementes de tomate. Em virtude disso, objetivou-se estudar a influência dos agentes condicionantes PEG,  $\text{KNO}_3$  ou ambos, na atividade de algumas enzimas envolvidas no metabolismo germinativo, e no desempenho fisiológico de sementes de tomate condicionadas. Sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv Santa Clara foram condicionadas em soluções de polietileno glicol 6000 (PEG) e nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) por 2, 4 e 6 dias. As soluções dos agentes osmóticos (v/v) foram: 100%PEG 2; 4 e 6 dias; 100%  $\text{KNO}_3$  por 2; 4 e 6 dias; e combinações de 50% PEG + 50% $\text{KNO}_3$  por 2; 4 e 6 dias. Após o condicionamento foram realizadas análises bioquímicas e fisiológicas. Nos condicionamentos com 100% ( $\text{KNO}_3$ ) por 4 e 6 dias, foram observados altos índice de velocidade germinação (IVG), índice de velocidade formação de plântulas (IVP) e índice de velocidade emergência (IVE) devido à maior atividade da redutase do nitrato, que possivelmente agiu no aumento da assimilação de nitrogênio e também no aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante. Portanto, o condicionamento em 100%  $\text{KNO}_3$  por 4 e 6 dias aumenta a atividade da redutase do nitrato e da superóxido dismutase, contribuindo para altos índices de velocidade de sementes tomate.

Palavras-chave: Redutase nitrato. Condicionamento osmótico. Semente dismutase do superóxido.

### ABSTRACT

Priming is a technique used to improve performance germination of tomato seeds. As a result, the objective was to study the influence of conditioning agents PEG, KNO<sub>3</sub> or both, in the activity of some enzymes involved in the metabolism germination, and physiological performance of tomato seeds conditioned. Seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Cv Santa Clara were placed in solutions of polyethylene glycol 6000 (PEG) and potassium nitrate (KNO<sub>3</sub>) for 2, 4 and 6 days. The solutions of osmagents (v / v) were: 100% PEG 2, 4 and 6 days; 100% KNO<sub>3</sub> by 2, 4 and 6 days, and combinations of 50% PEG + 50% KNO<sub>3</sub> by 2, 4 and 6 days. After conditioning were performed biochemical and physiological. In constraints with 100% (KNO<sub>3</sub>) for 4 and 6 days were observed higher germination speed index (IVG), speed seedling (IVP) and emergence velocity index (IVE) due to increased activity of nitrate reductase which possibly acted in increased nitrogen assimilation and also in increasing the activity of antioxidant enzymes system. Therefore, conditioning on 100% KNO<sub>3</sub> for 4 and 6 days increases the activity of nitrate reductase and superoxide dismutase, contributing to high rates of speed of tomato seeds.

Keywords: Nitrate reductase. Priming. Seed. Superoxide dismutase.

## 1 INTRODUÇÃO

A produtividade estimada do tomate em 2012 para o Brasil foi de aproximadamente 4 milhões de toneladas em uma área plantada de cerca de 66 mil hectares (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2012). Trata-se de uma hortaliça de alta importância para a economia, cujos valores atingidos devem-se à alta produtividade obtida, entre outros fatores, devido à qualidade das sementes.

Atualmente, técnicas que promovem melhorias em sementes visam aumento do vigor, que tem sido obtido, satisfatoriamente, através do condicionamento osmótico. Essa técnica promove germinação mais rápida e uniformidade nos lotes (NASCIMENTO, 2004), e está sendo utilizada, frequentemente, em sementes de tomate (BOCIAN; HOŁUBOWICZ, 2008; NAWAZ et al., 2012; ROSSETTO; LIMA; NAKAGAWA, 2002).

O condicionamento osmótico consiste na absorção de água pelas sementes de uma forma controlada, utilizando-se de compostos para controlar o potencial da solução (HEYDECKER; GIBBINS, 1978). Com isso os processos de germinação somente têm início, sem que haja germinação.

Entre os compostos utilizados existem os inertes (polietileno glicol e manitol), devido ao alto peso molecular não são absorvidos pelas sementes, mas a alta viscosidade da solução pode dificultar a aeração. Além dos salinos (nitrato de potássio, cloreto de sódio, outros), que podem ser absorvidos pelas sementes e possui baixa viscosidade, conseqüentemente, fácil aeração (NASCIMENTO, 2004).

A absorção de determinados íons poderá influenciar na germinação, através da ativação de enzimas de rotas metabólicas, que não seriam ativas naturalmente (NAWAZ et al., 2012; PACE et al., 2012). Dentre esses possíveis íons, o nitrato merece estudos mais aprofundados, por ser utilizado em larga escala em sementes de tomate, sendo proveniente da dissociação do nitrato de

potássio na maioria das vezes (BOCIAN; HOLUBOWICZ, 2008; MAVI; ERMIS; DEMIR, 2006; NASCIMENTO, 2004), Além disso, pouco se sabe dos mecanismos que agem nas sementes quando absorvem esses íons no condicionamento e os efeitos ao metabolismo.

Desse modo o estudo da atividade da enzima redutase do nitrato pode ser importante na elucidação de questões metabólicas das sementes de tomate condicionadas em solução de nitrato de potássio. Essa enzima é essencial na assimilação de nitrogênio, por converter nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) em nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) (MIFLIN; LEA, 1976). A redutase do nitrato tem sido bastante estudada em órgãos de plantas, no entanto, há poucos trabalhos em sementes. Além disso, segundo Pereira et al. (2010) outro fator relacionado ao nitrato e o metabolismo de sementes condicionadas é o estímulo da atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD), que juntamente com a catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX), exercem um papel na remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CHEN; ARORA 2011).

Na remoção dos EROS, o anion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) é removido pela SOD, que catalisa sua conversão a peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que por sua vez, pode ser reduzido à água e oxigênio pela CAT. Já a APX atua na catalise do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) utilizando o ciclo AsA-GSH (CHEN; ARORA 2011; TULLIO; ARRIGONI, 2003).

Objetivou-se estudar a influência dos agentes condicionantes PEG,  $\text{KNO}_3$  ou ambos, na atividade de algumas enzimas envolvidas no metabolismo germinativo, e no desempenho fisiológico de sementes de tomate.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv Santa Clara foram condicionadas em soluções de polietileno glicol 6000 (PEG) e nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) por 2, 4 e 6 dias. As soluções dos agentes osmóticos (v/v) foram: 100%PEG 2; 4 e 6 dias; 100% KNO<sub>3</sub> por 2; 4 e 6 dias; e combinações de 50% PEG + 50%KNO<sub>3</sub> por 2; 4 e 6 dias. Todas as soluções apresentaram um  $\Psi_s$  de -1,1 MPa, equivalente a uma concentração de 0,05M PEG e 0,22M KNO<sub>3</sub>. As sementes foram incubadas sob luz e aeração constante, temperatura de 15 °C, com 15 mL de solução por grama de semente. Os cálculos de potencial osmótico foram obtidos através da equação de Michel e Kaufmann (1973) para PEG6000 e equação de Van'Thoff (HILLEL, 1971) para o KNO<sub>3</sub>. A testemunha não foi condicionada. Após condicionamento, as sementes foram lavadas em água corrente para remover a solução osmocondicionadora da superfície, sendo a secagem realizada em uma sala com temperatura de 25 °C e umidade relativa de 50% por um período de vinte e quatro horas, quando as sementes atingiram um grau de umidade entre 5-7%.

A condutividade elétrica foi realizada pelo sistema "bulk", segundo metodologia proposta pelo comitê de vigor da *Association of Official Seed Analysts* - AOSA (1983), descrita por Marcos Filho, Cícero e Silva (1987). Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes, condicionadas em 100%PEG por 6 dias, 50%PEG + 50%KNO<sub>3</sub> por 6 dias e 100%KNO<sub>3</sub> por 6 dias, lavadas em água corrente e secas até a umidade inicial, posteriormente pesada e acondicionada em copos plásticos contendo 75 mL de água deionizada. Os copos foram mantidos em germinador a 25 °C e a leitura efetuada após 24 horas de embebição, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{S cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Para a quantificação de nitrogênio total foi utilizado digestão sulfúrica (*ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY* - AOAC, 1990). Para tanto, foram pesadas 10 mg de semente e transferidas para tubo de digestão,

adicionando 1,5 g de sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ) e 0,3 g de sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ) mais 3,0 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado. O teor de nitrogênio total foi determinado de acordo com o método de *kjeldahl*.

