

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV  
CURSO DE DOUTORADO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

**MATHEUS SANTIN PADILHA**

**Vigor em sementes de feijão para superar condições de estresse abiótico**

**LAGES**

**2023**

**MATHEUS SANTIN PADILHA**

**VIGOR EM SEMENTES DE FEIJÃO PARA SUPERAR CONDIÇÕES DE ESTRESSE  
ABIÓTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Cileide Maria Medeiros Coelho

**LAGES**

**2023**

Padilha, Matheus Santin

Vigor em sementes de feijão para superar condições de estresse abiótico/ Matheus Santin Padilha. -- 2023.

212 p.

Orientadora: Cileide Maria Medeiros Coelho

Tese (Doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2023.

1. *Phaseolus vulgaris* L.. 2. Desempenho fisiológico. 3. Componentes de reserva. 4. Sistema Antioxidante. I. Padilha, Matheus Santin. II. Coelho, Cileide Maria Medeiros. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. IV. Vigor em sementes de feijão para superar condições de estresse abiótico.

MATHEUS SANTIN PADILHA

**VIGOR EM SEMENTES DE FEIJÃO PARA SUPERAR CONDIÇÕES DE ESTRESSE  
ABIÓTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

BANCA EXAMINADORA

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cileide Maria Medeiros Coelho  
UDESC/Lages-SC

Membros:

Dra. Natalia Carolina Moraes Ehrhardt-Brocardo  
Membro Interno – UDESC/Lages-SC

Dr. Cristiano Reschke Lajús  
Membro Interno – UNOCHAPECÓ/Chapecó – SC

Dr. Diego Medeiros Gindri  
Membro externo – CIDASC/Lages SC

Dr. Marcelo Maraschin  
Membro externo – UFSC/Florianópolis – SC

Lages, 07 de julho de 2023.

## RESUMO

A mobilização de reservas pode variar de acordo com o genótipo, vigor de sementes e a condição ambiental, sendo necessário determinar as relações entre esses fatores sobre a mobilização das reservas. A pesquisa foi dividida em nove capítulos, com objetivo de avaliar a resposta do vigor de sementes a condições de estresse abiótico. No capítulo 1, foram utilizados sete genótipos de feijão (BAF07, BAF13, BAF23, BAF42, BAF55, BAF81 e BAF112) submetidos a condições de estresse salino e foi possível identificar diferenças no processo de mobilização das reservas e associação do maior vigor do lote com a atividade de alfa-amilase, sendo essa relação dependente do estresse. No capítulo 2, verificou-se a mobilização de proteínas e açúcares solúveis durante a germinação em estresse hídrico dos genótipos BAF07 e BAF55, constatou-se que o genótipo com sementes de maior vigor apresentou maior capacidade de hidrólise e mobilização mesmo em condições de estresse, o que favoreceu o desempenho de plântulas. No capítulo 3, sete genótipos de feijão (BAF07, BAF13, BAF23, BAF42, BAF44, BAF55 e BAF112) foram utilizados e foi verificado que os genótipos possuem tolerância e vigor distintos e esses fatores afetam o desempenho em estresse hídrico e, o aminoácido prolina foi associado ao menor vigor do lote de sementes em condições de estresse hídrico e salino. No capítulo 4, verificou-se a mobilização de proteínas e açúcares solúveis durante a germinação em estresse salino dos genótipos BAF44 e BAF55, constatou-se que o genótipo com sementes de maior vigor apresentou maior capacidade de hidrólise e mobilização mesmo sob condições de estresse, o que favoreceu o melhor desempenho no estresse. No capítulo 5, a mobilização de fósforo foi avaliada sob condições de estresse hídrico no genótipo BAF42 com três níveis de vigor e, foi verificado que as sementes de maior vigor apresentam maior atividade de fitase, contribuiu para a hidrólise do fitato e disponibilização de fósforo. No capítulo 6, três lotes de sementes do genótipo BAF07 foram utilizados com três níveis de vigor e submetidos a estresse hídrico, observou-se que os lotes de maior vigor apresentaram melhor desempenho no estresse, mas sem associação ao sistema antioxidante (i.e., catalase (CAT), ascorbato (APX) e guaiacol peroxidase (GPX)) durante a germinação. No capítulo 7, dois lotes de sementes com vigor distinto do genótipo BAF42 foram submetidas a condições de germinação em estresse térmico (i.e., baixa e alta temperatura) e o lote de sementes de maior vigor apresentou o melhor desempenho fisiológico durante os estresses, sendo esse desempenho associado a mobilização de reservas mais eficaz e não ao sistema antioxidante vegetal. Capítulo 8, as sementes dos genótipos BAF42, BAF44 e BAF55 com dois níveis de vigor, foram submetidas a condições de estresse por frio e, constatou-se que as sementes de maior vigor apresentaram desempenho superior após a condição de estresse por frio e, as sementes de menor vigor demonstraram maior acúmulo de peróxido de hidrogênio e malondialdeído durante a após o estresse imposto, contudo o

sistema antioxidante não apresentou associação com o alto vigor, exceto para a CAT durante o estresse por frio. No capítulo 9, dois lotes de sementes do genótipo BAF55 foram submetidas a condições de estresse salino, e o lote de sementes de vigor superior demonstra melhor desempenho, mas a atividade antioxidante não apresentou relação com o maior vigor, mas observou-se diferença na maior mobilização de reservas e menor dano fisiológico inicial nas sementes utilizadas. Dessa forma, o vigor do lote de sementes favorece a germinação e o desempenho de plântulas durante condições de estresse abiótico.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris* L.; Desempenho fisiológico; Componentes de reserva; Sistema antioxidante.

## ABSTRACT

### COMMON BEAN SEED VIGOR TO OVERCOME ABIOTIC STRESS CONDITIONS

Seed reserve mobilization are dependent of the genotype, seed vigor, and environmental condition, and it is necessary to determine the relationships among these factors on reserve mobilization and antioxidant system under abiotic stresses. The research was divided into nine chapters, aiming to evaluate the response of seed vigor under abiotic stress conditions. Chapter 1: Seven bean genotypes (BAF07, BAF13, BAF23, BAF42, BAF55, BAF81 and BAF112) submitted to salt stress conditions were used and it was possible to identify differences in the process of reserve mobilization and the association of the highest vigor of the batch with the alpha-amylase activity, this relationship being stress dependent. Chapter 2: The mobilization of proteins and soluble sugars during germination under water stress of the genotypes BAF07 and BAF55 was verified, it was found that the genotype with seeds of higher vigor showed higher capacity of hydrolysis and mobilization even under stress conditions, which favored the performance of seedlings. In Chapter 3: Seven common bean genotypes (BAF07, BAF13, BAF23, BAF42, BAF44, BAF55 and BAF112) were used and it was verified that the genotypes have distinct tolerance and vigor and these factors affect the performance under water stress and, the amino acid proline was associated with lower vigor of the seed lot under water and salt stress conditions. In chapter 4 the mobilization of proteins and soluble sugars during germination under salt stress of the genotypes BAF44 and BAF55 was verified, it was found that the genotype with seeds of higher vigor showed higher hydrolysis and mobilization capacity even under stress conditions, which favored the better performance under stress. Chapter 5: Mobilization of phosphorus was evaluated under water stress conditions in the genotype BAF42 with three levels of vigor, and it was verified that the seeds with higher vigor presented higher phytase activity, which contributed to the hydrolysis of phytate and availability of phosphorus. Chapter 6: Three seed lots of the genotype BAF07 were used with three levels of vigor and submitted to hydric stress, it was observed that the more vigorous lots presented better performance in stress and, the antioxidant system (i.e., catalase (CAT), ascorbate (APX) and guaiacol peroxidase (GPX)) were not associated to the higher vigor of the seed lot during germination. Chapter 7: Two seed lots with distinct vigor of genotype BAF42 were subjected to heat stress germination conditions (i.e., low and high temperature) and the higher vigor seed lot showed the best physiological performance during the stresses, this performance being associated with more effective reserve mobilization in higher vigor seeds and not with the plant antioxidant system. Chapter 8: The seeds of the genotypes BAF42, BAF44 and BAF55 with two levels of vigor, were submitted to cold stress conditions and it was found that the seeds of higher vigor presented superior performance after the cold stress condition and the seeds of lower vigor showed higher accumulation of hydrogen peroxide and malondialdehyde during the after stress imposed, however the antioxidant system showed no

association with the high vigor, except for CAT during the cold stress. Chapter 9: Two lots of seeds of the genotype BAF55 were submitted to salt stress conditions and the lot of seeds with higher vigor showed better performance, in which, the antioxidant activity showed no relationship with the higher vigor or the better performance obtained by the seeds with higher vigor, being the difference observed the result of the greater mobilization of reserves and less initial physiological damage in the seeds used. Thus, seed lot vigor favors germination and seedling performance during abiotic stress conditions.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris* L.; Physiological performance; Reserve compounds; Antioxidant system.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Redução de reservas da semente (RRS), taxa de redução de reservas (TRRS), massa seca de plântulas (MSP), taxa de mobilização de reservas (TMR), atividade da enzima alfa-amilase e taxa de redução de amido (TRA) em genótipos de feijão avaliadas em condições de ausência (Controle) e presença de estresse salino (NaCl). Barras seguidas de mesma letra minúscula dentro do tratamento não apresentam diferença significativa pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ..... 45
- Figura 2 – Análise de componentes principais referente a formação de plântulas no controle (a) e em estresse salino ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (b) e a associação entre os parâmetros avaliados. O CP1 e CP2 são o primeiro e o segundo componente principal, respectivamente..... 48
- Figura 3 – Mobilização de biomassa seca durante a germinação e formação de plântulas de feijão nos períodos de dois, quatro, seis e oito dias com ausência de estresse (Controle) e com presença de estresse hídrico (PEG  $-0,1 \text{ MPa}$ ) para os genótipos BAF07 e BAF55. Massa seca de plântulas (MSP) (a, b), comprimento de plântula (CP) (c, d), massa seca restante em cotilédones (MSRC) (e, f), gasto metabólico (GM) (g, h). \*:representa diferença significativa entre os genótipos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 57
- Figura 4 – Proteína (a) e amido (b) remanescente em cotilédones durante a formação de plântulas de feijão nos períodos de 0, 2, 4, 6 e 8 dias com ausência de estresse (Controle) e com presença de estresse hídrico (PEG  $-0,1 \text{ MPa}$ ), para os genótipos BAF07 e BAF55. \*:representa diferença significativa entre os genótipos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 59
- Figura 5 – Atividade de alfa-amilase em cotilédones durante a formação de plântulas de feijão nos períodos de 0, 2, 4, 6 e 8 dias de germinação com ausência de estresse (Controle) e com presença de estresse hídrico (PEG  $-0,1 \text{ MPa}$ ), para os genótipos BAF07 e BAF55. \*:representa diferença significativa entre os genótipos no tempo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro..... 60
- Figura 6 – Açúcar solúvel total em cotilédones (a, b) e eixo embrionário (c, d) durante a formação de plântulas de feijão nos períodos de 0, 2, 4, 6 e 8 dias com ausência de estresse (Controle) e com presença de estresse hídrico (PEG  $-0,1 \text{ MPa}$ ), para

	os genótipos BAF07 e BAF55. *:representa diferença significativa entre os genótipos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ....	62
Figura 7 –	Proteínas solúveis em cotilédones (a, b) e em eixo embrionário (c, d) durante a formação de plântulas de feijão nos períodos de 0, 2, 4, 6 e 8 dias com ausência de estresse (Controle) e com presença de estresse hídrico (PEG -0,1 MPa), para os genótipos BAF07 e BAF55. *:representa diferença significativa entre os genótipos no tempo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. ....	64
Figura 8 –	Diagrama de caixa demonstrando a variação e influência dos estresses salino (NaCl 150mmol/L) e hídrico (Polietileno Glicol (PEG) -0,2 MPa) sobre o comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT), massa seca de raiz (MSR), massa seca de hipocótilo (MSH) e massa seca total (MST) de plântulas de o número de raízes secundárias (NRS), taxa de redução de reservas (TRRS), taxa de mobilização de reservas (TMR) feijão aos 10 dias após a montagem do teste. ....	73
Figura 9 –	Diagrama de caixa demonstrando a variação e influência dos estresses salino (NaCl 150mmol/L) e hídrico (Polietileno Glicol (PEG) -0,2 MPa) sobre o teor de umidade (a) e teor de prolina livre de plântulas de feijão aos 10 dias após a montagem do teste.....	74
Figura 10 –	Comprimento de plântulas (CP), massa seca de plântulas (MSP) e redução de reservas da semente (RRS) avaliados durante a germinação em condição de ausência de estresse (controle) e presença de estresse salino (NaCl) para os lotes dos genótipos BAF44 e BAF55. *:indica diferença significativa entre os lotes dentro do tempo de avaliação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	88
Figura 11 –	Redução de amido e redução de proteína total avaliados durante a germinação em condição de ausência de estresse (controle) e presença de estresse salino (NaCl) para os lotes dos genótipos BAF44 e BAF55. *:indica diferença significativa entre os lotes dentro do tempo de avaliação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ....	89
Figura 12 –	Atividade da alfa-amilase ( $\alpha$ ) avaliada durante a germinação em condição de ausência de estresse (controle) (a) e presença de estresse salino (NaCl) (b) para os lotes dos genótipos BAF44 e BAF55. *:indica diferença significativa entre os lotes dentro do tempo de avaliação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	90
Figura 13 –	Açúcares solúveis totais (AST) avaliados em cotilédones (a, b) e eixo embrionário (c, d) durante a germinação em condição de ausência de estresse (controle) e	

	presença de estresse salino (NaCl) para os lotes dos genótipos BAF44 e BAF55. *:indica diferença significativa entre os lotes dentro do tempo de avaliação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	92
Figura 14 –	Proteínas solúveis (PS) avaliadas em cotilédones (a, b) e eixo embrionário (c, d) durante a germinação em condição de ausência de estresse (controle) e presença de estresse salino (NaCl) para os lotes dos genótipos BAF44 e BAF55. *:indica diferença significativa entre os lotes dentro do tempo de avaliação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	94
Figura 15 –	Eletrforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de cotilédones durante a germinação em condição de ausência de estresse (a) e presença de estresse salino (NaCl) (b) para os lotes dos genótipos BAF44 e BAF55 nos tempos de germinação de zero (0d), um (1d), três (3d), cinco (5d) e sete dias (7d). M: marcador de massa molecular.....	95
Figura 16 –	Concentração de prolina em plântulas de feijão aos seis dias após a semeadura provenientes de lotes de alto, médio e baixo vigor em condições de ausência de estresse (Controle) e estresse hídrico (PEG). Médias seguidas de mesma letra minúscula na condição de germinação não apresentam diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.....	104
Figura 17 –	Comprimento de total de plântulas (CP) e massa seca de plântulas (MSP) de feijão aos dois, quatro e seis dias após a semeadura provenientes de lotes de alto, médio e baixo vigor em condições de ausência de estresse (controle) e presença de estresse hídrico. Médias seguidas de mesma letra minúscula no tempo de germinação não apresentam diferença significativa entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.....	105
Figura 18 –	Porcentagem de germinação aos nove dias, comprimento total (CT), massa seca de plântulas (MSP), redução de reservas da semente (RRS), atividade de alfa-amilase e eficiência de uso de reservas da semente (EURS) obtidas nas diferentes temperaturas de germinação para o lote de alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) aos cinco dias de germinação. *indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre os lotes de sementes utilizados. A linha sólida e a linha pontilhada representam a regressão quadrática obtida para os lotes de sementes de alto vigor e baixo vigor, respectivamente. ....	119
Figura 19 –	Malondialdeído (MDA) determinados aos cinco dias de germinação em plântulas e cotilédones das sementes de alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) submetidas a	

- germinação em 15°C, 18°C, 25°C, 32°C e 35°C. \*indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre os lotes de sementes utilizados. A linha sólida e a linha pontilhada representam a regressão quadrática obtida para os lotes de sementes de alto vigor e baixo vigor, respectivamente. .... 122
- Figura 20 – Catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX) determinadas aos cinco dias de germinação em plântulas e cotilédones das sementes de alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) submetidas a germinação em 15°C, 18°C, 25°C, 32°C e 35°C. \*indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre os lotes de sementes utilizados. A linha sólida e a linha pontilhada representam a regressão quadrática obtida para os lotes de sementes de alto vigor e baixo vigor, respectivamente. .... 123
- Figura 21 – Teor de prolina livre em plântulas e em cotilédones durante a germinação de sementes de feijão avaliados aos 4 e 7 dias em condições de ausência e presença de déficit hídrico. .... 134
- Figura 22 – Malondialdeído (MDA), guaiacol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) avaliados aos 4 dias de germinação em plântula e cotilédones nas condições de presença e ausência (controle) de déficit hídrico. Médias seguidas de mesma letra na condição de germinação não apresentam diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ..... 136
- Figura 23 – Malondialdeído (MDA), guaiacol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) avaliados aos sete dias de germinação em plântula e cotilédones em condições de presença e ausência de déficit hídrico. Médias seguidas de mesma letra na condição de germinação não apresentam diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. .... 137
- Figura 24 – Malondialdeído (MDA), guaiacol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) e prolina avaliados aos sete dias de germinação em raízes e hipocótilo em condições de ausência (controle) e presença de déficit hídrico. Médias seguidas de mesma letra na condição de germinação não apresentam diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. .... 139
- Figura 25 – Procedimento de execução para determinar a resposta fisiológica de sementes sob condições de estresse por frio e após a submissão por estresse por frio. Malondialdeído (MDA); Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); Catalase (CAT); Ascorbato peroxidase (APX); guaiacol peroxidase (GPX); massa seca de plântulas

	(MSP); comprimento de raiz (CR); comprimento de hipocótilo (CH); comprimento total (CT).....	145
Figura 26 –	Agrupamento dos lotes utilizados considerando os parâmetros fisiológicos avaliados.....	152
Figura 27 –	Análise de componentes principais demonstrando a associação entre os parâmetros fisiológicos e bioquímicos com os grupos de vigor formados pela análise de agrupamento, considerando as avaliações no eixo embrionário na saída do estresse por frio (a) e em plântulas avaliadas quatro dias após a condição de estresse por frio (b). .....	153
Figura 28 –	Taxa de redução de amido (TRA) e atividade de alfa-amilase avaliada em cotilédones para os lotes de sementes com alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) do genótipo BAF55 em condições de estresse salino aos cinco dias de germinação. *:indica diferença significativa entre os níveis de vigor. ....	165
Figura 29 –	Concentração de prolina determinado em hipocótilo (a), raiz (b) e cotilédones (c) aos cinco dias de germinação os lotes de sementes com alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) do genótipo BAF55 em condições de estresse salino. *:indica diferença significativa entre os níveis de vigor.....	166
Figura 30 –	Concentração de malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) determinado em hipocótilo (a, d), raiz (b, e) e cotilédones (c, f) aos cinco dias de germinação para os lotes de sementes com alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) do genótipo BAF55 em condições de estresse salino. *:indica diferença significativa entre os níveis de vigor.....	167
Figura 31 –	Atividade de guaiacol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em hipocótilo (a, d, g), raiz (b, e, h) e cotilédones (c, f, i) aos cinco dias de germinação para os lotes de sementes com alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) do genótipo BAF55 em condições de estresse salino. *:indica diferença significativa entre os níveis de vigor.....	169

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de produtividade, área plantada e produção total de grão de feijão no Brasil das safras 2021/2022-2022/2023. ....	26
Tabela 2 – Maiores produtores brasileiros da cultura do feijão.....	26
Tabela 3 – Germinação, índice de vigor e comprimento total de plântulas (CP) obtidos para os lotes de sementes dos genótipos de feijão avaliadas em condições de ausência (Controle) e presença de estresse salino 50 mmol L <sup>-1</sup> (NaCl).....	42
Tabela 4 – Massa seca de sementes (MSS), massa seca restante nos cotilédones (MSRC), quantidade de amido antes da germinação (Amido Inicial) e após cinco dias de germinação (Amido Final) para os lotes de sementes dos genótipos de feijão avaliadas em condições de ausência (Controle) e presença (NaCl) de estresse salino. ....	44
Tabela 5 – Envelhecimento acelerado (EA), comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT) e índice de vigor (IV), obtidos para os genótipos avaliadas. ....	55
Tabela 6 – Porcentagem de germinação, teor de prolina em cotilédones e grau de umidade em cotilédones (GU) em condições ótimas (Controle) e sob estresse hídrico (PEG), obtidos para os genótipos BAF07 e BAF 55.....	56
Tabela 7 – Comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT), crescimento (C), uniformidade (U), índice de vigor (IV) das cultivares utilizadas.....	71
Tabela 8 – Primeira contagem de germinação (PCG) e porcentagem de germinação (G) em condições sem estresse (controle), estresse salino (NaCl) e estresse hídrico (PEG) para os genótipos avaliadas. ....	71
Tabela 9 – Índice de resposta cumulativa ao estresse salino (IRCES) e índice de resposta cumulativa ao estresse hídrico (IRCEH) entre os genótipos utilizadas. ....	75
Tabela 10 – Comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT), massa seca de raiz (MSR), massa seca de parte aérea (MSH) e massa seca total (MST), número de raízes secundárias (NRS), taxa de mobilização de reservas (TMR) e taxa de redução de reservas (TRRS) em condição sem estresse (Água), estresse salino (NaCl) e estresse hídrico (PEG) para os genótipos avaliados aos 10 dias após a montagem do teste. ....	76

Tabela 11 – Coeficiente de correlação de Pearson (r) para as variáveis analisadas e a sua associação com o vigor inicial do lote de sementes em condições de estresse salino (NaCl) e estresse hídrico (PEG).....	78
Tabela 12 – Coeficientes de correlação de Pearson (r) referente aos parâmetros associados ao desempenho de plântulas e a concentração de prolina em plântulas de diferentes genótipos de feijão. ....	79
Tabela 13 – Peso de mil sementes (PMS), teor de amido, teor de proteína total, primeira contagem de germinação (PCG), germinação (G), emergência a campo (EC), germinação em solução salina (GNaCl), comprimento de plântulas (CP) e massa seca de plântulas (MSP).....	87
Tabela 14 – Qualidade fisiológica dos lotes do genótipo BAF42 utilizados em relação a germinação (G), germinação em estresse hídrico (GPEG), envelhecimento acelerado (EA), comprimento total aos 3 dias (CT <sub>3dias</sub> ), massa seca de plântulas aos 3 dias (MSP <sub>3dias</sub> ) e índice de vigor (IV).....	103
Tabela 15 – Fósforo inorgânico (g Kg <sup>-1</sup> ) cotilédones de sementes de feijão com vigor alto, médio e baixo durante a germinação nos tempos de embebição de zero, dois, quatro e seis dias em condições de ausência de estresse hídrico (Controle) e presença de estresse hídrico. ....	106
Tabela 16 – Fósforo inorgânico (g Kg <sup>-1</sup> ) em eixo embrionário de sementes de feijão com vigor alto, médio e baixo durante a germinação nos tempos de embebição de zero, dois, quatro e seis dias em condições de ausência de estresse hídrico (Controle) e presença de estresse hídrico. ....	107
Tabela 17 – Teor de fitato (g Kg <sup>-1</sup> ) durante a germinação dos lotes de sementes de feijão de alto, médio e baixo vigor.....	107
Tabela 18 – Atividade da enzima fitase (U mg <sup>-1</sup> proteína) durante a germinação dos lotes de sementes de feijão de alto, médio e baixo vigor sob condições de ausência (Controle) e presença de estresse hídrico.....	109
Tabela 19 – Caracterização fisiológica referente aos lotes de sementes utilizados indicando o envelhecimento acelerado (EA), comprimento de raiz (CR <sub>3dias</sub> ), comprimento de hipocótilo (CH <sub>3dias</sub> ), comprimento total (CT <sub>3dias</sub> ) e índice de vigor (IV <sub>3dias</sub> ) dos lotes com alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) utilizados.....	117
Tabela 20 – Análise de regressão determinada para as variáveis porcentagem de germinação, comprimento total (CT), massa seca de plântulas (MSP), redução de reservas da semente (RRS), atividade de alfa-amilase e eficiência de uso de reservas da	

	semente (EURS) para alto e baixo vigor nas temperaturas de 15°C, 18°C, 25°C, 32°C e 35°C demonstrando o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a significância da curva de regressão. ....	117
Tabela 21 –	Análise de regressão determinada para as variáveis Malondialdeído (MDA), Catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX) determinadas aos cinco dias de germinação em plântulas e cotilédones das sementes de alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) submetidas a germinação em 15°C, 18°C, 25°C, 32°C e 35°C, demonstrando o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a significância da curva de regressão. ....	121
Tabela 22 –	Primeira contagem de germinação (PCG) e germinação de sementes do genótipo BAF07 com diferentes níveis de vigor (alto (AV), médio (MV) e baixo (BV)). ....	132
Tabela 23 –	Comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT) e massa seca de plântulas (MSP) avaliados nos períodos de 4 e 7 dias de germinação em condições de ausência de déficit hídrico (controle) e presença de déficit hídrico. ....	133
Tabela 24 –	Redução de reservas de cotilédones (RRC) avaliados nos períodos de 4 e 7 dias de germinação em condições de ausência de déficit hídrico (controle) e presença de déficit hídrico. ....	134
Tabela 25 –	Primeira contagem de germinação (PCG), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA) e sementes mortas (SM) dos lotes de sementes dos genótipos BAF55, BAF44 e BAF42 com contraste no vigor dos lotes utilizados em condições de ausência de frio e após estresse por frio. ....	148
Tabela 26 –	Desempenho de plântulas aos quatro dias após a condição de estresse por frio por sete dias à 5°C, demonstrando o comprimento de raiz ( $CR_{Frio}$ ), hipocótilo ( $CH_{Frio}$ ), total ( $CT_{Frio}$ ) e massa seca de plântulas ( $MSP_{Frio}$ ) para os lotes dos genótipos BAF55, BAF44 e BAF42 com contraste no vigor. ....	149
Tabela 27 –	Catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) e malondialdeído (MDA) avaliados em eixo embrionário após o estresse por frio por 7 dias a 5°C (Após o Estresse) e aos 4 dias de germinação após o estresse por frio por 7 dias a 5°C (4d após o estresse) dos genótipos BAF55, BAF44 e BAF42 com contraste no vigor dos lotes utilizados. ....	151



Tabela 28 – Germinação dos lotes de sementes do genótipo BAF55 com alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) submetidos a condições de estresse por cloreto de sódio (NaCl). .....	162
Tabela 29 – Comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT), massa seca de raiz (MSR), massa seca de hipocótilo (MSH), massa seca total (MST), proporção de mobilização de reservas para raiz (PMRR), hipocótilo (PMRH), relação raiz e hipocótilo (RH), massa seca remanescente em cotilédones (MSRC), redução de reservas da semente (RRS) e eficiência de uso de reservas da semente (EURS) dos lotes de semente com alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) submetidos a condições de estresse por cloreto de sódio (NaCl).....	164
Tabela 30 – Malondialdeído (MDA) determinado em eixo embrionário e cotilédones dos lotes de sementes de alto e baixo vigor após o envelhecimento artificial. ....	171

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1	OBJETIVO GERAL .....	23
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>25</b>
2.1	FEIJÃO ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.): IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA .....	25
2.2	QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES.....	27
2.3	GERMINAÇÃO E FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS .....	29
2.4	ESTRESSE ABIÓTICO E VIGOR DE SEMENTES .....	32
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 1 – VIGOR E ATIVIDADE DE ALFA-AMILASE EM SEMENTES DE FEIJÃO SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE SALINO .....</b>	<b>37</b>
3.1	RESUMO.....	37
3.2	INTRODUÇÃO .....	37
3.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	39
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.5	CONCLUSÃO .....	49
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 2 – MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO EM CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO HÍDRICA .</b>	<b>50</b>
4.1	RESUMO.....	50
4.2	INTRODUÇÃO .....	50
4.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	52
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.5	CONCLUSÃO .....	65
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO 3 – PROLINA, GENÓTIPO E VIGOR DE SEMENTES DE FEIJÃO DURANTE A GERMINAÇÃO EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE HÍDRICO E SALINO .....</b>	<b>66</b>
5.1	RESUMO.....	66
5.2	INTRODUÇÃO .....	66
5.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	68
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
5.5	CONCLUSÕES .....	80
<b>6</b>	<b>CAPÍTULO 4 – MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE SALINO .....</b>	<b>81</b>
6.1	RESUMO.....	81
6.2	INTRODUÇÃO .....	81
6.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	83
6.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
<b>6.5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>CAPÍTULO 5 – VIGOR DE SEMENTES E ATIVIDADE DE FITASE DURANTE A FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS DE FEIJÃO SOB RESTRIÇÃO HÍDRICA</b>	<b>98</b>
7.1	RESUMO.....	98
7.2	INTRODUÇÃO .....	98
7.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	100
7.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	102
7.5	CONCLUSÃO .....	110
<b>8</b>	<b>CAPÍTULO 6 – RESPOSTA ANTIOXIDANTE DE SEMENTES DE FEIJÃO COM CONTRASTE NO VIGOR DURANTE A GERMINAÇÃO SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO.....</b>	<b>111</b>
8.1	RESUMO.....	111

8.2	INTRODUÇÃO.....	111
8.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	113
8.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	117
8.5	CONCLUSÃO.....	125
<b>9</b>	<b>CAPÍTULO 7 – RESPOSTA FISIOLÓGICA DO VIGOR DE SEMENTES DE FEIJÃO DURANTE A GERMINAÇÃO SOB Deficit HÍDRICO .....</b>	<b>127</b>
9.1	RESUMO.....	127
9.2	INTRODUÇÃO.....	127
9.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	129
9.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	131
9.5	CONCLUSÃO.....	140
<b>10</b>	<b>CAPÍTULO 8 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E O VIGOR DE SEMENTES DE FEIJÃO APÓS ESTRESSE POR FRIO.....</b>	<b>141</b>
10.1	RESUMO.....	141
10.2	INTRODUÇÃO.....	141
10.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	143
10.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	147
10.5	CONCLUSÃO.....	155
<b>11</b>	<b>CAPÍTULO 9 – RESPOSTA FISIOLÓGICA E ANTIOXIDANTE DO VIGOR DE SEMENTES DE FEIJÃO DURANTE A GERMINAÇÃO SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE SALINO .....</b>	<b>156</b>
11.1	RESUMO.....	156
11.2	INTRODUÇÃO.....	156
11.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	158
11.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	162
11.5	CONCLUSÃO.....	172
<b>12</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>173</b>
<b>13</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>174</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>175</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>193</b>
	<b>APÊNDICE A – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>193</b>
	<b>APÊNDICE B – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>195</b>
	<b>APÊNDICE C – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>202</b>
	<b>APÊNDICE D – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>204</b>
	<b>APÊNDICE E – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>205</b>
	<b>APÊNDICE F – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>207</b>
	<b>APÊNDICE G – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 7.....</b>	<b>208</b>
	<b>APÊNDICE H – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 8.....</b>	<b>210</b>
	<b>APÊNDICE I – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 9 .....</b>	<b>212</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é produzido e consumido principalmente nos países em desenvolvimento da América Latina, África e Ásia, sendo um alimento essencial para essas regiões como uma importante fonte de proteínas, carboidratos, fibras e minerais (NADEEM *et al.*, 2021). O cultivo de feijão é comumente realizado em regiões expostas a altas e baixas temperaturas, salinidade dos solos e seca (DUTTA *et al.*, 2018), os quais afetam a emergência, crescimento, desenvolvimento e produtividade das culturas agrícolas (HAMPTON *et al.*, 2016; CASSIA *et al.*, 2018). O efeito desses estresses é dependente do momento em que ocorre, da intensidade do estresse e a espécie, podendo causar danos significativos e irreversíveis durante o processo de produção (WANG; FREI, 2011).

O uso de sementes com maior qualidade favorece o melhor desempenho das culturas agrícolas e, a qualidade de sementes é definida pelos parâmetros fisiológicos, físicos, sanitários e genéticos de um lote de sementes (MARCOS-FILHO, 2015b). Dentre esses, o parâmetro fisiológico (i.e., germinação e vigor) é estudado com maior frequência na literatura, visto que, pode ser utilizado como uma estratégia para evitar a perda de desempenho durante a emergência e formação de plântulas. As pesquisas associadas ao vigor de sementes de feijão demonstram que o vigor é uma característica é influenciada pelo genótipo (SHAIBU; IBRAHIM, 2016; GINDRI *et al.*, 2017), condições de produção e armazenamento (MARCOS-FILHO, 2015a, HAMPTON *et al.*, 2016; PINHEIRO *et al.*, 2020; MAITY *et al.*, 2023), sendo necessário cuidados específicos durante a escolha do genótipo e o processo de produção para evitar a perda da qualidade fisiológica de sementes.

O vigor é definido como o conjunto de atributos que determina o potencial para a emergência rápida, uniforme e completa de plântulas normais em uma ampla variação de condições ambientais (ISTA, 2014; MARCOS-FILHO, 2015a) e, esse conceito é baseado na maior capacidade de superação de estresses abióticos apresentada por sementes com vigor superior (MARCOS-FILHO, 2015b). Essa resposta do maior vigor do lote de sementes é verificada em condições de estresse hídrico, salino (PADILHA; COELHO; SOMMER, 2022), altas e baixas temperaturas (SBRUSSI; ZUCARELLI, 2014), sendo determinante para o melhor desempenho nessas condições.

Para que ocorra a formação de plântulas durante o processo de germinação, os compostos armazenados na semente como carboidratos, proteínas, lipídeos e fitato são hidrolisados e mobilizados em compostos que sejam possíveis de serem utilizados pelo embrião

(NONOGAKI, 2008). Entretanto, o processo de mobilização possui um controle fisiológico, bioquímico e fisiológico, o qual pode variar de acordo com o genótipo e as condições ambientais e, em condições de estresse ocorre redução da mobilização de reservas e desempenho durante a germinação (SOLTANI; GHOLIPOOR; ZEINALI, 2006; CHENG *et al.*, 2013a; PADILHA; COELHO; SOMMER, 2022) e, em geral, as sementes com maior vigor apresentam maior potencial de utilização dessas reservas, o que confere melhor desempenho (ANDRADE; COELHO, PADILHA, 2019; NERLING; COELHO; BRUMMER, 2022), contudo é necessário detalhar como as sementes de alta qualidade fisiológica realizam a mobilização e utilização das reservas em condições ambientais desfavoráveis (i.e., estresses abióticos), podendo ser uma resposta determinante para explicar as diferenças entre os lotes com vigor distinto.

Durante condições de estresse abióticos ocorre a perda da homeostase celular e, as plantas desenvolveram diversas estratégias para adaptação e superação desses estresses. Dentre essas estratégias ocorre a alteração em compostos (e.g., prolina, ácido ascórbico, carotenoides) e enzimas (e.g., catalase, peroxidases) que se apresentam como uma resposta coincidente em diversos estresses abióticos, sendo em geral, chamado de sistema antioxidante enzimático e não enzimático os quais buscam manter a homeostase durante a condição de estresse (SOARES *et al.*, 2019; BHAT *et al.*, 2022). O sistema antioxidante é uma estratégia para realizar o controle de espécies reativas de oxigênio (e.g.,  $H_2O_2$ ) as quais geram dano oxidativo em proteínas, lipídeos, organelas, DNA e RNA (MITTLER, 2017; XING *et al.*, 2023). A maior atividade antioxidante é verificada em plantas sob condições de estresse hídrico, salino, calor e frio, indicando a reposta antioxidante nessas condições e associado a maior capacidade de superação desses estresses, favorecendo o desempenho das plantas (BHAT *et al.*, 2022; LAXA *et al.*, 2019; NADARAJAH, 2020).

A relação entre mobilização de reservas das sementes e a atuação do sistema antioxidante em condições de estresse abiótico durante a germinação não são bem definidas, principalmente quando comparado entre lotes com níveis de vigor contrastante. Segundo Yu, Ho e Lo (2015), Thalmann e Santelia (2017) as enzimas envolvidas na hidrólise de reservas podem ser alteradas em condições de estresse abiótico, resultando em mudanças durante a degradação de um componente específico. De forma semelhante, é possível que a atividade antioxidante explique a capacidade de superação de estresses pelas sementes de alto vigor (MARCOS-FILHO, 2015b) atuando como diferencial entre os lotes de alto vigor, o que favorece a atividade de hidrólise, mobilização de reservas e conseqüentemente a formação de plântulas com desempenho superior mesmo sob condições de estresse abiótico por favorecer a

manutenção da homeostase vegetal. Desta forma, tem-se como hipótese geral do trabalho de que as sementes de maior vigor quando submetidas a condições de estresse abiótico durante a germinação, apresentam maior atividade enzimática associada a hidrólise de reservas e maior capacidade antioxidante, o que favorece as reações metabólicas e o melhor desempenho durante a germinação.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as diferenças associadas à hidrólise, mobilização das reservas e capacidade antioxidante em sementes e plântulas de feijão com contraste no vigor durante condições de estresse abiótico.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a importância da hidrólise e mobilização de reservas presentes em sementes para a superação de estresse hídrico, salino, altas e baixas temperaturas durante a germinação;

Avaliar a relação da atividade de alfa-amilase associada a hidrólise de componentes de reserva com o vigor do lote de sementes em condições de estresse hídrico, salino, altas e baixas temperaturas;

Verificar o efeito dos estresses abióticos durante o processo de germinação e mobilização de reservas;

Determinar a relação entre genótipo e o vigor de sementes em condições de estresse hídrico, salino, altas e baixas temperaturas;

Determinar as diferenças fisiológicas que as sementes com níveis de vigor distintos demonstram durante condições de estresse hídrico, salino, altas e baixas temperaturas;

Determinar os parâmetros fisiológicos de desempenho de plântulas associados ao vigor de sementes em condições de estresse hídrico, salino, altas e baixas temperaturas;

Determinar a resposta do sistema antioxidante vegetal em cotilédones e plântulas submetidas a condições de estresse hídrico, salino, altas e baixas temperaturas;

Determinar a associação entre atividade do sistema antioxidante e o vigor do lote de sementes durante a germinação em condições de estresse hídrico, salino, altas e baixas temperaturas;

Verificar a influência do sistema antioxidante sob a formação de plântulas com melhor desempenho em condições de estresse hídrico, salino, altas e baixas temperaturas;

Determinar a relação entre a atividade antioxidante, a mobilização de reservas e o vigor do lote de sementes.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.): IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA

Diversas evidências determinam a origem do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), sendo que, as pesquisas com o uso de marcadores bioquímicos reforçaram a existência de dois centros de origem distintos, sendo o Mesoamericano (México) e o Andino (Sul americano). Esse conhecimento fornece subsídios para a tomada de decisão na formação de bancos de germoplasma e para indicar o uso de genótipos para o melhoramento genético (GEPTS; BLISS, 1985; GEPTS *et al.*, 1986; GEPTS, 1990).

O feijão é produzido e consumido principalmente nos países em desenvolvimento na América Latina, África e Ásia, sendo um alimento essencial para essas regiões (GEPTS *et al.*, 2008). É uma importante fonte de proteínas, carboidratos, fibras e minerais na dieta humana (COSTA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2011; BARBOSA; GONZAGA, 2012). A composição química e nutricional do feijão é de 20-28% de proteínas (PEREIRA *et al.*, 2011), 52-59% de carboidratos, 2,5% de lipídeos e, 6-8% de fibras (COSTA *et al.*, 2006). Em relação ao teor de nutrientes minerais, são encontrados cálcio (0,43 g kg<sup>-1</sup>), magnésio (1,58 g kg<sup>-1</sup>), potássio (14,69 g kg<sup>-1</sup>), fósforo (4,84 g kg<sup>-1</sup>), fitato (6,31 g kg<sup>-1</sup>), zinco (43,70 mg kg<sup>-1</sup>) e ferro (94,92 mg kg<sup>-1</sup>). Essa composição bioquímica pode variar com o genótipo avaliado e com as condições de cultivo (PEREIRA *et al.*, 2011).

No geral, os países consumidores de feijão são os grandes produtores e, por esse motivo, o fluxo de exportação do grão não é grande como de outras culturas. Dentre os maiores produtores, se destacam por ordem de produção, Índia, Myanmar, Brasil, EUA, China, México, Tanzânia, Uganda, Quênia e Ruanda (FAO, 2023).

No Brasil, o feijão é um dos alimentos mais populares, sendo considerado um alimento básico e de grande importância para a população rural e urbana (COSTA *et al.*, 2006), em que, o consumo *per capita* brasileiro no ano de 2013, foi de 16,07 kg por habitante ao ano (FAO, 2023). Dentre os países Sul Americanos, o Brasil se destaca como o maior produtor (com aproximadamente 3000 mil toneladas anuais) e consumidor. A produção brasileira é diversificada, sendo cultivados o feijão comum cores, feijão preto e feijão caupi. Contudo, observa-se que a produção e a área cultivada não possuem grandes alterações nas últimas duas safras (Tabela 1) (CONAB, 2023).



Tabela 1 – Dados de produtividade, área e produção total de grão de feijão no Brasil, nas safras 2021/2022 e 2022/2023

Safra	Produtividade (Kg ha <sup>-1</sup> )	Área (mil hectares)	Produção (mil toneladas)
2021/22	1046	2859	2990
2022/23	1123	2742	3079
Média	1048	2800	3034

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023, a partir dos dados da CONAB (2023).

A produção de feijão no Brasil ocorre em todo o território, e os estados com maior destaque na produção são Paraná, Minas Gerais, Bahia, Goiás, São Paulo. O estado Santa Catarina é o 7º maior produtor de feijão do Brasil contribuindo com 108 mil toneladas do grão na safra 2021/2022 em uma área de 66,5 mil hectares. Os dez maiores produtores brasileiros de feijão compõem 88% da produção total do país e 80% da área cultivada com a cultura (Tabela 2). A média da produção de feijão brasileira é variável com a safra, dessa forma, considerando as últimas duas safras de cultivo (2021-2023) a média brasileira foi de 1048 kg ha<sup>-1</sup> (Tabela 1) (CONAB, 2023).

Tabela 2 – Maiores produtores brasileiros da cultura do feijão

Posição	Estado	Produção total (mil toneladas)	Produtividade (kg ha <sup>-1</sup> )	Área (mil hectares)
1	PR	749,9	1.563,0	479,8
2	MG	484,9	1.542,2	314,4
3	BA	283,7	695,3	408,0
4	GO	281,9	2.458,1	114,7
5	MT	255,3	1.622,9	157,3
6	SP	184,9	2.230,2	82,9
7	SC	108,4	1.630,5	66,5
8	CE	106,4	293,1	363,0
9	TO	97,6	1.132,1	86,2
10	PE	84,8	373,8	227,0
Total	-	2.637,8	-	2,299
Total Brasil	Brasil	2.989,0	-	2.859,0
% Representada pelos 10 maiores		88%	-	80%

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023, a partir dos dados da CONAB (2023).

No Brasil, mesmo com o aumento de produtividade registrado pela CONAB em relação ao início dos anos 2010 (935,4 kg ha<sup>-1</sup>), nos últimos anos a produtividade não tem apresentado aumento se comparado a outras culturas, o que faz com que a baixa produtividade do feijão seja algo negativo. Dentre os fatores associados a isso, a menor taxa de utilização de sementes é um dos fatores que contribuem como uma das causas do baixo rendimento da cultura no Brasil

(MENTEN *et al.*, 2006), visto que o potencial produtivo médio das cultivares no mercado é de aproximadamente 3500 kg ha<sup>-1</sup>.

Os dados fornecidos pela Associação Brasileira de Sementes e Mudas (ABRASEM, 2021) revelam que a taxa de utilização de sementes (TUS) de feijão no Brasil é de 18%, a partir disso, observa-se que de toda a área cultivada apenas 642,8 mil hectares são utilizados sementes legais conforme descrito pela Lei 10.711, 05 de agosto de 2003. Conseqüentemente, para aproximadamente 80% da área cultivada, as sementes utilizadas são salvas.

Em relação ao estado de Santa Catarina, de toda a área do estado dedicada à produção de feijão, 2.675 hectares foram destinados à produção de sementes com 92 campos de produção, sendo que, os campos de produção de sementes segundo dados fornecidos pelo Sistema de Gestão da Fiscalização (SIGEF, 2023), encontram-se distribuídos na região Serrana, Oeste e Norte Catarinense. Constata-se que o estado produz sementes para suprir a sua necessidade, contudo, a TUS do estado é de 16%, sendo menor que a média nacional (ABRASEM, 2021).