Os extratos para as análises de proteínas totais e aminoácidos foram obtidos através da maceração de 200 mg de sementes em 5 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 7,0) e submetidas a banho-maria a 40 °C por 30 minutos, centrifugadas a 10 000 rpm por 10 minutos. Após a coleta do sobrenadante, o precipitado foi ressuspensão em 5 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 7,0) sendo o sobrenadante novamente coletado e somado ao primeiro. As quantificações de proteínas e aminoácidos foram determinadas colorimetricamente pelo método de Bradford (1976) e Ninhidrina (YEMM; COCKING, 1955), respectivamente. Para ambas a análises, foram utilizadas alíquotas de 30  $\mu$ L do extrato.

Para determinação das atividades da redutase do nitrato e enzimas do sistema antioxidante, as sementes condicionadas bem como a testemunha, foram embebidas em água destilada por 24 horas. A atividade da redutase do nitrato foi feita segundo Delú Filho, Oliveira e Alves (1997), com algumas modificações. Foram utilizadas 600mg de sementes inteira *in vivo*, de acordo com pré-teste, as quais foram infiltradas à vácuo por dois minutos, e submetidas em seguida, a banho-maria por 75 minutos. Por fim, utilizou-se uma alíquota de 2 mL. A concentração de nitrito produzida foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm.

Para a extração das enzimas antioxidantes, 200 mg de sementes foram maceradas em  $N_2$  líquido e homogeneizadas em tampão com a seguinte composição: fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 1 mM. Os homogeneizados foram centrifugados a 13.000 g, por 20 minutos, a 4°C, coletando-se os sobrenadantes para as análises enzimáticas da

dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITISE; RIES, 1977) em um meio de incubação composto por tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1  $\mu$ M, NBT 75  $\mu$ M e riboflavina 2  $\mu$ M. Os tubos com o meio de reação e a amostra foram iluminados por 7 minutos com uma lâmpada fluorescente de 20W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado, sendo o branco mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da atividade enzimática foi feito com a seguinte equação: % de inibição =  $(A_{560}$  amostra com extrato enzimático –  $A_{560}$  do controle sem enzima) / ( $A_{560}$  controle sem enzima). Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

A CAT foi avaliada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, durante 3 minutos, em um tampão de incubação contendo fosfato de potássio 200 mM, pH 7,0 e  $H_2O_2$  12,5 mM, incubado a 28°C, em que foi monitorado o consumo do peróxido de hidrogênio (HAVIR; MCHALE, 1987).

A atividade da APX foi feita segundo Nakano e Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O tampão de incubação foi composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM e  $H_2O_2$  0,1 mM.

Os índices de velocidade de germinação (IVG), formação de plântula normal (IVP) e emergência (IVE) com base em três repetições de 50 sementes. Para a obtenção do primeiro e segundo índices, as sementes foram colocadas sobre substrato de papel umedecido com água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. Para a obtenção do IVE, as sementes foram germinadas em caixas *gerbox* contendo substrato de areia lavada. Ambos os testes de

germinação foram mantidos à temperatura alternada de 20-30 °C (temperatura ótima) e fotoperíodo de 12 horas, segundo com Brasil (2009). A contagem da germinação, formação de plântulas normal e emergência foram realizadas diariamente para cálculo dos índices. Índice de velocidade germinação (IVG), índice de velocidade formação de plântulas normal (IVP) e índice de velocidade emergência (IVE) de acordo com Maguire (1962), com algumas modificações na metodologia, substituindo o número de sementes germinadas, pelo número de plântulas normal e emergência para o cálculo de seus respectivos índices.

O delineamento experimental dos ensaios foi em DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado), seguindo o esquema fatorial (3x3) +1, sendo: 3 soluções osmóticas (100% PEG, 50%PEG+50%KNO<sub>3</sub> e 100% KNO<sub>3</sub>); 3 tempos de incubação (2, 4, 6 dias) mais a testemunha (sementes não condicionadas). Somente para o teste de condutividade é que foi utilizado o esquema fatorial 3x1 + 1, sendo: 3 soluções 100% PEG; 50%PEG+50%KNO<sub>3</sub>; 100%KNO<sub>3</sub>; 1 período (6 dias); e mais testemunha não condicionada. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico *Sisvar* (FERREIRA, 1999) e as médias comparadas pelo teste de *Scott-Knott* a 5% de probabilidade de erro ( $P < 0,05$ ). Os gráficos foram construídos no *software SigmaPlot*®.

### 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

A condutividade elétrica observada em sementes de tomate condicionadas em 100%KNO<sub>3</sub> 6 dias foi maior em relação às demais soluções (Tabela 1). O resultado é semelhante ao encontrado por José et al. (1999) onde observaram menor condutividade elétrica nos tratamentos com PEG em relação ao KNO<sub>3</sub>. Essa maior condutividade pode estar associada à facilidade das sementes de tomate em absorver os íons K<sup>+</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (SANTOS et al., 2008) e não há maior desestabilidade da membrana plasmática, visto que, sementes condicionadas com 100% KNO<sub>3</sub> 6 dias apresentaram elevados índices de velocidade.

Apesar de não observar diferença estatisticamente na concentração de nitrogênio total, os condicionamentos com 100% KNO<sub>3</sub> 4 e 6 dias, apresentaram uma tendência para maior concentração de nitrogênio total (Figura 1), contribuindo para a hipótese de absorção de íons.

Tabela1 Condutividade elétrica em sementes de tomate condicionadas e não condicionadas – UFLA – 2013.

TRATAMENTOS	COND. ELÉTRICA
100%PEG/6 dias	23,07 b
50%PEG+50%KNO <sub>3</sub> /6 dias	29,80 b
Testemunha	31,73 b
100%KNO <sub>3</sub> /6 dias	43,26 a
cv (%)	22,03

As médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knott* a 5% de probabilidade. Dados em (μS cm<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>).

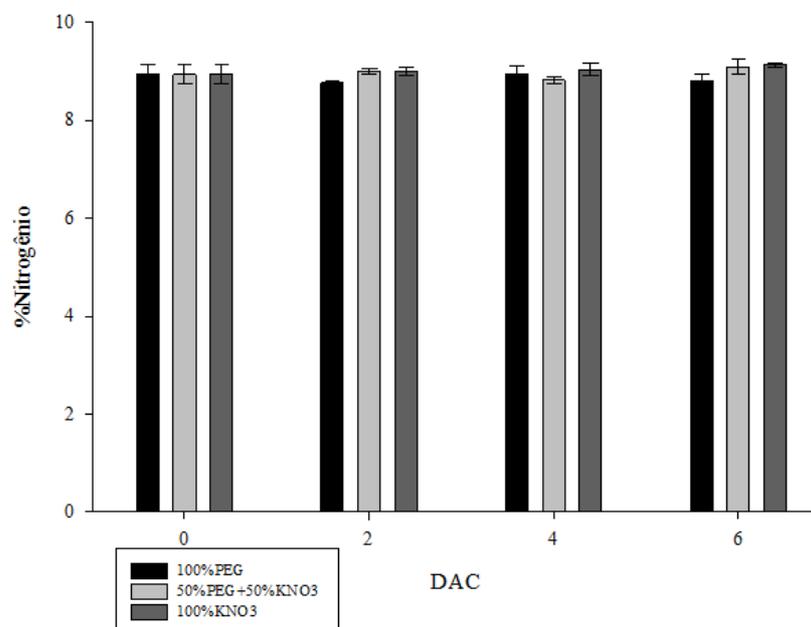


Figura 1 Porcentagem de nitrogênio total de sementes tomates condicionadas e não condicionadas. As barras representam o desvio padrão das médias.