A utilização de sementes produzidas dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira é indispensável, já que, possuem maior qualidade fisiológica em relação às sementes salvas (RAMPIM *et al.* 2016). Dessa forma, o uso de sementes de qualidade é determinante para a obtenção de um estande de plantas homogêneo no campo e ganho de produtividade de grãos (MAMBRIN *et al.*, 2015) sendo uma estratégia, além de outras práticas de manejo, para aumentar o rendimento e produtividade da cultura no Brasil e o ganho econômico dos produtores rurais.

## 2.2 QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES

O processo de formação de sementes inicia com a fusão dos gametas masculino e feminino, sendo esse processo conhecido como fertilização ou dupla fecundação (COPELAND; MCDONALD, 2001). O processo de desenvolvimento de uma semente é dividido em três fases distintas, sendo inicialmente a histodiferenciação, seguida da maturação e finalizando com a dessecação (CASTRO *et al.*, 2004). Esse conjunto de eventos sucessivos é necessário para que a semente seja formada e preparada para posteriormente obter sucesso na germinação (MARCOS-FILHO, 2015a).

Após a produção de sementes, é necessário realizar a avaliação da qualidade do lote de produzido, sendo importante para os consumidores, indústria e, conseqüentemente para a semeadura (HUANG *et al.*, 2015). A avaliação completa da qualidade envolve os atributos

genéticos (i.e., pureza genética), físicos (e.g., ausência de impurezas), fisiológicos (i.e., alta germinação e vigor) e sanitários (e.g., ausência de patógenos) (FRANÇA-NETO *et al.*, 2016).

Todos os atributos de qualidade possuem igual importância, contudo, o atributo fisiológico é o que possui maior atenção da pesquisa (MARCOS-FILHO, 2015a). A máxima qualidade fisiológica ocorre após as transformações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas recorrentes no óvulo fertilizado, sendo esse momento conhecido como maturação fisiológica ou maturidade fisiológica. A partir desse momento, ocorre redução na qualidade fisiológica ocasionado pelo processo de deterioração (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

A qualidade fisiológica de sementes pode ser afetada por diversos fatores durante o processo de produção como ocorrência de estresses em períodos críticos (HAMPTON *et al.*, 2016), deterioração por umidade, danos causados por insetos e por microrganismos, colheita em momento inadequado, entre outros (FRANÇA-NETO *et al.*, 2016). O genótipo também possui relação com a qualidade fisiológica de sementes, sendo que, alguns genótipos possuem potencial para produção de sementes com maior porcentagem de germinação e vigor (MICHELS *et al.*, 2014).

No geral, a avaliação da qualidade fisiológica de sementes pode ser determinada a partir do uso do teste de germinação, o qual é realizado em condições ideais (e.g., temperatura, umidade e substrato) que possui normas e procedimentos pré-estabelecidos para sua realização (MARTINS *et al.*, 2014; BRASIL 2009). Contudo, o teste tradicional de germinação possui limitações, já que é baseado em estruturas essenciais e realizado em condições ótimas, não sendo possível apenas com este teste, definir a resposta de determinado lote de sementes em condições de campo, sendo necessário o uso de testes de vigor (MCDONALD, 1993).

Isso ocorre, pois em condições ótimas de germinação, sementes de diferentes lotes podem possuir alta germinação. Contudo, esses mesmos lotes de sementes, quando submetidos a uma condição de estresse, podem apresentar diferenças na porcentagem final de germinação, o que resulta das diferenças no vigor entre os lotes. Por esse motivo ocorrem diferenças no momento do estabelecimento a campo (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). Baseado nessas diferenças em relação a condições de estresse, o termo vigor foi definido como o potencial de formação de plântulas normais de forma rápida e uniforme durante a emergência em uma ampla variação de condições de ambiente (AOSA, 1983).

Considerando a ineficiência do teste de germinação para avaliar a resposta do lote em situações não favoráveis (temperatura, disponibilidade de água, características de solo, salinidade, etc.), foram estabelecidos os ‘Testes de Vigor’, os quais buscam complementar a avaliação do potencial fisiológico de um lote de sementes (MARCOS-FILHO, 2015b). O uso

de testes de vigor é a maneira mais confiável de determinar o potencial fisiológico do lote de sementes e conseqüentemente a relação com a emergência a campo (TEKRONY, 1983; KOLASINSKA *et al.*, 2000).

A avaliação do vigor pode ser realizada utilizando diversos testes, como: teste de desempenho de plântulas, comprimento de raiz primária, índice de velocidade de germinação, emergência a campo, germinação em condições de estresse (hídrico, alta e baixa temperatura, salinidade, etc.), condutividade elétrica, deterioração controlada, envelhecimento acelerado, teste de frio, tetrazólio, entre outros (POPINIGIS, 1985; KRZYZANOWSKI *et al.*, 1999; MATTHEWS *et al.*, 2012; CORBINEAU *et al.*, 2012). Considerando a imprevisibilidade das condições de campo, é interessante utilizar mais de um teste de vigor para determinar o potencial fisiológico de um lote de sementes (MARCOS-FILHO, 2015a; KRZYZANOWSKI *et al.*, 2018).

Dessa forma, as sementes com maior vigor possuem maior potencial de sucesso durante a germinação a campo isso favorece o estabelecimento inicial da cultura e a formação de plântulas com potencial produtivo elevado (NAKAGAWA, 1999; FRANÇA-NETO *et al.*, 2016). A importância do vigor de sementes nesses pontos já está determinada na literatura, em que, para a cultura do feijão a maior porcentagem de emergência a campo (GINDRI *et al.*, 2016), superação de estresses abióticos (PADILHA; COELHO, SOMMER; 2022) e ganho de produtividade (MONDO; NASCENTE; CARDOSO-NETO, 2016) são observados.

### 2.3 GERMINAÇÃO E FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS

O processo de germinação pode ser conceituado de duas formas distintas, sendo uma do ponto de vista da fisiologia vegetal e um do ponto de vista da tecnologia de sementes. O conceito fisiológico de germinação considera as sementes que apresentarem protrusão da raiz primária e, nesse momento, finaliza a germinação. Por outro lado, o conceito agrônomo baseia-se na formação de plântulas normais para determinar a germinação final do lote (MARCOS-FILHO, 2015a).

Ao monitorar o teor de água das sementes durante o processo de germinação é possível visualizar um padrão trifásico de hidratação (CASTRO *et al.*, 2004). A fase I do processo é caracterizada pela acentuada absorção de água, esse processo é essencial para reativar o metabolismo e iniciar a atividade celular como a respiração, o reparo de mitocôndrias, reparo de DNA e, tradução e degradação de RNAm; A fase II é caracterizada pelo repouso fisiológico (não ocorrem grandes alterações no teor de água), e ocorre a transcrição e tradução de novos

RNAm, reparo de DNA, respiração, reparo e multiplicação mitocondrial e, início da hidrólise e mobilização de reservas; A fase III é o processo pós germinativo, marcado pela protrusão da raiz primária (BEWLEY *et al.*, 2013).

Nesse contexto, o tempo que uma semente leva para chegar à protrusão da raiz primária (Fase III) é dependente da espécie, do teor de água das sementes (MARCOS-FILHO, 2015a) e, da qualidade fisiológica do lote de sementes (MATTHEWS *et al.*, 2012). Em relação à qualidade fisiológica, as sementes que apresentam menor tempo de hidratação até a protrusão da raiz primária possuem maior vigor, sendo uma forma rápida de avaliar o potencial fisiológico de sementes de melancia, melão, pepino (MAVI; DEMIR; MATTHEWS *et al.*, 2009), feijão (EHRHARDT-BROCARDI; COELHO, 2016) e milho (PRAZERES; COELHO, 2017).

Durante a fase III, é o momento em que ocorre a maior parte da mobilização das reservas armazenadas na semente (CHENG *et al.*, 2015). Dentre as reservas armazenadas, os principais compostos de reserva existentes em sementes e utilizados durante o processo de germinação e formação de plântulas são: amido, proteínas, lipídeos e ácido fítico, os quais são hidrolisados em compostos passíveis de utilização para a formação de outras moléculas e tecidos. (BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

O armazenamento das reservas acumuladas durante o processo de maturação é realizado em tecidos especializados, em que, nas espécies da família *Poaceae* são localizadas principalmente no endosperma e, nas espécies da família *Fabaceae* situam-se nos cotilédones (MARCOS-FILHO, 2015a). Para que ocorra a formação da plântula, o embrião necessita de nutrientes fornecidos pelo processo de hidrólise e mobilização de reservas e, para que isso ocorra, as reservas armazenadas são hidrolisadas e convertidas em formas solúveis utilizáveis de açúcares (e.g., maltose, glicose) e aminoácidos (BEWLEY *et al.*, 2013).

O processo de mobilização é crucial para o estabelecimento de plântulas a campo (TAN-WILSON; WILSON, 2011), visto que, as sementes com maior capacidade de mobilização de reservas formam plântulas com melhor desempenho e, essa capacidade é relacionada ao vigor das sementes (DELGADO; COELHO; BUBA, 2015; EHRHARDT-BROCARDI; COELHO, 2016).

A mobilização de reservas é afetada por dois processos: a formação de enzimas e a atividade de enzimas. Contudo, para compreender a regulação da mobilização é necessário conhecimento da taxa de utilização de reservas, taxa de formação de enzimas e da atividade enzimática (BEWLEY *et al.*, 2013). Nesse contexto, foi observado que a maior atividade das enzimas amilase e sacarose sintase, favorecem o processo de mobilização e conseqüentemente a formação de plântulas de arroz com maior vigor por realizar a degradação do amido e

disponibilização de glicose para a posterior formação de sacarose e mobilização para o eixo embrionário (CHENG *et al.*, 2015; CHENG *et al.*, 2018). De forma semelhante, constata-se que em sementes de milho com maior vigor, a atividade de alfa-amilase é maior, favorecendo a disponibilidade de compostos solúveis ao embrião (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Para a cultura do feijão essa associação também foi verificada por Padilha, Coelho e Ehrhardt-Brocardo (2021) em estágios mais avançados da germinação (i.e., 5 dias).

A composição bioquímica das sementes, assim como a atividade enzimática, pode influenciar qualitativamente e quantitativamente a disponibilidade de compostos passíveis de pronta utilização pelo embrião (DELARMELINO-FERRARESI *et al.*, 2014). Nesse contexto, Kapoor *et al.*, (2011) observaram que sementes de arroz com maior deterioração, apresentam menor teor de proteína solúvel o que afetou a formação de plântulas. Em cultivares de soja com diferentes níveis de vigor foi verificado que sementes com alto vigor possuem maior teor de proteínas solúveis, amido e açúcares solúveis, assim como maior utilização de reservas, contudo a atividade de alfa-amilase não apresentou associação com o vigor (HENNING *et al.*, 2010). Possivelmente a enzima não apresentou associação devido ao baixo teor de amido em sementes de soja, indicando que a mesma enzima pode apresentar ou não associação com o vigor e a mobilização de reservas, dependendo a espécie avaliada. Em que, a hidrólise das reservas difere em monocotilédones e dicotiledônias apresentando especificidades entre as famílias e momento de determinação da atividade da enzima (BEWLEY *et al.*, 2013; NONOGAKI, 2008), dessa forma a atividade enzimática pode ser ou não associada ao vigor do lote de sementes dependendo a espécie avaliada.

A utilização das reservas é determinante para a formação de plântulas em que a utilização de fósforo e açúcares, assim como a maior hidrólise de componentes de reserva foi associada ao vigor do lote de sementes de milho (NEERLING; COELHO; BRUMMER, 2022; NEERLING; COELHO; BRUMMER, 2018) sendo parâmetros importantes na diferenciação de lotes de sementes. Essa relação da maior utilização de reservas ocorre também em sementes de feijão, e é verificada em condições de estresse abiótico, onde lotes de maior vigor apresentaram maior capacidade de utilização e mesmo sob condições de estresse hídrico e salinidade, formando plântulas com melhor desempenho (i.e., comprimento de plântulas e massa seca de plântulas) (PADILHA; COELHO; SOMMER, 2022). Nesse contexto, a importância da mobilização de reservas ocorre também em condições de estresse abiótico, podendo ser determinante nessas condições.

O vigor do lote de sementes favorece o desempenho de plântulas em uma ampla faixa de condições ambientais (MARCOS-FILHO, 2015b) e essa característica é bastante relacionada

com o processo de deterioração do lote de sementes, visto que, os lotes de sementes envelhecidos artificialmente tendem a apresentar, menor porcentagem de germinação, velocidade de germinação, crescimento lento e desuniforme, sendo o resultado da menor síntese de enzimas associadas a hidrólise (PADILHA; COELHO; EHRHARDT-BROCARDO; 2021; PADILHA; COELHO; SOMMER, 2022b). Isso ocorre, pois o processo de deterioração resulta em diversas alterações fisiológicas, metabólicas e genéticas e essas alterações resultam em perda de desempenho dos lotes de sementes durante a germinação (XING *et al.*, 2023). Dentre essas alterações, o dano oxidativo pode ser gerado por espécies reativas de oxigênio (e.g., peróxido de hidrogênio, radical superóxido, radical hidroxila) os quais interagem com a membrana plasmática gerando a degradação de membranas celulares e produção de malondialdeído (indicador de peroxidação lipídica), material genético (e.g., DNA e RNA) e proteínas (EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019).

Dessa forma, como o processo de hidrólise e utilização de reservas é dependente das condições ambientais, da espécie e do vigor do lote de sementes, sabe-se que a maior quantidade de reservas mobilizadas favorece a formação de plântulas com maior vigor, favorecendo o estabelecimento inicial de plântulas (SOLTANI; GHOLIPOOR; ZEINALI, 2006; SHARAFI *et al.*, 2012; ANDRADE; COELHO; PADILHA, 2019) e essa maior utilização é influenciada pelo vigor do lote de sementes, sendo que pode ser determinante para a superação de estresses, dando suporte ao sistema antioxidante vegetal (VERMA *et al.*, 2015; PADILHA; COELHO, SOMMER, 2022), em que, as espécies reativas de oxigênio geradas em condições de estresse sinalizam a necessidade da hidrólise para mobilizar reservas para o eixo e realizar o crescimento rápido do eixo embrionário (VERMA *et al.*, 2015).

## 2.4 ESTRESSE ABIÓTICO E VIGOR DE SEMENTES

Um dos principais objetivos da agricultura atual é realizar a produção agrícola em vista do aumento da população mundial e, para isso, é necessário que essa produção se mantenha mesmo sob condições de estresses bióticos e abióticos (BHAT *et al.*, 2022; LONE *et al.*, 2021). Dentre os principais limitantes da produção agrícola, os estresses abióticos são extremamente relevantes, sendo que limitam o local onde uma determinada cultura será cultivada assim como limitam a produção das culturas (HAMPTON *et al.*, 2016; NADARAJAH, 2020).

Atualmente os estresses abióticos são objeto de estudo de diversos pesquisadores. As mudanças climáticas referem-se a uma mudança estatisticamente diferente no estado do clima nos últimos anos (i.e., 30 anos), e essas, resultam do aumento da emissão de gases para a

atmosfera, as quais geram aumento da temperatura do planeta (MUNAWEERA *et al.*, 2022; UL-HASSAN *et al.*, 2022). Os estresses originados das mudanças climáticas resultam em diversas alterações, morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares durante o desenvolvimento (NADARAJAH, 2020). Dentre esses estresses afetados pelo aquecimento global, a restrição hídrica, salinização dos solos, altas e baixas temperaturas são os que geram a maior perda na produção (HAMPTON *et al.*, 2016; BHAT *et al.*, 2022).

As mudanças climáticas são causadas pela emissão de gases de efeito estufa (GEE), e hoje, há um consenso entre os pesquisadores de que a causa dessas mudanças é de origem antropogênica (BISBIS *et al.*, 2018). Dentre os GEE, o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é o maior responsável pelo aquecimento global, outros gases como metano (CH<sub>4</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), substâncias destruidoras de ozônio (ODSs), hidrofluorcarbonetos (HFCs), hexafluoreto de enxofre (SF<sub>6</sub>) e perfluorocarbonos (PFCs) também afetam as alterações climáticas (MONTZKA; DLUGOKENCKY; BUTLER, 2011). O efeito do aumento dos GEE na atmosfera é principalmente o aumento da temperatura (ADHIKARI *et al.*, 2015), a partir dos registros observados nas últimas décadas é possível dizer que comparado a década de 80, houve um aumento de 1 °C até o presente momento (HANSEN *et al.*, 2016). Considerando que existem previsões em que o aumento da temperatura possa chegar a 5,5 °C até o fim do século (ADHIKARI *et al.*, 2015), existe o interesse dos governos mundiais em manter o aumento da temperatura do planeta menor que 2 °C a partir da redução de emissão de GEE (BISBIS *et al.*, 2018).

As mudanças climáticas afetam a agricultura principalmente em relação ao efeito negativo em todo o ciclo da cultura desde a semeadura até a maturidade (KORRES *et al.*, 2016; NADEEM *et al.*, 2019a). Durante o processo de produção os estresses ambientais afetam o crescimento das culturas, enchimento e tamanho de grãos, conseqüentemente, causando a redução da produção e da qualidade de sementes (HAMPTON *et al.*, 2013; LIPIEC *et al.*, 2013; HAMPTON *et al.*, 2016). Da mesma forma, os estresses podem afetar a composição bioquímica de sementes em relação à formação e acúmulo de amido (WANG; FREI *et al.*, 2011; BECKLES; THITISAKSAKUL, 2014), proteínas (BALLALLOUI *et al.*, 2015) e lipídeos (ALI *et al.*, 2010; UARROTA *et al.*, 2018).

O efeito dos estresses ambientais é dependente de alguns fatores como o momento, a intensidade e a espécie submetida ao estresse. Esses fatores são determinantes para verificar os danos que ocorrem durante o processo de produção (WANG; FREI *et al.*, 2011) e germinação (MARCOS-FILHO, 2015a).



Durante o processo de germinação, a água e a temperatura são fatores determinantes, a ocorrência de estresses nesse período pode afetar a emergência a campo e o desempenho de plântulas (BEWLEY *et al.*, 2013; MARCOS-FILHO, 2015a). A mobilização das reservas é afetada em situações de estresse, reduzindo a quantidade de reservas mobilizadas, sendo esse efeito observado em sementes de trigo (BLUM; SINMENA, 1994; SOLTANI; GHOLIPOOR; ZEINALI, 2006), grão de bico (SOLTANI *et al.*, 2002), caju (VOIGT *et al.*, 2009) milho, cevada e alfafa (SHARAFI *et al.*, 2012), produzindo assim plântulas com menor vigor e, dessa forma, afetando o desempenho das plântulas a campo.

Em condições de estresse abióticos as plantas desenvolveram estratégias para realizar a adaptação e conseqüentemente superação desses estresses, sendo essas estratégias diferentes para cada espécie, contudo, diversas alterações fisiológicas e bioquímicas são semelhantes entre os organismos vegetais que buscam evitar os danos oxidativos durante condições de estresse (LONE *et al.*, 2021; MUNAWEERA *et al.*, 2022). Nesse sentido, busca-se identificar os aspectos associados a maior capacidade de adaptação das culturas aos estresses impostos para determinar como essas alterações podem ser utilizadas para o melhoramento de plantas.

De forma geral, o sistema antioxidante pode ser dividido em sistema antioxidante enzimático e não enzimático (SOARES *et al.*, 2019). Durante condições de estresse abiótico as plantas acumulam espécies reativas de oxigênio (ROS) e, o acúmulo excessivo dessas moléculas geram dano em ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos gerando dano celular muitas vezes irreversível (REJEB *et al.*, 2014). Dentre as espécies reativas de oxigênio tem-se o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), em que, quando a capacidade antioxidante não é suficiente ocorre o acúmulo destas e conseqüentemente dano celular (MITTLER, 2017).

Dentre os estresses abióticos citados como de maior importância (i.e., Estresse hídricos, estresse salino, estresse por frio e estresse por calor) diversos mecanismos apresentam relação com a tolerância ou a capacidade de superação de um determinado estresse, sendo que algumas respostas são coincidentes entre plantas e estresses (ASSEFA *et al.*, 2019).

O estresse hídrico afeta as culturas de forma significativa, e entre os mecanismos associados a resposta nessa condição tem-se os mecanismos não enzimáticos que são observados em relação ao acúmulo de metabólitos vegetais (e.g., açúcares, prolina) os quais apresentam função de sinalização do estresse, assim como, função osmoprotetora evitando a oxidação de proteínas, lipídeos e material genético durante essa condição (NADEEM *et al.*, 2019a). Essa relação também é observada em estresses salino (NADEEM *et al.*, 2019b), estresse por frio (BHAT *et al.*, 2022; FREITAS *et al.*, 2019) e estresse por calor (HASSAN *et*

*al.*, 2022). E essa relação é associada a maior tolerância de genótipos a essas condições de estresse, sendo um ponto relevante no melhor desempenho. Diversos outros componentes apresentam acúmulo em condições de estresse abiótico, como metionina, glutathiona, ácido ascórbico, flavonóides, carotenóides, proteínas *late embryogenesis abundant* (LEA) e podem ser associados a tolerância a estresses abióticos (SOARES *et al.*, 2019).

Outro mecanismo observado como resposta a esses estresses abióticos é o aumento da atividade enzimática antioxidante das plantas, buscando superar a condição de estresse imposta e evitar o dano celular (NADEEM *et al.*, 2019a; LONE *et al.*, 2021; HASSAN *et al.*, 2022) sendo esse o mecanismo enzimático antioxidante.

O controle de espécies reativas de oxigênio é feito principalmente pelo sistema antioxidante enzimático o qual busca degradar as moléculas reativas em moléculas não tóxicas (e.g., H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>) (SOARES *et al.*, 2019; DREYER; DIETZ, 2018). Dentre as enzimas associadas a degradação de espécies reativas de oxigênio e associação com o sistema antioxidante, tem-se a catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GPX), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutathiona peroxidase (GP), glutathiona redutase (GR) dentre outras (SOARES *et al.*, 2019). A maior atividade enzimática antioxidante de diversas enzimas foi verificada em diversos trabalhos de pesquisa, e sinalizadas como responsáveis pela maior tolerância de diversas espécies vegetais a estresses abióticos, sendo essas determinantes para o melhor desempenho durante os estresses (DREYER; DIETZ, 2018; NADEEM *et al.*, 2019a)

O vigor de sementes nesse cenário de estresses abióticos entra como uma estratégia para beneficiar o desenvolvimento das culturas em um dos momentos críticos do processo produtivo. O melhor desempenho de sementes com vigor superior em condições de estresse abiótico é conhecido (MARCOS-FILHO, 2015b), contudo, as respostas fisiológicas e bioquímicas expressadas pelas sementes de maior vigor, as quais, determinam esse melhor desempenho não estão completamente elucidadas. Segundo Andrade, Coelho e Padilha, (2019) o processo de mobilização de reservas é determinante e explica parcialmente o vigor de um lote de sementes. E essa relação é observada também em estresses abióticos (PADILHA; COELHO; SOMMER, 2022).

Contudo, diversas respostas ocorrem durante uma condição de estresse abiótico, conforme explanado acima e, outros mecanismos durante a condição de estresse abiótico podem favorecer o melhor desempenho de sementes de maior vigor nessas condições, sendo necessário elucidar esses mecanismos, buscando identificar como potencializar essa resposta durante a germinação e emergência a campo. A capacidade antioxidante é um dos pontos que podem ser

determinantes e apresentar associação com o vigor do lote de sementes se as plântulas produzidas por sementes de maior vigor apresentaram desempenho superior e maior atividade antioxidante. Considerando o abordado, essa resposta antioxidante ou o conjunto entre atividade antioxidante e mobilização de reservas, podem explicar o melhor desempenho do lote de sementes durante condições de estresse abiótico.

### 3 CAPÍTULO 1 – VIGOR E ATIVIDADE DE ALFA-AMILASE EM SEMENTES DE FEIJÃO SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE SALINO <sup>1</sup>

#### 3.1 RESUMO

As sementes com alto vigor possuem maior capacidade de hidrólise e mobilização das reservas armazenadas resultando na formação de plântulas vigorosas, sendo esse comportamento observado em condições de estresse abiótico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação da enzima alfa-amilase em lotes de sementes de feijão com contraste no vigor quando submetidos a condições de ausência e presença de estresse salino, buscando identificar a relação desta enzima com o vigor do lote de sementes nessas condições. Sete genótipos de feijão foram utilizados. A qualidade fisiológica foi determinada pela germinação, índice de vigor e comprimento de plântulas. A mobilização de reservas foi avaliada em condições com ausência e presença de estresse salino simulado com solução de NaCl com concentração de 50 mmol L<sup>-1</sup>. As variáveis analisadas referentes a mobilização de reservas foram a redução das reservas, taxa de redução das reservas, massa seca de plântulas, taxa de mobilização de reservas, amido, taxa de redução de amido e atividade da alfa-amilase. Os resultados demonstraram que a condição de estresse afetou negativamente todas as variáveis avaliadas, contudo, os genótipos classificados como de maior vigor apresentaram melhor desempenho fisiológico sob o estresse. A alfa-amilase apresentou associação positiva com o vigor do lote de sementes favorecendo a utilização das reservas. O estresse salino em sementes de feijão afeta o desempenho de plântulas e reduz a atividade da alfa-amilase durante a germinação e, os lotes de sementes com alto vigor apresentaram maior atividade da enzima em ambas as condições

#### 3.2 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é produzido e consumido principalmente nos países em desenvolvimento da América Latina, África e Ásia, sendo uma das leguminosas com maior importância mundial devido ao seu uso para a alimentação humana como fonte de amido, proteína, fibras e minerais (MUKANKUSI *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2016).

O cultivo do feijão é comumente realizado em regiões áridas e semiáridas, suscetíveis à salinização natural dos solos (DUTTA *et al.*, 2018). Os solos que apresentam salinidade podem comprometer a produtividade agrícola devido aos efeitos negativos na germinação, afetando o estande de plantas, comprimento de raízes, parte aérea e acúmulo de biomassa (LIANG *et al.*,

---

<sup>1</sup> Artigo Publicado na revista Semina: Ciências Agrárias (10.5433/1679-0359.2021v42n6SUPL2p3633)

2018). Uma das estratégias para favorecer o estabelecimento inicial das plântulas nessas condições, é o uso de sementes com alta qualidade fisiológica, visto que o vigor é o conjunto de atributos que determina o potencial para a emergência rápida e uniforme de plântulas em uma ampla diversidade de condições ambientais (ISTA, 2014), apresentando impacto positivo na produtividade da cultura do feijão (MONDO *et al.*, 2016).

O estabelecimento de plântulas a campo é determinado pelo processo heterotrófico de crescimento (GOMMERS; MONTE, 2018), dependente da hidrólise e mobilização dos componentes armazenados no tecido de reserva da semente para o eixo embrionário (BEWLEY *et al.*, 2013). A eficiência na hidrólise e mobilização das reservas favorece a formação de plântulas vigorosas, um dos aspectos associados ao vigor de sementes (CHENG *et al.*, 2015; ANDRADE; COELHO; PADILHA, 2019). Em geral, esse processo pode ser influenciado por condições adversas impostas pelo ambiente, como o estresse hídrico, salino, térmico, metais pesados, entre outros (KALAI *et al.*, 2015; EL-MOWAFY; KISHK, 2017).

As sementes de leguminosas contém em sua composição uma grande quantidade de carboidratos, entre eles o amido (TAYADE *et al.*, 2019). A avaliação da hidrólise e mobilização do amido em espécies da família *Fabaceae* é pouco explorada na literatura, quando comparados aos estudos relacionados com as espécies da família *Poaceae* (BEWLEY *et al.*, 2013). O amido é fonte de energia e metabólitos prontamente disponíveis para o crescimento das plântulas, sendo a alfa-amilase a principal enzima responsável pela sua hidrólise, a qual favorece o estabelecimento de plântulas (YU; HO; LO, 2015).

Diversos estudos buscaram associar a atividade da enzima alfa-amilase com o vigor inicial do lote de sementes. Em sementes de milho submetidas a germinação em condições sem estresse abiótico as sementes com alto vigor apresentaram maior atividade da enzima alfa-amilase durante o processo de germinação e formação de plântulas (OLIVEIRA *et al.*, 2013), o mesmo foi observado em sementes de arroz (CHENG *et al.*, 2013). Entretanto, em sementes de soja não foi verificado a relação entre o maior vigor das sementes e a atividade dessa enzima (HENNING *et al.*, 2010). Em trigo, Chen *et al.* (2017) demonstraram que a atividade da alfa-amilase e o vigor de sementes foram positivamente correlacionados em condição de germinação na ausência de estresse, contudo, não apresentou associação positiva quando as sementes foram submetidas a estresse hídrico.

Associar a atividade da enzima alfa-amilase com o vigor das sementes, e o quanto o vigor pode proporcionar um melhor desempenho fisiológico durante uma situação de estresse abiótico em função do envolvimento desta enzima, é muito relevante para o entendimento da qualidade fisiológica das sementes de feijão, visto a deficiência de trabalhos com este tema.

Desta forma, tem-se como hipótese deste trabalho que os lotes de sementes de feijão com maior vigor possuem maior atividade da alfa-amilase em condição de ausência e presença de estresse salino, onde a maior hidrólise de amido favorece a formação de plântulas com melhor desempenho fisiológico nessas condições. Com base nas hipóteses apresentadas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a relação da enzima alfa-amilase em lotes de sementes de feijão com contraste no vigor em condições ideais e de estresse salino, buscando identificar a relação desta enzima com o vigor inicial do lote de sementes.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os lotes de sementes dos genótipos BAF07, BAF13, BAF23, BAF42, BAF55, BAF81 e BAF112. As sementes utilizadas foram produzidas no município de Lages, Santa Catarina, na área experimental do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC-CAV) na safra 2018/2019. Após a colheita, as sementes foram homogeneizadas e 1000 g de sementes foram separadas para obtenção da amostra média, e posteriormente obtida a amostra de trabalho para as análises posteriores (BRASIL, 2009). As sementes foram armazenadas em câmara seca ( $10 \pm 2$  °C e  $50 \pm 5\%$  de umidade relativa) até a realização das análises.

A caracterização dos lotes de sementes quanto a sua qualidade fisiológica foi determinada por meio dos testes de germinação, índice de vigor e comprimento de plântulas, conduzidos com ausência (Controle) e presença de estresse salino (NaCl).

O estresse salino foi realizado utilizando uma solução com  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de cloreto de sódio (NaCl) com condutividade elétrica de  $5,07 \text{ dS m}^{-1}$  para umedecimento do papel. O umedecimento foi realizado na proporção de  $2,5 \text{ mL g}^{-1}$  de papel seco.

O teste de germinação conduzido com três repetições em germinador Mangelsdorf com temperatura de  $23 \pm 2$  °C utilizando fotoperíodo (12 h com luz e 12 h em escuro), sendo a semeadura realizada em substrato papel Germitest® na forma de rolo umedecido com água destilada ou solução salina na proporção de  $2,5 \text{ mL g}^{-1}$  de papel seco. As contagens do número de plântulas normais foram realizadas conforme descrito por BRASIL (2009), aos cinco e nove dias após o início do teste.

Para a determinação do índice de vigor foram utilizadas três repetições de 20 sementes dispostas na parte superior do papel (KRZYZANOWSKI *et al.*, 2020). Os rolos foram umedecidos na proporção de  $2,5 \text{ mL g}^{-1}$  de papel seco com água destilada (Controle) ou solução salina (NaCl) conforme descrito anteriormente e mantidos em germinador Mangelsdorf a  $23 \pm$

2 °C durante três dias. Após o tempo determinado, as plântulas consideradas normais foram mensuradas quanto aos comprimentos de hipocótilo, raiz e total com auxílio de paquímetro digital. O cálculo do índice de vigor (IV) foi determinado conforme equação (1) proposta por Sako *et al.* (2001), calculada com auxílio do *software* R (R CORE TEAM, 2020) utilizando o pacote SeedCalc (SILVA; MEDEIROS; OLIVEIRA, 2019), sendo:

$$\text{Índice de Vigor (IV)} = (wG \times (w_h \times l_h + w_r \times l_r)) + (wU \times (1000 - (w_{sh} \times s_h + w_{sr} \times s_r + s_{total} + w_{sr/h} \times s_{r/h})) - wd \times \text{numdead}) \quad (1)$$

Onde:  $l_h$  e  $l_r$  são as médias de hipocótilo e comprimento de raiz das amostras, respectivamente;  $s_h$ ,  $s_r$ ,  $s_{total}$  e  $s_{r/h}$  são os desvios padrões de comprimento de hipocótilo, comprimento de raiz, comprimento total e relação raiz/hipocótilo, respectivamente; o  $w$  representa a proporção para os parâmetros.

A avaliação da mobilização de reservas foi realizada aos cinco dias após a semeadura conforme descrito anteriormente. Foi realizado nas condições de ausência e presença de estresse salino (Controle e NaCl) utilizando três repetições de 20 sementes. No quinto dia após a montagem do teste, as plântulas foram mensuradas com paquímetro digital para obtenção do comprimento de plântulas total (CP). Após a separação dos cotilédones e das plântulas, realizou-se a secagem na temperatura de 80 °C por 24 h, obtendo-se a massa seca remanescente nos cotilédones (MSRC) e a massa seca de plântulas (MSP) (KRZYŻANOWSKI *et al.*, 2020). A massa seca de sementes (MSS) foi obtida após a retirada do tegumento de quatro repetições de 20 sementes e posterior secagem em estufa a 105 °C por 24 h. A MSRC foi corrigida para taxa de massa seca remanescente em cotilédones pela equação (2). A redução de reservas da semente (RRS) foi calculada pela equação (3) e determinaram-se ainda, a taxa de redução de reservas da semente (TRRS) pela equação (4) (SOLTANI, GHOLIPOOR; ZEINALI, 2006) e taxa de mobilização de reservas (TMR) pela equação (5) (ANDRADE; COELHO; PADILHA, 2019).

$$\text{MSRC} = ([\text{MSRC (mg)}] / [\text{MSS (mg)}]) \times 100 \quad (2)$$

$$\text{RRS} = ([\text{MSS (mg)}] / [\text{MSRC (mg)}]) \times 100 \quad (3)$$

$$\text{TRRS} = ([\text{RRS (mg)}] / [\text{MSS (mg)}]) \times 100 \quad (4)$$

$$\text{TMR} = ([\text{MSP (mg)}] / ([\text{MSS (mg)}]) ) \times 100 \quad (5)$$

A determinação do amido foi realizada antes de submeter as sementes a germinação

(inicial) e ao final do teste (cinco dias após a semeadura). A extração e quantificação do amido foram realizadas conforme proposto por McCready *et al.*, (1950) com alterações. Para a extração foram utilizados 125 mg de farinha seca e moída em almofariz, o material foi colocado em tubo de centrifugação. Foi realizada a extração dos açúcares solúveis a partir de extração dupla com álcool 80%. A extração do amido foi realizada do resíduo utilizando extração dupla com ácido perclórico 52%. A quantificação foi realizada com 1 mL do extrato diluído e 3 mL de antrona, seguido de agitação em vortex por 3 s. Os tubos de ensaio foram mantidos em banho-maria a 95 °C por 450 s, após isso, foi realizada a leitura em espectrofotômetro com absorvância de 630 nm. A curva padrão foi determinada por meio da solução com as concentrações 10, 20, 30, 40, 50 µg mL<sup>-1</sup> de glicose. Os resultados foram expressos em mg semente<sup>-1</sup>.

A taxa de redução de amido (TRA) foi determinada a partir dos resultados obtidos de amido inicial (AI), amido remanescente após cinco dias (AF), sendo calculada pela equação:

$$\text{Taxa de Redução de Amido (TRA)} = \left( \frac{\text{AI (mg semente}^{-1}) - \text{AF (mg semente}^{-1})}{\text{AI (mg semente}^{-1})} \right) \times 100 \quad (6)$$

A atividade de alfa-amilase (EC 3.2.1.2) foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959) utilizando o procedimento de Sun e Henson (1991) com alterações. Para obtenção do extrato enzimático, foram utilizadas 500 mg de farinha fresca previamente moída com nitrogênio líquido e homogeneizada em almofariz com 10 mL de tampão TRIS-HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,2) contendo 0,1 mol L<sup>-1</sup> de NaCl e 10 mmol L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> e centrifugado por 10 min em temperatura de 6 °C. O extrato foi incubado em banho-maria por 15 min à 70 °C. A quantificação foi realizada utilizando 500 µL do extrato enzimático, 500 µL de solução tampão de acetato de sódio (100 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 5 mmol L<sup>-1</sup> cloreto de cálcio (pH 5,0) e 500 µL de solução de amido contendo 2,5% (p/v), as amostras permaneceram em banho-maria por 15 min a 40 °C. A reação foi paralisada com a adição de 1000 µL de solução DNS, posteriormente, as amostras foram mantidas em banho-maria por 6 min a 95 °C. A reação foi paralisada em banho de gelo e foram adicionados 7,5 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com absorvância de 540 nm e os resultados foram expressos em unidades por mililitro (U mL<sup>-1</sup>). Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima para produzir 1 µmol de glicose por minuto nas condições avaliadas.



O delineamento experimental utilizado foi fatorial 7 x 2 (sete genótipos e duas condições de germinação) com três repetições. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* R (R CORE TEAM, 2020). Os resultados foram submetidos à análise de variância (teste F) e a comparação entre as médias e interações foi efetuada pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A análise de componentes principais (ACP) foi realizada para cada condição de germinação, sem estresse (Controle) e com estresse salino (NaCl) separadamente, buscando identificar as associações entre os parâmetros em cada condição. Os resultados da análise estatística podem ser observados ao final do documento em caso de necessidade (APÊNDICE A).

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a média geral das variáveis para caracterização da qualidade fisiológica, o efeito isolado da condição de germinação apresentou-se negativo sob o estresse salino imposto ( $p \leq 0,05$ ). Quando as sementes foram submetidas aos testes na presença de estresse salino houve redução do desempenho. Entre a variável germinação, índice de vigor e comprimento total, o efeito de decréscimo foi mais acentuado no índice de vigor e no comprimento total (Tabela 3).

Tabela 3 – Germinação, índice de vigor e comprimento total de plântulas (CP) obtidos para os lotes de sementes dos genótipos de feijão avaliadas em condições de ausência (Controle) e presença de estresse salino 50 mmol L<sup>-1</sup> (NaCl)

Genótipos	Germinação (%)		Índice de Vigor		CP (mm)	
	Controle	NaCl	Controle	NaCl	Controle	NaCl
BAF07	85 b	85 a	601 e	444 c	174,63 d	85,17 d
BAF13	91 a	89 a	810 b	517 b	231,21 b	126,19 b
BAF23	89 a	87 a	702 d	448 c	205,57 c	107,07 c
BAF42	88 a	85 a	728 d	515 b	218,09 b	133,23 b
BAF55	94 a	91 a	854 a	582 a	257,21 a	152,97 a
BAF81	90 a	88 a	774 c	503 b	218,08 b	138,23 b
BAF112	85 b	87 a	810 b	500 b	227,14 b	144,65 a
Média Geral	90 A	87 B	754 A	501 B	218,85 A	126,82 B
C.V.	3,31		3,62		5,21	

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade; C.V.: Coeficiente de Variação (%).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023

A porcentagem de germinação variou de 85% a 94% entre os genótipos na condição sem estresse e, de 85% a 91% quando submetidas ao estresse salino. Os genótipos BAF07 e BAF112 apresentaram menor germinação na condição controle, e não foi verificada diferença

significativa entre os genótipos sob estresse (Tabela 3). Este menor efeito na porcentagem de germinação possibilita a condução de um estudo mais detalhado para o vigor de sementes, visto que todas os genótipos possuem a capacidade de germinar sob as condições impostas. Assim, o índice de vigor e o comprimento total de plântulas foram determinados, buscando identificar grupos de vigor entre os genótipos utilizadas.

O índice de vigor demonstra a diferença no vigor entre os lotes dos genótipos utilizadas. Em ambas as condições, o maior vigor foi observado para a cultivar BAF55. Os menores índices foram observados para os genótipos BAF07, BAF23 e BAF42 na condição controle. Entretanto, na presença de estresse, o genótipo BAF42 apresentou maior vigor em relação a BAF07 e BAF23 (Tabela 3). As diferenças no vigor foram confirmadas com os resultados de comprimento de plântulas, em que, as sementes os genótipos BAF13, BAF42, BAF55, BAF81 e BAF112 apresentaram comprimento de plântulas superior aos genótipos BAF07 e BAF23, em ambas as condições de germinação. O índice de vigor e o comprimento de plântulas são testes eficientes na segregação do vigor de sementes de diversas espécies, pois avaliam a velocidade, a uniformidade e o desempenho de plântulas do lote (MARCOS-FILHO, 2015b; ROCHA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2019). Dessa forma, foi possível determinar dois grupos de vigor distintos, o grupo de maior vigor (i.e., BAF13, BAF42, BAF55, BAF81 e BAF112) e o grupo de menor vigor (i.e., BAF07 e BAF23).

A massa seca remanescente (MSRC) foi inferior na situação de ausência de estresse, indicando maior utilização das reservas existentes nos cotilédones. Foi observado efeito significativo do estresse salino, em que, as sementes quando submetidas ao estresse utilizaram menor quantidade de reservas, restando maior quantidade nos cotilédones. Contudo, lotes de sementes dos genótipos classificados como de alto vigor demonstraram menor massa seca remanescente, indicando maior utilização das reservas em relação aos lotes de sementes dos genótipos BAF07 e BAF23, os quais apresentaram a maior massa seca restante nos cotilédones em ambos os tratamentos (Tabela 4).