As maiores atividades da redutase do nitrato (RN) foram observadas nas sementes condicionadas em soluções com 100% KNO<sub>3</sub>. No qual o condicionamento 100% KNO<sub>3</sub> 6 dias aumentou a atividade da RN em 70% com relação à testemunha, seguido pelas condicionadas em 100% KNO<sub>3</sub> 4 e 2 dias que aumentou a atividade em 60% relação à testemunha. Nas demais soluções não foram observadas diferença estatística (Figura 2). Porém, houve diferença na atividade da RN, mesmo sem haver diferença estatística nas concentrações de nitrogênio total (Figura 1)

O aumento da atividade da RN nas sementes condicionadas com KNO<sub>3</sub> foi estimulado pelo aumento da concentração dos íons NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, provenientes da dissociação do KNO<sub>3</sub>. Os quais são substrato para a enzima (MIFLIN; LEA, 1976). Assim, a RN mostrou-se mais ativa em sementes de tomate quando

aumentou a disponibilização do substrato e, conseqüentemente, conferiu aumentos positivos nas variáveis fisiológicas, sugerindo uma relação positiva, entre atividade da redutase e as variáveis fisiológicas estudadas. Com isso, a entrada de determinados íons nas sementes, seria importante para que ocorra a ativação de rotas metabólicas, inativas em condições naturais, o que poderia proporcionar um desempenho melhor do que o esperado geneticamente.

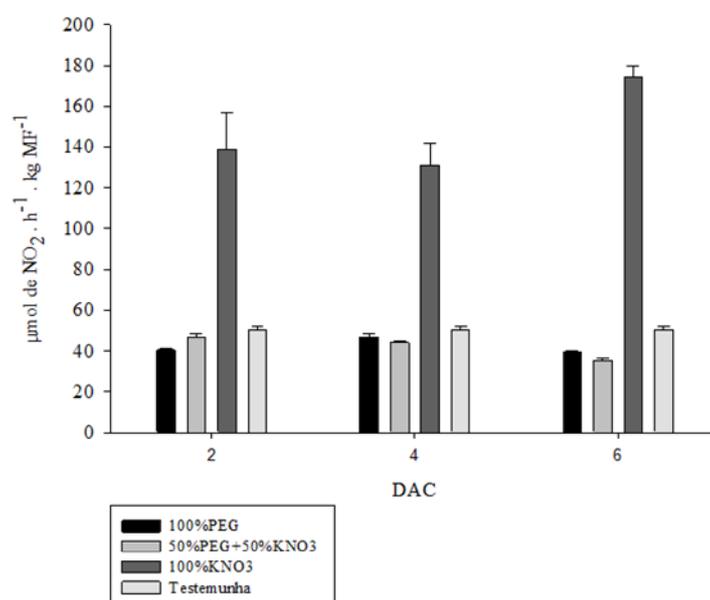


Figura 2 Atividade da redutase do nitrato em sementes de tomate submetidas a diferentes condicionamentos e não condicionadas. As barras representam o desvio padrão das médias.

Pode-se observar que as sementes dos tratamentos 100%PEG 2 e 6 dias, além da testemunha apresentaram a menor quantidade de proteínas totais, enquanto que o tratamento 100%PEG 4 dias não diferiu dos outros tratamentos, mantendo as maiores concentrações de proteínas totais (Figura 3). O aumento no teor de proteínas totais nas sementes durante o início dos processos

germinativos, está associado à indução da biossíntese de enzimas hidrolíticas, usadas na germinação (PONTES et al., 2002).

Os aminoácidos totais não diferiram estatisticamente, mantendo-se entre a 0,008 a 0,012g.g.MS<sup>-1</sup>. Pode tratar de uma técnica de pouca precisão para identificar pequenas variações nas concentrações de aminoácidos, pois além de haver diferença entre as proteínas totais, existem diferenças na atividade da RN.

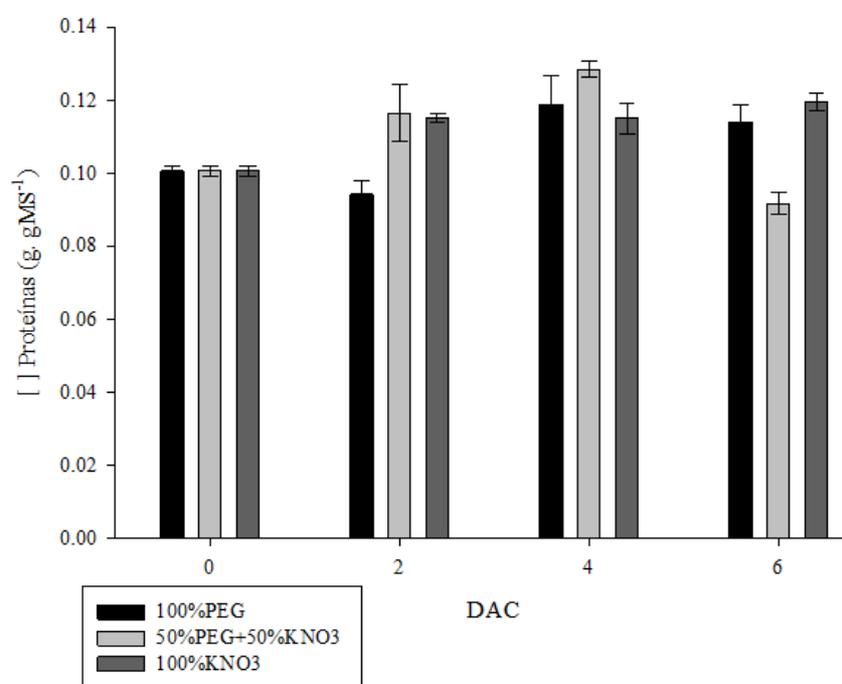


Figura 3 Quantidade de proteínas totais em sementes de tomate submetidas a diferentes condicionamentos e não condicionadas. As barras representam o desvio padrão das médias.

Os condicionamentos em 100%KNO<sub>3</sub> 4 e 6 dias aumentam a atividade da SOD em cerca de 40% em relação à testemunha. Enquanto, nos demais condicionamentos não foram registrados diferenças em relação à testemunha.

Esses resultados diferem dos encontrados na literatura (CHEN; ARORA, 2011; WEITING; TRELEASE; EISING, 1990) que observaram menor atividade da SOD em sementes na fase de transição entre quiescência e germinação para sementes condicionadas. O aumento observado pode ter sido causado por estímulo proveniente do óxido nítrico (NO) (PEREIRA et al., 2010) formado pelo  $\text{NO}_3^-$  absorvido durante o condicionamento. Segundo Bethke, Badger e Jones (2004) e Gupta e Abir (2011) a formação do NO se dá através do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) ou pela própria atividade da redutase do nitrato (LEA et al., 2004). No entanto, acredita-se que através do  $\text{NO}_3^-$  pode ser formado o NO.

Sendo assim, as sementes condicionadas em 100% $\text{KNO}_3$ , 4 dias e 6 dias com maior atividade da redutase do nitrato (Figura 2), conseqüentemente, maior formação de nitrito, foram nas quais, observaram maiores atividades da SOD. Com exceção das condicionadas em 100% $\text{KNO}_3$  2 dias, o qual apresentou alta atividade da RN, porém baixa atividade da SOD. Possivelmente devido ao menor tempo para a formação do NO, pois Pereira et al. (2010) em seu trabalho, observaram que a formação do NO a partir do  $\text{NO}_3^-$  levava aproximadamente 48 horas. Contudo, trabalhos que visem quantificar se há formação do NO e se é proveniente do  $\text{NO}_3^-$ , resultante da atividade da redutase nas sementes condicionadas precisam ser realizados.

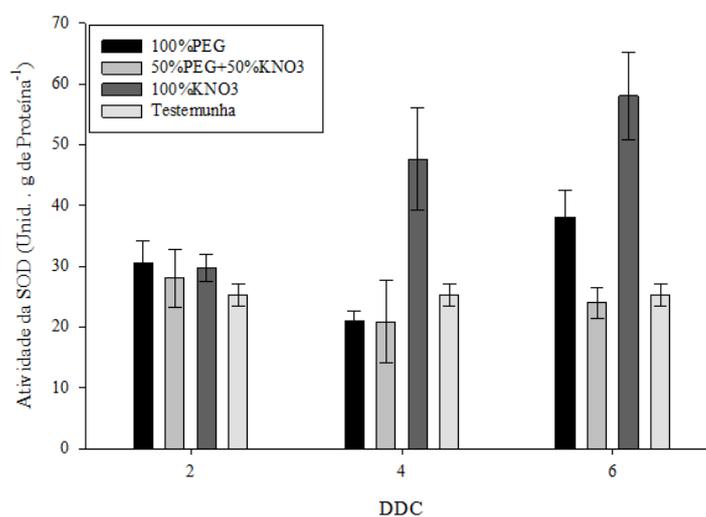


Figura 4 Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em sementes de tomate submetidas a diferentes condicionamentos e não condicionadas. As barras representam o desvio padrão das médias.