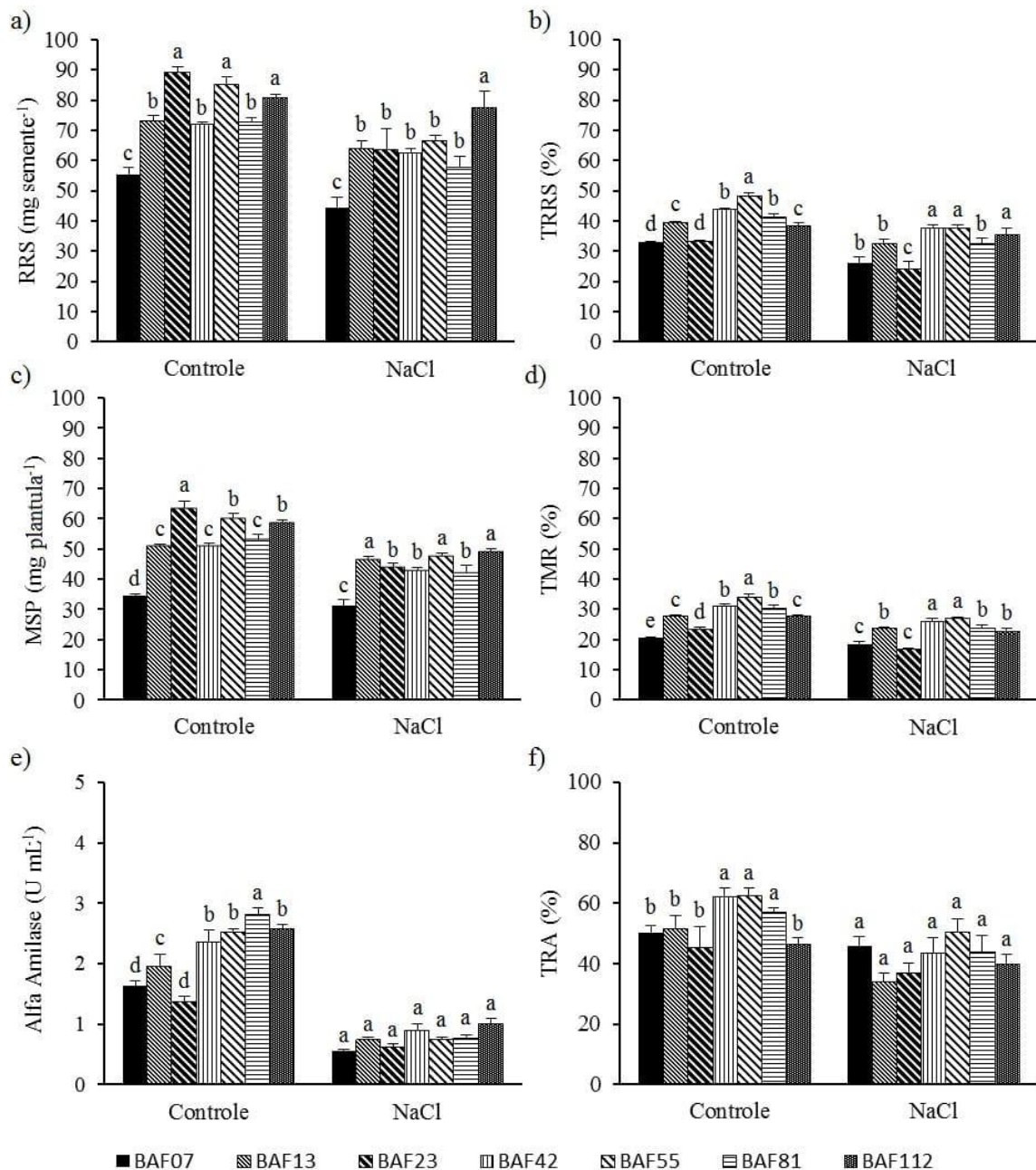
Tabela 4 – Massa seca de sementes (MSS), massa seca restante nos cotilédones (MSRC), quantidade de amido antes da germinação (Amido Inicial) e após cinco dias de germinação (Amido Final) para os lotes de sementes dos genótipos de feijão avaliadas em condições de ausência (Controle) e presença (NaCl) de estresse salino

Genótipos	MSS (mg semente <sup>-1</sup> )	MSRC (mg semente <sup>-1</sup> )		MSRC (%)	
		Controle	NaCl	Controle	NaCl
BAF07	169,82 ± 7,01 <sup>1</sup>	113,14 ± 6,89	125,37 ± 5,25	68,40 a	72,22 a
BAF13	183,91 ± 1,15	112,29 ± 1,58	133,14 ± 11,81	59,23 c	67,79 b
BAF23	271,53 ± 10,53	179,78 ± 10,19	200,69 ± 8,85	66,88 a	74,27 a
BAF42	163,99 ± 0,89	91,96 ± 0,49	104,01 ± 5,97	56,74 c	62,61 c
BAF55	175,68 ± 3,37	91,20 ± 1,66	111,02 ± 5,87	50,86 d	62,33 c
BAF81	174,63 ± 4,84	103,15 ± 2,20	120,67 ± 5,46	58,45 c	65,70 b
BAF112	212,08 ± 6,20	130,88 ± 3,73	141,67 ± 12,31	62,35 b	66,46 b
Média Geral	193,08 ± 35,43	117,48 ± 30,39	133,79 ± 30,22	60,41 B	67,34 A
C.V.	-	-	-	3,89	
Genótipos	Amido Inicial (mg semente <sup>-1</sup> )	Amido Final (mg semente <sup>-1</sup> )		Amido Final (%)	
		Controle	NaCl	Controle	NaCl
BAF07	83,14 ± 2,82	41,26 ± 1,98	44,98 ± 4,82	49,72 a <sup>1</sup>	54,07 a
BAF13	95,92 ± 13,81	45,65 ± 1,35	63,51 ± 10,60	48,30 a	66,15 a
BAF23	132,86 ± 26,16	70,62 ± 2,98	83,27 ± 11,73	54,67 a	63,22 a
BAF42	85,14 ± 13,02	31,68 ± 1,36	47,39 ± 3,33	37,68 b	56,45 a
BAF55	86,10 ± 11,24	32,03 ± 2,72	42,51 ± 6,56	37,57 b	49,60 a
BAF81	87,69 ± 2,28	37,66 ± 1,87	49,28 ± 7,73	42,95 b	56,29 a
BAF112	105,40 ± 6,27	56,32 ± 1,11	63,68 ± 8,36	53,59 a	60,32 a
Média Geral	96,61 ± 19,67	45,03 ± 13,48	56,37 ± 15,42	46,36 B	58,01 A
C.V.	-	-	-	12,82	

Legenda: <sup>1</sup>Média ± desvio padrão obtidos; <sup>2</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade; C.V.: Coeficiente de Variação (%). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023

Os resultados de amido final apresentaram comportamento semelhante aos da MSRC em situação de estresse salino. Houve efeito do estresse resultando em menor hidrólise de amido (Tabela 4). Isso acontece devido à salinidade influenciar no processo de hidrólise e mobilização das reservas durante a germinação, atrasando ou inibindo o processo de formação de plântulas dependendo da intensidade do estresse (IBRAHIM, 2016; LI *et al.*, 2019). Contudo, as maiores taxas de redução de amido (TRA) foram observadas para os genótipos BAF42, BAF55 e BAF81, sendo possível observar diferenças na hidrólise entre os grupos de vigor na condição com ausência de estresse (Figura 1f).

Figura 1 – Redução de reservas da semente (RRS), taxa de redução de reservas (TRRS), massa seca de plântulas (MSP), taxa de mobilização de reservas (TMR), atividade da enzima alfa-amilase e taxa de redução de amido (TRA) em genótipos de feijão avaliadas em condições de ausência (Controle) e presença de estresse salino (NaCl). Barras seguidas de mesma letra minúscula dentro do tratamento não apresentam diferença significativa pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023

A redução de reservas da semente (RRS), a taxa de redução de reservas da semente (TRRS), a massa seca de plântulas (MSP) e a taxa de mobilização de reservas (TMR)

apresentaram diferenças significativas entre os genótipos, sendo que, na condição de estresse salino apresentaram decréscimo (Figura 1a, Figura 1b, Figura 1c, Figura 1d). A maior redução de reservas (RRS) foi observada para os genótipos BAF23, BAF55 e BAF112 (Figura 1a), favorecendo a formação de plântulas com maior massa seca na condição controle (Figura 1c). Na condição de estresse salino, a redução de reservas (RRS) não apresentou o mesmo comportamento, onde pode ser observada a influência do vigor, em que a maior massa seca de plântulas foi observada para os genótipos BAF13, BAF55 e BAF112, que são pertencentes ao grupo de maior vigor (Figura 1c).

A massa seca de plântulas (MSP) é o resultado do que foi mobilizado durante o processo de germinação, sendo em geral, quanto maior a redução das reservas presentes no tecido de reserva, maior será a massa seca de plântulas (CHENG *et al.*, 2018). Desse modo, os genótipos do grupo de alto vigor (BAF13, BAF42, BAF55, BAF81 e BAF112) apresentaram maior capacidade de reduzir as reservas nos cotilédones (TRRS) e mobilizar para a formação das plântulas (TMR) (Figura 1b, Figura 1c). Do mesmo modo, Andrade, Coelho e Padilha (2019) avaliando a mobilização de reservas e o vigor de sementes de milho, observaram que as sementes de maior vigor apresentaram maior capacidade de redução de reservas e maior mobilização para as plântulas.

A presença de estresse salino durante a germinação resultou em menor utilização das reservas armazenadas da semente, afetando o acúmulo de massa seca e comprimento das plântulas. Esse efeito foi observado por Baghel, Katarina e Jain (2019) em sementes de milho, as quais apresentaram menor acúmulo de massa e comprimento quando em condição de estresse salino. O decréscimo no crescimento é causado pela ocorrência de estresse osmótico e posteriormente pela toxicidade iônica (i.e., absorção de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) resultando em desbalanço intracelular, tornando necessário o ajuste osmótico (TAIZ *et al.*, 2017; LIANG *et al.*, 2018). Contudo, as sementes do grupo de alto vigor (Tabela 3; Figura 1d) apresentaram melhor desempenho mesmo sobre a presença do estresse, demonstrando uma maior capacidade em germinar e formar plântulas de maior comprimento e massa seca nessas condições.

Na ausência de estresse, a atividade da alfa-amilase foi superior para os genótipos BAF42, BAF55, BAF81 e BAF112 (Figura 1e). A maior atividade da alfa-amilase resultou em maior taxa de redução de amido (Figura 1f) e maior taxa de redução de reservas (TRRS) (Figura 1b), sendo possível verificar a associação entre o alto vigor e a atividade da enzima. Após os genótipos serem submetidas à condição de estresse salino, essa relação não foi observada, uma vez que, houve decréscimo da atividade da alfa-amilase para todos os genótipos (Figura 1e), entretanto, as sementes de maior vigor continuaram apresentando maior TRRS (Figura 1b).

A implicação do estresse salino sobre a atividade da alfa-amilase foi verificada por Adda *et al.*, (2014) durante a germinação de sementes de feijão, onde, à medida que se aumentava a intensidade do estresse maior era a redução da atividade, comprometendo o desempenho das plântulas. A redução da atividade de alfa-amilase ocorre pela alteração hormonal nas sementes, essa alteração causa a decréscimo do conteúdo de giberelina, o que promove a menor utilização das reservas (LI *et al.*, 2019). A menor atividade da enzima alfa-amilase resulta em menor hidrólise de amido, disponibilizando menos açúcares solúveis para o crescimento do eixo embrionário (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Essa associação entre a atividade da enzima alfa-amilase, a hidrólise do amido e a disponibilização de açúcares, explica a menor massa seca de plântulas e menor redução de reservas observadas na presença de estresse salino (Figura 1a, Figura 1c).

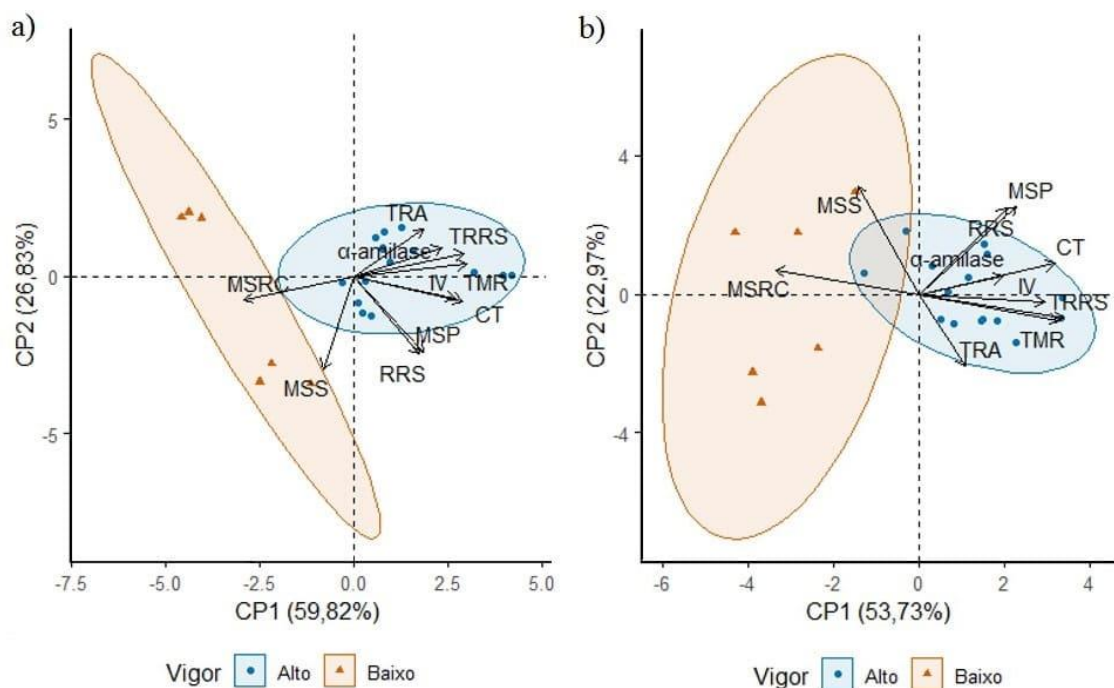
Para o melhor entendimento da relação da atividade da alfa-amilase com os grupos de vigor obtidos e a sua associação com os parâmetros de desempenho de plântulas, foi executada a análise de componentes principais (ACP). Os resultados obtidos demonstram associação positiva desta enzima com o grupo de sementes com maior vigor, sendo essa associação verificada em ambas as condições avaliadas. Para a condição controle, os componentes principais 1 (CP1) e 2 (CP2) explicaram, respectivamente, 59,82% e 26,83% da variabilidade dos dados (Figura 2a). Na ACP para condição de estresse, o CP1 e o CP2 explicaram 53,73% e 22,97% da variância dos dados, respectivamente (Figura 2b). Os dois grupos de vigor podem ser observados nas ACP, sendo possível verificar a associação entre as variáveis avaliadas com cada um dos grupos obtidos.

O CP1 possibilita a separação dos grupos de vigor independentemente da ausência ou presença de estresse e, ambas as ACP, apresentaram associação semelhante em relação às variáveis. Observou-se que as variáveis TRA, TMR, TRRS, CP, IV, MSP, RRS e alfa-amilase foram positivamente associadas entre si, assim como, foram associados ao grupo de alto vigor (i.e., BAF13, BAF42, BAF55, BAF81 e BAF112). Esse resultado indica que as sementes de feijão com alto vigor possuem maior atividade de alfa-amilase a qual proporciona maior redução das reservas, e com posterior mobilização de açúcares solúveis para o eixo embrionário, favorecendo a formação de plântulas com maior massa seca e maior comprimento.

Os resultados referentes à enzima alfa-amilase sugerem a sua importância no processo de germinação de sementes de feijão, o que favorece o melhor desempenho das plântulas oriundas de sementes de alto vigor. Em sementes de milho a maior capacidade de hidrólise é uma das principais causas da germinação rápida, com formação de plântulas de maior desempenho (NAGUIB; ABDALLA, 2019). Resultados semelhantes também foram

verificados nos trabalhos de com sementes de arroz (CHENG *et al.*, 2013). Por outro lado, as variáveis MSS e MSRC foram associadas com o grupo dos lotes de sementes de baixo vigor (i.e., BAF07 e BAF23) indicando menor hidrólise das reservas e menor mobilização (Figura 2a, Figura 2b).

Figura 2 – Análise de componentes principais referente a formação de plântulas no controle (a) e em estresse salino (50 mmol L<sup>-1</sup>) (b) e a associação entre os parâmetros avaliados. O CP1 e CP2 são o primeiro e o segundo componente principal, respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023

No segundo componente principal (CP2) diferente do observado na situação sem estresse, verifica-se que em presença de estresse salino a taxa de redução de amido (TRA) e a atividade da alfa-amilase não são positivamente associadas entre si. Em geral, a alfa-amilase é a principal enzima responsável pela hidrólise do amido (YU; HO; LO, 2015). Contudo, a hidrólise do amido em dicotiledôneas pode ser realizada por outras enzimas, em grão de bico o início da hidrólise do amido é resultado da atividade da enzima amido fosforilase, e ao longo da germinação aumenta a atividade das amilases (i.e., alfa-amilase e beta-amilase) (BEWLEY *et al.*, 2013). Essa diferença pode explicar os resultados observados anteriormente para alfa amilase e taxa de redução de amido em estresse (Figura 1e, Figura 1f).

Dessa forma, é possível que em condição de estresse salino, onde a atividade da alfa-amilase foi afetada (Figura 1e), outra molécula catalisadora contribuiu com a hidrólise do amido, a qual resultou na sua depleção mesmo durante esse estresse (Figura 1f). Segundo Thalmann e Santelia (2017), a rota metabólica relacionada à hidrólise do amido pode ser alterada em diferentes condições ambientais, como estresse por frio e estresse hídrico, alterando as enzimas que hidrolisam o amido. Com isso, sugere-se a avaliação e a identificação de outras enzimas relacionadas a hidrólise de amido durante a formação de plântulas de feijão em condições de estresse salino, o que pode ser um indicativo de outros enzimas associadas ao vigor de sementes dessa espécie.

### 3.5 CONCLUSÃO

A atividade da enzima alfa-amilase possui associação positiva com o vigor do lote de sementes nas condições controle. Na condição de estresse salino a associação entre o vigor do lote de sementes e a atividade de alfa-amilase avaliada aos cinco dias de germinação é fraca.



## 4 CAPÍTULO 2 – MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO EM CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO HÍDRICA

### 4.1 RESUMO

O processo de mobilização de reservas é um processo determinante durante a germinação e formação de plântulas. Esse processo pode ser comprometido em condições de estresse hídrico resultando em perdas de estande de plantas. O uso de sementes de alto vigor pode favorecer a superação do estresse relacionado a restrição hídrica durante a formação de plântulas devido a maior capacidade de mobilização de reservas para formar plântulas de melhor desempenho. O objetivo deste trabalho foi identificar como ocorre a utilização das reservas armazenadas em sementes de feijão durante uma condição estresse hídrico, buscando identificar a diferença na hidrólise e mobilização de reservas entre as sementes com vigor superior. Foram utilizadas sementes dos genótipos BAF55 (Alto vigor) e BAF07 (Baixo vigor). As avaliações foram realizadas aos dois, quatro, seis e oito dias de germinação. As variáveis avaliadas foram o comprimento e massa seca de plântulas, gasto metabólico, amido, proteína total, açúcares solúveis, proteínas solúveis e atividade de alfa-amilase. As sementes com maior vigor apresentaram maior massa seca e comprimento de plântulas mesmo quando submetidas a condições de estresse hídrico, resultado da maior hidrólise e mobilização de açúcares solúveis e uso das proteínas solúveis. As sementes de maior vigor apresentam maior capacidade de hidrólise e utilização de proteínas solúveis e açúcares solúveis, o que resulta em plântulas de melhor desempenho em condições de estresse hídrico.

### 4.2 INTRODUÇÃO

A cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das principais leguminosas cultivadas mundialmente. Com as mudanças climáticas observadas ao longo dos últimos anos, a presença de restrição hídrica durante o ciclo das culturas afeta negativamente o crescimento e desenvolvimento (HEMPTON *et al.*, 2016).

A semeadura é um dos processos determinantes para a garantia da produção, em que, a redução do estande de plantas pode resultar em perdas na produção de grãos em mais de 15% (STRUKER *et al.*, 2019). Em condições de estresse hídrico a absorção de água é afetada devido ao baixo potencial hídrico do solo, resultando em atraso na protrusão radicular, redução da

porcentagem de germinação e perdas no desempenho de plântulas (PRAZERES; COELHO, 2016).

Assim como a germinação, a mobilização das reservas armazenadas é influenciada pelo estresse hídrico, resultando em menor redução e utilização dessas reservas (SOLTANI; GHOLIPOOR; ZEINALI, 2006), entretanto, sementes de maior qualidade fisiológica apresentam maior eficiência de uso dessas (ANDRADE; COELHO; PADILHA, 2019), o que torna relevante a avaliação das alterações durante a mobilização de reservas em sementes com contraste em sua qualidade fisiológica, identificando como os componentes bioquímicos contribuem para a formação de plântulas durante situações de estresse hídrico.

Para que ocorra a formação de uma plântula é necessário que os componentes de reserva da semente sejam hidrolisados e mobilizados para o eixo embrionário (BEWLEY; NONOGAKI, 2017). O amido é a principal fonte de carbono em diversas sementes e, é hidrolisado em moléculas solúveis (e.g., glicose) para posterior formação de sacarose e transporte para o eixo embrionário (YU; HO; LO, 2015), as proteínas de armazenamento atuam como fonte de aminoácidos que são reutilizados para a formação de novas proteínas e outros processos anabólicos e, em geral o transporte de aminoácidos para o eixo embrionário ocorre na forma de glutamina e asparagina (BEWLEY *et al.*, 2013). Nesse contexto, a conversão dos componentes de reserva em metabólitos solúveis para o eixo embrionário é determinante para a formação de uma planta autotrófica (GOMMERS; MONTE, 2018).

Diversos estudos relatam a relação entre a formação de plântulas e capacidade de mobilização de reservas como proteínas e carboidratos, em que as sementes com maior capacidade de mobilização formam plântulas com melhor desempenho fisiológico (LIU *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018a; ZEID *et al.*, 2019; WEI *et al.*, 2020). Sabendo disso, é necessário determinar como as sementes de alto vigor se diferenciam metabolicamente em relação a mobilização destes componentes, sendo que o conhecimento do processo de mobilização pode auxiliar no entendimento fisiológico do vigor de sementes, principalmente quando avaliado em condições de estresse hídrico.

Com isso, o presente estudo foi baseado na hipótese de que os lotes de sementes de sementes de feijão com maior vigor, possuem maior capacidade de hidrólise dos componentes de reserva fornecendo maior teor de açúcares solúveis e proteínas solúveis para o eixo embrionário, os quais são utilizados com maior eficiência o que favorece a formação de plântulas vigorosas mesmo em condições de estresse hídrico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a mobilização das reservas armazenadas em sementes de feijão durante uma condição

estresse hídrico, buscando identificar as diferenças bioquímicas durante o processo de formação de plântulas.

### 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os genótipos BAF07 e BAF55 as quais são originalmente pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Feijão (BAF) do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina. Os genótipos foram utilizados considerando o seu potencial de qualidade fisiológica. O genótipo BAF07 é caracterizado como de baixa qualidade fisiológica e o genótipo BAF55 de alta qualidade fisiológica. As sementes utilizadas foram produzidas na safra 2018/2019 na área experimental da mesma universidade.

A caracterização dos lotes de sementes dos genótipos utilizados quanto a sua qualidade fisiológica foi determinada através da germinação, envelhecimento acelerado e índice de vigor.

O teste de germinação foi conduzido em germinador Mangelsdorf em temperatura de  $25 \pm 2$  °C, sendo a semeadura realizada em substrato de papel (*Germitest*®) utilizando três folhas de papel por rolo de germinação (BRASIL, 2009) e posteriormente mantidas na vertical dentro do germinador com ausência de luz em todo o período. Para o tratamento sem estresse hídrico (controle) o umedecimento do papel foi realizado com água destilada, sendo o volume na proporção de  $2,5 \text{ mL g}^{-1}$  de papel seco. Para a condução do teste com estresse hídrico, o papel foi umedecido com uma solução de polietileno glicol 6000 (PEG) equivalente a  $-0,1 \text{ MPa}$  (78,49g de PEG por litro de água) (VILELLA; DONI-FILHO; SEQUEIRA, 1991), utilizando quatro repetições de 50 sementes.

O índice de vigor foi realizado com oito repetições de 20 sementes distribuídas no terço superior de folhas de papel toalha umedecidas com volume de água destilada na proporção de  $2,5 \text{ mL g}^{-1}$  de papel seco. A semeadura foi realizada na forma de rolos de papel os quais foram mantidos em germinador a  $25 \pm 2$  °C durante três dias (SILVA; MEDEIROS; OLIVEIRA; 2019). Após esse período, o comprimento de hipocótilo (CH), comprimento de raiz (CR) e comprimento total de plântulas (CTP) foram mensurados com auxílio de paquímetro digital. O cálculo do índice de vigor (IV) foi determinado conforme fórmula proposta por Sako *et al.*, (2001) calculada com auxílio do *software* R (R CORETEAM, 2019) e utilizando o pacote SeedCalc (SILVA; MEDEIROS; OLIVEIRA, 2019).

O teste de envelhecimento acelerado foi conduzido em temperatura de 42 °C por 72 h (SANTOS; MENEZES; VILELLA, 2003), após esse período de envelhecimento o teste de germinação foi conduzido conforme descrito anteriormente conduzido com oito repetições de

50 sementes.

A avaliação da mobilização das reservas foi realizada em dois, quatro, seis e oito dias durante o processo de germinação. Três repetições de 20 sementes foram distribuídas no terço superior de folhas de papel toalha umedecidas com volume de água destilada na proporção de 2,5 mL g<sup>-1</sup> de papel seco (NAKAGAWA, 1999). Nos períodos determinados foram avaliados o comprimento das plântulas normais e posteriormente separado o eixo embrionário dos cotilédones e esses foram secos em estufa a 80 °C por 24 h para obtenção da massa seca de plântulas (MSP) e da massa seca restante em cotilédones (MSRC). A redução das reservas das sementes (RRS) foi realizada pela diferença entre a massa seca inicial das sementes (MSS) e da MSRC (SOLTANI; GHOLIPOOR; ZEINALI; 2006). A determinação do gasto energético durante o processo de mobilização foi realizada pela subtração do que foi reduzido (RRS) pelo produzido (MSP), conforme proposto por Andrade, Coelho e Padilha (2019).

Os componentes bioquímicos avaliados durante a formação das plântulas foram o amido, açúcares solúveis totais, proteínas solúveis totais, proteína total e atividade de alfa-amilase, sendo essas realizadas nos mesmos tempos das análises fisiológicas de mobilização de reservas descritas anteriormente, sendo avaliados em cotilédones e/ou eixo embrionário, em três repetições.

A extração e quantificação de açúcares solúveis totais foram realizadas conforme proposto por Clegg (1956). Foram utilizados 100 mg de farinha seca e moída em almofariz e realizada a extração dupla com álcool etílico 80%. A reação de quantificação foi realizada utilizando 1 mL do extrato propriamente diluído e 5 mL de reagente antrona, seguido de agitação em vortex por 3 segundos, os tubos de ensaio foram mantidos em banho maria a 95 °C por 480 segundos, após isso foi realizada a leitura em espectrofotômetro com absorvância de 630 nm. Os resultados foram expressos em mg g<sup>-1</sup> de massa seca (MS).

O amido foi realizado conforme descrito por McCready *et al.* (1950). A extração do amido foi realizada do resíduo remanescente da extração de açúcares solúveis, utilizando extração dupla com ácido perclórico 52%. A quantificação foi realizada com 1 mL do extrato propriamente diluído e 3 mL de reagente antrona, seguido de agitação em vortex por 3 s. Os tubos de ensaio foram mantidos em banho-maria a 95 °C por 450 s. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em absorvância de 630 nm.

A atividade de alfa amilase foi realizada utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959) utilizando o procedimento de Monerri e Guardiola (1986) com alterações. Para obtenção do extrato enzimático, 500 mg de farinha foram extraídas com 5 mL de tampão acetato de sódio pH 5,6 com presença de 4 mmol de CaCl<sub>2</sub> e 0,005% de Triton X-100. As

amostras foram mantidas em agitação por 1 h em presença de gelo e posteriormente centrifugados. O extrato foi submetido a temperatura de 70 °C por 15 min. A quantificação foi realizada utilizando-se 0,5 mL do extrato enzimático e 0,5 mL de solução de amido solúvel contendo 2,0% (p/v), as amostras ficaram em banho-maria por 30 min a 40 °C. Após, foram adicionados 1 mL de solução DNS e as amostras foram mantidas em banho-maria por 6 min a 95 °C. A reação foi paralisada em banho de gelo e, após resfriar, foram adicionados 8 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com absorvância de 540 nm. Uma unidade de enzima foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a produção de um  $\mu\text{mol}$  de maltose por minuto na condição avaliada. Os resultados foram expressos em unidade de enzima por miligrama de proteína ( $\text{U mg}^{-1}$ ).

A proteína total foi determinada segundo o método Kjeldahl (AOAC, 1995) a partir do teor de nitrogênio total da amostra, utilizando 200 mg de amostra seca (50 °C por 16 h). Para cada amostra foi adicionado 1 mL de peróxido de hidrogênio 30%, 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, e 0,7 g do catalisador (i.e., contendo 90% de sulfato de sódio, 9% de sulfato de cobre e 1% de selênio). O teor de proteína total da amostra foi obtido pela multiplicação do conteúdo de nitrogênio por 6,25.

Para a extração de proteínas solúveis uma amostra de 100 mg de tecido vegetal úmido macerado em almofariz utilizando 2 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,0 e posteriormente centrifugado. A proteína solúvel foi quantificada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm, conforme descrito por Bradford (1976). Os resultados foram expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  de massa seca (MS).

A partir dos dados obtidos de proteína e amido, foi determinada a redução desses componentes, sendo que o valor inicial obtido foi considerado 100%. Dessa forma, o valor remanescente foi determinado a partir dos valores obtidos em cada tempo de avaliação (i.e., 0, 2, 4, 6, 8 dias) em relação ao amido inicial, sendo expresso em porcentagem.

Para verificar a presença de estresse hídrico foi determinada o teor de prolina aos oito dias de germinação em cotilédones pelo do método de Bates, Waldren e Teare (1973) em quatro repetições. O teor de prolina foi determinado a partir de uma curva padrão com valores conhecidos de prolina. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de prolina por grama de massa fresca. O grau de umidade dos cotilédones foi determinado nesse mesmo período, realizando a secagem dos cotilédones das plântulas formadas em temperatura de 105 °C por 24 h.

O delineamento experimental para realizar a segregação entre os genótipos foi realizada em inteiramente casualizado, com oito repetições. A análise estatística para determinar o efeito do estresse hídrico sobre a germinação, teor de umidade e prolina livre foi realizada em arranjo

fatorial (estresse x genótipo) com quatro repetições. Considerando o interesse em determinar como as diferenças ocorrem entre os genótipos em cada tempo de avaliação, os dados obtidos em cada tempo (i.e., 0, 2, 4, 6, 8 dias), foram arrançados em forma de fatorial triplo (tempo x genótipo x estresse) com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e a comparação entre as médias e interações foi efetuada através do teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando o *software* Sisvar (FERREIRA, 2011). Os resultados da análise estatística podem ser observados ao final do documento em caso de necessidade (APÊNDICE B).

#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variáveis envelhecimento acelerado (EA), comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT) e índice de vigor (IV) determinaram a diferença na qualidade fisiológica entre os lotes dos genótipos BAF07 e BAF55, em que, o lote de sementes do genótipo BAF55 apresentou melhor desempenho em todas as variáveis utilizadas para a segregação do vigor do lote de sementes (Tabela 5). Os parâmetros EA, CR, CH, CT e IV são eficientes em determinar a qualidade fisiológica de um lote de sementes (MARCOS-FILHO, 2015b; SILVA; MEDEIROS; OLIVEIRA, 2019). Esses resultados eram esperados, considerando que os mesmos resultados foram obtidos por Ehrhardt-Brocardo e Coelho (2016); Padilha, Coelho e Andrade (2020) utilizando os mesmos genótipos em trabalhos anteriores.

Tabela 5 – Envelhecimento acelerado (EA), comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT) e índice de vigor (IV), obtidos para os lotes dos genótipos avaliados

Genótipo	EA (%)	CR cm pl <sup>-1</sup>	CH cm pl <sup>-1</sup>	CT cm pl <sup>-1</sup>	IV -
BAF07	81 b	5,22 b	2,37 b	7,59 b	633 b
BAF55	93 a	9,01 a	3,38 a	12,59 a	879 a
CV%	5,21	6,06	5,71	4,98	3,83

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Para a variável germinação, não foi verificado efeito significativo para a interação entre os genótipos e o estresse, assim como não foi verificado efeito significativo para o efeito isolado de estresse (Tabela 6). Contudo, a porcentagem de germinação indica a diferença na qualidade fisiológica inicial dos genótipos, corroborando com os resultados anteriores (Tabela 5). Foi verificada a diferença entre o grau de umidade dos cotilédones, assim como o aumento do teor

de prolina quando as sementes foram submetidas a condição de estresse hídrico aos oito dias de germinação (Tabela 6).

Tabela 6 – Porcentagem de germinação, teor de prolina em cotilédones e grau de umidade em cotilédones (GU) em condições ótimas (Controle) e sob estresse hídrico (PEG), obtidos para os lotes dos genótipos BAF07 e BAF55

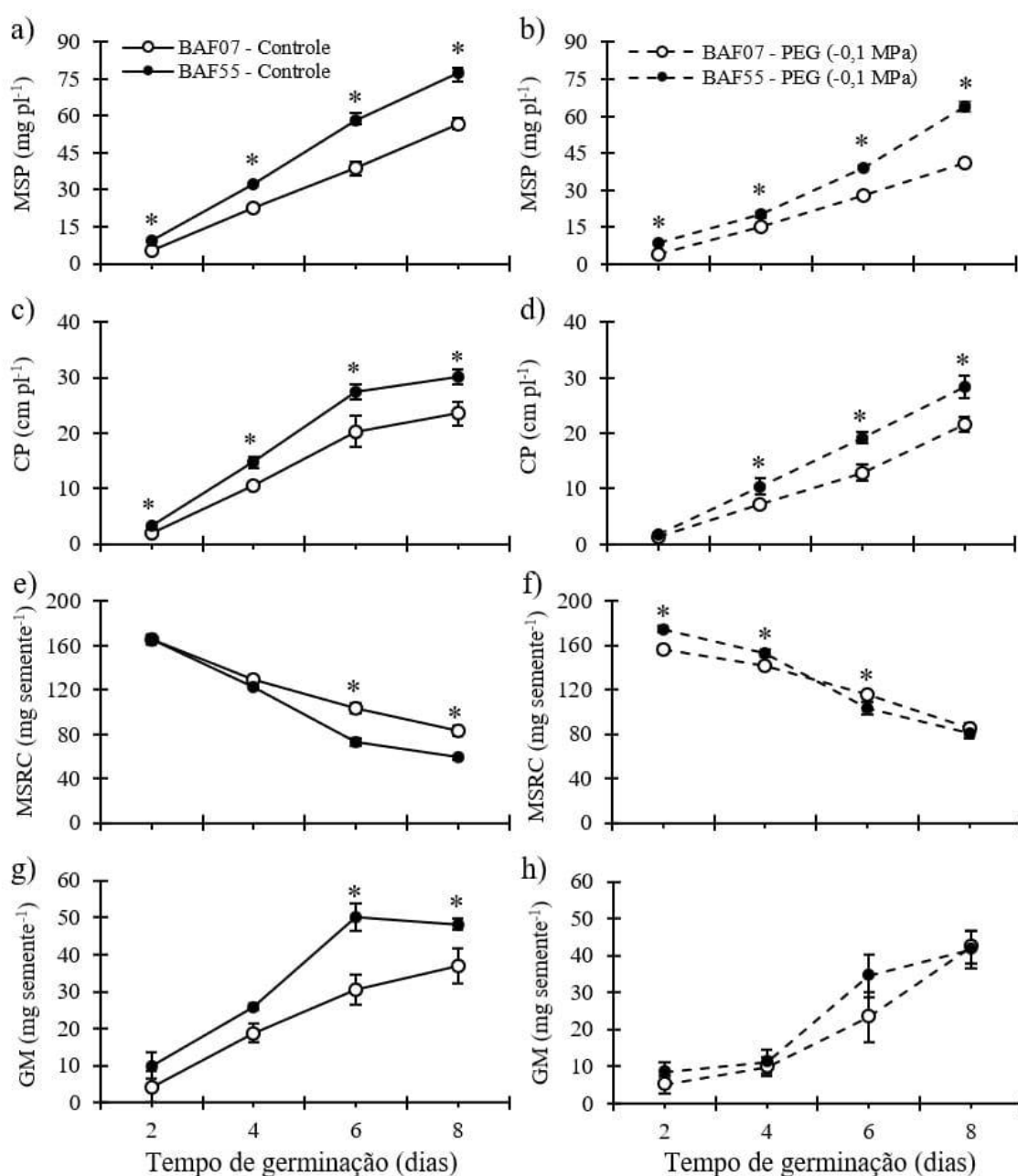
Genótipos	Germinação (%)		GU (%)		Prolina ( $\mu\text{mol g MF}^{-1}$ )	
	Controle	PEG	Controle	PEG	Controle	PEG
BAF07	87 b	85 b	68,8 bA	65,2 aB	1,79 aA	3,09 aB
BAF55	94 a	91 a	73,2 aA	65,9 aB	1,39 bA	2,31 bB
CV%	3,01		2,50		9,36	

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A prolina é um regulador osmótico importante para a manutenção do turgor celular e, é acumulada em situações de estresse abiótico (e.g., estresse hídrico e estresse salino), indicando a resposta a um estresse osmótico (CHEN *et al.*, 2016). Com a redução do potencial osmótico do substrato, ocorreu decréscimo do teor de umidade dos cotilédones das plântulas, indicando que essas estão sob estresse, e com isso ocorreu o aumento da concentração de prolina (Tabela 6). Dessa forma, é possível afirmar que as sementes estavam sob estresse hídrico durante o processo de germinação e formação das plântulas.

Durante o processo de germinação, as sementes com maior vigor (i.e., BAF55) apresentaram maior desempenho fisiológico, formando plântulas com maior massa seca (MSP) e comprimento (CP), sendo o resultado da maior hidrólise das reservas em cotilédones. Em ambas as condições avaliadas o genótipo BAF55 apresentou os maiores valores de MSP (Figura 1a, Figura 1b) e CP (Figura 3c, Figura 3d), sendo essa diferença observada, em geral, em todos os tempos avaliados. Na condição de estresse hídrico ocorreu um atraso no processo de mobilização de reservas, sendo verificado maior massa seca remanescente em cotilédones (MSRC) para ambos os lotes de sementes (Figura 3e, Figura 3d). A menor redução nas reservas em cotilédones devido a presença do estresse resultou em menor massa seca de plântulas (Figura 3b). De forma geral, sementes com maior vigor apresentam em condições ótimas maior capacidade de redução das reservas devido à atividade de hidrólise, fornecendo maior quantidade de metabólitos solúveis para o eixo embrionário, favorecendo a formação de plântulas com maior massa seca (EHRHARDT-BROCARD; COELHO 2016).

Figura 3 – Mobilização de biomassa seca durante a germinação e formação de plântulas de feijão nos períodos de dois, quatro, seis e oito dias com ausência de estresse (Controle) e com presença de estresse hídrico (PEG -0,1 MPa) para os genótipos BAF07 e BAF55. Massa seca de plântulas (MSP) (a, b), comprimento de plântula (CP) (c, d), massa seca restante em cotilédones (MSRC) (e, f), gasto metabólico (GM) (g, h). \*:representa diferença significativa entre os genótipos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

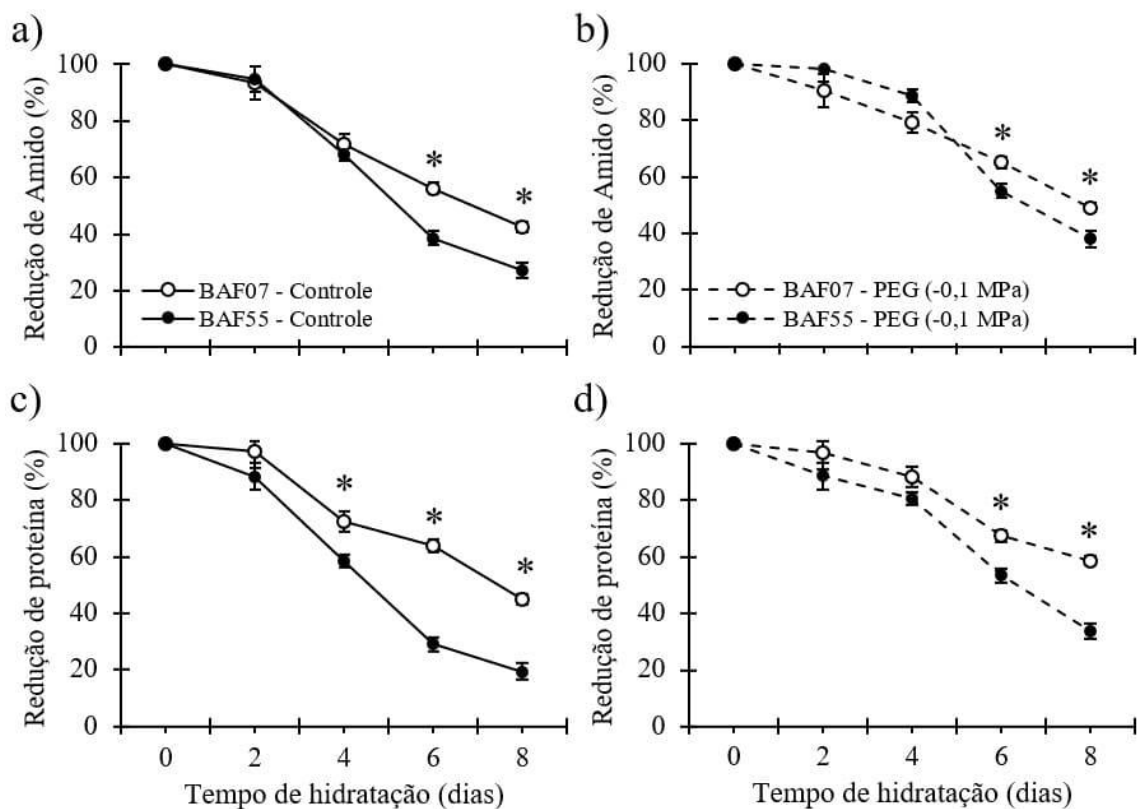




Na condição de ausência de estresse, o genótipo BAF55 apresentou maior GM em relação ao BAF07 no sexto e no oitavo dia de germinação (Figura 3f). Contudo, esse maior gasto resultou em maior quantidade de reservas reduzidas (Figura 3e) e maior quantidade de massa seca produzida (Figura 3a), indicando que o metabolismo dessas sementes é mais ativo durante o processo de mobilização. Resultados obtidos por Andrade, Coelho e Padilha (2019), revelam esse mesmo comportamento em sementes de milho com alto vigor, em que, as sementes de maior vigor apresentaram maior gasto metabólico em condições ótimas, conseqüentemente formando plântulas com maior comprimento e massa seca. Para o GM em condições de estresse hídrico não foi verificada diferença significativa entre os genótipos (Figura 3h). Contudo, as sementes com maior vigor formaram plântulas com maior massa seca, indicando maior eficiência das sementes mesmo sob condições de estresse hídrico (Figura 3a).

O decréscimo na MSRC demonstra a degradação dos componentes de reserva para mobilização. Durante o processo de germinação as reservas armazenadas são hidrolisadas para posterior mobilização de compostos solúveis (BEWLEY *et al.*, 2013). Essa relação da degradação das reservas durante o processo de germinação pode ser observada pela redução de amido e proteína. Foi verificado que independente da condição de germinação, o genótipo BAF55 com maior vigor apresentou maior redução desses componentes de reserva a partir dos quatro dias de germinação para proteína total e seis dias para o amido (Figura 4).

Figura 4 – Proteína (a) e amido (b) remanescente em cotilédones durante a formação de plântulas de feijão nos períodos de 0, 2, 4, 6 e 8 dias com ausência de estresse (Controle) e com presença de estresse hídrico (PEG -0,1 MPa), para os genótipos BAF07 e BAF55. \*:representa diferença significativa entre os genótipos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

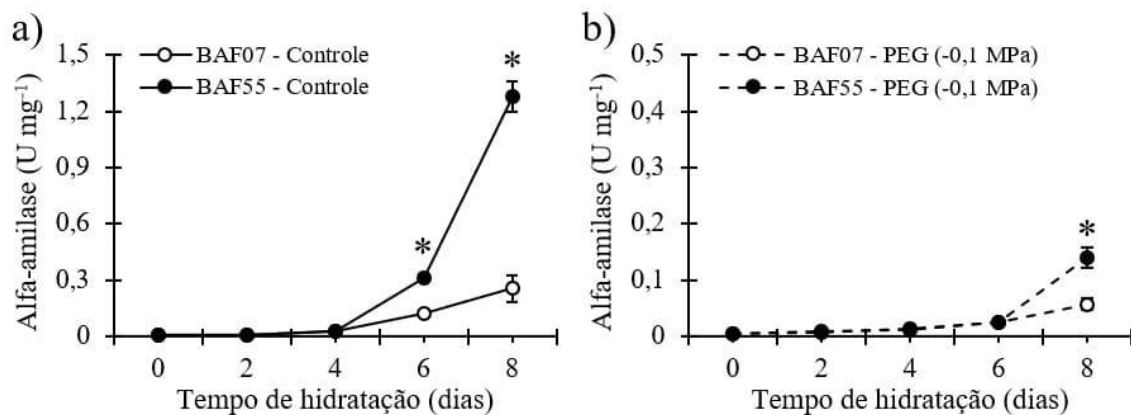
A proporção de proteína residual ao fim da avaliação (i.e., oito dias) foi de 27,06% na condição controle e 38,05% na condição de estresse hídrico para o genótipo BAF55 e; 42,59% e 49,21% respectivamente para o genótipo BAF07 (Figura 4a, Figura 4b). Resposta semelhante foi observada para o amido residual, em que foi de 19,56% na condição controle e de 33,71% na condição de estresse hídrico para o lote do genótipo BAF55 e, para o genótipo BAF07 foi de 45,02% e 58,73%, respectivamente (Figura 4c, Figura 4d).

A redução de proteína de amido durante a germinação também foi observada por Shaik *et al.* (2014), os quais destacaram a importância da maior capacidade de hidrólise para o estabelecimento inicial de plântulas devido a maior disponibilização de aminoácidos e açúcares

solúveis para o eixo embrionário. A maior capacidade de utilização de reservas é associada ao maior vigor de lotes de sementes (ANDRADE; COELHO; PADILHA, 2019). Dessa forma, os resultados demonstram que a maior capacidade de hidrólise das sementes com maior vigor, proporcionou maior disponibilidade dos compostos solúveis o que favoreceu a formação de plântulas com maior massa seca (Figura 3a).

Considerando que as sementes de feijão possuem maior quantidade de carboidratos em relação a proteínas, e nesse caso, por ser a principal fonte de carbono durante a germinação, a avaliação da capacidade de hidrólise do amido foi identificada a partir da avaliação da atividade de alfa amilase. Foi observado que a atividade de alfa-amilase foi crescente à medida que passou o tempo de hidratação das sementes (Figura 5). O aumento da atividade de amilases durante a germinação é relatado na literatura para diversas espécies (WANG *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2017; ZEID *et al.*, 2019).