A atividade da catalase não foi observada aos 2 dias de condicionamento para nenhuma solução testada. Além disso, no condicionamento em 50%PEG+50%KNO<sub>3</sub> 4 dias e 6 dias observou-se uma menor atividade em relação à testemunha. Apenas nas sementes condicionadas em 100%KNO<sub>3</sub> 6 dias foi observado o aumento de 15% da atividade da catalase em relação à testemunha. As demais não diferiram da testemunha (Figura 5). O condicionamento 100%KNO<sub>3</sub> 6 dias conferiu tal resultado, em resposta à alta atividade da SOD, que tem como produto o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que é o substrato da catalase (CHEN; ARORA, 2011). Dessa forma, o aumento na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estimulou a catalase.

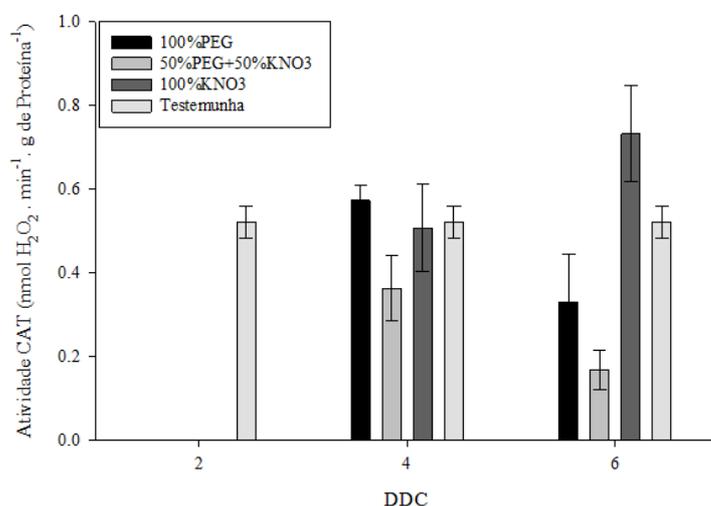


Figura 5 Atividade dacatalase (CAT) em sementes de tomate submetidas a diferentes condicionamentos e não condicionadas. As barras representam o desvio padrão das médias.

A atividade da APX nas sementes condicionadas em 100%KNO<sub>3</sub> 4 e 6 dias não diferiram da testemunha. Enquanto nas demais soluções foram observadas uma atividade no mínimo 50% maior, quando comparado com a testemunha. Sendo que o condicionamento em 100%PEG 4 e 6 dias aumentou a atividade em torno de 65% quando comparado à testemunha (Figura 6). Resultados semelhantes foram encontrados por Chen e Arora (2011) que observaram maiores atividade da APX em sementes condicionadas com PEG. A baixa atividade apresentada pelo lote da testemunha, a qual está relacionada com a fase de transição de quiescente para a germinação, as quais outras enzimas do sistema antioxidante têm papel mais significativo (TULLIO; ARRIGONI, 2003).

A baixa atividade da APX observada nos condicionamentos 100%KNO<sub>3</sub> 4 e 6 dias, em relação às demais soluções pode ser em função da utilização de outra rota para dismutar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois como observado, a alta atividade da CAT nessas sementes. De um modo geral, sementes condicionadas em 100% KNO<sub>3</sub> 4

dias e 6 dias utilizam a CAT para dissociar o  $H_2O_2$ . Pois, devido à alta atividade da SOD nas mesmas, é possível que haja uma alta produção de  $H_2O_2$ , sendo a catalase a responsável pela remoção nesse caso. Já sementes condicionadas com 100%PEG 4 dias e 6 dias utilizam a APX para a dissociação do  $H_2O_2$ , pois, ela remove pequenas concentrações, devido à sua maior afinidade ao mesmo (MITTLER, 2002; SHIGEOKA et al., 2002). Essa relação também pode ser vista em relação ao condicionamento com 50%PEG+50%KNO<sub>3</sub> 4 dias e 6 dias, que apresentam baixa atividade da CAT e alta atividade da APX. Além disso, de acordo com Sun et al. (2011) sementes condicionadas com PEG após 72h de condicionamento o teor de  $H_2O_2$  diminui cerca de 60% em relação à testemunha.

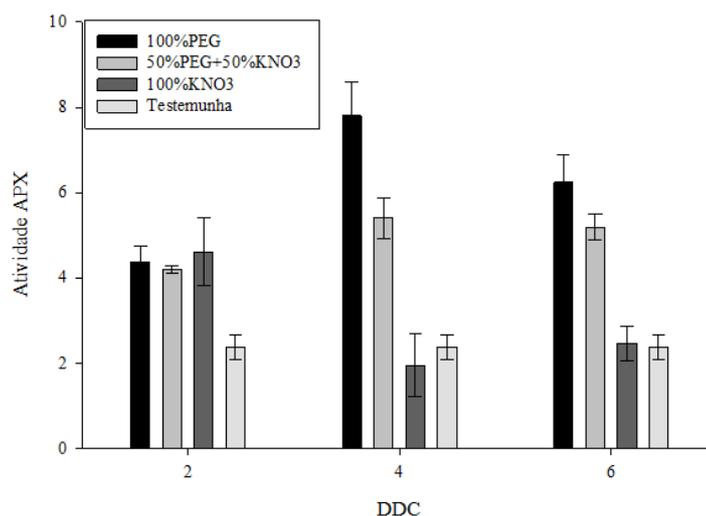


Figura 6 Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em sementes de tomate submetidas a diferentes condicionamentos e não condicionadas. As barras representam o desvio padrão das médias.

Os condicionamentos em 100%KNO<sub>3</sub> 6 dias e 50%PEG+50%KNO<sub>3</sub> 4 dias aumentaram em cerca de 43% o IVG em relação à testemunha e o condicionamento 100%KNO<sub>3</sub> 4 dias aumentou cerca de 30% em relação ao

mesmo. (Tabela 2). Já o índice de velocidade de formação de plântula normal (IVP) foi observado maior nas sementes condicionadas em 100%KNO<sub>3</sub> 4 dias e 6 dias, 50%PEG+50%KNO<sub>3</sub> 4 dias e 100%PEG 4 dias (Tabela 2). Novamente os condicionamentos em 100%KNO<sub>3</sub> 2 dias, 4 dias e 6 dias, juntamente com o 100%PEG 4 dias aumentaram o IVE em cerca de 20 % em relação à testemunha. (Tabela 2). Além disso, as sementes condicionadas por 4 dias, em qualquer solução testada, foram registrados maiores índices em relação à testemunha.

Tabela 2 Índices de velocidades de sementes de tomate condicionadas ou sem condicionamento – UFLA – 2013.

TRATAMENTOS	IVG	IVP	IVE
Testemunha	12.06 d	5.43 b	3.24 b
100%PEG/2 dias	12.78 d	5.35 b	3.51 b
100%PEG/4 dias	17.00 c	6.53 a	4.56 a
100%PEG/6 dias	15.22 c	5.90 b	3.35 b
50%PEG+50%KNO <sub>3</sub> /2 dias	13.55 d	5.61 b	3.23 b
50%PEG+50%KNO <sub>3</sub> /4 dias	21.70 a	7.26 a	3.65 b
50%PEG+50%KNO <sub>3</sub> /6 dias	16.40 c	6.17 b	3.47 b
100%KNO <sub>3</sub> /2 dias	14.95 c	5.87 b	4.09 a
100%KNO <sub>3</sub> /4 dias	17.86 b	6.36 a	3.99 a
100%KNO <sub>3</sub> /6 dias	21.34 a	6.75 a	4.36 a
CV (%)	8.59	14.38	12.71

IVG = índice de velocidade germinação; IVP = índice de velocidade formação de plântula normal; IVE = índice de velocidade emergência. As médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os condicionamentos em 100%KNO<sub>3</sub> por 4 dias e 6 dias, em geral aumentaram os índices de velocidade estudados. Esse resultado assemelha-se aos observados por Bocian e Hołubowicz (2008) que trabalharam com tomate e

Ahmadvand et al. (2012) e Reis et al. (2012) que trabalharam com soja e berinjela, respectivamente, que observaram um melhor desempenho fisiológico de sementes condicionadas com  $\text{KNO}_3$  em relação ao PEG. No entanto, como observado neste trabalho, o melhor desempenho fisiológico das sementes de tomates condicionadas em  $\text{KNO}_3$  está relacionado como aumento da atividade da redutase do nitrato. Proveniente da maior disponibilidade de substrato, proporcionado pela solução de  $\text{KNO}_3$ . Além disso, a redutase do nitrato pode estar relacionada, de forma indireta, no aumento da atividade da enzima SOD e CAT, por meio do óxido nítrico, porém o aprofundamento dos estudos é necessário para validar essa hipótese. Todavia, o papel da redutase do nitrato ainda não havia sido investigado nessa situação.