Figura 5 – Atividade de alfa-amilase em cotilédones durante a formação de plântulas de feijão nos períodos de 0, 2, 4, 6 e 8 dias de germinação com ausência de estresse (Controle) e com presença de estresse hídrico (PEG -0,1 MPa), para os genótipos BAF07 e BAF55. \*:representa diferença significativa entre os genótipos no tempo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

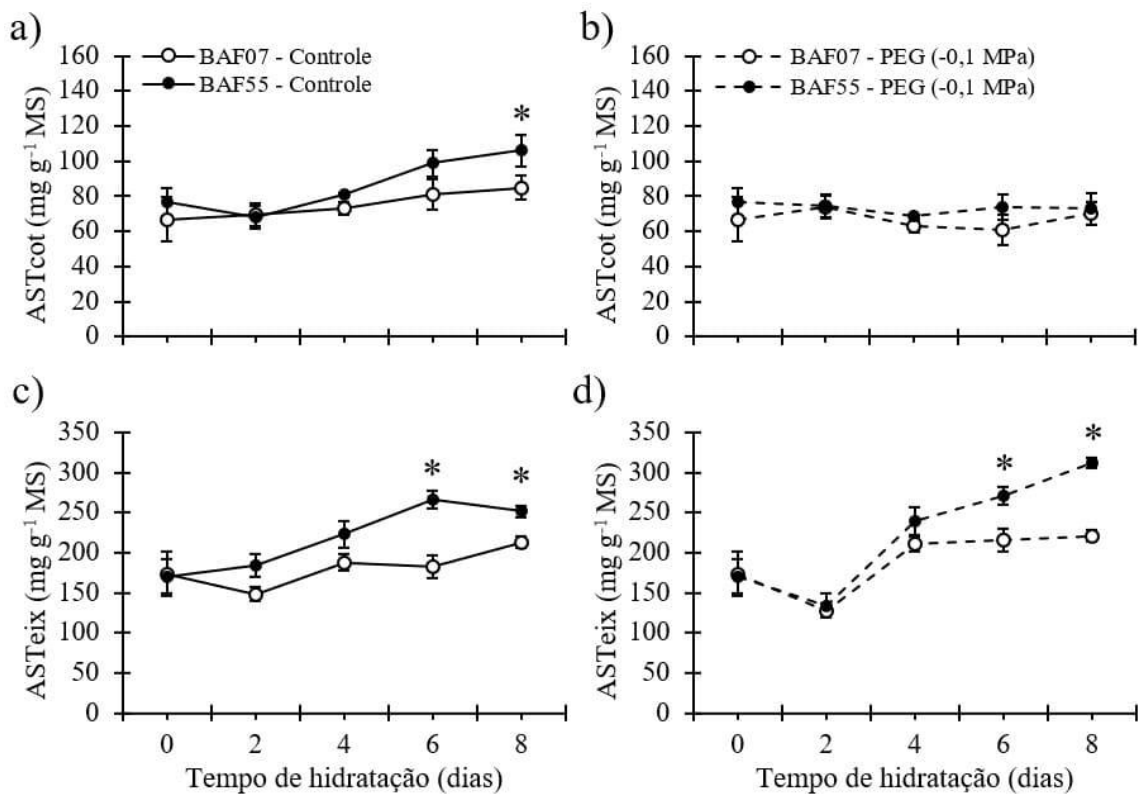
Até os quatro dias de germinação na condição sem estresse a atividade de alfa-amilase não apresentou diferença significativa entre os genótipos avaliadas, não demonstrando associação do maior vigor de sementes com a atividade dessa enzima até este período. Aos seis e oito dias foi verificada maior atividade de alfa-amilase para o genótipo BAF55. Esses resultados corroboram ao destacado por Bewley *et al.* (2013) em que, o incremento da atividade

de alfa amilase em sementes de dicotiledôneas ocorrem após os quatro dias de germinação. Em relação ao vigor, resultados semelhantes foram observados por Padilha, Coelho e Ehrhardt-Brocardo (2021), em que as sementes de feijão com maior vigor apresentaram maior atividade de alfa-amilase aos cinco dias de germinação, e apresentou associação positiva com a degradação de amido.

Durante o estresse hídrico apenas foi observada diferença significativa entre os genótipos aos oito dias de germinação (Figura 5b), entretanto, a diferença na hidrólise do amido foi observada aos seis dias de germinação (Figura 4b). Segundo Bewley *et al.*, (2013) a hidrólise em dicotiledôneas inicialmente ocorre por outras enzimas (e.g., amido fosforilase); essas enzimas podem estar associadas ao maior vigor quando avaliadas em estresse em períodos anteriores a seis dias. A maior capacidade de degradação de amido durante o estresse favoreceu a formação de plântulas de maior massa seca para o genótipo de maior vigor (Figura 3b). Sendo esse melhor desempenho associado a maior disponibilidade de açúcares solúveis durante a germinação os quais são posteriormente mobilizados para o eixo embrionário (GUZMÁN-ORTIZ *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos para os açúcares solúveis totais em cotilédones demonstram que na condição controle houve aumento da quantidade de açúcares solúveis nos cotilédones, sendo que esse incremento ocorreu principalmente a partir dos quatro dias de germinação na condição controle. Quando observado em situação de estresse hídrico, esse aumento não foi observado, sendo que a quantidade de açúcares solúveis nos cotilédones foi constante durante os oito dias de germinação, sem diferença significativa entre os genótipos (Figura 6a, Figura 6b).

Figura 6 – Açúcar solúvel total em cotilédones (a, b) e eixo embrionário (c, d) durante a formação de plântulas de feijão nos períodos de 0, 2, 4, 6 e 8 dias com ausência de estresse (Controle) e com presença de estresse hídrico (PEG -0,1 MPa), para os genótipos BAF07 e BAF55. \*:representa diferença significativa entre os genótipos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

O aumento de açúcares solúveis em cotilédones foi observado por Erbaç, Tonguç e Şanlı (2016) em sementes de girassol. O aumento dos açúcares solúveis possivelmente deve-se a maior atividade de hidrólise observada, sendo que, durante a hidrólise do amido ocorre o aumento da concentração de açúcares solúveis, que serão mobilizados posteriormente (Figura 6). Durante o estresse hídrico, a estabilização dos teores de açúcares solúveis em cotilédones durante os tempos de avaliação pode estar associada a menor hidrólise causada pela restrição hídrica (Figura 6b).

Os açúcares solúveis em eixo embrionário demonstram que houve aumento da disponibilidade de açúcares solúveis à medida que houve aumento do tempo de germinação,

em que essa diferença é observada a partir dos quatro dias de germinação em ambas as condições avaliadas. Em dicotiledôneas após a hidrólise da amilose e amilopectina ocorre a liberação de glicose e maltose as quais posteriormente são transformadas em sacarose pela enzima sacarose sintetase e mobilizadas para o eixo embrionário (NONOGAKI, 2008).

Em ambas as condições o genótipo BAF55 com maior vigor apresentou maior disponibilidade de açúcares solúveis no eixo embrionário aos seis e oito dias de germinação. O aumento dos açúcares solúveis no eixo embrionário foi observado por Shaik *et al.*, (2014) em plântulas de cevada. Considerando o aumento da disponibilidade de açúcares solúveis no eixo embrionário, Zeid *et al.*, (2019) avaliando a germinação em sementes de feijão caupi identificaram que as sementes que apresentam maior desempenho fisiológico possuem maior atividade amilolítica (i.e., alfa e beta-amilase) fornecendo maior quantidade de açúcares solúveis para o eixo embrionário. Nesse sentido, a maior atividade de alfa amilase observada para as sementes de alto vigor no sexto e oitavo dia, explicam parcialmente o melhor desempenho observado nesses períodos em ambas as condições avaliadas (Figura 3a, Figura 3b, Figura 3c, Figura 3d).

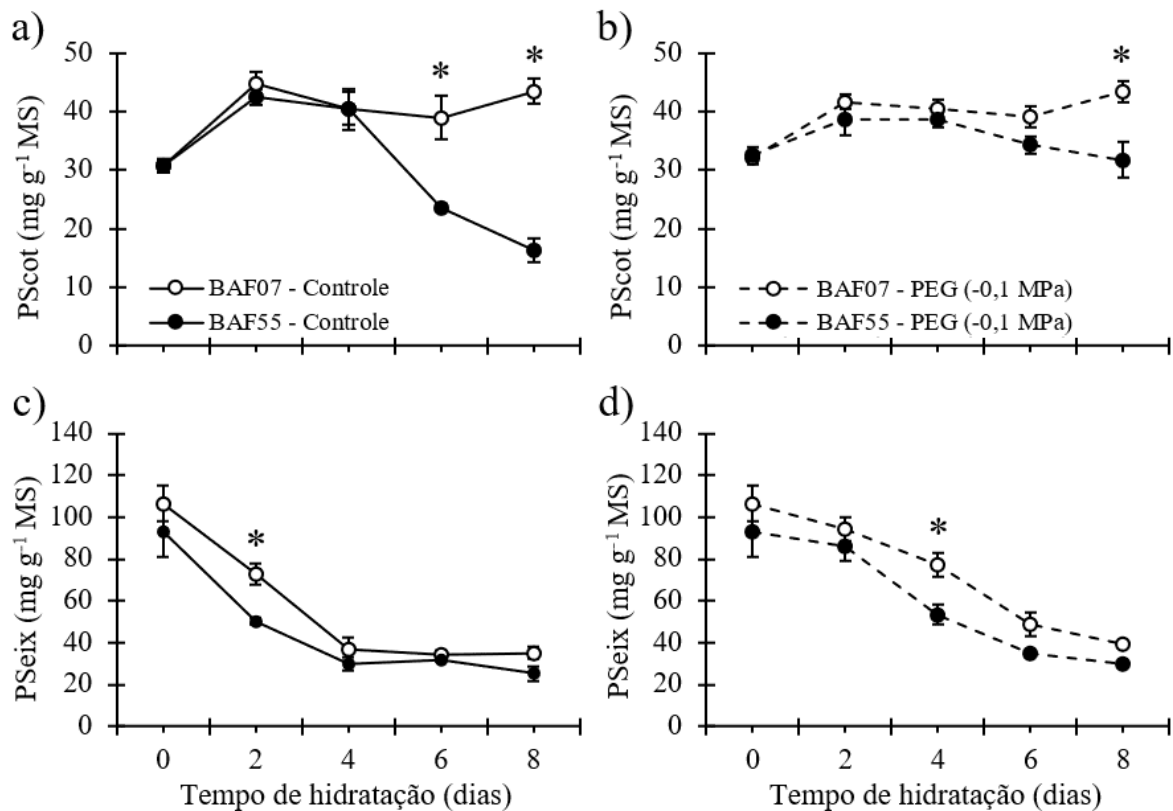
Aos quatro dias de germinação não foi observada diferença significativa para os açúcares solúveis disponíveis no eixo embrionário na condição controle (Figura 6c), contudo, houve maior acúmulo de massa seca das plântulas para a genótipo BAF55 (Figura 3a), esses resultados indicam a maior capacidade de utilização de açúcares solúveis hidrolisados os quais foram mobilizados, o que não permitiu o acúmulo de açúcares no eixo embrionário devido a maior utilização. Essa abordagem é possível considerando que a hidrólise do amido (Figura 5a, Figura 5b) e a redução do amido (Figura 4a, Figura 4b) não apresentaram diferença significativa entre os genótipos.

Durante as condições avaliadas foi observado aumento do teor de proteínas solúveis nos cotilédones para os dois lotes de sementes avaliados aos dois e quatro dias. Para o genótipo BAF07 esse aumento foi observado durante todo o período avaliado e, o genótipo BAF55 apresentou decréscimo de proteínas solúveis após quatro dias na condição sem estresse (Figura 7a) e após seis dias na condição de estresse hídrico (Figura 7b). Resultados semelhantes foram observados por Galotta *et al.*, (2019) em que, até o quarto dia de hidratação ocorreu aumento do teor de proteínas solúveis no endosperma de sementes de cevada, sendo o resultado da degradação e solubilização das proteínas de reserva.

O decréscimo das proteínas solúveis observado em cotilédones especialmente relacionado ao genótipo BAF55 após quatro dias de germinação pode estar associada à sua degradação para a formação de aminoácidos Zhao *et al.* (2018). Wei *et al.*, (2020) verificaram

em sementes de soja que a menor atividade de proteases resulta em menor proteólise e pode afetar a germinação e a formação de plântulas. Dessa forma, a maior capacidade de proteólise e utilização de proteínas solúveis pelas sementes de maior vigor podem ser a contribuição para a formação de plântulas de maior vigor (Figura 3a, Figura 3b, Figura 3c, Figura 3d).

Figura 7 – Proteínas solúveis em cotilédones (a, b) e em eixo embrionário (c, d) durante a formação de plântulas de feijão nos períodos de 0, 2, 4, 6 e 8 dias com ausência de estresse (Controle) e com presença de estresse hídrico (PEG -0,1 MPa), para os genótipos BAF07 e BAF55. \*:representa diferença significativa entre os genótipos no tempo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A quantificação de proteínas em eixo embrionário durante a germinação demonstrou decréscimo, sendo essa resposta observada para os dois genótipos em ambas as condições de estudo. O decréscimo ocorreu até os quatro dias de germinação, com posterior estabilização dos valores obtidos na condição de controle e aos seis dias na condição de estresse hídrico, demonstrando menor velocidade de utilização das proteínas solúveis. O genótipo BAF55 apresentou os menores teores de proteínas solúveis a partir dos dois dias na condição controle e a partir dos quatro dias a condição de estresse hídrico (Figura 7c, Figura 7d).

Em relação a redução de proteínas solúveis em eixo embrionário, sugere-se a sua utilização, em que, segundo Van Der Hoorn (2008) as proteínas não funcionais são submetidas a proteólise para a formação de aminoácidos e; os aminoácidos presentes nos órgãos de crescimento são utilizados para a síntese de novas proteínas e em outros processos anabólicos (BEWLEY *et al.*, 2013). O aumento de aminoácidos foi observado por Silva *et al.*, (2021) em cotilédones e eixo embrionário em plântulas de soja. Dessa forma, a redução das proteínas observadas em ambas as estruturas sugere a maior proteólise e liberação de amino ácidos livres, sendo que a maior atividade de proteases pode estar associada ao maior vigor das sementes de feijão, sendo necessário estudos dessa natureza para determinar essa relação.

#### 4.5 CONCLUSÃO

A restrição hídrica durante a germinação e formação de plântulas atrasa a atividade de hidrólise e mobilização dos componentes de reserva.

As sementes de feijão com maior vigor possuem maior capacidade de degradação de amido e proteínas durante a germinação mesmo sob condições de estresse hídrico, o que favorecesse a disponibilidade e utilização de açúcares e proteínas solúveis.



## 5 CAPÍTULO 3 – PROLINA, GENÓTIPO E VIGOR DE SEMENTES DE FEIJÃO DURANTE A GERMINAÇÃO EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE HÍDRICO E SALINO<sup>2</sup>

### 5.1 RESUMO

Dentre as principais causas da redução na porcentagem de emergência a campo, está a ocorrência de estresses abióticos, especialmente o estresse hídrico e salino. Ambos causam estresse osmótico e induzem a produção de prolina livre. Diversos estudos associam a maior concentração de prolina com a tolerância de genótipos a esses estresses. Entretanto é necessário determinar como o genótipo e o vigor influenciam na superação dos estresses, e como a concentração de prolina interage com esses fatores. O objetivo deste trabalho foi avaliar como as sementes de alto vigor toleram os estresses hídrico e salino, assim como determinar se existe associação do aminoácido prolina com as sementes de maior vigor. Foram utilizados os genótipos BAF07, BAF13, BAF23, BAF42, BAF44, BAF55 e BAF112, as quais foram submetidas a germinação em estresse hídrico (Polietileno glicol -0,2 Mpa) e salino (150 mmol L<sup>-1</sup>). Aos 10 dias após a semeadura foram avaliados o comprimento, massa seca das plântulas e capacidade de mobilização de reservas, assim como o teor de prolina livre das plântulas. Os resultados demonstraram que as sementes de alto vigor favoreceram a superação dos estresses, formando plântulas com maior massa e comprimento, entretanto, o vigor apresentou correlação não significativa com a concentração de prolina em ambos os estresses. Dessa forma, concluiu-se que o vigor de sementes influencia na superação dos estresses hídrico e salino e deve ser utilizado como estratégia durante a semeadura e, o aminoácido prolina não está associado ao maior vigor do lote de sementes.

### 5.2 INTRODUÇÃO

O feijão é uma das culturas com grande importância mundial, sendo uma das principais fontes de alimento para a população humana em países da Ásia, África e América latina (DE RON *et al.*, 2016). Os principais limitantes da produção são os estresses hídrico e salino, os quais resultam em estresse osmótico, inibição da germinação, estresse oxidativo, inibição fotossintética, desbalanço nutricional e redução do crescimento (MOUKHATARI *et al.*, 2020).

Considerando que os efeitos dos estresses abióticos podem ser observados em todo o ciclo da planta, um dos momentos mais críticos para o sucesso da produção é a emergência de

---

<sup>2</sup> Artigo Publicado na Revista Ciência Agronômica ([10.5935/1806-6690.20220056](https://doi.org/10.5935/1806-6690.20220056))

plantas a campo. A perda na porcentagem de germinação e conseqüentemente do estande de plantas é reportada especificamente sob condições de estresse hídrico e salino (JOVOVIĆ *et al.*, 2018). Sendo que os efeitos negativos são observados no decréscimo da porcentagem germinação resultando em menor número de plantas por área, e na formação das plântulas, reduzindo sua massa seca e comprimento (PANTOLA *et al.*, 2017).

Para manter o potencial de emergência de plântulas a campo é determinante o uso de sementes com alto vigor. A capacidade das sementes com alto vigor em apresentarem maior porcentagem de germinação, emergência a campo e desempenho de plântulas em condições de estresse abiótico pode ser determinante para o estabelecimento inicial (MARCOS-FILHO, 2015b; FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). Contudo, o genótipo possui grande influência na resposta aos estresses abióticos, o qual pode ser determinante na germinação das sementes e formação de plântulas (AVCI; ÍLERI; DEMIRKAYA, 2017; AFLAKI *et al.*, 2017). Nesse contexto, a interação entre a tolerância de genótipos a estresses abióticos e a capacidade das sementes com alto vigor apresentarem melhor desempenho nessas condições precisa ser estudada com maiores detalhes, buscando compreender a contribuição de cada um (i.e., genótipo e vigor de sementes) durante a germinação e formação de plântulas.

Uma das estratégias desenvolvidas pelas plantas para favorecer a superação de estresses abióticos é o acúmulo de prolina nos diferentes órgãos da planta (CHEN *et al.*, 2016). O acúmulo de prolina é relatado como um dos osmólitos responsáveis pelo o ajuste osmótico das células, favorecendo a manutenção das atividades metabólicas durante esses estresses (MANSOUR; ALI, 2017). Considerando a relação entre a prolina e a capacidade de superação de estresses, diversos estudos identificaram a influência desse aminoácido na tolerância de genótipos a estresses abióticos (CHEN *et al.*, 2016; PER *et al.*, 2017; MOROSAN *et al.*, 2017; FURLAN *et al.*, 2020). Considerando que as sementes de alto vigor possuem maior capacidade de superar as condições de estresse abiótico, e que a concentração de prolina pode influenciar para a superação desses estresses, é possível que sementes com maior vigor apresentem maior capacidade de produção de prolina, o que favoreceria a formação das plântulas nessas condições.

Diante do exposto o presente estudo foi baseado nas hipóteses que: os lotes de sementes de feijão com maior vigor possuem maior capacidade de superar condições de estresse hídrico e/ou salino por apresentar maior concentração de prolina livre o que favorece a formação de plântulas com maior vigor durante essas condições e; os genótipos apresentam diferenças na tolerância aos estresses impostos quando avaliadas no estágio inicial de desenvolvimento, o que contribui na germinação e formação de plântulas vigorosas. Dessa forma, o objetivo deste

trabalho foi avaliar como as sementes de alto vigor toleram os estresses hídrico e salino, assim como determinar se existe associação do aminoácido prolina com as sementes de maior vigor.

### 5.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os genótipos BAF07, BAF13, BAF23, BAF42, BAF44 e BAF55 as quais são originalmente pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Feijão (BAF) do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina e a cultivar comercial BAF112 (IPR88 Uirapurú). As sementes dos genótipos foram produzidas na safra 2019/2020 no município de Lages, Santa Catarina, Brasil. Após a colheita e beneficiamento, as sementes foram armazenadas em câmara seca (10 °C e 50% de umidade relativa do ar) durante quatro meses até o início do experimento.

A caracterização dos lotes de sementes dos genótipos quanto a sua qualidade fisiológica foi realizada pela germinação e índice de vigor.

O índice de vigor foi realizado com três repetições de 20 sementes distribuídas no terço superior de folhas de papel toalha umedecidas com volume de água destilada na proporção de 2,5 mL g<sup>-1</sup> de papel seco (KRZYZANOWSKI *et al.*, 2020). Os rolos foram mantidos em germinador a 25 ± 2 °C durante três dias. Após esse período, o comprimento de hipocótilo (CH), comprimento de raiz (CR) e comprimento total de plântulas (CTP) foram mensurados com auxílio de paquímetro digital e expressos em cm.plântula<sup>-1</sup>. O cálculo do índice de vigor (IV) foi determinado a partir do índice de crescimento (G) (SAKO *et al.*, 2001) e o índice de uniformidade (U) (CASTAN; GOMES-JUNIOR; MARCOS-FILHO, 2018), calculada com auxílio do *software* R (R CORETEAM, 2021) utilizando o pacote SeedCalc (SILVA; MEDEIROS; OLIVEIRA, 2019).

Como complemento ao IV o teste de germinação foi conduzido e determinada a porcentagem de germinação e a porcentagem de primeira contagem de germinação (PCG) no quinto dia após a sementeira (BRASIL, 2009) para as condições controle, estresse hídrico e salino. A condição de estresse hídrico foi realizada utilizando uma solução de Polietileno Glicol 6000 equivalente a -0,2 Mpa (119,57 g de Polietileno Glicol 6000 por litro de água) (VILELLA; DONI-FILHO; SIQUEIRA, 1991). Para a condição de estresse salino foi utilizada uma solução de cloreto de sódio com concentração de 150 mmol L<sup>-1</sup> com condutividade elétrica de 14,6 dS m<sup>-1</sup>. A água utilizada foi destilada e deionizada.

O teste de germinação foi conduzido em germinador Mangelsdorf em temperatura de 21 ± 2 °C, sendo a sementeira realizada em papel *Germitest*® na forma rolo, com três repetições.

O papel foi umedecido com água destilada, solução de Polietileno Glicol 6000 ou solução de cloreto de sódio na proporção de 2,5 mL g<sup>-1</sup> de papel seco. A primeira contagem de germinação (PCG) foi considerada no quinto dia após a sementeira e a contagem final foi realizada aos 10 dias após a sementeira. Os rolos de papel foram dispostos na vertical dentro do germinador, e envoltos com sacos plásticos para evitar perdas, umidade e manter o estresse desejado.

O desempenho de plântulas foi avaliado 10 dias após a sementeira. Para isso, três repetições de 20 sementes distribuídas no terço superior de folhas de papel toalha foram umedecidas com volume de água destilada, solução de Polietileno Glicol 6000 ou solução de cloreto de sódio na proporção de 2,5 mL g<sup>-1</sup> de papel seco. As plântulas normais obtidas foram utilizadas para as avaliações e determinados o comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total da plântula (CT) mensurados com auxílio de paquímetro digital e expressos em centímetros por plântula (cm pl<sup>-1</sup>). As plântulas mensuradas foram utilizadas para a determinação de massa seca de raiz (MSR), massa seca de hipocótilo (MSH) e massa seca total de plântulas (MST), secas a 80 °C por 24 h e os resultados foram expressos em miligramas por plântula (mg pl<sup>-1</sup>) (KRZYZANOWSKI *et al.*, 2020). O número de raízes secundárias foi determinado das plântulas mensuradas e contabilizadas as raízes maiores que 0,5 cm (NRS). A taxa de mobilização de reservas (TMR) foi determinada conforme Andrade, Padilha e Coelho (2019) e expressa em porcentagem e; a TRRS foi determinada conforme (SOLTANI; GHOLIPOOR; ZEINALI, 2006) e expressa em porcentagem.

A determinação da tolerância aos estresses utilizados foi realizada aos 10 dias utilizando o cálculo para avaliação da tolerância individual aos estresses, baseado na metodologia realizada por Kakar *et al.* (2019), sendo essa adaptada para as condições de germinação, de acordo com as variáveis utilizadas. A interpretação do cálculo é baseada em que os genótipos com maior índice apresentam maior tolerância ao estresse determinado. Para o cálculo do índice de resposta cumulativa ao estresse hídrico (IRCEH) e índice de resposta cumulativa ao estresse salino (IRCES) foram utilizados os valores de resposta individual dos parâmetros germinação (G), comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH) comprimento total (CT), massa seca de raiz (MSR), massa seca de hipocótilo (MSH), massa seca total (MST), taxa de mobilização de reservas (TMR) e número de raízes secundárias (NRS), a variável TRRS não foi considerada para a tolerância por não ser um parâmetro direto de avaliação nas plântulas formadas avaliadas em estresse hídrico (h), estresse salino (s) e controle (c), conforme demonstrado nas equações (1) e (2) abaixo:

$$\text{IRCEH} = (\text{Gh/Gc}) + (\text{CRh/CRc}) + (\text{CHh/CHc}) + (\text{CTh/CTc}) + (\text{MSRh/MSRc}) + (\text{MSHh/MSHc}) + (\text{MSTh/MSTc}) + (\text{TMRh/TMRc}) + (\text{NRSh/NRSc}) \quad (1)$$

$$\text{IRCES} = (\text{Gs/Gc}) + (\text{CRs/CRc}) + (\text{CHs/CHc}) + (\text{CTs/CTc}) + (\text{MSRs/MSRc}) + (\text{MSHs/MSHc}) + (\text{MSTs/MSTc}) + (\text{TMRs/TMRc}) + (\text{NRSS/NRSc}) \quad (2)$$

A concentração de prolina foi determinada em três repetições biológicas de plântulas originadas em cada condição avaliada através do método de Bates, Waldren e Teare (1973) sem alterações, conduzido em duplicata.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições em arranjo fatorial 7 x 3, sendo, sete genótipos e três condições de germinação com três repetições. A análise de variância e as análises de correlação de Pearson foram realizadas utilizando o *software* R (R CORETEAM, 2021). Os resultados foram submetidos à análise de variância (teste F), e comparação entre as médias e interações foi efetuada através do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Para a análise de correlação, foram determinadas correlações significativas a 1% ou 5% e não significativas pelo teste t. Os resultados da análise estatística podem ser observados ao final do documento em caso de necessidade (APÊNDICE C).

#### 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variáveis comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT), índice de crescimento (C), índice de uniformidade (U) e índice de vigor (IV) apresentaram diferença significativa entre os lotes de sementes das cultivares utilizadas. Os genótipos BAF13, BAF42, BAF55 e BAF112, apresentaram maior qualidade fisiológica quando comparados aos genótipos BAF07, BAF23 e BAF44 (Tabela 7).

Tabela 7 – Comprimento de raiz (CR), hipocótilo (CH) e total (CT), crescimento (C), uniformidade (U), índice de vigor (IV) das cultivares utilizadas

Genótipos	CR	CH	CT	C	U	IV
BAF 07	5,69 c	2,02 c	7,72 d	533 c	747 c	597 c
BAF 13	7,85 b	2,44 a	10,30 b	731 b	846 b	772 b
BAF 23	6,04 c	2,18 b	8,23 c	566 c	823 b	643 c
BAF 42	7,79 b	2,46 a	10,26 b	726 b	879 a	772 b
BAF 44	4,50 d	1,65 d	6,16 d	422 d	691 d	502 d
BAF 55	8,73 a	2,44 a	11,17 a	810 a	898 a	836 a
BAF 112	7,93 b	2,32 b	10,25 b	737 b	882 a	781 b
CV%	6,06	4,52	4,91	5,88	3,04	4,42

Legenda: Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Um dos princípios básicos para os estudos relacionados ao vigor é determinar a diferença no vigor entre os lotes utilizados, segregando em grupos e posteriormente a sua associação com os caracteres de interesse. Segundo Finch-Savage e Bassel (2016) as sementes com maior vigor apresentam maior velocidade, uniformidade e crescimento de plântulas durante a germinação.

A primeira contagem de germinação (PCG) é um parâmetro utilizado para a segregação de lotes de sementes quanto ao vigor, sendo que nos resultados apresentados, em todas as condições de germinação (i.e., controle, estresse hídrico e estresse salino) as sementes dos genótipos BAF07, BAF23 e BAF44 apresentaram menor porcentagem na PCG, complementando a segregação entre os lotes dos genótipos utilizados anteriormente (Tabela 8).

Dessa forma, com os parâmetros associados ao vigor de sementes, foi possível definir dois grupos de vigor distintos, o grupo com alto vigor (i.e., BAF13, BAF42, BAF55 e BAF112), e o grupo com baixo vigor (i.e., BAF07, BAF23 e BAF44).

Tabela 8 – Primeira contagem de germinação (PCG) e porcentagem de germinação (G) em condições sem estresse (controle), estresse salino (NaCl) e estresse hídrico (PEG) para os genótipos avaliadas

Genótipos	PCG (%)			G (%)		
	Controle	NaCl	PEG	Controle	NaCl	PEG
BAF 07	82 b	50 b	53 b	95 a	87 b	87 a
BAF 13	90 a	67 a	69 a	96 a	89 a	91 a
BAF 23	79 b	55 b	47 c	95 a	83 b	88 a
BAF 42	95 a	74 a	65 a	97 a	91 a	91 a
BAF 44	79 b	47 b	43 c	95 a	85 b	77 b
BAF 55	97 a	73 a	72 a	97 a	93 a	91 a
BAF 112	90 a	73 a	56 b	97 a	92 a	90 a
CV%		8,64			3,59	

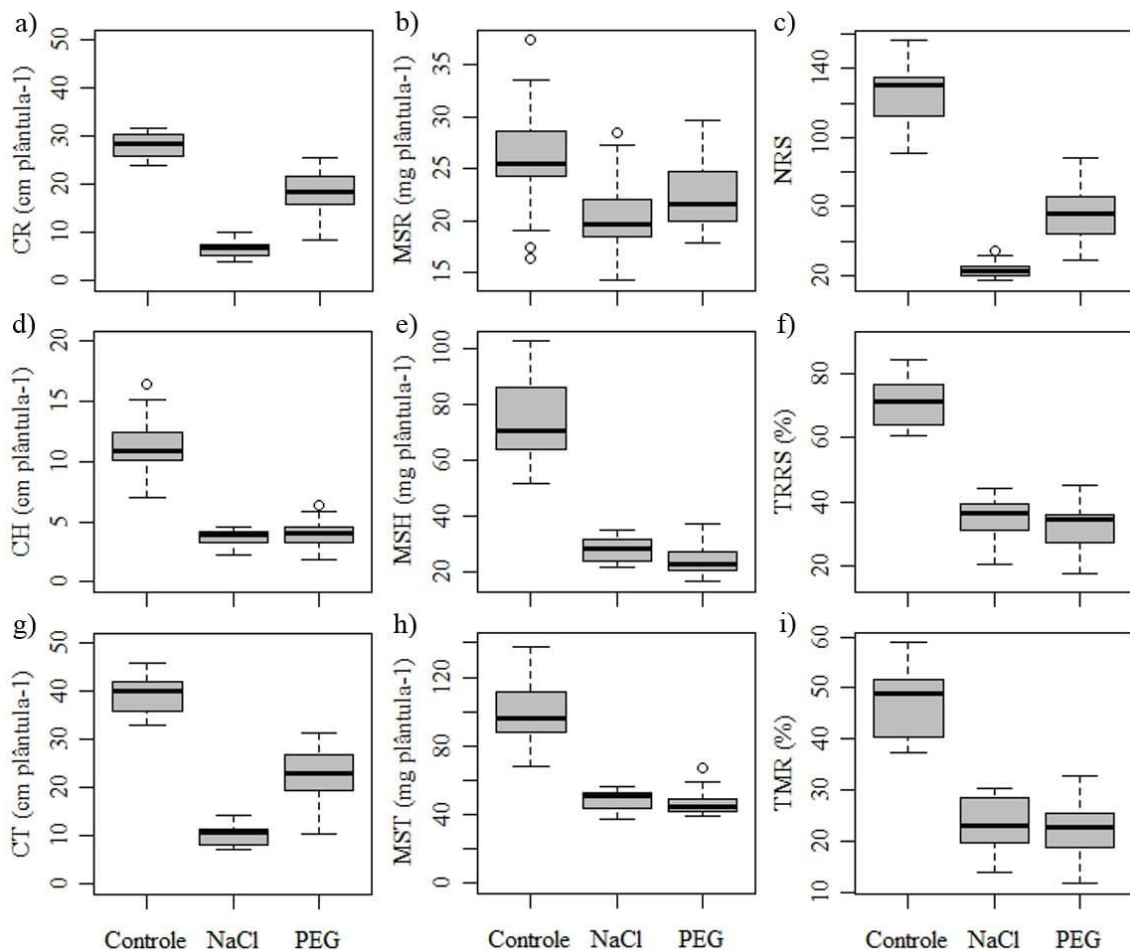
Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Os resultados de germinação em condições de estresse hídrico e estresse salino apresentaram efeito significativo entre os genótipos. Em estresse hídrico (PEG) apenas a genótipos BAF44 de menor vigor apresentou menor porcentagem de germinação. Entretanto, sob estresse salino (NaCl) os genótipos BAF07, BAF23 e BAF44 apresentaram menor porcentagem de germinação em relação aos genótipos pertencentes ao grupo com alto vigor (Tabela 8). O efeito negativo desses estresses sobre a porcentagem de germinação é conhecido na literatura (PANTOLA *et al.*, 2017; AVCI; ÍLERI; DEMIRKAYA, 2017; JOVOVIĆ *et al.*, 2018). A redução do percentual de germinação ocorre devido a redução da disponibilidade hídrica necessária para que ocorra o processo de germinação, e iônico ocasionada pelas condições salinas que impõe uma toxicidade no protoplasma das células vegetais em situação de estresse salino (ARAUJO-NETO *et al.*, 2020).

Uma variação significativa foi observada para o comportamento dos parâmetros avaliados. Em geral, essa variação observada no diagrama de caixa é o resultado da resposta genética dos genótipos quando submetidos a diferentes condições de estresse, assim como pode estar atrelada as diferenças no vigor observadas para os lotes de sementes (Figura 8, Figura 9).

O estresse salino apresentou efeito mais severo sobre o crescimento das plântulas quando comparado ao estresse hídrico. Dentre as variáveis mais afetadas, destaca-se uma maior redução no comprimento das raízes (CR) (Figura 8a) e o número de raízes secundárias (NRS) (Figura 8c). O CR apresentou redução de 76% em estresse salino e 37% em estresse hídrico. Para o número de raízes secundárias (NRS) o decréscimo foi de 81% em estresse salino e de 56% quando submetidas a estresse hídrico. Em condição de estresse hídrico, por sua vez, o crescimento radicular foi superior ao observado em estresse salino (Figura 8a), resultados semelhantes forma encontrados por Maia *et al.* (2015), atribuindo esse fenômeno a morte do meristema apical em estresse salino, limitando dessa forma a diferenciação e conseqüentemente crescimento do sistema radicular em profundidade.

Figura 8 – Diagrama de caixa demonstrando a variação e influência dos estresses salino (NaCl 150 mmol L<sup>-1</sup>) e hídrico (Polietileno Glicol (PEG) -0,2 MPa) sobre o comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT), massa seca de raiz (MSR), massa seca de hipocótilo (MSH) e massa seca total (MST) de plântulas de o número de raízes secundárias (NRS), taxa de redução de reservas (TRRS), taxa de mobilização de reservas (TMR) feijão aos 10 dias após a montagem do teste



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Para ambos os estresses, a massa seca do hipocótilo (MSH) e a massa seca total (MST) não diferiram entre os estresses (Figura 8e, Figura 8h). A massa seca de raízes (MSR) apresentou diferença significativa entre as condições avaliadas, sendo que em estresse hídrico e estresse salino foram inferiores ao controle. A redução na MSR foi de 22% em estresse salino e 14% em estresse hídrico. A MSR foi menos afetada em relação a observada na MSH, em que apresentou redução de 61% para o estresse salino e 67% para o estresse hídrico. Esses resultados

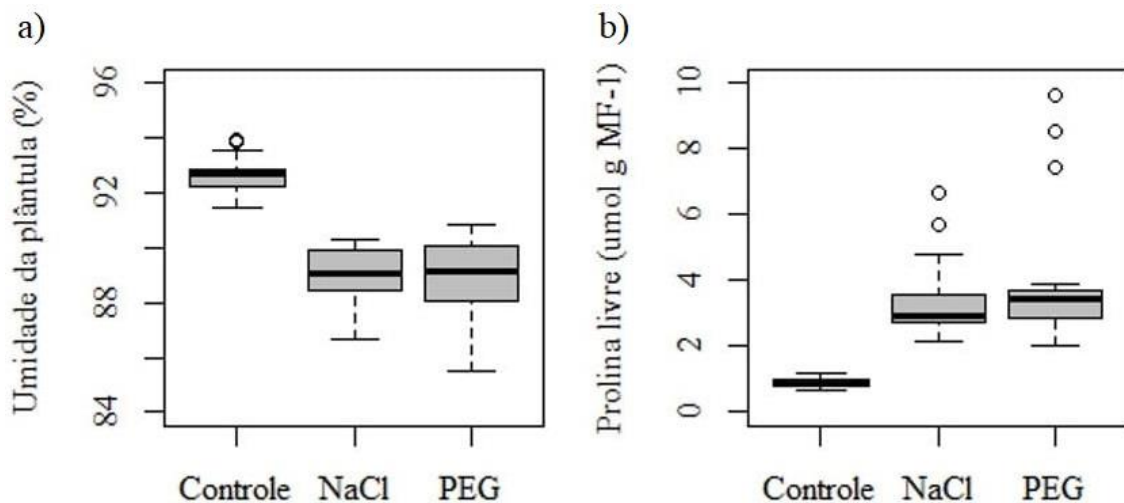


demonstram que as plântulas quando estressadas priorizaram a mobilização de reservas para o crescimento das raízes buscando superar a condição de estresse imposta (Figura 8b).

A taxa de mobilização de reservas (TMR) e a taxa de redução de reservas (TRRS), apresentaram resposta similar entre os estresses impostos, demonstrando uma redução da quantidade de reservas utilizadas e mobilizadas para o eixo embrionário (Figura 8f, Figura 8i). A restrição hídrica e/ou a presença de íons (i.e.,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) resultam na redução da turgescência celular e toxicidade, respectivamente, resultando na redução da capacidade de degradação e mobilização das reservas armazenadas (DANTAS *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018)

Dentre as respostas das plantas a estresse osmóticos de estresses, tem-se a redução do teor de água das plantas (Figura 9a) e o aumento do teor de prolina livre (Figura 9b). Em ambas as situações de estresse, o percentual de umidade da plântula foi reduzido e consequentemente, houve aumento do teor de prolina do tecido vegetal das plântulas.

Figura 9 – Diagrama de caixa demonstrando a variação e influência dos estresses salino ( $\text{NaCl}$   $150 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e hídrico (Polietileno Glicol (PEG)  $-0,2 \text{ MPa}$ ) sobre o teor de umidade (a) e teor de prolina livre de plântulas de feijão aos 10 dias após a montagem do teste



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Diversos estudos relatam as diferenças genótípicas em relação a tolerância a estresses abióticos, sendo possível determinar a tolerância de um genótipo a partir do uso de parâmetros fisiológicos (DANTAS *et al.*, 2017; AFLAKI *et al.*, 2017; KAKAR *et al.*, 2019). Foi verificada diferença significativa entre o índice de tolerância cumulativa ao estresse salino (IRCES) e no índice de tolerância cumulativa ao estresse hídrico (IRCEH), indicando diferenças entre os

genótipos em relação as tolerâncias aos estresses salino e hídrico. Para o estresse salino (IRCES) os genótipos BAF07, BAF42 e BAF55 apresentaram maior tolerância. Para o estresse hídrico (IRCEH), a maior tolerância foi obtida pelos genótipos BAF07 e BAF55 (Tabela 9).

Tabela 9 – Índice de resposta cumulativa ao estresse salino (IRCES) e índice de resposta cumulativa ao estresse hídrico (IRCEH) entre os genótipos utilizadas

Genótipos	IRCES	IRCEH
BAF 07	4,30 a	5,96 a
BAF 13	4,07 b	5,19 b
BAF 23	3,66 b	3,85 b
BAF 42	4,47 a	5,01 b
BAF 44	3,85 b	4,89 b
BAF 55	4,37 a	5,98 a
BAF 112	3,99 b	4,75 b
CV%	5,68	11,35

Legenda: Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Considerando a resposta dos genótipos aos estresses, foi possível identificar diferenças entre a tolerância ao estresse (Tabela 9) e o vigor do lote (Tabela 7), isto é, genótipos com sementes de alto e baixo vigor com maior tolerância aos estresses, assim como, genótipos com sementes de alto e baixo vigor com menor tolerância. Essa relação apresenta importância para determinar a relação da tolerância do genótipo e o vigor durante a formação de plântulas associadas a superação de condições de estresse.

Para o comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH) e comprimento total (CT) em condições ótimas, os genótipos BAF55 e BAF112 apresentaram os maiores comprimentos. Entretanto, em condições de estresse hídrico o CR e o CH do genótipo BAF112 foram afetados, sendo inferior ao obtido pelo genótipo BAF07 (Tabela 10). Segundo Krzyzanowski *et al.* (2020), as sementes com maior vigor são capazes de originar plântulas com maior comprimento. Dessa forma, os resultados indicam a influência do genótipo durante a formação das plântulas em estresse hídrico, visto que o genótipo BAF112 possui maior vigor de sementes e apresentou menor comprimento. Esse resultado corrobora com a diferença na tolerância ao estresse hídrico observada para esses genótipos (Tabela 9).

Sobre o estresse salino, não foi verificada diferença significativa entre os genótipos para o CR e CH, entretanto para o CT, os genótipos BAF13, BAF42, BAF55 e BAF112 apresentaram maiores médias de comprimento (Tabela 10) o que indica a influência do vigor do lote de sementes durante esse estresse, considerando que foram classificados como alto vigor (Tabela 7, Tabela 8).