Os altos índices de velocidade proporcionados pelos tratamentos em 50%PEG+50% $\text{KNO}_3$  4 dias e 100%PEG 4 dias pode estar relacionado à concentração de proteínas totais, que podem ser utilizadas como reserva de pequenos peptídeos e aminoácidos, que posterior pode suprir o nitrogênio orgânico durante o desenvolvimento inicial (LIMA et al., 2008). Outra vantagem referente ao condicionamento com 100%PEG 4 dias está no aumento da atividade da CAT, que trata-se de uma enzima-chave na proteção das sementes contra o acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , diminuindo assim o estresse oxidativo e favorecendo a germinação (KIBINZA et al., 2011).

#### **4 CONCLUSÃO**

O condicionamento em 100%KNO<sub>3</sub> 4 e 6 dias conferiu as maiores atividade da redutase do nitrato e da dismutase do superóxido, além dos maiores índices germinação, formação de plântula normal e emergência.

## REFERÊNCIAS

AHMADVAND, G. et al. Effect of seed priming with potassium nitrate on germination and emergence traits of two soybean cultivars under salinity stress conditions. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, Dubai, v. 12, n. 6, p. 769-774, 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14th ed. Arlington, 1984. 1141 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigour testing handbook**. Lincoln, 1983. 88 p.

BETHKE, P. C.; BADGER, M. R.; JONES, R. L. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 2, p. 332-341, 2004.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeratio following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.

BOCIAN, S.; HOŁUBOWICZ, R. Effect of different ways of priming tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds on their quality. **Journal of Natural Sciences**, Olsztyn, v. 23, n. 4, p. 729–739, 2008.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. p. 395.

CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). **Plant science**, Limerick, v. 180, n. 2, p. 212–220, 2011.

DELÚ FILHO, N.; OLIVEIRA, L. E. M.; ALVES, J. D. Atividade da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis Muell*) otimização das condições de ensaio e ritmo circadiano. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 21, n. 3, p. 329-336, 1997.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**: sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 1999.

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

GUPTA, K. J.; ABIR, U. I. The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. **Mitochondrion**, Birmingham, v. 11, n. 4, p. 537-43, 2011.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 84, n. 2, p. 450–455, 1987.

HEYDECKER, W.; GIBBINS, B. M. The priming of seeds. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 83, p. 213-223, 1978.

HILLEL, D. The state of water in the soil. In: \_\_\_\_\_. **Soil and water**: physical principles and processes. New York: Academic, 1971. p. 49-77.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_201202.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201202.pdf)>. Acesso em: 23 set. 2012.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas de sementes de

pimentão submetidas ao osmocondicionamento, utilizando diferentes agentes osmóticos e meios de embebição. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 217-223, 1999.

KIBINZA, S. et al. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant science**, Limerick, v. 181, n. 3, p. 309–315, 2011.

LEA, U. S. et al. Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in high nitrite excretion and NO emission from leaf and root tissue. **Planta**, Berlin, v. 219, n. 1, p. 59-65, 2004.

LIMA, R. B. S. et al. Primary metabolite mobilization during germination in rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) seeds. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 32, n. 1, p. 19-25, 2008.

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

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S. M.; SILVA, W. R. **Avaliação da qualidade fisiológica das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230 p.

MAVI, K.; ERMIS, S.; DEMIR, I. The effect of priming on tomato rootstock seeds in relation to seedling growth. **Asian Journal of Plant Sciences**, New York, v. 5, n. 6, p. 940-947, 2006.

MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, New York, v. 15, n. 6, p. 873–885, 1976.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867–880, 1981.

NASCIMENTO, W. M. **Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças**. Brasília: Embrapa, 2004. p. 12

NAWAZ, A. et al. Induction of salt tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds through sand priming. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v. 6, n. 7, p. 1199–1203, 2012.

PACE, R. et al. Germination of untreated and primed seeds in rapeseed (*Brassica napus* var. Oleifera DEL.) under salinity and low matric potential. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 48, n. 2, p. 238-251, 2012.

PEREIRA, B. L. C. et al. Influência do óxido nítrico na germinação de sementes de *Plathymenia reticulata* Benth com baixo vigor. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 88, p. 629-636, 2010.

PONTES, C. A. et al. Mobilização de reserva em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel). J.F. Macbr. (Garapa) durante a embebição. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 26, n. 5, p. 593-601, 2002.

REIS, E. G. R. et al. Physiological quality of osmoprimed eggplant seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 5, p. 526-532, 2012.

ROSSETTO, C. A. V.; LIMA, T. M.; NAKAGAWA, J. Qualidade fisiológica e potencial de armazenamento de sementes de tomate submetidas ao condicionamento osmótico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 630-634, 2002.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1305-1319, 2002.

SUN, H. et al. Ascorbate-glutathione cycle of mitochondria in osmoprimed soybean cotyledons in response to imbibitional chilling injury. **Journal of Plant Physiology**, Minneapolis, v. 168, n. 3, p. 226-232, 2011.

TULLIO, M. C.; ARRIGONI, O. The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. **Seed Science Research**, Wallingford, v.13, n. 4, p. 249-260, 2003.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino acid with ninhydrin. **Analyst**, London, v. 80, p. 209-213, 1955.

WEITIN, N. I.; TRELEASE, R. N.; EISING, R. Two temporally synthesized charge subunits interact to form the five isoforms of cotton seed (*Gossypium hirsutum*) catalase. **Biochemical Journal**, London, v. 269, n. 1, p. 233–238, 1990.

**ARTIGO 2 Influência do condicionamento osmótico na germinação de sementes de tomates sob diferentes condições ambientais**

## RESUMO

O condicionamento osmótico é uma técnica que pode ser utilizada para aumentar a tolerância das sementes a possíveis estresses durante a germinação e na fase inicial de desenvolvimento. Objetivou-se estudar a influência dos agentes condicionantes PEG,  $\text{KNO}_3$  ou ambos, na concentração de alguns carboidratos e na tolerância a diferentes condições ambientais. As sementes de tomate cultivar Santa Clara foram condicionadas da seguinte maneira: 100%PEG 2 dias; 50%PEG+50% $\text{KNO}_3$  (v/v) 2 dias; 100%  $\text{KNO}_3$  2 dias; 100% PEG 4 dias; 50%PEG+50% $\text{KNO}_3$  (v/v) 4 dias; 100%  $\text{KNO}_3$  4 dias; 100% PEG 6 dias; 50%PEG+50% $\text{KNO}_3$  (v/v) 6 dias; 100%  $\text{KNO}_3$  6 dias. Após o condicionamento as sementes foram submetidas a análises fisiológicas e a análises para quantificar alguns carboidratos. O condicionamento 100% $\text{KNO}_3$  4 dias foi o que proporcionou os maiores IVG, %G e %P. Apenas o condicionamento em 100% PEG 4 e 6 dias não aumentou o IVG à baixa temperatura em relação à testemunha. Em condições ideais, independente do condicionamento houve aumento no IVG. Além disso, observou uma menor concentração de açúcares solúveis totais nas sementes condicionadas, quando comparadas com a testemunha. O condicionamento osmótico aumentou a velocidade de germinação das sementes de tomate em condições ideais, de estresse hídrico e à baixa temperatura.

Palavras-chave: Estresse abiótico. Condicionamento. Semente. Tomate.

### ABSTRACT

Priming is a technique that can be used to increase the tolerance to possible stresses during germination and early development. The objective was to study the influence of conditioning agents PEG, KNO<sub>3</sub> or both, the concentration of some carbohydrates and tolerance to different environmental conditions. Seeds of tomato cultivar Santa Clara were conditioned as follows: 100% PEG 2 days, 50% PEG +50% KNO<sub>3</sub> (v / v) 2 days, 100% KNO<sub>3</sub> 2 days, 100% PEG 4 days, 50% PEG + KNO<sub>3</sub> 50% (v / v) 4 days; 100% KNO<sub>3</sub> 4 days, 100% PEG 6 days, 50% PEG +50% KNO<sub>3</sub> (v / v) 6 days; 100% KNO<sub>3</sub> 6 days. After conditioning the seeds were examined and physiological analysis to quantify some carbohydrates. The conditioning 100% KNO<sub>3</sub> 4 days was what gave greater IVG, % G and % P. Only priming in 100% PEG 4 and 6 days did not increase the IVG low temperature compared to control. Ideally, irrespective of the conditioning increased in IVG. Furthermore, we observed a lower concentration of soluble sugars in seeds primed, when compared with the control. Priming increased the speed of germination of tomato seeds under ideal conditions, water stress and low temperature.

Keywords: Abiotic stress. Priming. Seeds. Tomato.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente com o crescimento populacional, necessita-se cada vez mais, a busca por aumentos substanciais para suprimento da demanda mundial por alimentos. Entretanto, as principais limitações concentram-se nos fatores edafoclimáticos, especialmente, água, temperatura, dentre outros, que levam sementes, plântulas e plantas a situações de estresses fisiológicos. Quando presentes, desde o desenvolvimento inicial da plântula, podem reduzir o índice de velocidade, bem como o percentual germinativo das sementes, o que acarreta em desuniformidade e redução do *stand* e, conseqüentemente, perdas irreparáveis na produção.

Técnicas têm sido estudadas para que as sementes superem melhor a fase crucial da germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas, aumentando a tolerância aos estresses abióticos. Dentre elas, destaca-se o condicionamento, baseado na absorção de água pelas sementes, porém, de forma controlada, utilizando-se de compostos que reduzem o potencial da solução. Dessa forma, os processos de germinação somente iniciarão, sem contudo, que haja germinação (HEYDECKER; GIBBINS, 1978). As soluções mais utilizadas são inertes, como polietileno glicol e manitol, devido seu alto peso molecular. Outros compostos poderão ser recomendados como nitrato de potássio e cloreto de sódio (NASCIMENTO, 2004).

O condicionamento osmótico também proporciona benefícios bioquímicos como, aumento na expressão das proteínas LEAs (*late embryogenesis abundant*), (SOEDA et al., 2005), aumenta a atividade do sistema antioxidante (CHEN; ARORA, 2011; KIBINZA et al., 2011), bem como aumenta a quantidade de adenosina trifosfato (ATP) e na razão ATP / ADP (adenosina difosfato) (CORBINEAU et al., 2000), estimular a divisão celular até a desenvolvimento (fase G2), (CASTRO et al., 2000), além de mudanças no metabolismo de reservas e na homeostase celular (FAROOQ et al., 2010). Esses

benefícios possibilitam um melhor vigor fisiológico, refletindo através dos aumentos na velocidade de germinação, uniformidade e no vigor das plântulas, além de ampliar as variedades de ambientes possíveis para a germinação e crescimento inicial (VARIER; VARI; DADLANI, 2010).

A possibilidade de germinação e crescimento inicial em condições adversas sugere uma maior tolerância aos estresses abióticos. Nesse contexto, Amini (2011) trabalhando com sementes de centeio, encontraram resultados significativos com o aumento à tolerância ao déficit hídrico em *Capsicum annuum* L. Yadav, Kumari e Ahmed (2011) observaram aumento da tolerância ao frio e ao estresse salino e, em tomate, Nawaz et al. (2012) constataram aumento no vigor das sementes de tomate sob condições de estresse salino. Em adição, o estresse abiótico está diretamente relacionado com alterações no metabolismo de carboidratos. Os quais têm a função de estabilizar as proteínas e complexos proteicos, além de manter a estabilidade da membrana e o potencial osmótico celular mais baixo que o meio externo para manter o balanço hídrico (BOHNERT; SHEN 1999; GUPTA; KAUR, 2005).

Objetivou-se estudar a influência dos agentes condicionantes PEG,  $KNO_3$  ou ambos, na concentração de alguns carboidratos e na tolerância a diferentes condições ambientais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv Santa Clara foram condicionadas em soluções de polietileno glicol 6000 (PEG) e nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) por 2, 4 e 6 dias. As soluções dos agentes osmóticos (v/v) foram: 100%PEG 2; 4 e 6 dias; 100%  $\text{KNO}_3$  por 2; 4 e 6 dias; e combinações de 50% PEG + 50% $\text{KNO}_3$  por 2; 4 e 6 dias. Todas as soluções apresentaram um  $\Psi_s$  de -1,1 MPa, equivalente a uma concentração de 0,05M PEG e 0,22M  $\text{KNO}_3$ . As sementes foram incubadas sob luz e aeração constante, temperatura de 15 °C, com 15 mL de solução por grama de semente. Os cálculos de potencial osmótico foram obtidos através da equação de Michel e Kaufmann (1973) para PEG6000 e equação de Van'Thoff (HILLEL, 1971) para o  $\text{KNO}_3$ . A testemunha não foi condicionada. Após condicionamento, as sementes foram lavadas em água corrente para remover a solução osmocondicionadora da superfície, sendo a secagem realizada em uma sala com temperatura de 25 °C e umidade relativa de 50% por um período de vinte e quatro horas, quando as sementes atingiram um grau de umidade entre 5-7%.

O índice de velocidade germinação foi com base em três repetições de 50 sementes colocadas sob substrato de papel. Umedecidas com água destilada ou determinadas soluções dependendo do estresse, equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco e mantido à temperatura de 20-30 °C (temperatura ideal) e fotoperíodo de 12 horas conforme Brasil (2009).

A contagem da germinação foi realizada diariamente para os cálculos dos índices de velocidade de germinação (IVG) de acordo com Maguire (1962). A porcentagem final de germinação e de plântulas normais foi realizada após a estabilização, das mesmas. A média da massa seca foi em relação à plântula inteira, resultados apresentados em (mg), obtida por cinco repetições de uma plântula, após 15 dias de plantio.

Para avaliar a germinação em temperatura ideal (TI), as sementes foram colocadas em placas de Petri®, sobre 3 folhas de papel *Germitest*® umedecido com água destilada mantidas em B.O.D., conforme Brasil (2009). Para a germinação à baixa temperatura (TB) com exceção da temperatura, que foi de 15°C, as mesmas condições do TI foram mantidas. No entanto, para a germinação sob estresses salino (ES) e hídrico (EH), primeiramente foi feito um pré-teste com sementes, sem qualquer tratamento para determinar em qual potencial ocorreu uma diminuição acentuada na germinação. Potencial esse, que foi utilizado nos estudos da germinação, em ambos os casos, utilizando o potencial de -0,6MPa. Assim, o papel foi umedecido com as soluções de NaCl para simular estresse salino e de PEG para simular estresse hídrico, e posteriormente, acrescentou apenas água destilada. As outras condições para a germinação foram as mesmas da TI.

Os extratos para as análises de amido, açúcares redutores (AR), açúcares não redutores (NR) e açúcares solúveis totais (AST), foram obtidos através da maceração de 200 mg de sementes em 5 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 7,0) e submetidas a banho-maria a 40 °C por 30 minutos, centrifugadas a 10 000 rpm por 10 minutos. Após a coleta do sobrenadante, o precipitado foi ressuspensão em 5 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 7,0) sendo o sobrenadante novamente coletado e somado ao primeiro. O precipitado foi utilizado para quantificar os açúcares solúveis totais e açúcar não redutor, pelo método da antrona, segundo Yemm e Willis (1954) e o açúcar redutor pelo método de Miller (1959).