Tabela 10 – Comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT), massa seca de raiz (MSR), massa seca de parte aérea (MSH) e massa seca total (MST), número de raízes secundárias (NRS), taxa de mobilização de reservas (TMR) e taxa de redução de reservas (TRRS) em condição sem estresse (Água), estresse salino (NaCl) e estresse hídrico (PEG) para os genótipos avaliados aos 10 dias após a montagem do teste

Var	T	Genótipos						
		BAF07	BAF13	BAF23	BAF42	BAF44	BAF55	BAF112
CR (cm pl <sup>-1</sup> )	Água	26,24 b	27,54 b	27,50 b	30,24 a	25,76 b	31,23 a	28,81 a
	NaCl	5,02 a	7,07 a	6,36 a	9,34 a	4,84 a	7,18 a	6,56 a
	PEG	18,67 a	21,09 a	11,53 c	22,27 a	14,41 b	20,16 a	16,34 b
CH (cm pl <sup>-1</sup> )	Água	12,33 b	11,28 c	8,18 d	10,64 c	9,69 d	12,00 b	14,42 a
	NaCl	3,74 a	3,81 a	2,43 a	4,25 a	3,10 a	4,97 a	4,03 a
	PEG	5,08 a	4,29 a	2,13 b	4,05 a	3,15 b	5,48 a	3,71 b
CT (cm pl <sup>-1</sup> )	Água	38,58 b	38,81 b	35,76 b	40,89 a	35,46 b	43,23 a	43,27 a
	NaCl	10,04 b	12,46 a	10,14 b	15,29 a	91,68 b	12,97 a	12,46 a
	PEG	21,72 c	26,76 a	14,79 d	27,65 a	18,59 c	30,57 a	23,57 b
MSR (mg pl <sup>-1</sup> )	Água	17,57 c	27,89 b	33,23 a	28,07 b	24,35 b	24,42 b	26,57 b
	NaCl	16,47 c	18,59 c	26,23 a	21,13 b	17,69 c	19,82 b	21,60 b
	PEG	19,51 b	20,77 b	24,58 a	20,36 b	24,40 a	24,12 a	23,33 a
MSH (mg pl <sup>-1</sup> )	Água	57,18 e	69,77 c	98,64 a	69,88 c	63,59 d	71,43 c	89,56 b
	NaCl	24,50 b	29,75 a	24,90 b	30,95 a	23,12 b	33,60 a	31,58 a
	PEG	25,38 b	24,21 b	18,58 b	22,99 b	20,18 b	32,57 a	26,41 b
MST (mg pl <sup>-1</sup> )	Água	74,75 e	97,67 c	131,8 a	97,95 c	87,85 d	95,85 c	116,14 b
	NaCl	40,98 b	48,34 a	51,14 a	52,09 a	40,81 b	53,42 a	53,18 a
	PEG	44,89 b	44,99 b	43,17 b	43,36 b	44,58 b	56,70 a	49,74 a
NRS (Nr.)	Água	110 b	142 a	127 a	135 a	100 b	138 a	129 a
	NaCl	21 a	25 a	23 a	29 a	18 a	23 a	23 a
	PEG	57 b	64 b	35 c	56 b	36 c	79 a	56 b
TMR (%)	Água	43,39 c	48,19 b	38,82 c	55,25 a	40,33 c	53,10 a	50,62 b
	NaCl	23,26 b	23,62 b	15,15 c	29,57 a	18,95 c	29,34 a	22,96 b
	PEG	25,73 b	21,93 c	12,84 d	24,44 b	20,79 c	31,55 a	21,66 c
TRRS (%)	Água	64,23 c	71,42 b	62,93 c	76,63 a	63,51 c	79,62 a	76,89 a
	NaCl	34,63 b	34,13 b	22,94 d	41,83 a	30,45 c	41,54 a	37,68 b
	PEG	37,41 a	32,79 b	19,46 d	35,08 b	28,41 c	43,03 a	31,59 b
Prolina ( $\mu\text{mol g MF}^{-1}$ )	Água	0,87 a	0,78 a	1,09 a	0,91 a	0,85 a	0,78 a	0,91 a
	NaCl	3,01 c	2,71 c	5,71 a	3,05 c	3,85 b	2,39 c	2,71 c
	PEG	3,10 b	3,57 b	8,51 a	2,94 c	3,51 b	2,53 c	3,33 b

Legenda: Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Var: Variáveis; T: Tratamentos. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

O NRS na ausência de estresse, os genótipos do grupo com alto vigor (i.e., BAF13, BAF42, BAF55 e BAF112) apresentaram o maior número de raízes secundárias. Nas condições de estresse salino não foi observada diferença significativa entre os genótipos, possivelmente

pela severidade observada para este estresse. Em condição de estresse hídrico o maior NRS foi observado para o genótipo BAF55 (alto vigor com maior tolerância), e os menores valores foram observados para os genótipos BAF23 e BAF44 (baixo vigor com menor tolerância), nessas condições, a tolerância do genótipo e o vigor atuam sinergicamente potencializando a formação de um número maior de raízes secundárias favorecendo a formação de plântulas mais vigorosas durante o estresse hídrico.

Considerando os genótipos BAF07 e BAF55 as quais são tolerantes ao estresse hídrico e possuem vigor contrastante (Tabela 9), observa-se que o genótipo BAF55 com maior vigor de sementes apresentou maior CR, CT e NRS, confirmando a influência do vigor sobre esses parâmetros durante o estresse hídrico (Tabela 10).

Em relação a massa seca de raiz (MSR), hipocótilo (MSH) e total (MST) nos estresses salino e hídrico para o genótipo BAF07 e BAF55 com maiores índices de tolerância (Tabela 9), é possível observar que a genótipo BAF55 classificado como de alto vigor (Tabela 7) apresentou a maior massa seca independente da condição submetida (Tabela 10). Esse resultado demonstra a importância do vigor durante a formação de plântulas em condições de estresse. No trabalho conduzido por Silva *et al.* (2016) comportamentos similares foram observados onde lotes de menor vigor apresentaram plântulas com matéria seca inferior em relação aos lotes de alto vigor em condições de estresse salino. O mesmo foi observado ao analisar os resultados de MSR, MSH e MST para os genótipos BAF44 e BAF112 com menor tolerância (Tabela 9), em que, o genótipo BAF112 apresentou o melhor desempenho nas condições de estresse (Tabela 10). Essa mesma relação é observada para os dados de TMR e TRRS, indicando que os genótipos com maior vigor de sementes, apresentaram maior capacidade de hidrolisar e mobilizar as reservas para a formação da plântula (Tabela 10).

A TMR demonstra que os genótipos BAF13, BAF42, BAF55 e BAF112 apresentam maior mobilização de reservas durante as condições ideais de germinação, assim como, maior taxa de redução de reservas das sementes (TRRS) (Figura 9b) esses resultados vão de encontro ao observado por Padilha, Coelho e Andrade (2020) em que as sementes de maior vigor apresentam maior TMR e TRRS. Entretanto, ao serem submetidas a condições de estresse salino os genótipos BAF13 e BAF112 (menor IRCES) apresentaram menor taxa de mobilização em relação ao BAF42 e BAF55 (maior IRCES). Esses resultados destacam a influência do genótipo durante a formação de plântulas em estresse salino.

A importância do vigor do lote de sementes (IV) e da tolerância em estresse salino (IRCES) e hídrico (IRCEH) podem ser observadas na análise de correlação de Pearson. O IV apresentou correlação negativa em relação aos índices de tolerância. Considerando que o vigor

e o genótipo influenciam durante a formação das plântulas, a correlação não significativa entre esses índices é desejável, desta forma é possível identificar como o vigor do lote e a tolerância favoreceram a formação das plântulas durante cada um dos estresses estudados (Tabela 11).

Tabela 11 – Coeficiente de correlação de Pearson (r) para as variáveis analisadas e a sua associação com o vigor inicial do lote de sementes em condições de estresse salino (NaCl) e estresse hídrico (PEG)

Parâmetro	Estresse Salino		Estresse Hídrico	
	IV	IRCES	IV	IRCEH
CR	0,66*	0,58*	0,55**	0,60*
CH	0,61*	0,75*	0,39 <sup>ns</sup>	0,94*
CT	0,74*	0,71*	0,63*	0,81*
MSR	0,80*	-0,14 <sup>ns</sup>	0,48**	-0,01
MSH	0,22 <sup>ns</sup>	0,54*	-0,14 <sup>ns</sup>	0,81*
MST	0,71*	0,31 <sup>ns</sup>	0,33 <sup>ns</sup>	0,65*
NRS	0,55*	0,58**	0,69*	0,76*
TMR	0,64*	0,84*	0,38 <sup>ns</sup>	0,88*
TRRS	0,57*	0,82*	0,45**	0,90*
Prolina	-0,50**	-0,69*	-0,27 <sup>ns</sup>	-0,59*
IRCES/IRCEH	0,39 <sup>ns</sup>	-	0,17 <sup>ns</sup>	-

Legenda: Não significativo (<sup>ns</sup>), Significativo a 1% (\*) e significativo a 5% (\*\*) de probabilidade pelo teste t. Comprimento de raiz (CR); Comprimento de hipocótilo (CH); Comprimento Total (CT); Massa seca de raiz (MSR); Massa seca de hipocótilo (MSH); Massa seca total (MST); Número de raízes secundárias (NRS), Taxa de mobilização de reservas (TMR); Taxa de redução de reservas (TRRS); Teor de prolina livre (Prolina), Índice de tolerância cumulativa ao estresse salino (IRCES); Índice de tolerância cumulativa ao estresse hídrico (IRCEH). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Os parâmetros de crescimento avaliados e o vigor do lote de sementes apresentam associação positiva durante a formação das plântulas (MARCOS-FILHO, 2015b, PEREIRA; PEREIRA; DIAS, 2015, ANDRADE; COELHO; PADILHA, 2019), e foi possível identificar associação semelhante mesmo sobre condições de estresse hídrico e salino (Tabela 11). Foi verificada correlação positiva do vigor de sementes com CR, CH, CT, MSR, MST, NRS, TMR e TRRS em situação de estresse salino. Nas condições de estresse hídrico, o vigor do lote de sementes influenciou de forma positiva nos parâmetros CR, CT, MSR, NRS e TRRS. Considerando essas correlações positivas, as sementes de maior vigor apresentam maior capacidade de degradação das reservas (i.e., TRRS) em estresse hídrico e salino, a qual favorece o crescimento de plântulas e massa seca das raízes. Entretanto, considerando as correlações observadas, a tolerância do genótipo foi determinante para a formação de plantulas neste estresse, sendo que, com excessão da MSR, todos os parâmetros apresentaram associação positiva com a tolerância do genótipo (Tabela 9).

Em condição de estresse hídrico foi observada forte associação do genótipo (i.e., IRCEH) para todas as variáveis, exceto MSR (Tabela 10). Essa relação pode ser observada nos

resultados do genótipo BAF07 (baixo vigor com maior tolerância) e do genótipo BAF112 (alto vigor com menor tolerância). O genótipo BAF07 na situação controle foi inferior em todos os parâmetros fisiológicos por apresentar menor vigor de sementes. Entretanto na condição de estresse hídrico para os resultados de CR, CH, CT, TMR e TRRS, o genótipo BAF07 foi superior ao genótipo BAF112 e, nos parâmetros MSH e NRS não foi identificada diferença significativa entre esses genótipos (Tabela 9).

Os genótipos com maior tolerância a um estresse hídrico ou salino possuem melhor desempenho fisiológico quando comparada aos genótipos de menor tolerância (ARTEAGA *et al.*, 2020), a partir disso é possível destacar que os parâmetros CR, CH, CT, TMR e TRRS possuem associação positiva com a tolerância a estresse hídrico. O genótipo BAF07 por possuir maior tolerância em relação ao genótipo BAF112, explica o melhor desempenho do genótipo BAF07 nesses parâmetros, mesmo que o BAF07 tenha apresentado menor vigor.

A concentração de prolina apresentou correlação negativa com o vigor de semente e com o índice de tolerância a estresse salino. Essa mesma associação foi observada na correlação para essa variável em estresse hídrico (Tabela 12). O acúmulo de prolina é uma das principais respostas aos estresses salino e hídrico indicando a presença desses estresses nas plantas (PER *et al.*, 2017), assim como é associado a maior tolerância de genótipos a esses estresses (MANSOUR; ALI, 2017). No entanto, o presente estudo não foi observada essa relação, visto que os genótipos com menor tolerância observada (i.e., BAF23 e BAF44) (Tabela 9) apresentaram os maiores concentrações de prolina em ambas as condições (Tabela 9).

Tabela 12 – Coeficientes de correlação de Pearson (r) referente aos parâmetros associados ao desempenho de plântulas e a concentração de prolina em plântulas de diferentes genótipos de feijão

Parâmetro	Prolina ( $\mu\text{mol g FW}^{-1}$ )	
	Estresse Salino	Estresse Hídrico
CR	-0,32 <sup>ns</sup>	-0,61*
CH	-0,85*	-0,67*
CT	-0,53**	-0,68*
MSR	0,48**	0,33 <sup>ns</sup>
MSH	-0,59*	-0,43 <sup>ns</sup>
MST	-0,16 <sup>ns</sup>	-0,21 <sup>ns</sup>
NRS	-0,23 <sup>ns</sup>	-0,57*
TMR	-0,79*	-0,73*
TRRS	-0,84*	-0,77*

Legenda: Não significativo (<sup>ns</sup>), Significativo a 1% (\*) e significativo a 5% (\*\*) de probabilidade pelo teste t. Comprimento de raiz (CR); Comprimento de hipocótilo (CH); Comprimento Total (CT); Massa seca de raiz (MSR); Massa seca de hipocótilo (MSH); Massa seca total (MST); Número de raízes secundárias (NRS), Taxa de mobilização de reservas (TMR); Taxa de redução de reservas (TRRS). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Considerando que os genótipos BAF23 e BAF44 possuem baixo vigor e menor tolerância, sugere-se que a maior suscetibilidade nas condições de estresse exigiu a maior produção de prolina para a superação do estresse. O mesmo foi observado por Morosan *et al.* (2017) em que, os genótipos de feijão com menor tolerância apresentaram maior concentração de prolina. Esses resultados indicam que durante a germinação a prolina não está associada a tolerância, sendo apenas um marcador desses estresses.

A associação da concentração de prolina com os parâmetros fisiológicos avaliados foi, em geral, negativa ou não significativa, o que reforça a ausência de relação da prolina na tolerância durante a germinação (Tabela 12). Arteaga *et al.*, (2020) observaram que prolina apresentou correlação significativa negativa com os parâmetros de crescimento em diferentes genótipos de feijão, e destacam que a maior concentração de prolina afeta negativamente o crescimento e acúmulo de massa. Esse decréscimo no desempenho pode estar associado a rota de síntese desse aminoácido, o qual requer um custo energético metabólico expressivo (TAIZ *et al.*, 2017), limitando dessa forma o crescimento e desenvolvimento de novos tecidos consequentemente formando plântulas menos vigorosas. Essa associação pode ser observada a partir dos resultados dos genótipos BAF23 e BAF44, ambos de menor vigor (Tabela 7) e menor tolerância (Tabela 9), os quais apresentaram maior teor de prolina em plântulas (Tabela 10).

As plantas que apresentam um melhor desempenho em condições de estresse hídrico e de salino apresentam um eficiente mecanismo de defesa antioxidante celular, além de uma grande habilidade de transportar água e íons, compartimentalizando compostos tóxicos, evitando dessa forma a morte celular mantendo o crescimento e desenvolvimento das plântulas (MAIA *et al.*, 2015), tais aptidões podem ser associadas a tolerância genotípica e ao vigor das sementes em estágios iniciais de germinação e desenvolvimento das plântulas, sendo necessário a elucidação desses mecanismos em trabalhos futuros associados ao vigor de sementes.

## 5.5 CONCLUSÕES

O vigor de sementes favorece a germinação e formação de plântulas em condição de estresse hídrico ou salino, contudo a melhor performance não está associada a maior concentração de prolina nas plântulas originadas por essas sementes. Os genótipos apresentam diferenças quanto a sua tolerância aos estresses hídrico e salino, sendo essa identificada durante os estágios iniciais de desenvolvimento; e essa tolerância favorece a formação de plântulas de melhor desempenho nessas condições.

## 6 CAPÍTULO 4 – MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE SALINO

### 6.1 RESUMO

A mobilização de reservas favorece a formação de plântula durante a germinação. Esse processo é influenciado pelo vigor de sementes e por condições de estresse salino. As sementes com maior vigor apresentam maior potencial de hidrólise e utilização de reservas e isso pode favorecer o desempenho em condições de estresse salino. O objetivo deste trabalho foi identificar como a utilização das reservas armazenadas em sementes de feijão contribuem para a superação do estresse salino, buscando identificar a diferença na hidrólise e mobilização de reservas entre as sementes com vigor superior. Foram utilizadas sementes dos genótipos BAF44 (baixo vigor) e BAF55 (alto vigor). O estresse salino foi simulado utilizando cloreto de sódio e as avaliações foram realizadas em um, três, cinco e sete dias de germinação. As variáveis foram o comprimento e massa seca de plântulas, gasto metabólico, amido, proteína total, açúcares solúveis, proteínas solúveis e atividade de alfa-amilase. As sementes com maior vigor apresentaram maior massa seca e comprimento de plântulas mesmo quando submetida a condições de estresse salino, resultado da maior hidrólise e mobilização de açúcares solúveis e uso das proteínas solúveis. As sementes de maior vigor apresentam maior capacidade de hidrólise e utilização de proteínas solúveis e açúcares solúveis, o que resulta em plântulas de melhor desempenho em condições de estresse salino.

### 6.2 INTRODUÇÃO

A produção de grãos ocorre em todo o mundo e por esse motivo diversas são as condições de produção as quais as culturas agrícolas são submetidas. Nesse sentido a presença de estresses abióticos são os principais limitantes da produção de uma cultura, resultando em grande decréscimo na produtividade (SINDHU *et al.*, 2020). Dentre os estresses abióticos, o cultivo em solo salino apresenta-se como um grande desafio para os produtores, considerando que seu efeito pode ocorrer em todos os estádios de crescimento das plantas resultando em efeito negativo na germinação, formação de plântulas, crescimento e desenvolvimento, culminando com a perda da produtividade (YADAV *et al.*, 2019). Nesse contexto, um solo salino ocorre, em geral, pelo acúmulo de cloreto de sódio natural ou decorrente da irrigação (NADEEM *et al.*, 2019a).



O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é produzido e consumido principalmente nos países em desenvolvimento da América Latina, África e Ásia, sendo uma das leguminosas de maior importância mundial devido ao uso na alimentação humana como fonte de amido, proteína, fibras e minerais (MUKANKUSI *et al.*, 2017; LOS *et al.*, 2018). O cultivo do feijão é realizado em todo o mundo, sendo que suas principais regiões produtoras estão localizadas em regiões áridas e semiáridas, suscetíveis à estresses abióticos como a salinização natural dos solos (NADEEM *et al.*, 2019a; NADEEM *et al.*, 2019b; FAROOQ *et al.*, 2017).

Com os efeitos negativos resultantes do estresse salino, a perda de emergência de plântulas pode ser evitada parcialmente utilizando-se sementes de maior qualidade fisiológica (germinação e vigor) (PADILHA, COELHO; SOMMER, 2022). Além disso, o uso de sementes de maior vigor favorece a formação de plântulas com melhor desempenho (MARCOS-FILHO, 2015b).

Para que haja a retomada do metabolismo da semente e o processo de germinação seja estabelecido, as reservas armazenadas nos cotilédones devem ser hidrolisadas e mobilizadas para o eixo embrionário, a fim de serem utilizadas para formação de novos tecidos (NONOGAKI, 2008). A maior hidrólise e mobilização de reservas pode permitir um melhor desempenho de plântulas em condições de estresse, favorecendo a sua superação (VERMA *et al.*, 2015). As principais reservas armazenadas em sementes de feijão são amido e proteínas, compondo mais de 70% de sua massa (LOS *et al.*, 2018). A maior hidrólise de amido favorece a disponibilização de açúcares solúveis para uso durante a germinação (WANG *et al.*, 2016). De forma semelhante, o catabolismo proteico favorece a disponibilidade de proteínas solúveis e aminoácidos, os quais podem ser utilizados durante a germinação (NONOGAKI, 2008; GUZMÁN-ORTIZ *et al.*, 2019).

A mobilização de reservas em sementes é um parâmetro importante na avaliação de estresse abiótico, visto que, sementes com desempenho superior (germinação, comprimento de plântula e acúmulo de massa seca) em condições de estresse, apresentam maior utilização das reservas durante essas condições (WANG *et al.*, 2016; EL-MOUKHTARI *et al.*, 2022; PADILHA, COELHO; SOMMER, 2022). Nesse sentido, a maior hidrólise e mobilização desses componentes armazenados pode favorecer o melhor desempenho em uma condição de estresse salino, sendo essa mobilização, superior em sementes de maior vigor.

Dessa forma, o objetivo deste estudo é avaliar a mobilização de reservas em sementes de feijão contrastantes na qualidade fisiológica, buscando determinar a importância desse processo durante a formação de plântulas vigorosas em condições de estresse salino.

### 6.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os genótipos utilizados foram BAF44 e BAF55, originalmente procedentes do Banco Ativo de Germoplasma de Feijão (BAF) do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). As sementes foram produzidas na área experimental do CAV-UDESC no município de Lages, Santa Catarina na safra 2020/2021 e, após a colheita, as sementes foram secas e mantidas em câmara seca ( $10 \pm 2$  °C e  $50 \pm 5\%$  de umidade relativa) até o momento da realização das análises. Os genótipos utilizados foram selecionados a partir de trabalhos prévios, considerando os genótipos que apresentaram contraste em seu potencial de produção de sementes com diferenças estatísticas para qualidade fisiológica (MICHELS *et al.*, 2014; GINDRI *et al.*, 2017).

Para a caracterização física, fisiológica e bioquímica dos lotes de sementes dos genótipos BAF44 e BAF55 foram utilizadas seis repetições. Os testes realizados para avaliação da qualidade fisiológica foram realizados em condições de ausência e presença de estresse salino ( $\text{NaCl } 100 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

O peso de mil sementes (PMS) foi determinado conforme procedimento descrito nas regras para análise de sementes (BRASIL, 2009) utilizando-se seis repetições.

O percentual de germinação (G) foi determinado pelo teste conduzido em germinador *Mangelsdorf* em temperatura de  $25 \pm 2$  °C, sendo a semeadura realizada em substrato de papel utilizando três folhas dispostas em forma de rolo, sendo a primeira contagem de germinação (PCG) realizada no quinto dia e a contagem final no nono dia (BRASIL, 2009). Para o umedecimento do papel foram utilizadas água destilada (controle) e solução salina (estresse salino) contendo  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de cloreto de sódio (NaCl) na proporção de 2,5 mL de água destilada ou solução de NaCl por grama de papel seco.

O desempenho de plântulas foi realizado utilizando 15 sementes distribuídas no terço superior de folhas de papel (NAKAGAWA, 1999). As folhas foram umedecidas com água destilada ou solução salina na proporção de  $2,5 \text{ mL g}^{-1}$  de papel seco. Aos cinco dias, as plântulas normais foram mensuradas com auxílio de paquímetro digital quanto ao seu comprimento total de plântulas (CP) e posteriormente, houve separação da plântula e dos cotilédones para secagem em estufa a 80 °C por 24 h para obtenção da massa seca de plântulas (MSP) e da massa seca restante em cotilédones (MSRC). A redução das reservas das sementes (RRS) foi realizada pela diferença entre a massa seca inicial das sementes (MSS) e da MSRC (SOLTANI; GHOLIPOOR; ZEINALI, 2006).

A emergência a campo (EC) foi realizada em solo utilizando 50 sementes por repetição e

a semente realizada a 5 cm de profundidade. A contagem da emergência foi realizada no 15º dia após a semente.

Durante a germinação foram determinados 5 tempos de avaliação (0 [semente seca], 1, 3, 5 e 7 dias) nas condições controle e estresse salino. As avaliações fisiológicas e bioquímicas foram determinadas em três repetições biológicas em cada período de avaliação. Os componentes bioquímicos avaliados durante a formação das plântulas foram amido, proteína total, açúcares solúveis totais, proteínas solúveis, e atividade da alfa-amilase, sendo essas realizadas em cotilédones e/ou eixo embrionário.

A avaliação do amido foi realizada conforme descrito por McCready *et al.* (1950), onde utilizou-se extração dupla com ácido perclórico 52%. A quantificação foi realizada com 1 mL do extrato propriamente diluído e 3 mL de reagente antrona, seguido de agitação em vortex por 3 s. Os tubos de ensaio foram mantidos em banho-maria a 95 °C por 450 s. A leitura foi realizada em espectrofotômetro na absorvância de 630 nm e os resultados foram expressos em mg g<sup>-1</sup> de massa seca.

A proteína total foi determinada pelo método Kjeldahl (AOAC, 1995) a partir do teor de nitrogênio total da amostra, utilizando 200 mg de amostra. Para cada amostra foi adicionado 1 mL de peróxido de hidrogênio 30%, 2 mL de ácido sulfúrico concentrado e 0,7 g do catalisador (contendo 90% de sulfato de sódio, 9% de sulfato de cobre e 1% de selênio) e realizada a digestão em bloco digestor. O teor de proteína total foi determinado por titulação e o nitrogênio obtido da amostra foi multiplicado por 6,25. Os resultados foram expressos em mg g<sup>-1</sup> de massa seca.

A partir dos dados obtidos de amido e proteína total, foi determinada a taxa de redução desses componentes. Dessa forma, o valor remanescente foi mensurado a partir dos valores obtidos em cada tempo de avaliação (1, 3, 5, 7 dias) em relação ao inicial, sendo expresso em porcentagem. A taxa de redução de amido (TRA) e proteína foi determinada a partir dos resultados obtidos inicialmente (I), e o valor remanescente de cada componente no tempo de germinação avaliado (F), sendo calculada pela equação (1):

$$TRA = \left( \frac{[I \text{ (mg semente}^{-1})] - [F \text{ (mg semente}^{-1})]}{[I \text{ (mg semente}^{-1})]} \right) \times 100 \quad (1)$$

A extração e quantificação de açúcares solúveis totais foi realizada em eixo embrionário e cotilédones conforme proposto por Clegg (1956). Foram utilizados 100 mg de amostra seca e moída em almofariz e realizada a extração dupla com álcool etílico 80%. A reação de quantificação foi realizada utilizando 1 mL do extrato diluído e 5 mL de reagente antrona,

seguido de agitação em vortex por 3 s. Os tubos de ensaio foram mantidos em banho-maria a 95 °C por 480 s, após isso, foi realizada a leitura em espectrofotômetro na absorvância de 630 nm. Os resultados foram expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  de massa seca.

Para a extração de proteínas solúveis utilizaram-se amostras de 100 mg maceradas em almofariz e 2 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,0; posteriormente centrifugado. A proteína solúvel foi quantificada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm, conforme descrito por Bradford (1976), e os resultados foram expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  de massa seca.

A atividade da alfa-amilase foi avaliada pelo método do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959) empregando-se o procedimento de Monerri e Guardiola (1986) com adaptações. Para obtenção do extrato enzimático, em 500 mg de amostra foram adicionados 5 mL de tampão acetato de sódio pH 5,6 juntamente com 4 mmol de  $\text{CaCl}_2$  e 0,005% de Triton X-100. As amostras foram mantidas em agitação por 1 h no gelo e posteriormente centrifugadas. O extrato foi submetido a temperatura de 70 °C por 15 minutos. A quantificação foi realizada utilizando-se 0,5 mL do extrato enzimático e 0,5 mL de solução de amido solúvel contendo 2,0% (p/v), as amostras ficaram em banho-maria por 30 min a 38 °C. Após, foram adicionados 1 mL de solução DNS e as amostras foram mantidas em banho-maria por 6 min a 95 °C. A reação foi inativada em gelo e, após resfriar, foram adicionados 8 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro na absorvância de 540 nm. Uma unidade de enzima foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1  $\mu\text{mol}$  de maltose por minuto na condição avaliada. Os resultados foram expressos em unidade de enzima por miligrama de proteína ( $\text{U mg}^{-1}$ ).

A eletroforese das proteínas obtidas durante a germinação foi realizada num sistema vertical em uma concentração de 12% (gel de resolução) e 4% (gel de empacotamento), contendo dodecil sulfato de sódio (SDS). A eletroforese foi realizada com o extrato de proteína solúvel dos cotilédones conforme metodologia de Laemmli (1970). Após a quantificação, 15  $\mu\text{g}$  de amostra foram adicionadas ao tampão (Tris-HCL pH 6,7; Glicerol; 10% de SDS; 0,5% de azul de bromofenol e 2-mercaptoetanol na proporção 1:1. O sistema de eletroforese contendo as amostras foi acondicionado em uma solução tampão pH 8,3 (25 mM de Tris, 192 mM de Glicina e 1% de SDS) e submetido a 140V em temperatura ambiente (20 °C) por duas horas. Após a eletroforese, o gel foi lavado com água destilada e mantido por três horas em solução corante Coomassie Brilliant Blue R-250. A eletroforese foi efetuada duas vezes (duas repetições) em condições similares de ambiente, buscando verificar a reprodutibilidade.

O delineamento experimental para realizar a qualidade física, qualidade fisiológica e composição bioquímica entre os lotes dos genótipos utilizados foi realizada em delineamento

experimental inteiramente casualizado com seis repetições. A análise estatística para determinar o efeito do estresse salino sobre a formação de plântulas foi realizada em delineamento experimental inteiramente casualizado, em que, os dados obtidos para cada genótipo (BAF44 e BAF55) em cada tempo (0, 1, 3, 5, 7 dias) e estresse (controle e estresse salino) foram arranjos em fatorial triplo 2 x 5 x 3 (tempo x genótipo x estresse) com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e a comparação entre as médias e interações foi efetuada através do teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando o *software* Sisvar (FERREIRA, 2011). Os resultados da análise estatística podem ser observados ao final do documento em caso de necessidade (APÊNDICE D).

#### 6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade fisiológica dos lotes foi mensurada pela avaliação da primeira contagem de germinação (PCG), germinação (G) (BRASIL, 2009), emergência à campo (EC), germinação em estresse salino (GNaCl), comprimento de plântulas (CP) e massa seca de plântulas (MSP). A germinação não apresentou diferença significativa entre os lotes de sementes dos genótipos, contudo, diferenças no vigor foram observadas pelas variáveis PCG, EC, GNaCl, CP e MSP, sendo esta associação já destacada por Finch-Savage e Bassel (2016). O lote de sementes do genótipo BAF55 apresentou o melhor desempenho de plântulas, indicando maior vigor (Tabela 13).

O potencial de produção de sementes com maior qualidade fisiológica do genótipo BAF55 em relação ao genótipo BAF44 é uma característica já estabelecida e que foi verificada em diferentes condições de produção (EHRHARDT-BROCARD; COELHO, 2016; GINDRI *et al.*, 2017). Este comportamento também foi verificado no presente estudo, utilizando-se sementes produzidas em mesmo ambiente na safra 2020/2021. Dessa forma, o lote de sementes do genótipo BAF55 apresenta maior vigor em contraste com o lote do BAF44 com menor vigor. Em relação a composição bioquímica das sementes, não foi verificada diferença significativa entre os genótipos para os componentes amido e proteína total (Tabela 13).

Tabela 13 – Peso de mil sementes (PMS), teor de amido, teor de proteína total, primeira contagem de germinação (PCG), germinação (G), emergência a campo (EC), germinação em solução salina (GNaCl), comprimento de plântulas (CP) e massa seca de plântulas (MSP)

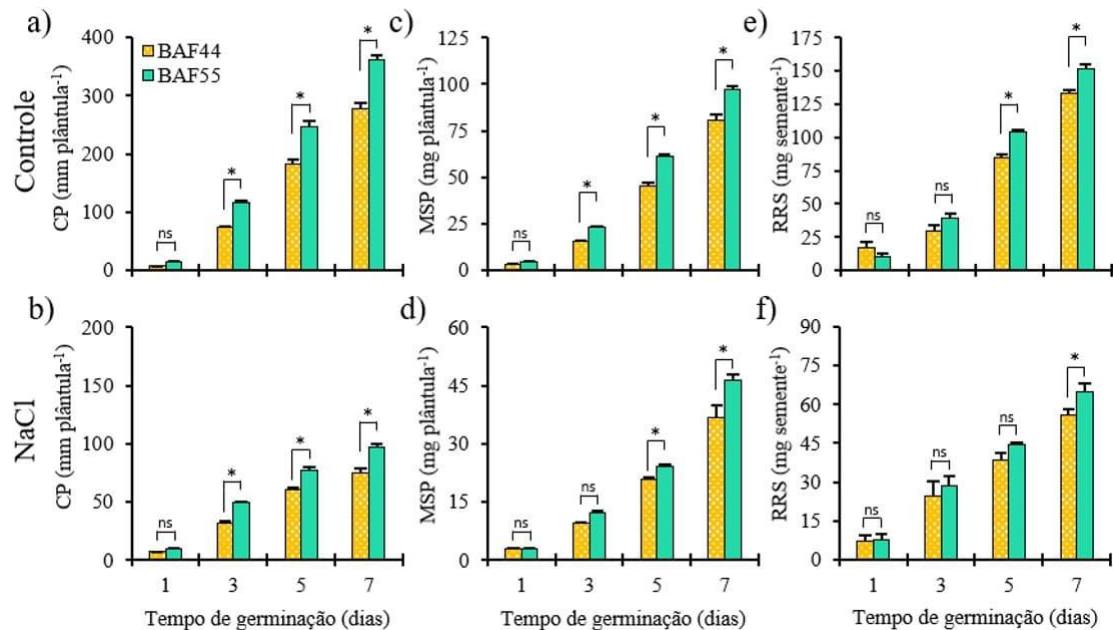
Atributo <sup>2</sup>	BAF 55	BAF 44	F-calc	p-valor
PMS (g)	223	271	370,30	0,000
Amido (%)	42,93	45,07	1,097	0,319
Proteína Total (%)	23,17	25,74	2,127	0,175
PCG (%)	95	81	19,22	0,001
G (%)	97	95	4,623	0,057
EC (%)	91	86	12,712	0,005
GNaCl (%)	94	88	23,442	0,000
CP (mm plântula <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	245,72	182,67	61,549	0,000
MSP (mg plântula <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	58,87	45,55	41,250	0,000

Legenda: <sup>1</sup>Avaliado aos cinco dias após a semeadura. <sup>2</sup>n=12 (6 repetições para BAF44 e BAF55). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A condição de estresse salino afetou negativamente o desempenho das plântulas, resultando em decréscimo no comprimento de plântulas, acúmulo de massa seca e redução das reservas da semente. Pode-se verificar resposta do vigor de sementes sobre a mobilização de reservas durante a germinação, onde o melhor desempenho de plântulas foi observado a partir do terceiro dia de germinação para as sementes do BAF55, gerando, na ausência e presença de estresse salino, plântulas com maior comprimento (Figura 10a, Figura 10b) e massa seca (Figura 10c, Figura 10d).

Considerando a redução de reservas da semente (RRS), as sementes de maior vigor apresentaram maior utilização das reservas armazenadas, diferença essa observada no quinto dia de germinação na ausência de estresse e apenas no sétimo dia no estresse salino (Figura 10e, Figura 10f). Da mesma forma, Padilha, Coelho e Andrade (2020) verificaram que sementes de maior vigor apresentam maior capacidade de mobilizar reservas em condições de estresse salino, favorecendo a formação de plântulas de melhor desempenho (CP e MSP).

Figura 10 – Comprimento de plântulas (CP), massa seca de plântulas (MSP) e redução de reservas da semente (RRS) avaliados durante a germinação em condição de ausência de estresse (controle) e presença de estresse salino (NaCl) para os lotes dos genótipos BAF44 e BAF55. \*:indica diferença significativa entre os lotes dentro do tempo de avaliação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade



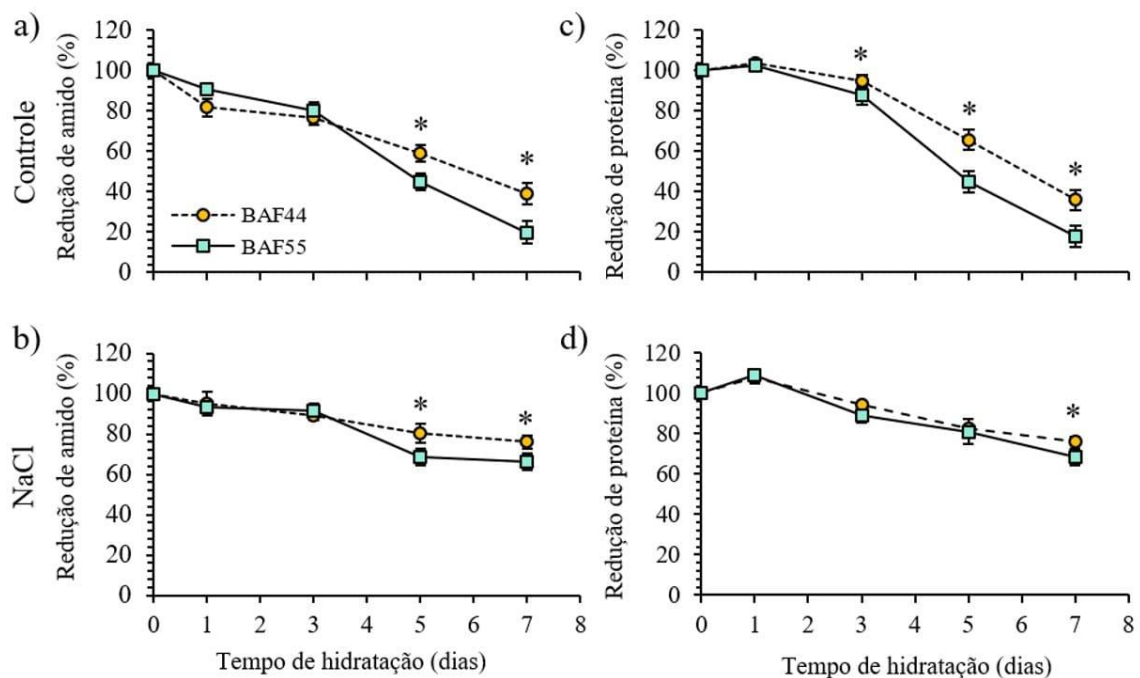
Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A maior RRS é resultante da degradação das reservas armazenadas na semente e que durante a germinação foram hidrolisadas e mobilizadas para os pontos de crescimento. Essa relação pode ser constatada pela redução de amido e de proteínas totais durante a germinação das sementes. No amido, a redução aos cinco e sete dias foi significativamente superior no lote de maior vigor (i.e., BAF55) em ambas as condições de germinação, demonstrando a maior hidrólise em sementes com maior vigor (Figura 11a, Figura 11b). De forma semelhante, a hidrólise de proteínas totais em sementes com maior vigor foi superior na condição controle, observada a partir do terceiro dia de germinação (Figura 11c). No estresse salino essa diferença foi observada no sétimo dia de germinação, resultados que corroboram com a RRS (Figura 10e, Figura 10f).

Buscando associar a maior degradação de amido com a formação e desempenho de plântulas, Wang *et al.* (2016) trabalharam com arroz, Shaik *et al.* (2014) com cevada e Zeid *et al.* (2019) com feijão de corda e verificaram que as sementes que apresentavam maior maior potencial de degradação do amido formaram plântulas com melhor desempenho. Nesse sentido, as sementes de maior vigor utilizadas apresentaram maior capacidade de hidrólise resultando

em plântulas com melhor desempenho nas duas condições de germinação (Figura 10). Conforme Wang *et al.* (2016), a maior capacidade de degradação de amido apresenta importância para a sobrevivência e rápido crescimento em uma ampla faixa de condições ambientais. Assim, a maior utilização das reservas possibilitou o melhor desempenho em estresse salino, considerando que as sementes de maior vigor tiveram maior capacidade de hidrólise de amido (Figura 11a, Figura 11b) e melhor desempenho de plântulas no estresse salino (Figura 10).

Figura 11 – Redução de amido e redução de proteína total avaliados durante a germinação em condição de ausência de estresse (controle) e presença de estresse salino (NaCl) para os lotes dos genótipos BAF44 e BAF55. \*:indica diferença significativa entre os lotes dentro do tempo de avaliação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

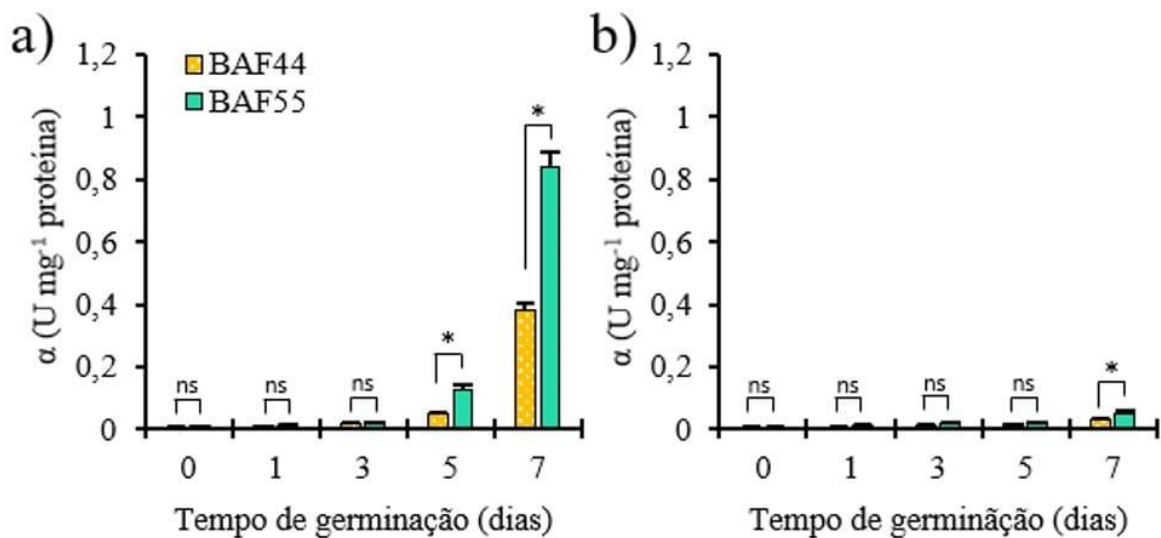
Na avaliação da atividade da enzima alfa-amilase, constatou-se aumento no transcorrer da germinação em ambas as condições. Os resultados demonstraram que aos cinco e aos sete dias sementes com maior vigor apresentaram maior atividade da enzima na ausência de estresse, indicando maior potencial para hidrolisar o amido (Figura 12a). Entretanto, ao considerar os resultados obtidos durante o estresse salino, foi observada diferença significativa apenas no



sétimo dia de germinação sendo que a atividade foi comprometida significativamente em relação à condição controle (Figura 12b).

Dentre as enzimas responsáveis pela degradação do amido, a atividade da alfa-amilase é uma das principais (BEWLEY *et al.*, 2013). Durante a germinação, a alfa-amilase contribui para a hidrólise de amido e a formação de plântulas com maior comprimento e massa seca (WANG *et al.*, 2016), sendo sua ativação dependente da giberelina presente na semente (WANG *et al.*, 2018b). Dessa forma, a maior atividade da alfa-amilase observada para as sementes de maior vigor na ausência de estresse contribuiu com a maior hidrólise do amido.

Figura 12 – Atividade da alfa-amilase ( $\alpha$ ) avaliada durante a germinação em condição de ausência de estresse (controle) (a) e presença de estresse salino (NaCl) (b) para os lotes dos genótipos BAF44 e BAF55. \*:indica diferença significativa entre os lotes dentro do tempo de avaliação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

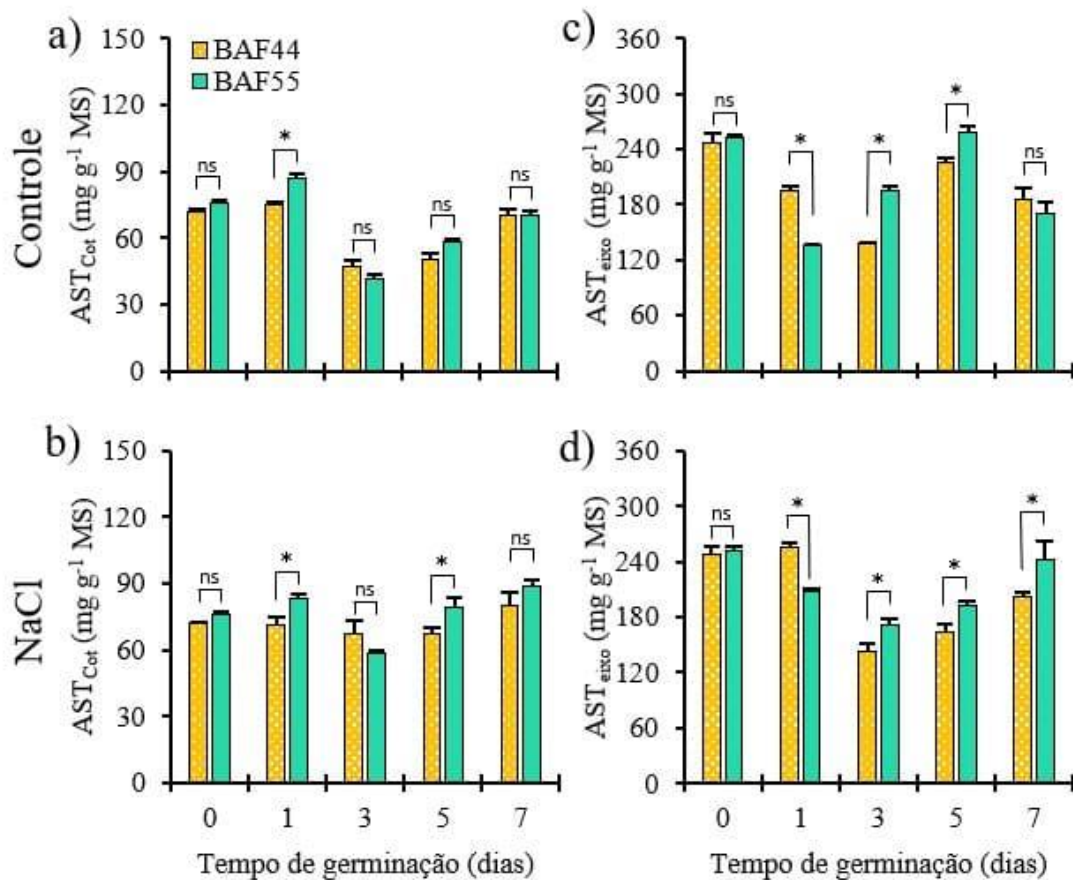
Considerando o estresse salino, a atividade da alfa-amilase é inferior em relação a condição de ausência de estresse (LIU *et al.*, 2018; PADILHA; COELHO; EHRHARDT-BROCARD, 2021). Essa redução na atividade enzimática resultou em menor hidrólise de amido (Figura 11b) e menor desempenho de plântulas (Figura 10b, Figura 10d) em ambos os lotes de sementes utilizados. Embora a atividade da alfa-amilase não tenha apresentado diferença significativa entre os lotes aos cinco dias, as sementes de maior vigor demonstraram maior desempenho (Figura 10b, Figura 10d). Isso já havia sido observado por Padilha, Coelho e Ehrhardt-Brocado (2021) em sementes de feijão com contraste no vigor inicial sob condições

de estresse salino. As sementes apresentaram atividade da alfa-amilase semelhante, e os autores indicaram que outras enzimas associadas a hidrólise do amido apresentam importância nessa condição até o quinto dia de germinação.