O *pellet* foi utilizado para determinar o teor de amido, sendo o mesmo ressuspensão em 8 mL de tampão acetato de potássio (200 mM; pH 4,8) e incubado em banho-maria a 40°C por 15 minutos. Na sequência, foi adicionado 2 mL da enzima amiloglicosidase (1 mg/mL em tampão acetato de potássio), e levado para incubação novamente em banho-maria a 40°C por 120 minutos,

sendo centrifugação na sequência a 10000 rpm por 20 minutos (RICKARD; BEHN, 1987), o teor foi determinado pelo método da antrona.

O delineamento experimental dos ensaios foi em DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado), seguindo o esquema fatorial (3x3) +1, sendo: 3 soluções osmóticas (100% PEG, 50%PEG+50%KNO<sub>3</sub> e 100% KNO<sub>3</sub>); 3 tempos de incubação (2, 4, 6 dias) mais a testemunha (sementes não condicionadas). A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico *Sisvar* (FERREIRA, 1999) e as médias comparadas pelo teste de *Scott-Knott* a 5% de probabilidade de erro ( $P < 0,05$ ).

### 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Em sementes condicionadas com 100%PEG, independente do período de tratamento e em 50%PEG+50%KNO<sub>3</sub> 4 dias, foram observadas as menores concentrações de açúcares redutores (AR), (cerca de 13%) em relação à testemunha, enquanto que o restante não diferiram da testemunha (Tabela 1). Contudo, as sementes que foram condicionadas em 100%PEG 4 dias, 100% KNO<sub>3</sub> 6 dias, além do testemunha, apresentaram as maiores concentrações de açúcares não redutores (NR), enquanto para as condicionadas em 100% PEG 6 dias apresentaram as menores (cerca de 25%) em relação à testemunha (Tabela 1). Em sementes de tomate, Nawaz et al. (2011) observaram maior quantidade de açúcares AR, NR e AST nas sementes condicionadas com KNO<sub>3</sub> em relação a testemunha, atribuindo tais resultados ao aumento da atividade da alfa-amilase. Todavia, neste estudo, esse tipo de relação não mostrou-se clara. A maior concentração de AST foi observada na testemunha acima de 17% em relação aos demais (Tabela 1). A redução dos AST nas sementes condicionadas pode ser devido à mobilização desses carboidratos para a demanda metabólica durante o processo germinativo (CORTE et al., 2006), uma vez que, foi observado para a testemunha o menor índice de velocidade de germinação (IVG), como pode-se observar (Tabela 5). Quanto ao amido, observou-se um acréscimo de aproximadamente 35% nas sementes condicionadas com 50%PEG+50%KNO<sub>3</sub> 6 dias em relação à testemunha (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados por Magalhães, Borges e Berger (2010) trabalharam com sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) e Corte et al. (2006) trabalharam com sementes de *Caesalpinia peltophoroides* (Benth.) nos quais, ambos observaram redução dos AST nas sementes condicionadas. Porém Magalhães, Borges e Berger (2010) registraram uma redução no teor de amido ao longo da germinação; enquanto Corte et al. (2006) observaram pouca variação no conteúdo deste composto ao longo da germinação.

Tabela 1 Quantidade de açúcar redutor (AR), açúcar não redutor, (NR), açúcar solúvel total (AST), e amido em diferentes condicionamentos ou sem condicionamento, resultado em grama/grama de matéria seca de semente – UFLA – 2013.

Tratamentos	AR	NR	AST	AMIDO
Testemunha	0.039 a	0.50 a	0.092 a	0.078 b
100%PEG/4 d	0.033 b	0.49 a	0.068 b	0.082 b
50%PEG+50%KNO <sub>3</sub> /4 d	0.030 b	0.43 b	0.077 b	0.086 b
100%KNO <sub>3</sub> /4 d	0.039 a	0.43 b	0.075 b	0.084 b
100%PEG/6 d	0.034 b	0.37 c	0.072 b	0.085 b
50%PEG+50%KNO <sub>3</sub> /6 d	0.042 a	0.44 b	0.074 b	0.102 a
100%KNO <sub>3</sub> /6 d	0.043 a	0.46 a	0.069 b	0.091 b
cv %	16,78	7,98	13,04	8,66

As médias seguidas das mesmas letras nas linhas e colunas não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knott* a 5% de probabilidade.

Nas variáveis fisiológicas avaliadas para o estresse hídrico, o condicionamento com 100% KNO<sub>3</sub> 4 dias aumento o IVG em 62%, a %G em 21% e a %P em 25% relação à testemunha. Além disso, o condicionamento 100%PEG 4 dias foi o que promoveu menores vantagens. (Tabela 2). De uma forma geral, o condicionamento aumentou o vigor fisiológico. Amini (2011) trabalhando com sementes de centeio sob estresse hídrico, condicionadas em PEG, observou aumento tanto no comprimento da parte aérea e raiz como na velocidade de germinação. Os benefícios segundo Amini (2011) foram provenientes do aumento da atividade da invertase e amilase, que resultou em uma maior concentração de soluto celular, logo ocorreu diminuição do potencial celular interno, o que manteve o balanço hídrico.

Tabela 2 Análises fisiológicas de sementes de tomate condicionadas submetidas ao estresse hídrico a -0,6 MPa – UFLA – 2013.

Tratamentos	IVG	%G	%P	M. M.
Testemunha	7.09 d	71 b	60 b	3,52 a
100%PEG/4 d	8.52 d	77 b	76 b	4,37 a
50%PEG+50%KNO <sub>3</sub> /4 d	14.56 c	83 b	81 a	5,12 a
100%KNO <sub>3</sub> /4 d	19.18 a	89 a	79 a	4,57 a
100%PEG/6 d	16.03 b	81 b	79 a	4,57 a
50%PEG+50%KNO <sub>3</sub> /6 d	13.72 c	88 b	80 a	5,30 a
100%KNO <sub>3</sub> /6 d	13.48 c	83 b	77 a	4,64 a
cv%	9,19	4,09	12,97	16,57

As médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Índice de velocidade germinação (IVG), índice de velocidade formação de plântulas (IVP); porcentagem germinação (%G), porcentagem de plântula normal (%P), média massa de plântula (M. M.) em mg.

Em relação ao estresse salino, houve apenas diferença quanto às medidas das massas, onde foi observado que os condicionamentos em 50%PEG+50%KNO<sub>3</sub> 4 dias, 100%PEG 6 dias e 100%KNO<sub>3</sub> 6 dias apresentaram médias em torno de 18% menores em relação à testemunha (Tabela 3). Nawaz et al. (2012) trabalharam com sementes de tomate condicionadas em areia e cloreto de sódio, em condições de estresse salino, observaram aumento no IVG, %G e no vigor das plântulas, justificando essa resposta ao melhor funcionamento do sistema antioxidante. Porém a utilização de cloreto de sódio por Nawaz et al. (2012) no condicionamento, possivelmente induziu diferentes respostas metabólicas em relação ao presente estudo, as quais, permitiu uma maior tolerância ao estresse salino.

Tabela 3 Análises fisiológicas de sementes de tomate condicionadas submetidas ao estresse salino a -0,6 MPa – UFLA – 2013.

Tratamentos	IVG	%G	%P	M. M.
Testemunha	6.87 a	78 a	67 a	6,29 a
100%PEG/4 d	7.00 a	75 a	73 a	6,34 a
50%PEG+50%KNO <sub>3</sub> /4 d	7.95 a	76 a	74 a	4,56 b
100%KNO <sub>3</sub> /4 d	8.97 a	74 a	68 a	5,58 a
100%PEG/6 d	10.04 a	88 a	84 a	5,21 b
50%PEG+50%KNO <sub>3</sub> /6 d	7.57 a	80 a	78 a	6,17 a
100%KNO <sub>3</sub> /6 d	8.61 a	70 a	64 a	4,14 b
cv	18,13	10,62	13,22	12,45

As médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knott* a 5% de probabilidade. Índice de velocidade germinação (IVG), porcentagem germinação (%G), porcentagem de plântula normal (%P), média massa de plântula (M. M.) em mg.

Com relação às análises fisiológicas observadas para o estresse à baixa temperatura, os menores valores de IVG foram observados na testemunha e quando condicionado em PEG 4 e 6 dias. Enquanto, os demais condicionamentos, conferiram aumentos no IVG de no mínimo 20% em relação à testemunha (Tabela 4). Resultados semelhantes foram encontrados por Nascimento (2005) trabalhando com sementes de tomate, onde observou maiores valores de IVG em sementes condicionadas com KNO<sub>3</sub>, quando comparado com a testemunha. No entanto, houve uma tendência de aumento, em todas as análises realizadas, para as sementes condicionadas em relação ao controle. Amooaghaie, Nikzad e Shareghi (2010) trabalharam com tomate em condicionamento com PEG, em condições de baixa temperatura, atribuiu o aumento na velocidade emergência, e na média de emergência, relataram ainda

alterações na quantidade de proteína solúvel e de fósforo, o que resultou, em uma melhor estabilidade e integridade da membrana.

Tabela 4 Análises fisiológicas de sementes de tomate condicionadas submetidas ao estresse à baixa temperatura a 15 °C – UFLA – 2013.

Tratamentos	IVG	%G	%P	M. M.
Testemunha	3.94 b	81 a	78 a	3,39 a
100%PEG/4 d	4.84 b	82 a	80 a	5,64 a
50%PEG+50%KNO <sub>3</sub> /4 d	5.81 a	88 a	80 a	5,09 a
100%KNO <sub>3</sub> /4 d	4.97 a	89 a	86 a	3,85 a
100%PEG/6 d	4.34 b	81 a	76 a	3,12 a
50%PEG+50%KNO <sub>3</sub> /6 d	5.13 a	83 a	80 a	4,08 a
100%KNO <sub>3</sub> /6 d	5.62 a	88 a	85 a	3,49 a
cv	8,95	7,44	8,94	26,93

As médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Índice de velocidade germinação (IVG), porcentagem germinação (%G), porcentagem de plântula normal (%P), média massa de plântula (M. M.) em mg.

Já em condições ideais, a testemunha apresentou o menor IVG. Além disso, os condicionamento 100%KNO<sub>3</sub> 6 dias e 50%PEG+50%KNO<sub>3</sub> 4 dias foram os que proporcionaram os maiores IVG cerca de 43% maior que a testemunha (Tabela 5). Para as outras análises não houve diferenças. Farooq et al. (2005) trabalharam com sementes de tomate condicionadas em PEG e KNO<sub>3</sub>, encontraram resultados semelhantes, onde o IVG foi maior para as condicionadas em 100%KNO<sub>3</sub>, seguida pelo 100%PEG e, por último, a testemunha. Porém Farooq et al. (2005) encontraram aumento no crescimento, porém no presente estudo, as médias de altura não diferiram da testemunha. No entanto, a diferença pode ser em relação ao uso de sementes de pior qualidade, uma vez que, a média de porcentagem de germinação no estudo de Farooq et al.

(2005) foi de 50% menor do que no presente estudo. Pois segundo Varier, Vari e Dadlani (2010) os efeitos do condicionamento são mais acentuados em lotes de sementes de pior qualidade.

Tabela 5 Análises fisiológicas de sementes de tomate condicionadas submetidas a condições ideais – UFLA – 2013.

Tratamentos	IVG	%G	%P	M. M.
Testemunha	12,07 c	87 a	85 a	3,41 a
100%PEG/4 d	17,00 b	86 a	84 a	4,91 a
50%PEG+50%KNO <sub>3</sub> /4 d	21,70 a	87 a	85 a	4,52 a
100%KNO <sub>3</sub> /4 d	17,86 b	87 a	81 a	4,53 a
100%PEG/6 d	15,22 b	81 a	78 a	4,09 a
50%PEG+50%KNO <sub>3</sub> /6 d	16,40 b	84 a	80 a	4,26 a
100%KNO <sub>3</sub> /6 d	21,34 a	86 a	84 a	5,11 a
cv	8,72	5,59	6,32	15,70

As médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Índice de velocidade germinação (IVG), porcentagem germinação (%G), porcentagem de plântula normal (%P), média massa de plântula (M. M.) em mg.

De um modo geral, o condicionamento proporcionou aumento no IVG em condições ideais e para o estresse hídrico e à baixa temperatura. Apenas ao estresse salino o condicionamento não se mostrou eficiente. Não foi observada uma relação clara favorável entre os carboidratos e repostas fisiológicas ao estresse. Somente em condições ideais, onde se observou menores concentrações de AST nas sementes com maiores IVG. A técnica do condicionamento osmótico é muito promissora no sentido de aumentar a tolerância do desenvolvimento inicial das sementes, porém mais estudos serão necessários no sentido de encontrar o melhor meio de incubação para cada espécie e para cada tipo de estresse.

#### **4 CONCLUSÃO**

O condicionamento 100%KNO<sub>3</sub> 4 dias é o mais indicados para aumentar o IVG, %G e %P em estresse hídrico. O condicionamento não se mostrou eficiente em estresse salino. Apenas o condicionamento em 100% PEG 4 e 6 dias não se mostrou eficiente em aumentar o IVG à baixa temperatura. Em condições ideais, independente do condicionamento houve aumento no IVG. Por fim, houve diminuição da concentração de açúcar solúvel total em sementes condicionadas de tomate.

## REFERÊNCIAS

AMINI, R. Effects of osmopriming on drought stress tolerance of perennial rye (*Secale montanum* Guss.) during germination. **Journal of Food Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 9, p. 305–308, 2011.

AMOOAGHAIE, R.; NIKZAD, K.; SHAREGHI, B. The effect of priming on emergence and biochemical changes of tomato seeds under suboptimal temperatures. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 38, p. 508-512, 2010.

BOHNERT, H. J.; SHEN, B. Transformation and compatible solutes. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 78, p. 237-260, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 395 p.

CASTRO, R. D. et al. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.122, p. 327–336, 2000.

CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). **Plant science**, Limerick, v. 180, p. 212–220, 2011.

CORBINEAU, F. et al. Improvement of tomato seed germination by osmopriming as related to energy metabolism. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON SEEDS, 6., 1999, Merida. **Proceedings...** Cambridge: CABI, 2000, p. 467–474.

CORTE, V. B. et al. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, p. 941-949, 2006.

FAROOQ, M. et al. Thermal hardening: a new seed vigor enhancement tool in rice. **Journal of Integrative Plant Biology**, Chichester, v. 47, p. 187–93, 2005.

FAROOQ, M. et al. Changes in nutrient-homeostasis and reserves metabolism during rice seed priming: consequences for seedling emergence and growth. **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v. 9, p. 191–198, 2010

FERREIRA, D. F. **Sisvar**: sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 1999.

GUPTA, A. K.; KAUR, N. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 30, p. 761–776, 2005.

HEYDECKER, W.; GIBBINS, B. M. The priming of seeds. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 83, p. 213-223, 1978.

HILLEL, D. The state of water in the soil. In: \_\_\_\_\_. **Soil and water**: physical principles and processes. New York: Academic, 1971. p. 49-77.

KIBINZA, S. et al. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant science**, Limerick, v. 181, p. 309–315, 2011.

MAGALHÃES, S. R.; BORGES, E. E. L.; BERGER, A. P. A. Mobilização de reservas no eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) S. F. Blake durante a germinação. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, p. 589-595, 2010.

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

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

NASCIMENTO, W. M. **Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2004. 12 p. (Circular Técnica, 33).

NASCIMENTO, W. M. Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças visando a germinação em condições de temperaturas baixas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 211-214, 2005.

NAWAZ, A. et al. Effect of halopriming on germination and seedling vigor of tomato. **African Journal of Agricultural Research**, Ekapoma, v. 6, p. 3551-3559, 2011.

NAWAZ, A. et al. Induction of salt tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds through sand priming. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v. 6, p. 1199–1203, 2012.

RICKARD, J. E.; BEHN, K. R. Evaluation of acid and enzyme hydrolytic methods for determination of cassava starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 41, n. 4, p. 373 -379, 1987.

SOEDA, Y. et al. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 137, p. 354–368, 2005.

VARIER, A.; VARI, A. K.; DADLANI, M. The subcellular basis of seed priming. **Current science**, Bangalore, v. 99, p. 450-456, 2010.

YADAV, V. P.; KUMARI, M.; AHMED, Z. Seed priming mediated germination improvement and tolerance to subsequent exposure to cold and salt stress in Capsicum. **Research Journal of Seed Science**, Cambridge, v. 3, p. 125-136, 2011.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, London, v. 57, p. 508-515, 1954.