Em relação aos açúcares solúveis totais (AST) é possível identificar semelhanças no comportamento dessa variável nas duas condições de germinação, sendo essa resposta dependente da estrutura avaliada (cotilédones ou eixo embrionário). Em ambas as condições de germinação, as sementes com maior vigor apresentaram maior disponibilidade de açúcares solúveis totais em cotilédones no primeiro dia de germinação, entretanto, aos 3, 5 e 7 dias não foi observada diferença na disponibilidade de açúcares solúveis totais entre os lotes. No terceiro dia houve decréscimo de açúcares solúveis totais no controle e em condição de estresse, seguido de incremento no quinto e no sétimo dia (Figura 13a, Figura 13b).

A disponibilização de substâncias orgânicas é importante para a formação de plântulas durante a germinação, sendo mobilizadas para o eixo embrionário em crescimento (BEWLEY *et al.*, 2013). Dessa forma, os resultados obtidos demonstraram respectivamente a hidrólise e a mobilização de AST para o eixo, onde houve incremento no primeiro dia seguido de decréscimo no terceiro dia (Figura 13a, Figura 13b). O aumento aos cinco e sete dias podem ser associados com a maior atividade das amilases (Figura 12) na hidrólise do amido (Figura 11a, Figura 11b), o que resultou em maior disponibilidade em cotilédones (Figura 13a, Figura 13b). De acordo com Cheng *et al.* (2013), o aumento do teor de açúcares solúveis totais durante a formação de plântulas de arroz foi devido aos açúcares mobilizados do endosperma para o eixo embrionário.

Figura 13 – Açúcares solúveis totais (AST) avaliados em cotilédones (a, b) e eixo embrionário (c, d) durante a germinação em condição de ausência de estresse (controle) e presença de estresse salino (NaCl) para os lotes dos genótipos BAF44 e BAF55. \*:indica diferença significativa entre os lotes dentro do tempo de avaliação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

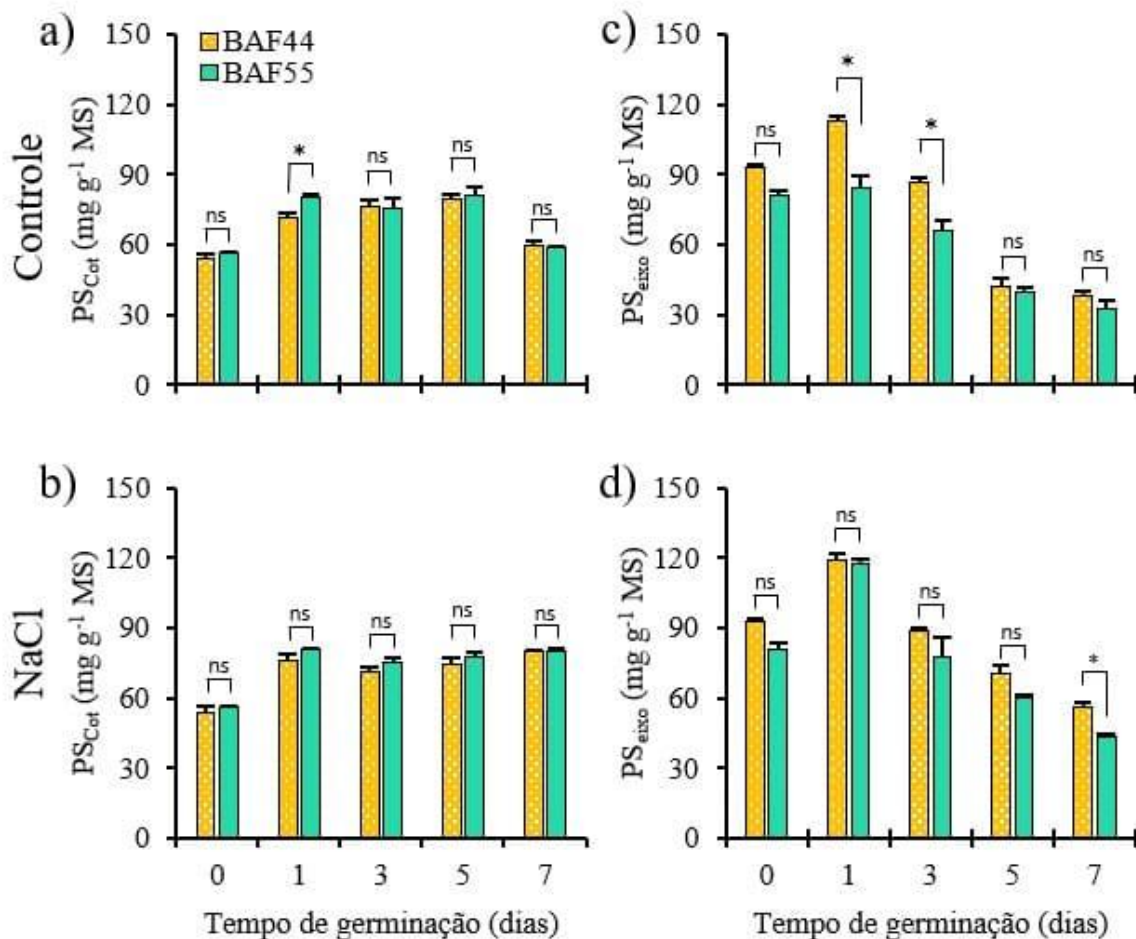
Considerando o AST avaliado em eixo embrionário é possível observar que as sementes de maior vigor apresentaram menores valores no primeiro dia de germinação e posteriormente (3, 5 dias) apresentaram maior quantidade de AST disponível em ambas as condições de germinação (presença e ausência de estresse salino) (Figura 13c, Figura 13d). Esses resultados demonstram que a dinâmica de mobilização de açúcares solúveis é dependente da sua hidrólise e utilização. A redução de açúcares solúveis totais observadas em um tempo específico em relação ao anterior deve-se a utilização, o aumento subsequente é dependente da hidrólise do amido, visto que, a atividade enzimática aumenta durante a germinação (Figura 12).

A hidrólise do amido e a disponibilização de açúcares solúveis totais como fonte de carbono para o acúmulo de massa é determinante durante a formação de plântulas (GUZMÁN-ORTIZ *et al.*, 2019; ZEID *et al.*, 2019). Desta forma, sementes de maior vigor apresentaram rápida utilização de açúcares solúveis totais, o que favoreceu o maior CP (Figura 10a, Figura 10b) e MSP (Figura 10c, Figura 10d). A maior hidrólise do amido garantiu uma maior disponibilidade de açúcares solúveis totais no eixo embrionário para utilização a partir do terceiro dia de germinação (Figura 13c, Figura 13d), resultando no maior desempenho em todo o restante do período de germinação avaliado (Figura 10). Assim, a degradação do amido e sua utilização pelo eixo embrionário demonstra-se fundamental para a formação de plântulas em condições de estresse salino.

A proteína total apresentou decréscimo durante a germinação, indicando hidrólise das proteínas armazenadas e sendo inferior durante o estresse salino (Figura 11c, Figura 11d). No trabalho de Shaik *et al.* (2014) com sementes de cevada, observou-se que durante a germinação ocorreu redução das proteínas totais dos tecidos de reserva das sementes indicando sua hidrólise e utilização durante esse processo. Já as proteínas solúveis (PS) em cotilédones não apresentaram diferença significativa entre os lotes, porém, verificou-se aumento das proteínas solúveis no primeiro dia de germinação (Figura 14a, Figura 14b).

Para as proteínas solúveis (PS) avaliadas em eixo embrionário, em ambas as condições de germinação e para ambos os lotes de sementes, foi verificado o aumento no primeiro dia de germinação e posterior decréscimo das proteínas solúveis nos tempos subsequentes, indicando que as proteínas foram utilizadas pelo eixo embrionário (Figura 14c, Figura 14d).

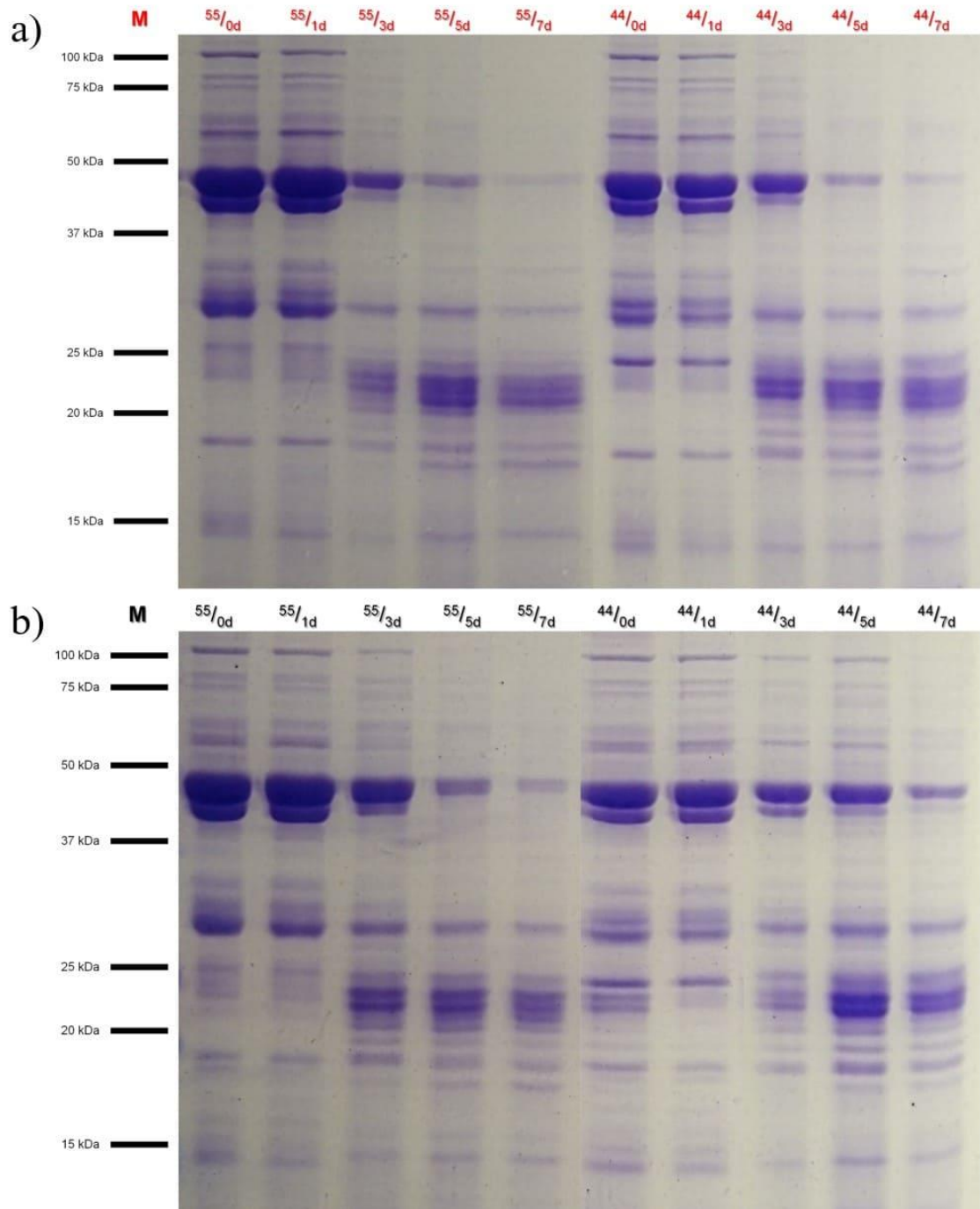
Figura 14 – Proteínas solúveis (PS) avaliadas em cotilédones (a, b) e eixo embrionário (c, d) durante a germinação em condição de ausência de estresse (controle) e presença de estresse salino (NaCl) para os lotes dos genótipos BAF44 e BAF55. \*:indica diferença significativa entre os lotes dentro do tempo de avaliação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A avaliação qualitativa das proteínas solúveis avaliadas em cotilédones em condições de ausência de estresse (Figura 15a) e presença de estresse salino (Figura 15b) pode ser verificada pelo gel de eletroforese o qual demonstra a redução gradativa das proteínas solúveis presentes nas bandas entre 40 e 54 kDa para ambos os lotes avaliados durante a germinação (Figura 15). O lote de sementes com maior vigor apresentou menor intensidade das bandas 40 a 54 kDa a partir do terceiro dia de germinação na condição controle e somente a partir do quinto dia no estresse salino, indicando atraso na utilização de proteínas solúveis durante a condição de estresse.

Figura 15 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de cotilédones durante a germinação em condição de ausência de estresse (a) e presença de estresse salino (NaCl) (b) para os lotes dos genótipos BAF44 e BAF55 nos tempos de germinação de zero (0d), um (1d), três (3d), cinco (5d) e sete dias (7d). M: marcador de massa molecular



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

As principais proteínas de reserva em *Phaseolus vulgaris* L. são as globulinas, podendo ser observadas por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (BROWN *et al.*, 1981) com maior destaque nas bandas com massa molecular entre 41,1 e 54,7 kDa (MONTROYA *et al.*, 2008). Em Karmous *et al.* (2011), foi verificado decréscimo na intensidade das bandas de globulinas durante o processo de germinação de sementes de feijão e aumento da massa seca de plântulas associado à essa redução. Assim, a redução de intensidade das bandas das proteínas solúveis em cotilédones, verificada nos lotes de alto e baixo vigor, é resultado da hidrólise e mobilização dessas proteínas durante a germinação (Figura 15).

A menor intensidade de bandas de peso molecular entre 41 e 50 kDa observadas nas sementes de alto vigor indica a maior atuação de proteases na hidrólise proteica (Figura 15). Em feijão de corda, Zeid *et al.* (2019) constataram que a maior atividade de proteases favoreceu a germinação e a formação de plântulas. Em condições de estresse salino, Punia *et al.* (2020) observaram que variedades de sorgo tolerantes apresentaram maior quantidade de proteases que culminaram na maior redução de proteínas. As proteases são enzimas determinantes durante a hidrólise de proteínas de reserva e, apresentam incremento durante a germinação para a disponibilização de proteínas solúveis (GUZMÁN-ORTIZ *et al.*, 2019). Essa maior disponibilidade proteica pode ser observada no aumento das proteínas solúveis nos cotilédones (Figura 14a, Figura 14b), que pode ter contribuído para um melhor desempenho, considerando a menor intensidade de bandas a partir do quinto dia de germinação em ambas as condições de germinação (Figura 15a, Figura 15b).

As sementes de maior vigor apresentaram maior capacidade de hidrólise e mobilização das reservas armazenadas durante o processo de germinação. Essa atividade catabólica dos componentes de reserva é associada a maior síntese de proteínas hidrolíticas, o que resultou na formação de plântulas de maior desempenho. Com a ressalva do retardamento no processo, esses resultados ocorreram de forma semelhante na presença ou não do estresse salino. Dessa forma, o processo de mobilização na sua totalidade favoreceu a superação do estresse salino, sendo um dos principais motivos pelos quais as sementes de maior vigor demonstraram melhor desempenho nessas condições.

## 6.5 CONCLUSÃO

Lotes de sementes com maior vigor apresentam maior capacidade de hidrólise dos componentes de reserva e demonstram rápida utilização de açúcares solúveis e proteínas solúveis, resultando em plântulas de maior vigor mesmo sob condições de estresse salino.





## 7 CAPÍTULO 5 – VIGOR DE SEMENTES E ATIVIDADE DE FITASE DURANTE A FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS DE FEIJÃO SOB RESTRIÇÃO HÍDRICA

### 7.1 RESUMO

O fósforo é um elemento essencial e, durante germinação a sua disponibilidade pode favorecer a velocidade desse processo. A principal fonte de fósforo em sementes está em forma de ácido fítico o qual é hidrolisado pela enzima fitase e posterior disponibilização de fosfato. A presença de estresse hídrico durante a germinação retarda o processo o que pode afetar a disponibilidade de fósforo e a atuação da enzima fitase. Nesse sentido o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade da enzima fitase e a sua relação com o vigor do lote de sementes de feijão em condições de estresse hídrico. Foram utilizados três lotes de sementes do genótipo BAF42 com alto, médio e baixo vigor. Esses lotes foram submetidos a condição de germinação em presença e ausência de estresse hídrico e avaliados o desempenho de plântulas e o teor de fósforo inorgânico, fitato e fitase em eixo embrionário e cotilédones nos períodos de zero, dois, quatro e seis dias de germinação. Os resultados demonstram que as sementes de maior vigor apresentaram melhor desempenho de plântulas durante ambas as condições testadas e, a maior atividade da enzima fitase foi verificada para esses lotes principalmente após o segundo dia de germinação, indicando maior disponibilidade de minerais e fósforo para a formação da plântula. Conclui-se que a atividade da enzima fitase é associada ao vigor do lote de sementes e a sua importância é determinante durante os estádios mais avançados da germinação.

### 7.2 INTRODUÇÃO

A cultura do feijão é uma das principais fontes de carboidratos, proteínas e minerais na dieta humana em diversos países na América latina, África e Asia (BEEBE *et al.*, 2013). Apresenta entre 30-50 % de amido (MONTROYA *et al.*, 2008; PADILHA; COELHO, EHRHARDT-BROCARD, 2021), 19-31% de proteína (PEREIRA *et al.*, 2009), fonte de fibras e minerais como zinco, ferro, cálcio, magnésio, potássio e fósforo (PEREIRA *et al.*, 2011; LOS *et al.*, 2018). Entretanto, a principal forma de alocação dos minerais em sementes ocorre juntamente com o ácido fítico ou fitato, e a dificuldade de degradação deste composto faz com que este seja considerado um componente antinutricional (NKHATA *et al.*, 2018; GIBSON *et al.*, 2018). A quantidade de fitato presente em sementes varia de 0,3% a 1,1%, (PEREIRA *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2011). sendo necessária a atuação de enzimas específicas para a sua degradação (NKHATA *et al.*, 2018).

Durante a germinação de sementes os compostos armazenados durante a maturação, são degradados para que possam ser mobilizados para o eixo embrionário e promover o seu crescimento (BEWLEY *et al.*, 2013). A velocidade e eficiência com que o processo de mobilização dessas reservas é realizado está intimamente associado ao vigor do lote de sementes (ANDRADE; COELHO; PADILHA, 2019; PADILHA; COELHO; ANDRADE, 2020). De forma semelhante, a maior qualidade fisiológica do lote de sementes (i.e., germinação e vigor) favorece a superação de estresse abióticos favorecendo o processo de germinação e formação das plântulas (MARCOS-FILHO, 2015b; PADILHA, COELHO; SOMMER, 2022).

Dentre os estresses abióticos de maior importância, a presença de restrição hídrica é prejudicial durante todo o ciclo da cultura e, resulta em perda significativa de germinação, estabelecimento de plântulas, crescimento e desenvolvimento, enchimento de grãos e produtividade (NADEEM *et al.*, 2019a). A restrição hídrica durante a germinação afeta negativamente a mobilização de reservas afetando a degradação dos compostos presentes em cotilédones, resultando em plântulas com desempenho inferior (PADILHA, COELHO; SOMMER, 2022). Considerando isso, o vigor de sementes pode influenciar positivamente durante a mobilização de reservas em condições de estresse hídrico favorecendo a formação das plântulas (DANTAS *et al.*, 2018; PADILHA, COELHO; SOMMER, 2022).

O fitato em sementes é a fonte de fósforo indisponível, e a sua presença inibe a utilização e a disponibilidade de outros minerais, seja na alimentação humana ou no processo de germinação (GIBSON *et al.*, 2018; GUZMAN-ORTIZ *et al.*, 2018). Dessa forma, é necessário que sejam sintetizadas as enzimas fitase, as quais são específicas na degradação do fitato, o que resulta na disponibilização de fósforo e outros minerais durante a germinação (NKHATA *et al.*, 2018). Com isso, o teor de fitato durante a germinação apresenta decréscimo, sendo esse o resultado do aumento da síntese de fitases as quais realizam a degradação desse componente (BOUJILA *et al.*, 2020). A maior degradação de fitato causada pela enzima fitase e consequente disponibilidade de fósforo e minerais foi associada ao melhor desempenho de plântulas de soja em condições de ausência de estresse (DONG *et al.*, 2020; HUI *et al.*, 2019). A associação entre a maior atividade da enzima fitase e o vigor do lote de sementes de feijão quando em condições de estresse hídrico não está relatada na literatura, dessa forma, considerando a importância da enzima fitase na disponibilidade de fósforo e outros minerais, é possível que exista essa associação em condições de estresse durante a germinação, a qual favorece a formação de plântulas com desempenho superior nessas condições e explica parcialmente as diferenças entre sementes de maior vigor em relação as sementes de menor vigor.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi determinar a associação entre a atividade da enzima fitase e o vigor do lote de sementes em condições de restrição hídrica.

### 7.3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução do experimento foi utilizada as sementes do genótipo BAF42. Esse lote foi submetido a envelhecimento artificial para a obtenção de outros dois lotes com vigor contrastante, considerados como alto, médio e baixo vigor.

O envelhecimento artificial para a obtenção dos lotes de médio e baixo vigor, foi realizado utilizando caixas plásticas do tipo “gerbox” nas dimensões de 11 x 11 x 3,5 cm, em que, as sementes foram distribuídas uniformemente sobre telas de aço inoxidável e, ao fundo de cada caixa depositou-se 40 mL de solução salina saturada (i.e., 40% [p/v] de NaCl) e posteriormente tampadas e vedadas com papel filme (KZYZANOWSKI *et al.*, 2020). Após esse procedimento, as caixas contendo as sementes foram alocadas em câmara de envelhecimento em temperatura de  $41 \pm 1$  °C pelos períodos de 7 dias (médio vigor) e 12 dias (baixo vigor). Após cada período as sementes foram secas a umidade de 13% em temperatura de 30 °C. O lote não envelhecido foi considerado com alto vigor.

A caracterização fisiológica dos lotes foi realizada pela porcentagem de germinação em água e estresse hídrico, envelhecimento acelerado, comprimento e massa seca de plântulas aos três dias e índice de vigor.

Para o teste de germinação para a condição controle e estresse a semeadura foi realizada em substrato papel Germitest® na forma de rolo umedecido com água destilada equivalente a 2,5 mL g<sup>-1</sup> de papel seco (BRASIL, 2009) e a condição de estresse hídrico foi realizada a partir do umedecimento do papel com solução de Polietileno Glicol 6000 equivalente a -0,2 Mpa (VILELLA, DONI-FILHO, SIQUEIRA, 1991). Para ambos, foram utilizadas oito repetições de 25 sementes por lote.

Para a determinação do comprimento total e massa seca de plântulas aos três dias foram utilizados os dados obtidos durante a execução do índice de vigor, utilizando oito repetições de 20 sementes dispostas na parte superior do papel (KRZYZANOWSKI *et al.*, 2020). Os rolos foram umedecidos na proporção de 2,5 mL g<sup>-1</sup> de papel seco com água destilada e mantidos em germinador durante três dias a 25 °C. Após o tempo determinado, as plântulas consideradas normais foram mensuradas quanto aos comprimentos de hipocótilo, raiz e total (CT<sub>3dias</sub>) com auxílio de paquímetro digital e expressos em cm pl<sup>-1</sup>. O cálculo do índice de vigor (IV) foi determinado conforme fórmula proposta por Sako *et al.*, (2001), calculada com auxílio do

*software* R (R CORE TEAM, 2020) utilizando o pacote SeedCalc (SILVA; MEDEIROS; OLIVEIRA, 2019). As plântulas mensuradas foram secas em estufa a 80 °C por 24 h para obtenção da massa seca de plântulas (MSP<sub>3dias</sub>).

Após a caracterização fisiológica, os lotes de sementes foram submetidos as avaliações durante a germinação em condições de estresse hídrico.

A avaliação do desempenho das plântulas durante a germinação foi realizada aos dois, quatro e seis dias após a semeadura, nas condições controle e estresse hídrico, conforme descrito anteriormente.

Durante a germinação em condições controle e estresse hídrico, foram realizadas três repetições biológicas nos tempos de 0, 2, 4 e 6 dias de germinação para a avaliação de fósforo inorgânico, fitato e fitase. Em cada tempo, as amostras de eixo embrionário e cotilédone foram congeladas em nitrogênio líquido. Para o fósforo inorgânico as avaliações foram realizadas em eixo embrionário e cotilédones. A enzima fitase e o fitato foram determinadas apenas em cotilédones.

A atividade da enzima fitase foi determinada aos quatro dias de germinação, em que, os cotilédones das plântulas foram removidos para a sua determinação pelo método descrito por (ENGELLEN *et al.*, 2001) utilizando o procedimento de Ou *et al.* (2011), com alterações. Para obtenção do extrato enzimático, foram utilizadas 500 mg de farinha fresca previamente macerada em nitrogênio líquido e foram adicionados 7 mL de tampão Acetato de Sódio 240 mmol L<sup>-1</sup> com pH 5,5; contendo 4 mmol L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> e 0,005% (v/v) de Triton X-100. As amostras foram mantidas em agitação por 60 min em presença de gelo, e posteriormente centrifugadas. Para a quantificação foram utilizados 1,5 mL de extrato enzimático diluído e 0,5 mL de solução de fitato de sódio 7,5 mmol diluído em Acetato de Sódio 240 mmol L<sup>-1</sup> com pH 5,5; seguido de incubação a 38 °C por 80 min. Após o período de incubação foram adicionados 2 mL do reagente de paralisação (i.e., solução contendo molibdato de amônio 80 mmol L<sup>-1</sup>, vanadato de amônio 20 mmol L<sup>-1</sup> e ácido nítrico 5 M). A mistura foi centrifugada por 10 minutos e o sobrenadante foi submetido à leitura em espectrofotômetro a 415 nm. Cada amostra possuía um branco que não foi submetido à incubação. A atividade da fitase foi calculada utilizando uma curva padrão de fósforo e; uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol de fosfato por minuto. A atividade de fitase foi apresentada em unidade de enzima por miligrama de proteína (U mg<sup>-1</sup>). A proteína foi quantificada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm, conforme descrito por Bradford (1976).

A extração de fósforo das amostras foi realizada conforme descrito por Wilcox *et al.*,

(2000) com alterações. Foram utilizados 50 mg de farinha previamente seca a 50 °C por 24 h. A extração foi realizada utilizando 5 mL de ácido tricloroacético 12,5% com presença de 25 mmol de MgCl<sub>2</sub> e, as amostras foram maceradas e mantidas overnight a 4 °C e posteriormente centrifugadas. A quantificação foi realizada conforme descrito por Chen *et al.*, (1956).

A extração de fitato foi realizado utilizando como extrator HCl 2,4% (v/v) e quantificado a partir da utilização de reagente Wade, em que, a leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro em absorvância de 500 nm (LATTA; ESKIN, 1980). A curva padrão foi realizada utilizando fitato de sódio e os resultados foram apresentados em mg g<sup>-1</sup> de massa seca.

Para a confirmação da presença do estresse hídrico, a concentração de prolina foi determinada em três repetições biológicas de plântulas aos seis dias após a semeadura através do método de Bates, Waldren e Teare (1973).

O delineamento experimental utilizado para a segregação fisiológica foi delineamento de blocos inteiramente casualizado com oito repetições e três tratamentos (i.e., Lotes). Para a avaliação temporal do desempenho de plântulas em condições controle e estresse hídrico, foi considerado delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (lotes x condição de germinação x tempo de avaliação) com três repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2011). Os resultados da análise estatística podem ser observados ao final do documento em caso de necessidade (APÊNDICE E).

#### 7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de segregação fisiológica dos lotes de sementes utilizados demonstram que as sementes de maior vigor apresentaram melhor desempenho fisiológico em todas as variáveis utilizadas para essa caracterização (i.e., G, GPEG, EA, CT<sub>3dias</sub>, MSP<sub>3dias</sub>, IV). De forma semelhante, o lote de sementes com médio vigor apresentou resultados superiores de desempenho em relação ao lote de baixo vigor, indicando que o envelhecimento artificial foi eficiente em realizar a deterioração do lote de semente (Tabela 14).

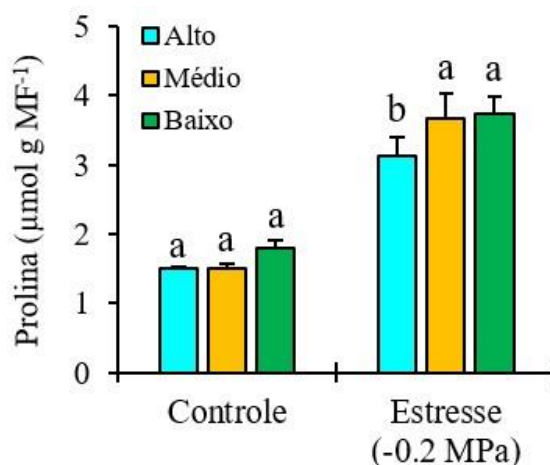
Tabela 14 – Qualidade fisiológica dos lotes do genótipo BAF42 utilizados em relação a germinação (G), germinação em estresse hídrico (GPEG), envelhecimento acelerado (EA), comprimento total aos 3 dias (CT<sub>3dias</sub>), massa seca de plântulas aos 3 dias (MSP<sub>3dias</sub>) e índice de vigor (IV)

Vigor	G (%)	GPEG (%)	EA (%)	CT <sub>3dias</sub> (cm pl <sup>-1</sup> )	MSP <sub>3dias</sub> (mg pl <sup>-1</sup> )	IV -
Alto	94 a	86 a	91 a	10,14 a	19,42 a	758 a
Médio	89 b	78 b	71 b	8,30 b	15,53 b	645 b
Baixo	86 b	79 b	48 c	7,34 c	12,38 c	591 c
CV%	3,71	5,14	9,03	7,17	15,37	6,46

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não apresentam diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Dentre os testes de vigor utilizados, a utilização de estresses abióticos pode ser uma alternativa, visto que sementes de maior vigor apresentam maior capacidade de desempenhar melhor em condições de estresse abiótico (MARCOS-FILHO, 2015b). Essa relação foi observada na germinação em polietileno glicol, em que as sementes de maior vigor apresentaram germinação superior (Tabela 14), ao mesmo tempo, durante condições de restrição hídrica o acúmulo de diferentes metabólitos é verificado (NADEEM *et al.*, 2019a) e, dentre esses, o acúmulo de prolina é verificado em condições de estresse hídrico atuando como osmoprotetor (ALVAREZ *et al.*, 2022). Essa associação foi verificada no presente estudo, em que, a maior concentração de prolina foi observada em condições de restrição hídrica independentemente do nível de vigor e, nas condições de estresse hídrico as sementes de maior vigor apresentaram menor concentração de prolina (Figura 16). Essa relação foi observada por Padilha, Coelho e Sommer (2022), em que, sementes de maior vigor apresentaram menor concentração de prolina em plântulas.

Figura 16 – Concentração de prolina em plântulas de feijão aos seis dias após a semeadura provenientes de lotes de alto, médio e baixo vigor em condições de ausência de estresse (Controle) e estresse hídrico (PEG). Médias seguidas de mesma letra minúscula na condição de germinação não apresentam diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro

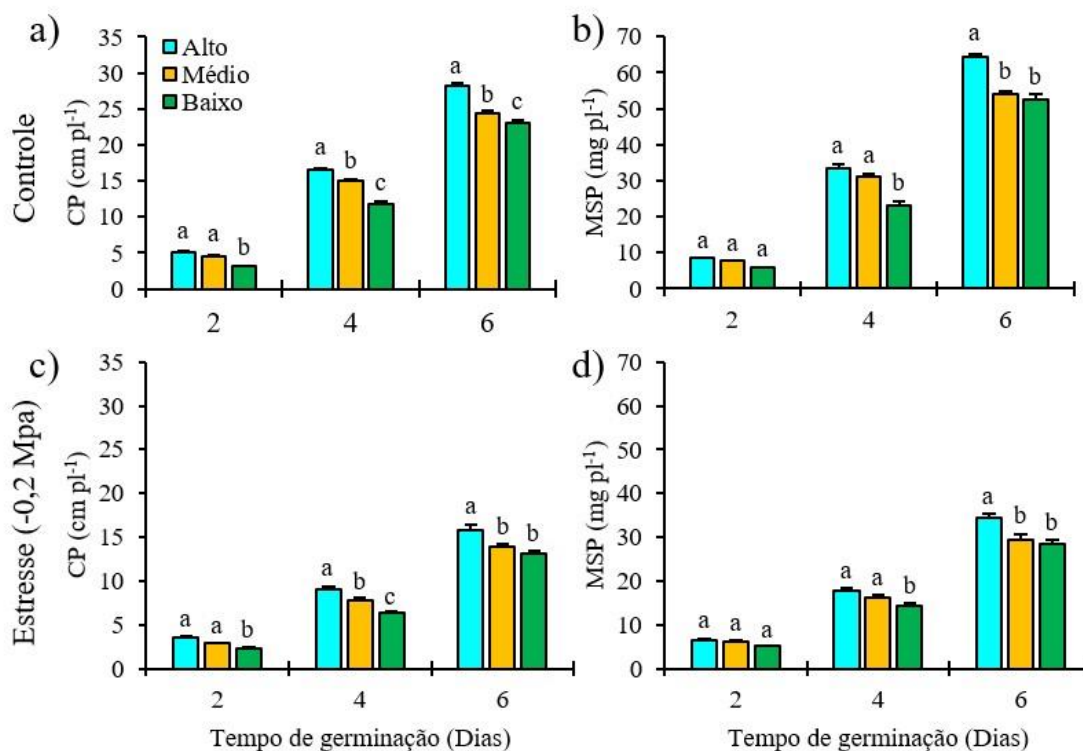


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Os resultados referentes ao desempenho de plântulas (i.e., Comprimento e massa) demonstram que as sementes de maior vigor apresentaram melhor desempenho durante o decorrer da germinação, demonstrando diferença significativa nos parâmetros avaliados a partir do segundo dia de germinação e, essa diferença foi observada em ambas as condições de germinação utilizadas (i.e., ausência e presença de estresse hídrico) (Figura 17). Sementes de maior vigor apresentam maior potencial de germinação em condições de estresse hídrico realizando esse processo com maior velocidade (PRAZERES; COELHO, 2019). O melhor desempenho de sementes com qualidade fisiológica superior em condições com ausência ou presença de estresse é o resultado da maior capacidade de hidrólise e mobilização de reservas durante a germinação, o que favorece a produção de plântulas com maior comprimento e massa seca (PADILHA; COELHO; SOMMER, 2022).

O teor de fósforo inorgânico determinado em cotilédones demonstra incremento durante a germinação, independentemente do nível de vigor e condição de germinação avaliada. Durante a germinação os compostos de reservas como, amido, proteínas e fitato são degradados para a disponibilização de compostos solúveis para uso do eixo embrionário (BEWLEY *et al.*, 2013) e, no caso do fitato, à medida que o mesmo é degradado ocorre aumento da disponibilidade de fosfato (BOUJILA *et al.*, 2020).

Figura 17 – Comprimento de total de plântulas (CP) e massa seca de plântulas (MSP) de feijão aos dois, quatro e seis dias após a semeadura provenientes de lotes de alto, médio e baixo vigor em condições de ausência de estresse (controle) e presença de estresse hídrico. Médias seguidas de mesma letra minúscula no tempo de germinação não apresentam diferença significativa entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de vigor avaliados e a quantidade de fósforo inorgânico presente nos cotilédones. Nerling, Coelho e Brümmer (2022) verificaram a maior capacidade de hidrólise de fitato por sementes com maior qualidade fisiológica, contudo, não verificaram diferença significativa entre o teor de fósforo inorgânico no endosperma de sementes de milho. Nesse contexto, o aumento do fósforo observado indica a maior degradação de fitato e a disponibilização de fósforo inorgânico pode estar associada a disponibilidade para mobilização assim como manutenção para a atividade metabólica nos cotilédones (Tabela 15).



Tabela 15 – Fósforo inorgânico ( $\text{g Kg}^{-1}$ ) cotilédones de sementes de feijão com vigor alto, médio e baixo durante a germinação nos tempos de embebição de zero, dois, quatro e seis dias em condições de ausência de estresse hídrico (Controle) e presença de estresse hídrico

Vigor	Controle			
	Tempo de germinação (dias)			
	0	2	4	6
Alto	0,286 cB	0,516 bA	0,572 aB	0,589 aB
Médio	0,340 cA	0,482 bA	0,632 aA	0,590 aB
Baixo	0,374 dA	0,469 cA	0,563 bB	0,658 aA
Média	0,333 c	0,489 b	0,589 a	0,612 a
Vigor	Estresse hídrico			
	Tempo de germinação (dias)			
	0	2	4	6
Alto	0,286 cB	0,417 bA	0,512 aA	0,556 aB
Médio	0,340 cA	0,407 bA	0,505 aA	0,551 aB
Baixo	0,374 cA	0,418 cA	0,550 bA	0,637 aA
Média	0,333 d	0,414 c	0,523 b	0,581 a

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Resultados semelhantes foram observados no eixo embrionário, em que, houve aumento do fósforo durante o decorrer da germinação. A disponibilidade de fósforo no eixo embrionário variou em relação a condição de germinação, nas sementes submetidas a germinação em condições de estresse hídrico apresentaram menores valores de fósforo inorgânico em relação a condição de ausência de estresse. A menor concentração de fósforo no eixo embrionário na condição de estresse pode ser o resultado da menor hidrólise de fitato, assim como da menor necessidade de fósforo para realizar as atividades metabólicas visto que a massa seca das plântulas na condição de restrição hídrica é inferior a condição controle (Figura 17).

Tabela 16 – Fósforo inorgânico ( $\text{g Kg}^{-1}$ ) em eixo embrionário de sementes de feijão com vigor alto, médio e baixo durante a germinação nos tempos de embebição de zero, dois, quatro e seis dias em condições de ausência de estresse hídrico (Controle) e presença de estresse hídrico

Vigor	Controle			
	Tempo de germinação (dias)			
	0	2	4	6
Alto	1,088 dA	2,712 cA	3,594 bB	3,929 aB
Médio	1,188 cA	2,504 bA	3,655 aB	3,905 aB
Baixo	1,266 dA	2,825 cA	4,223 bA	4,631 aA
Média	1,181 d	2,680 c	3,824 b	4,155 a
Vigor	Estresse hídrico			
	Tempo de germinação (dias)			
	0	2	4	6
Alto	1,088 cA	2,360 bA	3,225 aA	3,460 aA
Médio	1,188 dA	2,178 cA	2,945 bA	3,372 aA
Baixo	1,266 dA	1,917 cB	2,861 bA	3,547 aA
Média	1,181 d	2,152 c	3,010 b	3,459 a

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

As sementes com menor vigor apresentaram maior concentração de fósforo inorgânico disponível no eixo embrionário na condição de ausência de estresse (Tabela 16), essa relação pode indicar menor capacidade de utilização de fósforo pela plântula visto que, no sexto dia de germinação foi observada maior concentração de fitato nas sementes de menor vigor em relação as sementes de maior vigor (Tabela 17). Segundo Andrade, Coelho e Padilha (2019) sementes de milho com maior vigor apresentam maior atividade metabólica o que resulta em maior utilização das reservas e formação de plântulas com maior desempenho. Dessa forma, os menores valores de fósforo inorgânico observados para as sementes de maior vigor em eixo embrionário aos quatro e seis dias (Tabela 16), podem estar associados à sua maior utilização para a formação de outras moléculas o que também favoreceu a formação de plântulas com desempenho superior (Figura 17). Dentre as diversas funções do fósforo nos tecidos vegetais a biossíntese de ácidos nucleicos e membrana fosfolipídica são essenciais para o crescimento (LAMBERS *et al.*, 2022) e, a utilização do fósforo para esses fins justificam o maior crescimento de plântulas observado pelas sementes de alto vigor em ambas as condições de germinação (Figura 17).

Tabela 17 – Teor de fitato ( $\text{g Kg}^{-1}$ ) durante a germinação dos lotes de sementes de feijão de alto, médio e baixo vigor

Vigor	Controle			
	Tempo de germinação (dias)			
	0	2	4	6

	0	2	4	6
Alto	9,71 aA	8,04 bA	7,97 bA	5,16 cB
Médio	8,53 aA	9,09 aA	7,31 bA	6,55 bA
Baixo	9,05 aA	8,84 aA	7,8 aA	7,28 aA
Média	9,09 a	8,65 a	7,69 b	6,33 c
	Estresse hídrico			
	Tempo de germinação (dias)			
Vigor	0	2	4	6
Alto	9,71 aA	8,45 aA	8,81 aA	8,32 aA
Médio	8,53 aA	8,66 aA	8,33 aA	7,71 aA
Baixo	9,05 aA	9,06 aA	9,13 aA	8,21 aA
Média	9,51 a	8,75 a	8,72 a	8,08 b

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A redução da quantidade de fitato foi observada para ambas as condições de germinação e, houve maior degradação dessa molécula, em situação de ausência de estresse hídrico (Tabela 17). Na condição controle a maior degradação do fitato foi observada para sementes de alto vigor apresentando os menores valores de fitato no sexto dia de germinação (Tabela 17). Segundo Bouajila *et al.*, (2020) o ácido fítico é hidrolisado pelas enzimas fitase o que resulta na disponibilidade de fósforo e minerais para utilização da plântula. Essa associação entre a hidrólise do fitato e o aumento do teor de fósforo inorgânico foi observada, em que, os cotilédones avaliados em ambas as condições de germinação apresentaram aumento do teor de fósforo inorgânico (Tabela 15). Dessa forma, a maior hidrólise do fitato contribuiu para o processo de formação de plântulas (Tabela 17).

A atividade da enzima fitase aumentou durante o processo de germinação, em que, a partir do segundo dia de germinação na condição controle, as sementes de maior vigor apresentaram maior atividade dessa enzima. Na condição de estresse hídrico a diferença significativa entre os lotes de sementes foi observada a partir do quarto dia de germinação, e assim como na condição controle, o lote de sementes com alto vigor apresentou maior atividade (Tabela 18). A maior atividade observada na condição controle vai de encontro ao obtido para a degradação de fitato, em que as sementes de maior vigor apresentaram maior atividade da enzima fitase (Tabela 18) e menor teor de fitato no sexto dia de germinação (Tabela 17), indicando que a maior atividade favoreceu a degradação do fitato.

A atividade da enzima fitase é crescente durante o processo de germinação o qual resulta na hidrólise do fitato disponibilizando fósforo para a utilização (AZEKE *et al.*, 2011; NKHATA *et al.*, 2018). A maior atividade da enzima fitase foi observada principalmente no quarto dia de germinação (Tabela 18) coincidindo com a maior massa seca das plântulas avaliadas nesse período (Figura 17a, Figura 17b). Essa relação indica que a maior atividade da enzima fitase possui associação com o vigor do lote de sementes principalmente em estádios mais avançados

da germinação, o que favorece a formação de plântulas de maior vigor devido a maior realização da hidrólise do fitato.

Tabela 18 – Atividade da enzima fitase ( $U\ mg^{-1}$  proteína) durante a germinação dos lotes de sementes de feijão de alto, médio e baixo vigor sob condições de ausência (Controle) e presença de estresse hídrico

Vigor	Controle			
	Tempo de germinação (dias)			
	0	2	4	6
Alto	0,012 cA	0,061 cA	0,546 bA	3,155 aA
Médio	0,024 cA	0,022 cB	0,268 bB	1,743 aB
Baixo	0,019 bA	0,024 bB	0,236 bB	0,887 aC
Média	0,018 c	0,035 c	0,350 b	1,928 a
Vigor	Estresse hídrico			
	Tempo de germinação (dias)			
	0	2	4	6
Alto	0,012 cA	0,039 cA	0,133 bA	0,429 aA
Médio	0,024 bA	0,038 bA	0,083 bB	0,193 aB
Baixo	0,019 bA	0,043 bA	0,072 bB	0,272 aB
Média	0,018 c	0,040 c	0,095 b	0,298 a

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Na condição de estresse hídrico menor hidrólise de fitato em relação ao controle foi observada, especialmente no quarto e no sexto dia de germinação (Tabela 17), esse resultado está associado a menor atividade de fitase também observada na condição de estresse hídrico (Tabela 18), indicando que a hidrólise de fitato é dependente do incremento da atividade de fitase. A maior atividade de fitase foi associada a maior degradação do fitato ao longo do tempo de germinação (AZEKE *et al.*, 2011) e por esse motivo pôde ser associada ao melhor desempenho de sementes de soja (DONG *et al.*, 2019).

As sementes com maior vigor apresentaram maior atividade da enzima fitase na condição de estresse hídrico (Tabela 18), contudo, não apresentaram maiores valores de fósforo inorgânico em cotilédones (Tabela 15) ou eixo embrionário aos seis dias de germinação (Tabela 16), o que se sugere que as sementes de maior vigor apresentaram uma maior mobilização de fósforo para o eixo embrionário e subsequente utilização para a formação de tecidos principalmente em estágios mais avançados da germinação.

A atividade de fitase na condição de estresse hídrico não apresentou diferença significativa aos dois dias de germinação (Tabela 18), assim como, não houve diferenças entre a quantidade de fósforo inorgânico nos cotilédones entre os níveis de vigor utilizados (Tabela 15). Entretanto, houve diferença na quantidade de fósforo no eixo embrionário das plântulas

aos dois dias de germinação, em que, as sementes de maior vigor apresentaram maior teor de fósforo nesse momento.

Dessa forma, é possível que o teor de fósforo superior aos dois dias de germinação em plântulas originadas por sementes de maior vigor não tenha sido proveniente da hidrólise do fitato, visto que o teor do fitato aos dois dias também foi superior na condição de restrição hídrica. Segundo Chen *et al.* (2019) o metabolismo energético durante a germinação é complexo, em que, açúcares e aminoácidos também estão relacionados ao crescimento e, o metabolismo de açúcares associado a glicólise é uma das principais fontes de energia durante a germinação. Durante a germinação de sementes de arroz Nie *et al.*, (2020) ressaltam que o melhor desempenho de sementes foi associado a maior glicólise, em que as sementes com melhor desempenho apresentaram maior capacidade respiratória e presença de ATP. Considerando que o processo de respiração celular apresenta importância durante o fornecimento de energia para o metabolismo, sugere-se que a diferença fisiológica observada aos dois dias de germinação (Figura 17), esteja associada a maior capacidade respiratória das sementes com alto vigor, o que favoreceu a disponibilidade de fósforo em plântulas nesse momento (Tabela 15), não sendo, dessa forma, o resultado da hidrólise do fitato.

## 7.5 CONCLUSÃO

Sementes de maior vigor apresentam maior atividade da enzima fitase ao longo da germinação, o que favorece a degradação do ácido fítico e, essa resposta se estende para condições de estresse hídrico.

## 8 CAPÍTULO 6 – RESPOSTA ANTIOXIDANTE DE SEMENTES DE FEIJÃO COM CONTRASTE NO VIGOR DURANTE A GERMINAÇÃO SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO

### 8.1 RESUMO

Durante a emergência a campo diversos estresse abióticos podem ocorrer, como os estresses térmicos, os quais resultam em perda de porcentagem de plântulas emergidas e desempenho das plântulas. Nesse sentido, o uso de sementes de maior vigor entra como uma estratégia no sistema de produção para evitar essas perdas. Contudo, não estão elucidados os mecanismos utilizados por sementes de alto vigor para superar essas condições de estresse abiótico. Com isso o objetivo do presente estudo foi avaliar a relação do sistema antioxidante vegetal e o vigor do lote de sementes em condições de estresse por frio e calor. Foram utilizados dois lotes de sementes do genótipo BAF42 com dois níveis de vigor (alto e baixo vigor) submetidos a condições de germinação de 15 °C, 18 °C, 25 °C, 32 °C e 35 °C e as plântulas normais germinadas foram avaliadas quanto ao seu desempenho fisiológico (i.e., comprimento e massa seca de plântulas) e a resposta bioquímica (i.e., malondialdeído (MDA), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX)) aos cinco dias de germinação. Os resultados indicam que a temperatura fora da ótima da cultura durante a germinação resulta em redução de desempenho fisiológico e, em geral, aumento da atividade antioxidante principalmente em estresses mais severos (i.e., 15 °C e 35 °C), sendo essa relação dependente da estrutura avaliada. O vigor do lote de sementes foi pouco responsivo as condições de estresse em relação as enzimas, contudo, maior desempenho fisiológico foi observado para as sementes de maior vigor. Ness sentido, as plântulas produzidas por sementes de maior vigor não apresentam maior síntese de enzimas associadas ao sistema antioxidante em condições de estresse por frio ou calor durante a germinação.

### 8.2 INTRODUÇÃO

Durante o processo de produção de grãos a presença de estresses abióticos é inevitável, sendo que, a presença desses estresses causa a perda de desempenho das plântulas afetando diversos mecanismos fisiológicos que podem comprometer a produtividade (IMRAN *et al.*, 2021; HAMPTON *et al.*, 2016). Por esse motivo diversos pesquisadores buscam estudar a resposta das plantas nessas condições buscando identificar estratégias para superar essas condições (HAMPTON *et al.*, 2016). Dentre os estresses abióticos, a presença de temperaturas

subótimas (i.e., alta e baixa temperatura) afetam negativamente o crescimento resultando em alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas durante o desenvolvimento (WAQAS *et al.*, 2021).

Nesse contexto, o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma espécie da família *Fabaceae* com grande importância econômica devido às suas propriedades nutricionais, sendo fonte de carboidratos, proteínas e minerais (LOS *et al.*, 2018). O processo de produção da cultura ocorre em grande parte do mundo e por esse motivo apresenta desafios durante o processo de produção, principalmente associado a estresses abióticos (ASSEFA *et al.*, 2019), em que, é afetada negativamente em estresses por alta temperatura (VARGAS *et al.*, 2020) e baixas temperatura (SRIVASTAVA; SONI; SONAM, 2015).

O processo de germinação de sementes e emergência a campo é uma das fases mais críticas durante o processo de produção, em que, é determinante que ocorra a emergência para que se tenha um estande de plantas adequado. Dentre os parâmetros de qualidade de sementes, o parâmetro fisiológico (i.e., germinação e vigor) é determinante para a emergência a campo (MARCOS-FILHO, 2015b). O vigor de sementes é uma propriedade que favorece a superação de estresses abióticos na germinação, favorecendo a emergência nessas condições adversas (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016), contudo, os mecanismos fisiológicos associados ao vigor de sementes durante a germinação, não estão completamente elucidados, sendo necessário identificar quais as respostas fisiológicas e bioquímicas são determinantes para que as sementes de alto vigor superem as condições de estresse abiótico.

Em condições de estresse por baixa e alta temperatura ocorre o incremento de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (e.g., peróxido de hidrogênio) as quais geram estresse oxidativo (GARCÍA-CAPARRÓS *et al.*, 2018). As ROS causam diversos danos em lipídeos, proteínas e material genético; sendo necessário a atuação do sistema antioxidante vegetal, buscando controlar as moléculas tóxicas originadas pelas condições de estresse (MITTLER, 2017; SOARES *et al.*, 2019). Dentre as principais enzimas associadas ao controle de ROS, a catalase, ascorbato peroxidase e guaiacol peroxidase, apresentam relação direta no controle de peróxido de hidrogênio, mantendo a homeostase metabólica durante condições de estresse abiótico (SOARES *et al.*, 2019; VAN DOORN; KETSA, 2014).

A maior atividade de enzimas peroxidases durante a germinação de sementes de trigo demonstraram papel determinante durante a adaptação da germinação em condições de estresse térmico (ESSEMINE *et al.*, 2010). Durante a germinação, linhagens de milho tolerantes a estresse por frio apresentaram maior capacidade antioxidante relacionada as peroxidases, favorecendo a germinação em temperatura abaixo da ótima para a cultura (MENG *et al.*, 2022).

Harsh *et al.* (2016) destacaram que a maior atividade de peroxidases e catalase podem apresentar associação com a maior tolerância a estresses por calor em genótipos de feijão mungo, favorecendo o melhor desempenho nessas condições. Nesse contexto, dentre os mecanismos que podem favorecer o melhor desempenho durante condições de estresse por calor (CHAUDHARY *et al.*, 2021) e por frio (DREYER; DIETZ, 2018) a maior capacidade do sistema antioxidante vegetal é um dos pontos relevantes nessa temática.

O uso de sementes de maior vigor pode ser utilizado como estratégia para a superação de estresses por frio e/ou calor durante a emergência de plântulas, segundo Sbrussi e Zucarelli (2014) as sementes de maior vigor apresentam maior capacidade de resposta a condições de estresse térmico, apresentando maior porcentagem de germinação e crescimento de plântulas em condições de germinação em temperaturas fora da ótima. Com isso, as enzimas associadas ao sistema antioxidante podem estar associadas ao maior vigor do lote de sementes em condições de estresse térmico, o que confere o melhor desempenho dessas sementes nas condições de estresse por temperatura.

A partir do exposto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a resposta do sistema antioxidante vegetal durante a germinação de sementes com diferenças no seu vigor quando submetidas a condições de estresse por alta ou baixa temperatura.

### 8.3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução do experimento foram utilizadas as sementes do genótipo BAF42. O genótipo é originalmente pertencente ao Banco Ativo de Germoplasma de Feijão (BAF) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). O genótipo foi produzido na safra 2020/2021 no município de Lages, Santa Catarina, Brasil, na área experimental da mesma universidade. Após a colheita as sementes foram encaminhadas ao laboratório de análise de sementes da UDESC, o qual passou pelo processo de padronização e homogeneização para posteriormente ser obtida a amostra média de 1000 g (BRASIL, 2009) para posterior execução dos experimentos.

O envelhecimento artificial para a obtenção do lote de sementes com baixo vigor feito realizado por meio do procedimento de envelhecimento acelerado em solução salina saturada. Para isso, 500 gramas de sementes da amostra média foram submetidas ao envelhecimento artificial para a obtenção dos lotes de baixo vigor, realizado utilizando caixas plásticas do tipo “gerbox” nas dimensões de 11 x 11 x 3,5 cm, em que, as sementes foram distribuídas uniformemente sobre telas de aço inoxidável e, ao fundo de cada caixa depositou-se 40 mL de



solução salina saturada (i.e., 40% [p/v] de NaCl) e posteriormente tampadas e vedadas com papel filme (KZYZANOWSKI *et al.*, 2020). Após esse procedimento, as caixas contendo as sementes foram alocadas em câmara de envelhecimento em temperatura de  $41 \pm 1$  °C pelos períodos de 7 dias. Após esse período as sementes foram secas até umidade de 12-13% em temperatura de 35 °C. O lote não envelhecido foi considerado com alto vigor.

A caracterização fisiológica dos lotes foi realizada pelo teste de envelhecimento acelerado, comprimento de raiz, hipocótilo e total aos três dias de germinação e índice de vigor.

O teste de envelhecimento acelerado tradicional foi conduzido em temperatura de 42 °C por 72 h (SCAPPA-NETO *et al.*, 2001). Após esse período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação o qual foi realizado em substrato papel filtro na forma de rolo umedecido com água destilada equivalente a 2,5 mL g<sup>-1</sup> de papel seco (BRASIL, 2009) em temperatura de  $22 \pm 2$  °C utilizando oito repetições de 50 sementes.

O índice de vigor foi realizado utilizando oito repetições de 20 sementes dispostas na parte superior do papel (NAKAGAWA, 1999). Os rolos foram umedecidos na proporção de 2,5 mL g<sup>-1</sup> de papel seco com água destilada e mantidos em germinador durante três dias a 25 °C. Após o tempo determinado, as plântulas consideradas normais foram mensuradas quanto aos comprimentos de hipocótilo (CH<sub>3dias</sub>), raiz (CR<sub>3dias</sub>), e total (CT<sub>3dias</sub>) com auxílio de paquímetro digital e expressos em cm pl<sup>-1</sup>. O cálculo do índice de vigor (IV) foi determinado conforme fórmula proposta por Sako *et al.*, (2001), calculada com auxílio do *software* R (R CORE TEAM, 2020) utilizando o pacote SeedCalc (SILVA; MEDEIROS; OLIVEIRA, 2019).

A partir da caracterização fisiológica dos lotes de sementes a resposta do vigor quanto ao estresse térmico (i.e., alta e baixa temperatura) foi determinada realizando os testes de germinação e desempenho de plântulas em condições de 15 °C, 18 °C, 25 °C, 32 °C e 35 °C constantes.

A condução do teste de germinação foi realizada em germinador, em que, as sementes foram dispostas em substrato papel filtro na forma de rolo umedecido com água destilada equivalente a 2,5 mL g<sup>-1</sup> de papel seco utilizando as temperaturas descritas acima por todo o período do teste utilizando quatro repetições de 50 sementes. A contagem final de germinação foi determinada no nono dia de germinação (BRASIL, 2009).

O teste de desempenho de plântulas foi realizado utilizando 15 sementes por repetição, sendo essas dispostas em papel filtro no terço superior do papel e arranjado em forma de rolo de papel, dispostos na vertical em germinador (NAKAGAWA, 1999). Aos cinco dias de germinação as plântulas normais obtidas foram mensuradas com o auxílio de paquímetro digital para obtenção do comprimento total (CT) e apresentado em mm pl<sup>-1</sup>. As plântulas e cotilédones

das plântulas mensuradas foram submetidas a secagem a 80 °C por 24 h para obtenção da massa seca das plântulas (MSP) e massa seca remanescente em cotilédones (MSRC) e apresentados em mg pl<sup>-1</sup> e mg semente<sup>-1</sup>, respectivamente (NAKAGAWA, 1999). A redução de reservas das sementes (RRS) foi determinada a partir da diferença entre a massa seca inicial das sementes e a massa seca remanescente em cotilédones obtida aos cinco dias de germinação. A eficiência de uso de reservas da semente (EURS) foi determinada pela relação entre a MSP e a RRS e apresentada em mg mg<sup>-1</sup> (SOLTANI; GHOLIPOOR; ZEINALI, 2006).

No mesmo período das avaliações fisiológicas (i.e., cinco dias) as plântulas e cotilédones obtidos foram congelados em nitrogênio líquido e macerados para obtenção das amostras a serem utilizadas para a avaliação de alfa-amilase, malondialdeído (MDA), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX).

A atividade da alfa-amilase foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959), utilizando o procedimento descrito por Monerri e Guardiola (1989) com modificações. A extração foi realizada utilizando 0,3 g de amostra fresca de cotilédones, em que foram adicionados 5 mL de solução tampão acetato de sódio 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 5,4 com presença de 10 mmol L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> e 0,01% de Triton X-100, a solução foi agitada por 60 min em presença de gelo e centrifugado. O extrato enzimático utilizado na quantificação foi incubado em banho-maria por 10 min a 70 °C. 250 µL de extrato enzimático e 250 µL de solução de amido 2,0% (p/v) permaneceram em banho-maria por 20 min a 38 °C. A reação foi interrompida com a adição de 500 µL de solução DNS e as amostras foram posteriormente mantidas em banho-maria por 6 min a 95 °C. Ao final desse processo foi adicionado 4 mL de água destilada seguido de homogeneização. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com absorvância de 540 nm e os resultados foram expressos em unidade de enzima por miligrama de proteína (U mg<sup>-1</sup>). Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima para produzir 1 µmol de maltose por minuto.

O extrato enzimático obtido de cada repetição biológica para APX, CAT e GPX foi realizado utilizando 200 mg de amostra fresca e macerado em almofariz com 5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,2; contendo 1 mM de EDTA, 3 mM de DTT e 1% de PVP, e posteriormente centrifugado (AZEVEDO *et al.*, 1998).

A determinação de APX foi realizada por meio de incubação utilizando com 700 µl de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,4; 100 µL de solução de ácido ascórbico 5 mM e 100 µL de solução de peróxido de hidrogênio 1 mM, sendo a reação iniciada com a adição de 100 µL de extrato enzimático (NAKANO; ASADA, 1981). A leitura foi realizada em 290 nm, pelo

período de 120 s. Uma unidade de ascorbato peroxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para realizar a oxidação de 1  $\mu\text{M}$  de ascorbato por minuto.

Para a quantificação GPX foi realizada utilizando guaiacol como substrato (NAKANO; ASADA, 1981), realizada conforme procedimento de Simões *et al.* (2015) com alterações, em que, o meio de incubação foi realizado utilizando 700  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 6,0; 100  $\mu\text{L}$  de guaiacol 40 mM e 100  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 10 mM, a reação foi iniciada adicionando 100  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático. A leitura foi realizada em 470 nm pelo período de 60 s. Uma unidade de guaiacol peroxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para realizar a formação de 1  $\mu\text{M}$  de tetraguaiacol por min.

Para a quantificação de CAT foi realizada utilizado procedimento proposto por Aebi (1984) com alterações, em que, o meio de incubação foi realizado utilizando 2000  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,2; 800  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 75 mM e 200  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático. A leitura foi realizada em 240 nm pelo período de 120 s. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para realizar a degradação de 1  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrogênio por min.

As enzimas avaliadas foram apresentadas em unidades de enzima por miligrama de proteína, sendo essa determinada conforme descrito por Bradford (1976).

O malondialdeído foi determinado conforme procedimento descrito por Hodges *et al.* (1999). Foram utilizados 100 mg de amostra macerada em 4 mL de álcool 80% (v/v) as quais foram maceradas em almofariz e centrifugadas. A quantificação foi realizada utilizando 1 mL de extrato propriamente diluído e 1 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) contendo 0,65% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 0,01% (p/v) hidroxitolueno butilado (BHT). As amostras foram mantidas em banho maria a 95 °C por 25 min e as leituras realizadas em 440, 532 e 600 nm, e posteriormente calculadas conforme especificado em Hodges *et al.* (1999).

Inicialmente a caracterização fisiológica foi realizada em delineamento experimental inteiramente casualizado com dois tratamentos (i.e., alto vigor e baixo vigor) com oito repetições. Posteriormente, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 5, sendo dois lotes (i.e., AV e BV) x cinco condições de germinação (i.e., 15 °C, 18 °C, 25 °C, 32 °C, 35 °C) com quatro repetições. Os dados foram submetidos a teste de normalidade quando necessário e posteriormente realizada a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a análise de regressão foram determinadas as regressões significativas utilizando o *software* Sisvar (FERREIRA, 2011). Os resultados da análise estatística podem ser observados ao final do

documento em caso de necessidade (APÊNDICE F).

#### 8.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os lotes utilizados do genótipo BAF42 apresentaram diferença significativa quanto aos parâmetros utilizados para a caracterização do vigor. O lote de sementes o qual não foi envelhecido (i.e., AV) apresentou maior porcentagem de vigor por envelhecimento acelerado (EA) e maior capacidade de formação de plântulas com desempenho superior quando avaliado aos 3 dias de germinação, resultando em maior índice de vigor (IV) (Tabela 19). Esses resultados eram esperados, visto que segundo Ebone, Caverzan e Chavarria (2019) o vigor de um lote de sementes é intimamente relacionado com a deterioração sofrida por um lote e, considerando que o lote de semente de baixo vigor (BV) foi envelhecido artificialmente, os parâmetros fisiológicos associados ao vigor foram inferiores.

Tabela 19 – Caracterização fisiológica referente aos lotes de sementes utilizados indicando o envelhecimento acelerado (EA), comprimento de raiz (CR<sub>3dias</sub>), comprimento de hipocótilo (CH<sub>3dias</sub>), comprimento total (CT<sub>3dias</sub>) e índice de vigor (IV<sub>3dias</sub>) dos lotes com alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) utilizados

Vigor	EA %	CR <sub>3dias</sub> ----- mm plântula <sup>-1</sup> -----	CH <sub>3dias</sub>	CT <sub>3dias</sub>	IV <sub>3dias</sub>
AV	86 a	84,38 a	30,01 a	114,39 a	846 a
BV	62 b	69,93 b	26,30 b	96,33 b	750 b
C.V%	12,43	8,40	6,26	6,24	5,00

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Os lotes de sementes quando foram submetidas as diferentes temperaturas de germinação apresentaram resposta fisiológica em modelo quadrático de regressão, o que demonstra que o efeito da temperatura foi, em geral, prejudicial a germinação e/ou desempenho de plântulas, confirmando que temperaturas inferiores ou superiores a ótima determinada para a cultura (i.e., 20 - 30 °C (BRASIL, 2009)) afetam negativamente o desempenho durante a germinação (Tabela 20).

Tabela 20 – Análise de regressão determinada para as variáveis porcentagem de germinação, comprimento total (CT), massa seca de plântulas (MSP), redução de reservas da semente (RRS), atividade de alfa-amilase e eficiência de uso de reservas da

semente (EURS) para alto e baixo vigor nas temperaturas de 15 °C, 18 °C, 25 °C, 32 °C e 35 °C demonstrando o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a significância da curva de regressão

Variável	Vigor	Equação	<i>p-value</i>	$R^2$
G	AV	$y = -0,1482x^2 + 6,6401x + 20,278$	*	0,96
	BV	$y = -0,1658x^2 + 7,2252x + 12,057$	*	0,98
CT	AV	$y = -1,6882x^2 + 87,89x - 925,77$	*	0,86
	BV	$y = -1,4526x^2 + 75,465x - 795,02$	*	0,88
MSP	AV	$y = -0,3917x^2 + 20,676x - 222,47$	*	0,80
	BV	$y = -0,3133x^2 + 16,529x - 177,29$	*	0,87
RRS	AV	$y = -0,5413x^2 + 28,821x - 304,42$	*	0,77
	BV	$y = -0,4442x^2 + 23,598x - 247,42$	*	0,83
Alfa-amilase	AV	$y = -0,0044x^2 + 0,2385x - 2,6808$	*	0,74
	BV	$y = -0,0026x^2 + 0,1443x - 1,6292$	*	0,77
EURS	AV	$y = -0,0026x^2 + 0,1326x - 1,0182$	*	0,78
	BV	$y = -0,0021x^2 + 0,1117x - 0,8330$	*	0,97

Legenda: \*significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste t. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

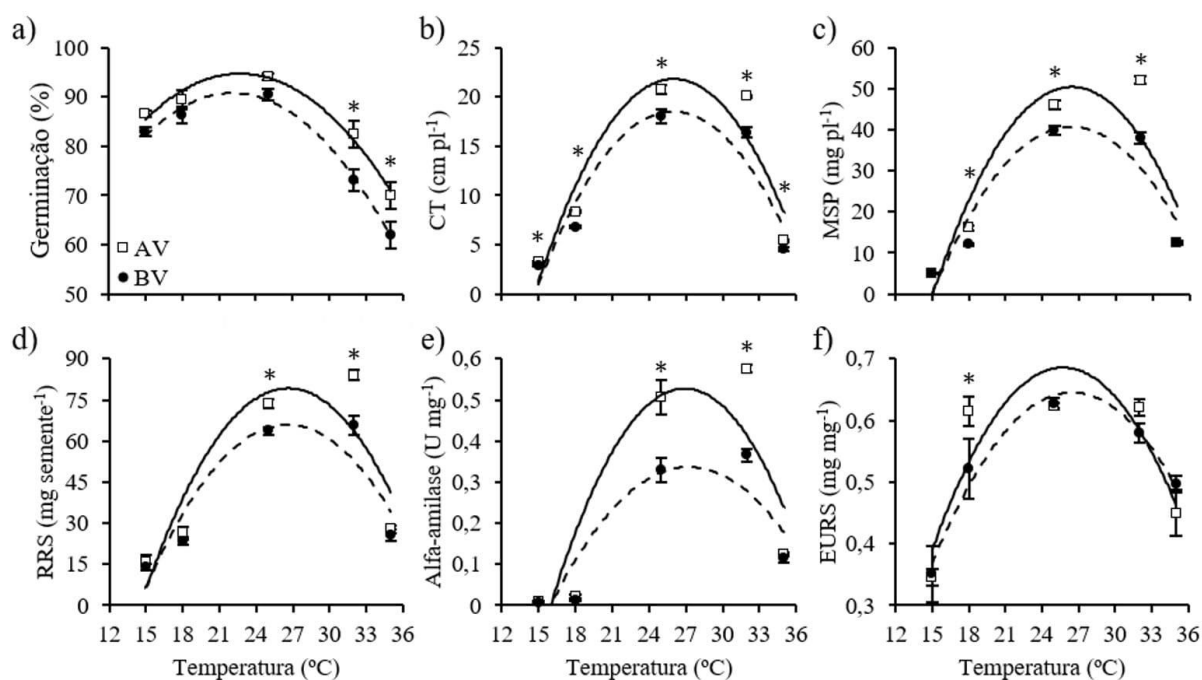
A resposta negativa sobre os parâmetros fisiológicos foi observada por Sbrussi e Zucarelli (2014) com sementes de milho, em que, em temperaturas abaixo ou acima da ótima da cultura, o desempenho foi afetado negativamente. Em geral, as alterações fisiológicas relacionadas ao crescimento são o resultado do rompimento da homeostase metabólica sendo necessário a que as plantas realizem diversas modificações durante os estresses térmicos, resultando em muitos casos, na perda de desempenho (RAZA *et al.*, 2021). Com isso, as alterações observadas estão associadas a condição estressante imposta as sementes durante a germinação em condições fora da temperatura adequada.

As sementes de maior vigor apresentaram germinação superior as sementes com baixo vigor quando submetidas a temperatura de 32 °C e 35 °C, indicando maior capacidade de superação dessa condição de estresse. Para as temperaturas de 15 °C, 18 °C e 25 °C, não foi observada diferença significativa entre os níveis de vigor (Figura 18a).

No desempenho de plântulas a maior diferença entre os lotes de sementes com níveis de vigor distintos é verificada nas temperaturas de 18 °C, 25 °C e 32 °C, em que, para as variáveis comprimento total (CT) e massa seca de plântulas (MSP), as sementes de maior vigor apresentaram desempenho superior (Figura 1b, Figura 1c). Contudo, para o comprimento total as sementes de maior vigor desempenharam melhor em todas as temperaturas. O melhor desempenho de plântulas observados por sementes de maior vigor em condições adversas de temperatura foi observado por Sbrussi e Zucarelli (2014). O melhor desempenho de plântulas é associado a maior capacidade de utilização de reservas e posterior mobilização para as estruturas de reserva (PADILHA; COELHO; SOMMER, 2022). Essa relação é observada nos

resultados de redução de reservas da semente, em que as sementes de maior vigor apresentaram maior capacidade de reduzir reservas dos cotilédones durante a germinação em 25 °C e 32 °C (Figura 18d), resultando em um desempenho fisiológico significativamente superior (Figura 18b, Figura 18c).

Figura 18 – Porcentagem de germinação aos nove dias, comprimento total (CT), massa seca de plântulas (MSP), redução de reservas da semente (RRS), atividade de alfa-amilase e eficiência de uso de reservas da semente (EURS) obtidas nas diferentes temperaturas de germinação para o lote de alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) aos cinco dias de germinação. \*indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre os lotes de sementes utilizados. A linha sólida e a linha pontilhada representam a regressão quadrática obtida para os lotes de sementes de alto vigor e baixo vigor, respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A atividade de alfa-amilase apresentou diferença significativa entre os níveis de vigor nas temperaturas de 25 °C e 32 °C. Nas temperaturas de 15 °C, 18 °C e 35 °C, não foi verificada diferença significativa entre o nível de vigor. A atividade de alfa-amilase é relacionada a maior capacidade de hidrólise de amido e está associada a maior disponibilização de açúcares solúveis para a utilização pelas sementes (YU, HO, LO, 2015; NEERLING; COELHO; BRUMMER, 2022). Em sementes de feijão a atividade de alfa-amilase foi associada a maior hidrólise de

amido em condições de ausência de estresse abiótico quando avaliada aos cinco dias de germinação, favorecendo a formação de plântulas com desempenho superior (PADILHA; COELHO; EHRHARDT-BROCARD, 2021). Dessa forma, a maior atividade de alfa-amilase aos 25 °C e 32 °C (Figura 18e) favoreceu a maior redução de reservas das sementes (Figura 18d) e formação de plântulas de maior vigor (Figura 18b, Figura 18c).

Nesse contexto, considerando que as condições de 25 °C e 32 °C apresentaram maior atividade de alfa-amilase (Figura 18e) e maior redução de reservas das sementes (Figura 18d), isso favoreceu a formação de plântulas de maior desempenho. Contudo, a condição de 32 °C foi estressante, considerando a germinação (Figura 18a), indicando que a relação da alfa-amilase e o vigor do lote de sementes pode ser verificada em condições de estresse abiótico. Nas temperaturas de 15 °C e 18 °C a atividade de alfa-amilase não apresentou diferença entre vigor do lote de sementes e, houve baixa atividade. Esse resultado possivelmente está associado a atividade metabólica reduzida, em que, nos primeiros dias de germinação, a hidrólise de amido em sementes de feijão é realizada por outras enzimas associadas ao metabolismo de carboidratos, para posterior incremento da atividade de alfa-amilase (BEWLEY *et al.*, 2013).

A eficiência de uso de reservas da semente (EURS) apresentou diferença significativa na temperatura de 18 °C, em que, as sementes de menor vigor apresentaram menor eficiência, indicando utilização das reservas as quais não foram destinadas a formação de plântulas e, a temperatura afetou negativamente a eficiência de uso de reservas (Tabela 20). Segundo Andrade, Coelho e Padilha (2019) e Padilha; Coelho e Andrade (2020), sementes de alto vigor apresentam maior eficiência de uso de reservas da semente o que favorece a formação de plântulas de maior massa, contudo, os resultados obtidos demonstram que com exceção da temperatura de 18 °C, as demais temperaturas apresentaram eficiência sem diferença significativa, indicando que o vigor apresenta pouca associação com eficiência de uso das reservas, possivelmente pelo fato da EURS ser dependente da temperatura durante a germinação (Figura 18f).

Considerando a resposta fisiológica observada (Figura 18), a resposta do vigor de sementes é mais evidente nas condições de 18 °C, 25 °C e 32 °C, em que nas temperaturas de 15 °C e 35 °C a intensidade do estresse imposto foi excessiva, resultando em dano fisiológico o qual resultou em resposta sem diferença significativa entre os níveis de vigor nessas condições.

As enzimas associadas ao sistema antioxidante (i.e., APX, CAT e GPX), assim como, o malondialdeído (MDA), apresentaram em geral, resposta quadrática em relação ao estresse imposto, indicando efeito das temperaturas utilizadas sobre a atividade enzimática e acúmulo de MDA nos tecidos (Tabela 21). Durante condições de estresse abiótico, o sistema antioxidante

vegetal demanda a produção de enzimas específica que realizem o controle de espécies reativas de oxigênio, evitando o dano fisiológico (SOARES *et al.*, 2019). Essa relação de aumento da atividade enzimática durante a condição de estresse por temperatura foi verificada especialmente em plântulas para todas as enzimas avaliadas (Tabela 21). Esses resultados demonstram que a atuação enzimática para o controle do estresse abiótico imposto, ocorre de forma semelhante em ambos os lotes de sementes utilizados.

Tabela 21 – Análise de regressão determinada para as variáveis Malondialdeído (MDA), Catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX) determinadas aos cinco dias de germinação em plântulas e cotilédones das sementes de alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) submetidas a germinação em 15 °C, 18 °C, 25 °C, 32 °C e 35 °C, demonstrando o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) e a significância da curva de regressão

Variável	Vigor	Equação	<i>p-value</i>	R <sup>2</sup>
MDA <sub>Plântula</sub>	AV	$y = 0,0129x^2 - 0,6765x + 11,716$	*	0,89
	BV	$y = 0,0188x^2 - 0,9833x + 15,755$	*	0,94
MDA <sub>Cotilédone</sub>	AV	$y = -0,0076x^2 + 0,3864x - 2,0142$	*	0,73
	BV	$y = -0,0042x^2 + 0,2152x - 0,0295$	ns	0,39
CAT <sub>Plântula</sub>	AV	$y = 0,0315x^2 - 1,6982x + 37,254$	ns	0,13
	BV	$y = 0,0525x^2 - 3,2873x + 61,151$	*	0,91
CAT <sub>Cotilédone</sub>	AV	$y = 0,0241x^2 - 1,5534x + 27,018$	*	0,90
	BV	$y = 0,0311x^2 - 1,9174x + 31,176$	*	0,86
APX <sub>Plântula</sub>	AV	$y = 1,7049x^2 - 88,443x + 1431,1$	*	0,68
	BV	$y = 2,0400x^2 - 105,580x + 1624,0$	*	0,86
APX <sub>Cotilédone</sub>	AV	$y = -0,1589x^2 + 8,7608x - 83,093$	*	0,58
	BV	$y = -0,0252x^2 + 2,3352x - 14,466$	*	0,89
GPX <sub>Plântula</sub>	AV	$y = 6,7723x^2 - 309,72x + 3559,9$	*	0,90
	BV	$y = 7,1914x^2 - 329,16x + 3741,0$	*	0,75
GPX <sub>Cotilédone</sub>	AV	$y = 0,6156x^2 - 33,22x + 434,200$	*	0,70
	BV	$y = 1,0386x^2 - 55,571x + 717,69$	*	0,72

Legenda: \*significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste t. ns: não significativo. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

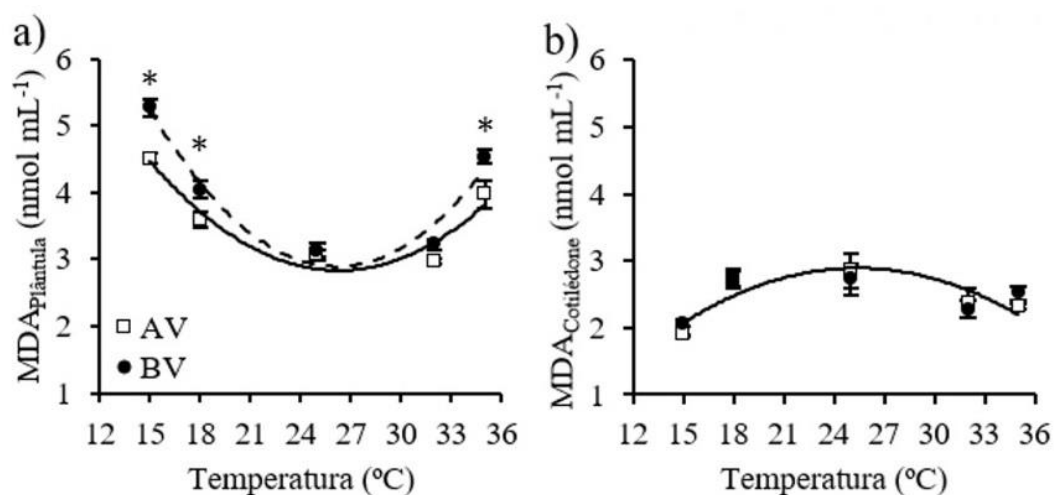
Para o teor de MDA nas plântulas produzidas por sementes de baixo vigor identificou-se maior valor desse componente nas temperaturas de 15 °C, 18 °C e 36 °C. Para as temperaturas de 25 °C e 32 °C, não houve diferença significativa entre os níveis de vigor entre o teor de MDA avaliado em plântulas normais formadas (Figura 19a).

A produção de MDA ocorre a partir do dano resultante da interação da hidroxila com a camada fosfolipídica da membrana celular, em que, isso ocorre em maior grau em condições de estresse biótico ou abiótico (MITTLER, 2017). Nesse contexto, as temperaturas de 15 °C, 18 °C e 36 °C, resultaram em dano oxidativo para ambos os níveis de vigor, entretanto, a maior



suscetibilidade ao dano celular foi observada em sementes de menor vigor (Figura 19a), resultando em menor desempenho fisiológico por essas sementes (Figura 18).

Figura 19 – Malondialdeído (MDA) determinados aos cinco dias de germinação em plântulas (a) e cotilédones (b) das sementes de alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) submetidas a germinação em 15 °C, 18 °C, 25 °C, 32 °C e 35 °C. \*indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre os lotes de sementes utilizados. A linha sólida (AV) e a linha pontilhada (BV) representam a regressão quadrática obtida para os lotes de sementes de alto vigor e baixo vigor, respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A avaliação da peroxidação lipídica (MDA) em cotilédones não demonstrou diferença significativa entre os níveis de vigor, indicando que nesta estrutura o dano fisiológico foi semelhante em termos de peroxidação de membranas celulares (Figura 19b). Dessa forma, observou-se que as estruturas da semente durante a germinação responderam de forma distinta à condição de estresse abiótico por temperatura e, o efeito do estresse em peroxidação lipídica ocorre de forma evidente nas plântulas (Figura 19a).

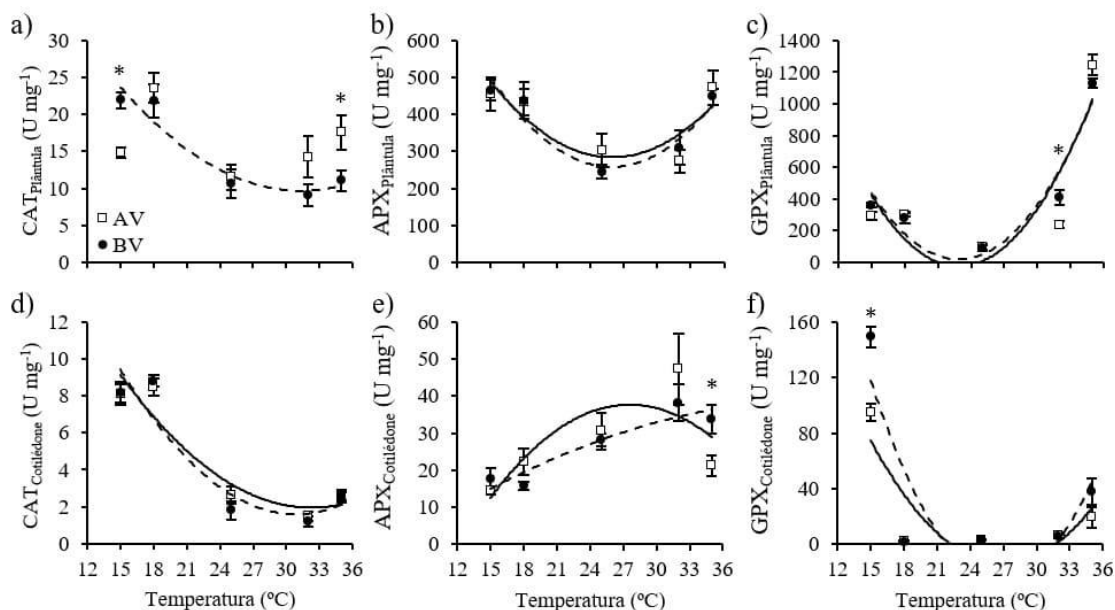
Para a atividade da enzima CAT, não foi verificada diferença significativa entre os níveis de vigor quando avaliado nos cotilédones em todas as temperaturas utilizadas durante a germinação (Figura 20d). Ao avaliar a mesma enzima em plântulas aos cinco dias de germinação, foi verificada apenas diferença significativa entre os níveis de vigor nas temperaturas de 15 °C e 35 °C, em que, as sementes de menor vigor apresentaram maior

atividade em 15 °C e as sementes de maior vigor, apresentaram maior atividade em 35 °C (Figura 20a).

A indução de atividade antioxidante durante condições de estresse abiótico é necessária para que a planta mantenha a homeostase metabólica (MITTLER, 2017). Nesse contexto, Meng *et al.*, (2022) verificaram que híbridos de milho tolerantes a estresse por frio apresentaram maior atividade das enzimas associadas ao sistema antioxidante como (i.e., Catalase, peroxidases e superóxido dismutase), o que favoreceu a germinação nessas condições. Com isso, considerando que o presente estudo utilizou o mesmo genótipo, apenas com níveis de vigor distintos, a resposta do genótipo foi semelhante nas condições testadas e, as sementes de menor vigor demonstraram maior atividade das enzimas CAT e GPX nas condições de germinação em 15 °C (Figura 20a, Figura 20f). Ignatenko *et al.* (2019) verificaram que ao aumentar o tempo de exposição ao estresse por frio durante a germinação de sementes de trigo a resposta antioxidante é crescente, indicando que o aumento da exposição ao um estresse exige maior necessidade de produção de enzimas associadas ao sistema antioxidante. Dessa forma, a maior suscetibilidade das sementes de menor vigor a condição de estresse imposta, exigiu maior síntese do sistema antioxidante para superação do estresse por frio pelas sementes de menor vigor.

Figura 20 – Catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX) determinadas aos cinco dias de germinação em plântulas e cotilédones das sementes de alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) submetidas a germinação em 15 °C, 18 °C, 25 °C, 32 °C e 35 °C. \*indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre os lotes de sementes utilizados. A linha

sólida (AV) e a linha pontilhada (BV) representam a regressão quadrática obtida para os lotes de sementes de alto vigor e baixo vigor, respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A enzima APX demonstrou diferença significativa entre os níveis de vigor apenas na temperatura de 35 °C em cotilédones, em que, as sementes de baixo vigor apresentaram maior atividade (Figura 20e). Entretanto, a atividade de APX determinada em plântulas, não revelou diferença significativa entre os níveis de vigor, independente da condição de temperatura utilizada durante a germinação (Figura 20b). A condição de 35 °C foi a mais prejudicial para a germinação das sementes afetando negativamente todas as variáveis fisiológicas (Figura 18) entretanto, as sementes de maior vigor apresentaram melhor resposta em germinação (Figura 18a) e comprimento de plântulas (Figura 18b), contudo, assim como a enzima CAT, a enzima APX não apresentou associação com o vigor. Dessa forma, mesmo que o sistema antioxidante pode estar associado ao melhor desempenho genótipos tolerantes durante condições de estresse por frio (MENG *et al.*, 2022) ou calor (KHAN; HUSSAIN; FAROOQ, 2022; CHAUDHARY *et al.*, 2021), a resposta de um mesmo genótipo, com níveis de vigor distintos, apresentam resposta enzimática semelhante em condições de estresse durante a germinação, sendo que, o resultado do melhor desempenho é parcialmente explicado pela maior mobilização de reservas das sementes de maior vigor (Figura 18d, Figura 18e).

Para a enzima GPX a atividade em plântulas foi superior para o lote de sementes com baixo vigor na condição de 32 °C, nas demais temperaturas de germinação, não foi verificada diferença significativa entre os níveis de vigor (Figura 20c). Em cotilédones, a maior atividade

dessa enzima foi verificada em cotilédones de sementes de baixo vigor na condição de 15 °C durante a germinação (Figura 20f).

Considerando as principais temperaturas (i.e., 18 °C e 32 °C) onde ocorreu a diferença fisiológica positiva associada ao lote de sementes de alto vigor (Figura 18), verificou-se que as sementes de menor vigor apresentaram maior atividade da enzima GPX em 32 °C (Figura 20c), o que pode ter resultado no controle da peroxidação lipídica nessa temperatura (Figura 19a). Em geral, o metabolismo celular das plântulas gera ROS, as quais podem alterar homeostase celular e geram danos durante o desenvolvimento (DECROS *et al.*, 2019). Dentre esses danos, a produção de MDA pode ocorrer devido a interação das ROS com a membrana celular e, o controle das ROS pode evitar esse dano a partir da maior produção de enzimas associadas ao sistema antioxidante vegetal (MITTLER, 2017). Nesse contexto, sugere-se que as sementes de menor vigor nessa condição necessitaram da maior produção de enzima GPX (Figura 20c) para controle de ROS (i.e., H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) evitando assim o aumento excessivo de peroxidação lipídica em plântulas (Figura 19a), contudo, a maior atividade não foi suficiente para manter o desempenho durante a germinação (Figura 18).

Segundo Ebone, Caverzan e Chavarria (2019) sementes com maior nível de deterioração apresentam maior suscetibilidade a condições adversas durante a germinação e, lotes de sementes deteriorados apresentam inicialmente maior dano oxidativo. Dessa forma, sugere-se que a maior suscetibilidade das sementes de menor vigor exige maior atuação do metabolismo antioxidante durante a germinação em condições de estresse por temperatura, buscando superar as condições de estresse abiótico impostas durante a germinação e, por esse motivo, as diferenças entre as enzimas avaliadas pelo sistema antioxidante na maioria dos casos de estresse, é observada em plântulas produzidas por sementes de menor vigor.

Com isso, é possível que outras enzimas ou componentes que apresentem resposta a condições de estresse térmico, apresentem associação com o vigor do lote de sementes, visto que, segundo Soares *et al.* (2019) o sistema antioxidante é dividido em enzimático e não-enzimático e, a interação entre as moléculas e enzimas associação a esse sistema é complexa. Com isso, a avaliação de outros compostos durante a germinação, podem auxiliar a compreender os mecanismos associados ao melhor desempenho das sementes de maior vigor durante condições de estresse abiótico.

## 8.5 CONCLUSÃO

As enzimas associadas ao sistema antioxidante (i.e., APX, CAT e GPX) não estão relacionadas ao maior vigor do lote de sementes quando avaliados em germinação sob condições de estresse térmico.

## 9 CAPÍTULO 7 – RESPOSTA FISIOLÓGICA DO VIGOR DE SEMENTES DE FEIJÃO DURANTE A GERMINAÇÃO SOB DÉFICIT HÍDRICO

### 9.1 RESUMO

O déficit hídrico é uma situação de estresse para a planta que ocasiona a produção de espécies reativas de oxigênio, onde a atividade do sistema antioxidante é indispensável para a superação do estresse. Com este trabalho, objetivou-se avaliar a resposta fisiológica de sementes com contraste de vigor quando submetidas à condição de déficit hídrico, buscando determinar as diferenças da atividade do sistema antioxidante entre os lotes de sementes. Foram utilizadas sementes do genótipo BAF07, submetidas a 5 e 10 dias de envelhecimento artificial. Após a obtenção dos lotes envelhecidos, juntamente com o lote original, foram conduzidos os testes de germinação e desempenho de plântulas (comprimento de raiz (CR), hipocótilo (CH) e total (CT)). Foram quantificadas as enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) e o aminoácido prolina, que são moléculas do sistema antioxidante, e ainda, o marcador de estresse oxidativo malondialdeído (MDA). O contraste de vigor provocado a partir do envelhecimento artificial e a imposição da condição de déficit hídrico, permitiu verificar as diferenças de respostas fisiológicas e metabólicas entre os lotes de sementes. Logo, sementes de baixo vigor além de apresentarem maior suscetibilidade ao déficit hídrico durante o processo de germinação, resultaram em plântulas e cotilédones com maior peroxidação lipídica e maior atividade das enzimas associadas ao sistema antioxidante.

### 9.2 INTRODUÇÃO

O feijão é uma das leguminosas de maior importância mundial, sendo determinante na dieta humana como fonte de proteínas, carboidratos e fibras nos diversos países da América Latina, África e Ásia (LOS *et al.*, 2018). As áreas de produção de feijão se estabelecem em regiões tropicais e subtropicais que apresentam frequentemente condições de déficit hídrico (ASSEFA *et al.*, 2019). Dentre os principais efeitos do déficit hídrico durante ao processo de produção de grãos são a redução da germinação, emergência de plantas, crescimento, fotossíntese, absorção de nutrientes, culminando com a redução da produtividade (NADEEM *et al.*, 2019a).

A germinação e a emergência de plântulas são diretamente associadas a qualidade fisiológica (germinação e vigor) do lote de sementes (MARCOS-FILHO, 2015b), em que, o

uso de sementes com maior qualidade favorece a germinação e a formação de plântulas com melhor desempenho mesmo sob condições de estresse hídrico (PADILHA; COELHO; SOMMER, 2022). Dentre os atributos de qualidade, o vigor de sementes é conceituado como a soma das propriedades que determinam a atividade e a performance do lote de sementes com germinação aceitável, em uma ampla faixa de ambientes (ISTA, 2014). O conjunto de propriedades, sobretudo a fisiológica, não é completamente elucidada, sendo necessário entender como as sementes de maior vigor apresentam potencial de superar as condições de estresse abiótico, especificamente o déficit hídrico, quando comparadas às sementes de menor vigor.

Em condições de déficit hídrico ocorre o incremento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como os radicais superóxido e hidroxila, o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete, os quais geram estresse oxidativo (NADEEM *et al.*, 2019a). Dentre as ROS, o radical hidroxila é bastante reativo com as moléculas biológicas, sendo uma das principais fontes de dano oxidativo, formado a partir da interação do peróxido de hidrogênio com  $Fe^{+2}$ , o qual causa danos nos lipídeos, proteínas e material genético (MITTLER, 2017). Para realizar o controle das ROS, as plantas possuem um complexo mecanismo antioxidante formado por componentes enzimáticos e não enzimáticos (SOARES *et al.*, 2019).

As enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX) são importantes enzimas antioxidantes que realizam a conversão do peróxido de hidrogênio em água e que contribuem para evitar o dano oxidativo (e.g., peroxidação lipídica, oxidação de proteínas) desencadeado por essa molécula (VAN DOORN; KETSA, 2014; ZULFIQAR; ASHRAF, 2021). Em condições de estresse hídrico durante a germinação, genótipos tolerantes de *Vigna mungo* L. demonstraram maior atividade antioxidante de peroxidases, sendo importantes na superação do estresse (ALI *et al.*, 2016). Resultados semelhantes são relatados por Begun *et al.* (2022) em sementes de soja, em que as enzimas CAT, APX e GPX apresentaram aumento durante o estresse hídrico e as cultivares reconhecidas como tolerantes ao estresse apresentaram maior atividade antioxidante, assim como, maior concentração de osmólitos (e.g., prolina). Em feijão, esta associação entre as enzimas antioxidantes e a tolerância ao estresse hídrico também é observada (SAGLAM *et al.*, 2011).

O sistema antioxidante vegetal é complexo e ocorrem interações entre o sistema antioxidante enzimático (e.g., catalase, superóxido dismutase, ascorbato e guaiacol peroxidase) e não enzimático (e.g., prolina, flavonóides, carotenóides, antocianina), buscando, em conjunto, evitar o dano oxidativo (MITTLER, 2017; SOARES *et al.*, 2019). Como descrito por Rejeb *et al.* (2014), a prolina estimula o sistema antioxidante que favorece a superação de estresses, onde

a aplicação exógena resultou no aumento da atividade enzimática (e.g., catalase, peroxidases, glutathione reductase). Essa relação ocorre devido ao papel regulador/sinalizador da prolina que promove a expressão gênica associada ao sistema antioxidante (CARVALHO *et al.*, 2013).

Considerando o abordado, moléculas do sistema antioxidante enzimático e não enzimático podem apresentar maior eficiência na sua atividade e/ou maior concentração, o que evita o dano oxidativo durante a germinação em condições de déficit hídrico e favorece o maior desempenho dos lotes de sementes com maior vigor quando submetidos a essas condições. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta fisiológica de sementes com contraste de vigor quando submetidas a condições de déficit hídrico, buscando determinar as diferenças metabólicas entre os lotes de sementes nessas condições.

### 9.3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do experimento foram utilizadas sementes do genótipo BAF07, pertencente ao Banco Ativo de Germoplasma de Feijão (BAF) do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). O genótipo utilizado foi selecionado considerando as suas características agrônomicas (ZILIO *et al.*, 2013; MICHELS *et al.*, 2014), valor genético para distribuição de sistema radicular (MELO *et al.*, 2016) e tolerância ao déficit hídrico durante a germinação (PADILHA; COELHO; SOMMER, 2022).

O lote de sementes foi produzido na safra 2020/2021 no município de Lages, Santa Catarina, Brasil, na área experimental do CAV-UDESC. Após a colheita, realizou-se a limpeza e padronização das sementes. O lote obtido foi segregado em três níveis de vigor utilizando-se o mesmo procedimento do teste de envelhecimento artificial com solução salina saturada, onde os lotes foram mantidos pelos períodos de cinco e dez dias em câmara de envelhecimento a 41 °C. Após cada período de envelhecimento, os lotes foram secos em estufa de circulação de ar até atingirem 13% de umidade. Assim, foram obtidos três lotes de sementes a partir de um lote inicial e do mesmo genótipo, sendo: Lote com Alto Vigor (AV), que não foi envelhecido; Lote com Médio Vigor (MV), envelhecido por cinco dias e; Lote com Baixo Vigor (BV), envelhecido por dez dias.

O teste de germinação foi realizado em condições de 25 °C utilizando quatro repetições de 50 sementes semeadas em papel *Germitest*® e dispostas em forma de rolo no germinador, utilizando iluminação de 12 h/12 h (luz/escuro). O umedecimento do papel foi realizado com água destilada para a condição controle (i.e., ausência de estresse) e com solução de polietileno



glicol 6000 (i.e., déficit hídrico) equivalente a -0,2 MPa (119,74 g de polietileno glicol 6000 por litro de água) (VILLELA; DONI-FILHO; SEQUEIRA, 1991). A porcentagem de germinação foi determinada aos quatro dias (i.e., primeira contagem de germinação) e aos nove dias (i.e., germinação).

A avaliação do desempenho de plântulas foi realizada aos quatro e aos sete dias após a semeadura, sendo avaliados o comprimento de raiz (CR), hipocótilo (CH) e total (CT). Para determinar o comprimento de plântulas foi utilizado paquímetro digital, e após mensuradas foram secas em estufa a 90 °C por 24 h para determinação da massa seca de plântulas (MSP). O teste foi conduzido em rolos de papel, conforme descrito no teste de germinação, utilizando-se quatro repetições de 20 sementes, sendo consideradas para a mensuração as plântulas normais (PEREIRA *et al.*, 2009). Os resultados foram expressos em centímetros por plântula ( $\text{cm pl}^{-1}$ ) e miligramas por plântula ( $\text{mg pl}^{-1}$ ).

Nos períodos de quatro e sete dias (i.e., mesmo período de avaliação fisiológica de desempenho de plântulas) as plântulas normais obtidas em condições de ausência e presença de déficit hídrico, foram utilizadas para a realização das análises de catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX), prolina e malondialdeído (MDA). Inicialmente, essas avaliações foram determinadas em plântulas e em cotilédones dos lotes de sementes de AV, MV e BV. Posteriormente, o lote de sementes de AV e BV foram selecionados, e as raízes e hipocótilo das plântulas aos sete dias foram avaliadas separadamente.

O extrato enzimático foi obtido utilizando-se 200 mg de amostra fresca e macerada em almofariz com 5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,2; contendo 1 mM de EDTA, 3 mM de DTT e 1% de PVP, e posteriormente centrifugado (AZEVEDO *et al.*, 1998).

A determinação de APX foi realizada conforme descrito por Nakano e Asada (1981), onde o meio de incubação foi constituído de 700  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,2; 100  $\mu\text{L}$  de solução de ácido ascórbico 5 mM e 100  $\mu\text{L}$  de solução de peróxido de hidrogênio 1 mM, sendo a reação iniciada com a adição de 100  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático. A leitura foi realizada em 290 nm durante 120 s. Uma unidade de ascorbato peroxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para realizar a oxidação de 1  $\mu\text{M}$  de ascorbato por minuto.

Para a quantificação GPX utilizou-se guaiacol como substrato (NAKANO; ASADA, 1981) e procedeu-se conforme descrito em Simões *et al.* (2015) com alterações. O meio de incubação continha 750  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 6,0; 100  $\mu\text{L}$  de guaiacol 40 mM e 100  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 10 mM, sendo a reação iniciada com a adição de 50  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático. A leitura foi realizada em 470 nm durante 120 s. Uma unidade de

guaiacol peroxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para realizar a formação de 1  $\mu\text{M}$  de tetraguaiacol por minuto.

A quantificação de CAT foi realizada conforme metodologia proposta por Aebi (1984) com alterações. O meio de incubação utilizou 2000  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,2; 800  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 75 mM e 200  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático. A leitura foi realizada em 240 nm durante 120 s. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para realizar a degradação de 1  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrogênio por minuto.

Todas as enzimas mensuradas foram apresentadas em unidades de enzima por miligrama de proteína, sendo determinada conforme descrito por Bradford (1976).

O teor de prolina foi determinado conforme descrito por Bates, Waldren e Teare (1973) sem modificações.

O MDA foi determinado conforme procedimento descrito por Hodges *et al.* (1999). Foram utilizados 100 mg de amostra macerada em 4 mL de álcool 80% (v/v). A quantificação foi realizada com 1 mL de extrato propriamente diluído e 1 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) contendo 0,65% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 0,01% (p/v) de hidroxitolueno butilado (BHT). As amostras foram mantidas em banho-maria a 95 °C por 25 min e as leituras foram realizadas em 440, 532 e 600 nm, e calculadas conforme Hodges *et al.* (1999).

Inicialmente, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 x 2, sendo, três lotes (AV, MV, BV) e duas condições de germinação (controle e déficit hídrico) com quatro repetições. Posteriormente, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 2, sendo dois lotes (AV e BV) e duas condições de germinação (controle e déficit hídrico) com quatro repetições. Os dados foram submetidos a teste de normalidade quando necessário, e posteriormente foi realizada análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o *software* Sisvar (FERREIRA, 2011). Os resultados da análise estatística podem ser observados ao final do documento em caso de necessidade (APÊNDICE G).

#### 9.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os lotes de sementes do genótipo BAF07 apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) quanto a qualidade fisiológica, onde o lote não envelhecido (AV) exibiu maior qualidade fisiológica em relação ao lote envelhecido por dez dias (BV). A diferença de resposta fisiológica do lote envelhecido por 5 dias (MV) foi evidenciada no percentual de germinação em condições

de déficit hídrico (Tabela 22). Esses resultados demonstram que o vigor está diretamente associado ao nível de deterioração do lote de sementes, em que, lotes de menor vigor apresentam menor capacidade de superar condições de estresse abiótico (MARCOS-FILHO, 2015b).

Tabela 22 – Primeira contagem de germinação (PCG) e germinação de sementes do genótipo BAF07 com diferentes níveis de vigor (alto (AV), médio (MV) e baixo (BV))

Vigor	PCG (%)		Germinação (%)	
	Controle	Déficit hídrico	Controle	Déficit hídrico
AV	73 aA	27 aB	92 aA	73 aB
MV	69 aA	24 aB	89 aA	60 bB
BV	51 bA	13 bB	79 bA	43 cB
CV	11,08		7,06	

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação (CV). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

As diferenças na qualidade fisiológica dos lotes puderam ser confirmadas ao serem analisados os resultados dos testes de desempenho de plântulas (comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT) e massa seca (MSP)). O lote de sementes de alto vigor apresentou maior comprimento (raiz e plântula) e acúmulo de massa em ambas as condições de avaliação (i.e., ausência e presença de déficit hídrico) e em ambos os períodos avaliados (i.e., 4 e 7 dias de germinação) (Tabela 23).

Tabela 23 – Comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT) e massa seca de plântulas (MSP) avaliados nos períodos de 4 e 7 dias de germinação em condições de ausência de déficit hídrico (controle) e presença de déficit hídrico

4 dias								
Vigor	CR (cm pl <sup>-1</sup> )		CH (cm pl <sup>-1</sup> )		CT (cm pl <sup>-1</sup> )		MSP (mg pl <sup>-1</sup> )	
	Controle	Déficit hídrico	Controle	Déficit hídrico	Controle	Déficit hídrico	Controle	Déficit hídrico
AV	10,24 aA	4,29 aB	3,84 aA	1,37 aB	14,08 aA	5,63 aB	24,07 aA	13,12 aB
MV	8,28 bA	3,16 bB	3,06 bA	1,13 aB	11,34 bA	4,29 bB	19,83 bA	10,55 bB
BV	6,62 cA	2,68 cB	3,04 bA	1,07 aB	9,66 bA	3,73 cB	16,78 cA	9,73 cB
CV	12,48		13,36		12,14		6,54	
7 dias								
Vigor	CR (cm pl <sup>-1</sup> )		CH (cm pl <sup>-1</sup> )		CT (cm pl <sup>-1</sup> )		MSP (mg pl <sup>-1</sup> )	
	Controle	Déficit hídrico	Controle	Déficit hídrico	Controle	Déficit hídrico	Controle	Déficit hídrico
AV	16,16 aA	10,84 aB	7,73 aA	2,91 aB	23,99 aA	13,75 aB	50,05 aA	25,62 aB
MV	14,23 bA	9,06 aB	6,61 bA	2,47 aB	20,85 bA	11,74 aB	47,77 aA	20,57 bB
BV	12,94 bA	8,17 bB	5,83 bA	2,21 aB	18,77 cA	10,39 bB	41,16 bA	17,08 bB
CV	7,26		11,55		6,82		9,06	

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação (CV). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

O comprimento total e a massa seca de plântulas são variáveis positivamente associadas ao vigor de sementes, o que as torna eficientes na segregação de lotes (FINCH-SAVAGE; BASSEL 2016), sendo que esta associação já havia sido observada em condições de déficit hídrico para sementes de feijão (PADILHA; COELHO; SOMMER, 2022). Assim, se observa um contraste bem estabelecido entre os lotes utilizados, sobretudo os lotes de alto vigor e baixo vigor.

As variáveis comprimento total e massa seca de plântulas também estão associadas positivamente à maior capacidade de mobilizar as reservas presentes em endosperma (ANDRADE; COELHO; PADILHA, 2019) e cotilédones (VERMA *et al.*, 2015; EHRHARDT-BROCARDI; COELHO, 2016). Essa associação foi observada na mensuração da redução de reservas dos cotilédones (RRC) onde, sementes de alto vigor apresentaram maior redução em condições de ausência e presença de déficit hídrico (Tabela 24), o que favoreceu a formação de plântulas de maior vigor (Tabela 23).

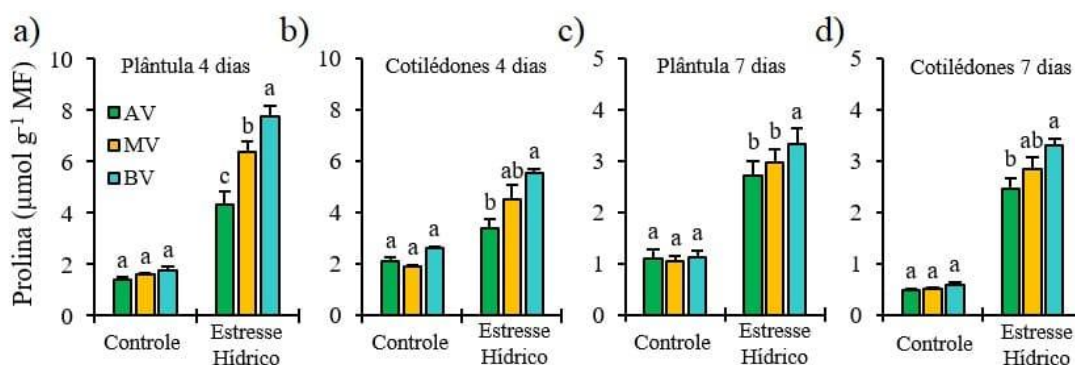
Tabela 24 – Redução de reservas de cotilédones (RRC) avaliados nos períodos de 4 e 7 dias de germinação em condições de ausência de déficit hídrico (controle) e presença de déficit hídrico

Vigor	4 Dias		7 Dias	
	RRC (mg cotilédone <sup>-1</sup> )		RRC (mg cotilédone <sup>-1</sup> )	
	Controle	Déficit hídrico	Controle	Déficit hídrico
AV	39,38 aA	18,67 aB	70,86 bA	29,48 aB
MV	32,54 bA	15,29 abB	67,36 abA	25,52 bB
BV	30,88 bA	11,03 bB	62,17 bA	22,55 bB
CV	13,01		9,48	

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação (CV). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

O teor de prolina livre na ausência de déficit hídrico não apresentou diferença significativa entre os lotes de sementes, independente do momento avaliado (i.e., 4 e 7 dias) e partes da plântula (i.e., plântula e cotilédones). Contudo, durante o déficit hídrico, foi verificado aumento do teor de prolina livre em plântula e cotilédones e nos dois momentos de avaliação. Os lotes de sementes de baixo vigor apresentaram maior concentração de prolina livre nas estruturas da plântula e nos dois momentos avaliados (Figura 21).

Figura 21 – Teor de prolina livre em plântulas e em cotilédones durante a germinação de sementes de feijão avaliados aos 4 e 7 dias em condições de ausência e presença de déficit hídrico



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

O acúmulo de prolina livre é uma resposta bioquímica na célula em condições de estresse abiótico, onde a prolina é sintetizada a partir do glutamato (REJEB *et al.*, 2014). A prolina atua no ajuste osmótico protegendo as estruturas celulares durante a desidratação, assim como, atua como molécula sinalizadora e antioxidante (SOARES *et al.*, 2019; ZULFIQAR; ASHRAF, 2021). Diferentes genótipos de feijão apresentaram incremento do conteúdo de

prolina em condições de estresse osmótico, demonstrando maior capacidade de tolerar o estresse imposto (CHEN *et al.*, 2016). Essa relação entre a maior concentração de prolina livre e o maior desempenho não foi observada, visto que, sementes de baixo vigor apresentaram desempenho inferior em déficit hídrico (Tabela 23). Como os lotes utilizados são do mesmo genótipo, a maior concentração de prolina livre pode estar associada à menor capacidade de superação do estresse pelas sementes de baixo vigor.

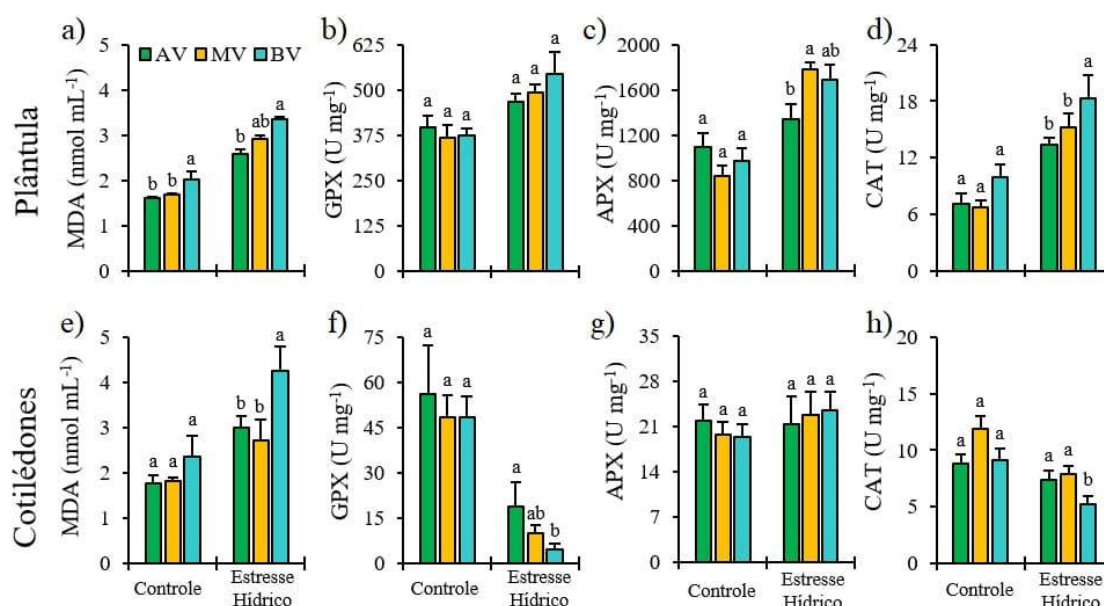
Dessa forma, as plântulas originadas a partir de sementes de baixo vigor apresentaram maior necessidade de produção deste aminoácido para realizar a regulação osmótica das células. Resultados semelhantes foram obtidos por Padilha, Coelho e Sommer (2022) onde sementes de menor vigor apresentaram maior concentração de prolina, e essa maior produção resultou no menor desempenho de plântulas devido ao gasto metabólico necessário para a sua produção.

Aos quatro dias de germinação em condições de déficit hídrico foi observado o aumento do teor de malondialdeído (MDA) em plântulas e em cotilédones em relação ao controle, indicando maior peroxidação lipídica no estresse. Durante o déficit hídrico, o conteúdo de MDA aumenta nos tecidos das plântulas como resultado do acúmulo de espécies reativas de oxigênio que interagem com as membranas celulares (MITTLER, 2017). O aumento do conteúdo de MDA varia com a intensidade do estresse imposto e com a suscetibilidade de um genótipo (BEGUN *et al.*, 2022). Sendo assim, o lote de sementes de baixo vigor por apresentar as maiores concentrações de malondialdeído, demonstrou maior suscetibilidade ao estresse imposto (Figura 22a, Figura 22e), o que justifica o desempenho fisiológico observado (Tabela 22). Marcos-Filho (2015b) ressalta que sementes com menor vigor possuem maior sensibilidade a condições adversas, dessa forma, o menor desempenho demonstrado pelas sementes de baixo vigor durante o déficit hídrico resultou em maior peroxidação lipídica nas plântulas formadas.

No quarto dia de germinação, as enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX), apresentaram aumento nas plântulas em condição de déficit hídrico em relação ao controle, independente do lote de sementes utilizado (Figura 22b, Figura 22c, Figura 22d). As sementes de baixo vigor apresentaram maior atividade das enzimas CAT e APX (Figura 22c, Figura 22d). Sarker e Oba (2018) demonstraram que quanto maior é o nível de estresse suportado por uma planta, maior é a produção das enzimas associadas ao sistema antioxidante, buscando controlar o dano oxidativo a partir do controle de espécies reativas de oxigênio. Dessa forma, sementes de baixo vigor apresentaram maior necessidade de síntese das enzimas relacionadas ao mecanismo antioxidante como alternativa para superação da condição de estresse. Contudo, essa maior produção não foi suficiente para manutenção da germinação ou desempenho de plântulas, como nos lotes de alto vigor e médio vigor, visto que o lote de

baixo vigor apresentou o menor desempenho em todas as variáveis fisiológicas (Tabela 22, Tabela 23).

Figura 22 – Malondialdeído (MDA), guaiacol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) avaliados aos 4 dias de germinação em plântula e cotilédones nas condições de presença e ausência (controle) de déficit hídrico. Médias seguidas de mesma letra na condição de germinação não apresentam diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

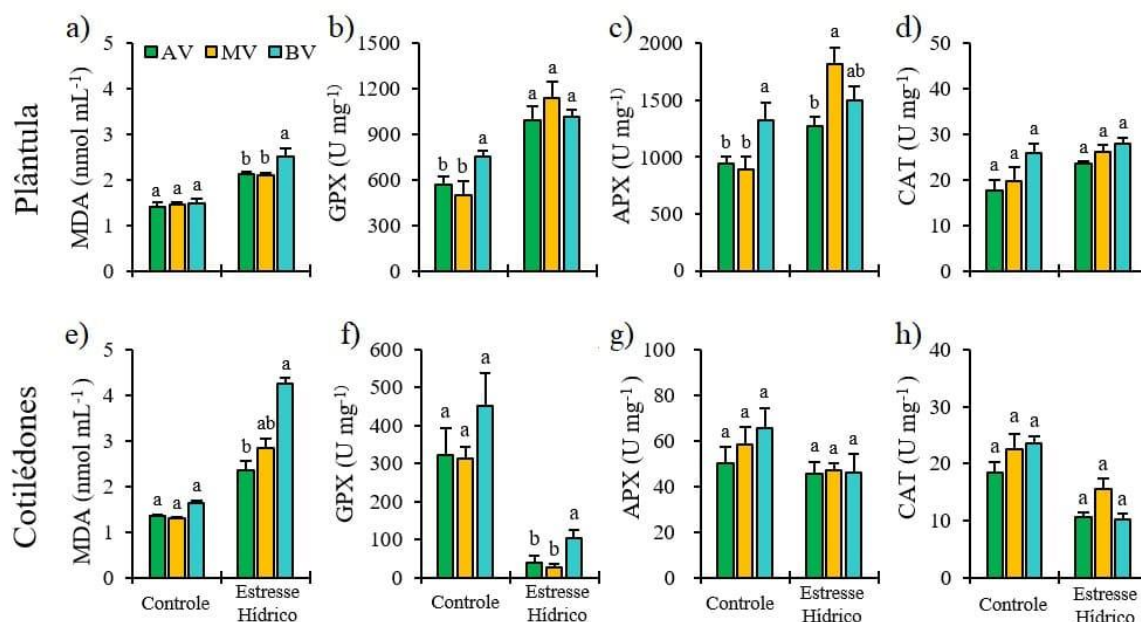
Os resultados obtidos nos cotilédones mostraram que as atividades das enzimas APX, GPX, e CAT não foram responsivas ao déficit hídrico (Figura 22f, Figura 22g, Figura 22h). Nos cotilédones o teor de prolina foi superior em sementes de baixo vigor (Figura 21b). As sementes de alto vigor apresentaram maior atividade de CAT e GPX no déficit hídrico, o que pode ter favorecido a menor peroxidação lipídica observada em cotilédones (Figura 22e), permitindo a mobilização de reservas para o eixo embrionário (Tabela 23). De acordo com Zulficar e Ashraf (2021), as enzimas antioxidantes favorecem o controle de espécies reativas de oxigênio o que pode evitar, em certo nível, a peroxidação de lipídios.

A menor atividade antioxidante observada nos cotilédones aos quatro dias em déficit hídrico em relação ao controle, pode estar relacionada a outros mecanismos antioxidantes atuando nessa estrutura. Conforme Soares *et al.* (2019), o sistema antioxidante é complexo, podendo ser enzimático e não enzimático. Uma vez que na composição química do feijão

podem ser encontrados compostos fenólicos, tocoferol, carotenoides, açúcares e outros componentes que apresentam atividade antioxidante (LOS *et al.*, 2018), estes componentes podem ter atuado na neutralização das espécies reativas de oxigênio não sendo necessária a síntese das enzimas APX, GPX e CAT nessa estrutura.

Considerando o teor de MDA, aos sete dias de germinação as sementes de baixo vigor apresentaram maior teor em relação as sementes de alto e médio vigor em ambas as estruturas avaliadas (Figura 23a, Figura 23e). Em geral, a atividade das enzimas APX, GPX e CAT, foram superiores em condições de déficit hídrico quando avaliadas em plântulas, e inferiores quando avaliadas em cotilédones, corroborando os resultados obtidos em 4 dias. Da mesma forma que a enzima APX aos 4 dias (Figura 21c), as sementes com médio e baixo vigor apresentaram maior atividade dessa enzima aos 7 dias (Figura 23c), indicando maior necessidade de síntese em lotes com qualidade fisiológica inferior quando submetidas a condições de déficit hídrico.

Figura 23 – Malondialdeído (MDA), guaiacol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) avaliados aos sete dias de germinação em plântula e cotilédones em condições de presença e ausência de déficit hídrico. Médias seguidas de mesma letra na condição de germinação não apresentam diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A deterioração de sementes está diretamente associada com a produção de espécies reativas de oxigênio que resultam na perda da capacidade de proteção, redução da atividade



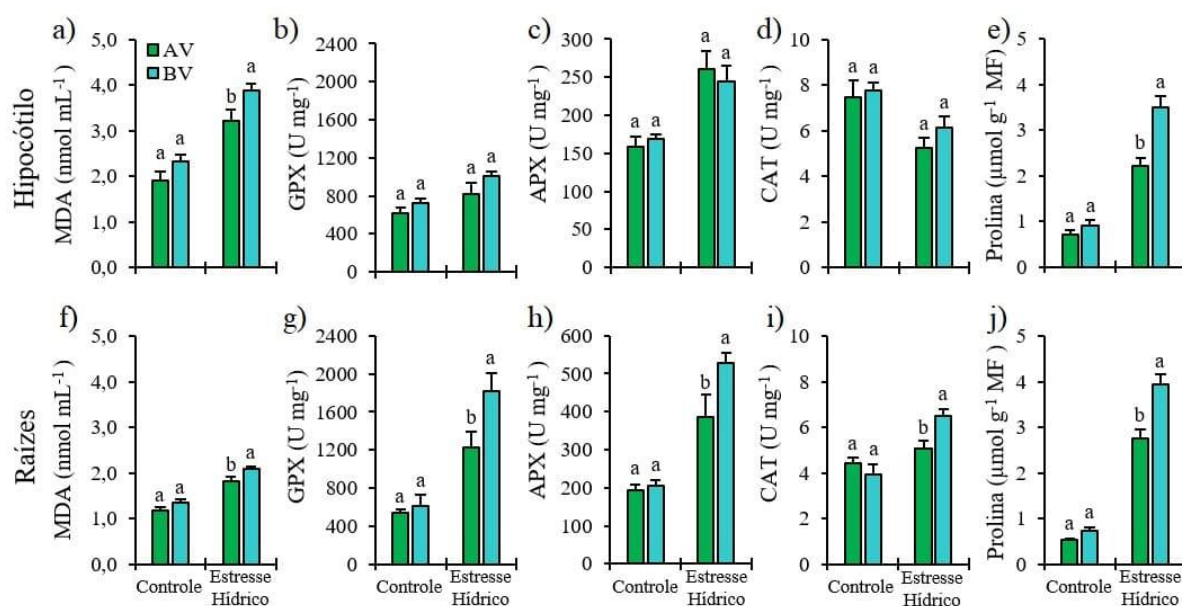
enzimática, peroxidação lipídica, consumo de reservas e dano ao material genético (EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019). As sementes de menor vigor apresentam menor desempenho e crescimento lento devido a maior necessidade de reparo de membranas, mitocôndrias e material genético, este resultante do dano ocorrido na deterioração (MARCOS-FILHO, 2015b). Assim, em uma condição de estresse abiótico, sementes de menor vigor tem menor desempenho devido a maior necessidade de reparo e, a maior suscetibilidade ao estresse exigiu uma maior síntese de prolina (Figura 21), APX (Figura 23c, Figura 22b), GPX (Figura 23f) e CAT (Figura 22d), buscando-se evitar maior dano ao metabolismo durante a germinação.

O acúmulo de prolina e a atividade antioxidante pode ser variável em diferentes estruturas da planta (e.g., raiz, parte aérea ou cotilédones) (CHEN *et al.*, 2016; VAN DOORN; KETSA, 2014; VERMA *et al.*, 2015). Considerando isso, os lotes de alto e baixo vigor foram avaliados nas mesmas condições quanto às diferentes estruturas (raízes e hipocótilo) aos sete dias de germinação, momento em que apresentaram o maior contraste de qualidade fisiológica (Tabela 22, Tabela 23).

Os resultados da peroxidação lipídica por meio do MDA em raízes e no hipocótilo, avaliados separadamente, foram semelhantes aos observados na plântula inteira (Figura 23a, Figura 23b). O aumento do conteúdo de MDA nas raízes e na parte aérea foi observado quando as sementes foram submetidas ao déficit hídrico, sendo superior nas sementes de baixo vigor (Figura 24a, Figura 24f). As enzimas avaliadas na parte aérea não apresentaram diferença entre os níveis de vigor das sementes, apenas o teor de prolina pode ser associado ao vigor, onde sementes de menor vigor apresentaram maior concentração de prolina (Figura 24e).

Em raízes, o aumento das enzimas GPX, APX e CAT foi observado para os lotes de alto e baixo vigor, onde sementes de menor vigor apresentaram maior atividade dessas enzimas (Figura 24g, Figura 24h, Figura 24i), e ainda, maior concentração de prolina (Figura 24j). Conforme Ebone, Caverzan e Chavarria (2019), sementes com maior nível de deterioração apresentam maior acúmulo de espécies reativas de oxigênio, tornando necessária a atuação do sistema antioxidante para realizar o seu controle. Assim, evidencia-se que a maior deterioração a qual o lote de baixo vigor foi submetido previamente aumentou os níveis de espécies reativas de oxigênio nas sementes, tornando-as mais sensíveis ao déficit hídrico durante a germinação, sendo necessária maior síntese de enzimas antioxidantes (Figura 24g, Figura 24h, Figura 24i) e outros componentes (Figura 24j) para evitar a peroxidação lipídica (Figura 24f) e outros danos às células.

Figura 24 – Malondialdeído (MDA), guaiacol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) e prolina avaliados aos sete dias de germinação em raízes e hipocótilo em condições de ausência (controle) e presença de déficit hídrico. Médias seguidas de mesma letra na condição de germinação não apresentam diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Os resultados obtidos demonstram que a maior atividade antioxidante não está associada ao maior vigor do lote de sementes. As sementes de menor vigor apresentaram maior atividade antioxidante, evidenciando a necessidade de síntese dessas enzimas para a superação do estresse abiótico imposto. Assim, essas sementes já estavam mais suscetíveis devido a deterioração realizada anteriormente, resultando em maior perda de germinação (Tabela 22) e desempenho de plântulas (Tabela 23). Dessa forma, verifica-se que a atuação do sistema antioxidante durante a germinação em déficit hídrico é dependente do nível de vigor do lote de sementes. O desempenho de plântulas formadas a partir de sementes de alto vigor, nessa condição, é determinado pela maior capacidade de hidrólise e mobilização de reservas (Tabela 23, Tabela 24).

## 9.5 CONCLUSÃO

Sementes com diferenças de vigor quando submetidas a condições de déficit hídrico demonstraram respostas fisiológicas e metabólicas distintas. As sementes de baixo vigor apresentaram maior suscetibilidade ao déficit hídrico, demonstrando maior peroxidação lipídica em plântulas e os cotilédones. E a resposta antioxidante apresenta-se superior em sementes de menor vigor.

## 10 CAPÍTULO 8 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E O VIGOR DE SEMENTES DE FEIJÃO APÓS ESTRESSE POR FRIO

### 10.1 RESUMO

A germinação de sementes é um dos momentos críticos durante o processo de germinação e, condições de estresse por frio afetam o potencial de emergência e formação de plântulas nesse momento. A resposta do vigor do lote de sementes contribui para a superação de estresses abióticos, dentre eles, o estresse por frio, contudo os mecanismos bioquímicos associados ao potencial de superação do estresse por frio por sementes de maior vigor é pouco estudado. Com isso, o objetivo do presente estudo foi determinar as diferenças no sistema antioxidante vegetal entre sementes com contraste no vigor para verificar a relação entre o vigor do lote de sementes e o sistema antioxidante. Foram utilizadas sementes dos genótipos BAF42, BAF44 e BAF55 com níveis de vigor distinto, totalizando seis lotes de sementes as quais foram submetidas a condições de germinação e teste de frio a 5 °C. Após o estresse por frio foram avaliados a peroxidação lipídica, peróxido de hidrogênio, catalase, guaiacol peroxidase e ascorbato peroxidase. Os resultados demonstram que sementes de maior vigor apresentam maior capacidade de superação do estresse por frio. Contudo, poucas alterações bioquímicas foram observadas durante o estresse por frio. As avaliações após a condição de estresse demonstraram que as sementes de menor vigor apresentaram maior suscetibilidade ao estresse e formaram plântulas com maior atividade antioxidante e maior peroxidação lipídica. Com isso, conclui-se que o sistema antioxidante avaliado não foi associado ao maior vigor do lote de sementes, sendo outro mecanismo não avaliado responsável pela sua capacidade de superação do estresse por frio.

### 10.2 INTRODUÇÃO

O feijão é uma cultura de extrema importância na alimentação humana mundial, sendo determinante como fonte de proteínas, carboidratos e minerais (NADEEM *et al.*, 2021). Processo produtivo da cultura apresenta diversos desafios, principalmente associados aos estresses abióticos, os quais resultam em perdas no desempenho da cultura e na produção de grãos (LONE *et al.*, 2021).

Dentre os aspectos que são relevantes durante a produção da cultura do feijão, o uso de sementes com qualidade é determinante, a qual gera ganhos em produtividade (MONDO *et al.*, 2016). A qualidade de sementes é determinada pelos parâmetros físicos, fisiológicos, genéticos

e sanitários, sendo o parâmetro fisiológico (i.e., germinação e vigor) é um dos mais estudados na literatura, devido a sua importância direta no sucesso do sistema produtivo (MARCOS-FILHO, 2015b). O vigor é uma característica determinante em lotes de sementes, a qual favorece a formação de plântulas normais durante a germinação e emergência a campo em uma ampla faixa de condições ambientais (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016).

Durante a emergência das plântulas a campo, diversos estresses abióticos podem ocorrer e resultar em perdas de germinação e emergência. Os estresses abióticos, como salinidade, seca, deficiência nutricional, baixas e altas temperaturas, resultam em perda de desempenho durante o crescimento e desenvolvimento vegetal (ALI *et al.*, 2022). Dentre esses, o estresse por frio é um dos estresses que resultam na perda de produtividade, em que, durante o crescimento diversas respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares são observadas, sendo que algumas respostas são associadas a capacidade de tolerância das plantas ao estresse por frio (BHAT *et al.*, 2022).

Durante condições de estresse por frio ocorre a redução da velocidade de germinação, menor porcentagem de germinação e formação de plântulas com menor desempenho, sendo que, as sementes de maior vigor apresentam melhor desempenho nessas condições (SBRUSSI; ZUCARELLI, 2014). A maior capacidade de sementes com maior vigor em superar condições de estresse por frio é demonstrada para sementes de feijão (GINDRI *et al.*, 2016), soja (KAYA *et al.*, 2016) e milho (SBRUSSI; ZUCARELLI, 2014). Entretanto, esses estudos não demonstram quais os mecanismos que favorecem o melhor desempenho de sementes de alto vigor nessas condições.

Uma das principais respostas associadas ao melhor desempenho de plantas em condições de estresse por frio é a maior atividade de enzimas associadas ao sistema antioxidante (ALI *et al.*, 2022). Durante condições de estresse por frio (i.e., 0 - 15 °C) alterações como a limitação da função da membrana plasmática devido ao aumento da sua rigidez, perda da integridade das membranas e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (e.g., peróxido de hidrogênio e radical superóxido) podem ocorrer (BHAT *et al.*, 2022; LONE *et al.*, 2021). Dessa forma, o aumento da atividade antioxidante é necessária para restaurar a homeostase e consequentemente a atividade metabólica normal (MITTLER, 2017).

A maior atividade antioxidante foi associada a maior capacidade germinativa de linhagens de milho tolerantes a estresse por frio, indicando a sua associação com a tolerância a esse estresse (MENG *et al.*, 2022). Resultados semelhantes forma observados por Freitas *et al.*, (2018), em que, sementes de arroz com maior tolerância a estresse por frio apresentaram menor peroxidação lipídica e maior atividade antioxidante (e.g., Catalase e Guaiacol Peroxidases),

favorecendo o desempenho nessas condições. Com isso, a resposta fisiológica superior de sementes de maior vigor submetidas a condições de estresse por frio pode estar associada a maior atividade antioxidante o qual favorece o melhor desempenho após serem submetidas a condições de estresse por frio.

Com isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta fisiológica de sementes com contraste no vigor durante condições de estresse por frio, buscando identificar a associação entre o vigor do lote de sementes e o sistema antioxidante vegetal.

### 10.3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do experimento foram utilizadas as sementes do genótipo BAF42, BAF44 e BAF55 os genótipos são originalmente pertencentes ao banco ativo de germoplasma de feijão (BAF) do Centro de ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Os genótipos utilizados foram selecionados considerando as suas características de qualidade fisiológica (EHRHARDT-BROCARDI; COELHO, 2016).

Os lotes dos genótipos foram produzidos na safra 2020/2021 no município de Lages, Santa Catarina, Brasil, na área experimental do CAV-UDESC. Após a colheita o lote de sementes passou pelo processo de limpeza e padronização. Para cada genótipo, o lote de sementes obtido foi segregado em dois níveis de vigor utilizando envelhecimento artificial a partir da metodologia de envelhecimento acelerado em solução salina saturada (JIANHUA; McDONALD, 1997). O lote envelhecido foi mantido pelo período de sete dias em câmara de envelhecimento em temperatura de 41 °C. Após os sete dias, as sementes foram removidas das caixas plásticas e submetidas a secagem em estufa de circulação de ar forçado até atingirem grau de umidade de 12 - 13%. Com isso obteve-se dois lotes de sementes para cada genótipo, sendo: 42L1, 44L1 e 55L1 como lotes com alto vigor, os quais não foram envelhecidos e; 42L2, 44L2 e 55L2 como lotes de sementes com baixo vigor, os quais foram envelhecidos.

A qualidade fisiológica foi determinada pelo teste de germinação e teste de frio. O teste de germinação foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes, em que, essas foram dispostas em papel filtro umedecidos com água destilada na proporção de 2,5 mL de água por grama de papel seco e confeccionados na forma de rolo de papel. Os rolos de papel foram mantidos em germinador na temperatura de  $23 \pm 2$  °C em escuro. Aos quatro dias de germinação foi realizada a primeira contagem de germinação (PCG) e, aos sete dias foram determinadas a porcentagem final de germinação, o número de plântulas anormais e sementes mortas (BRASIL, 2009).

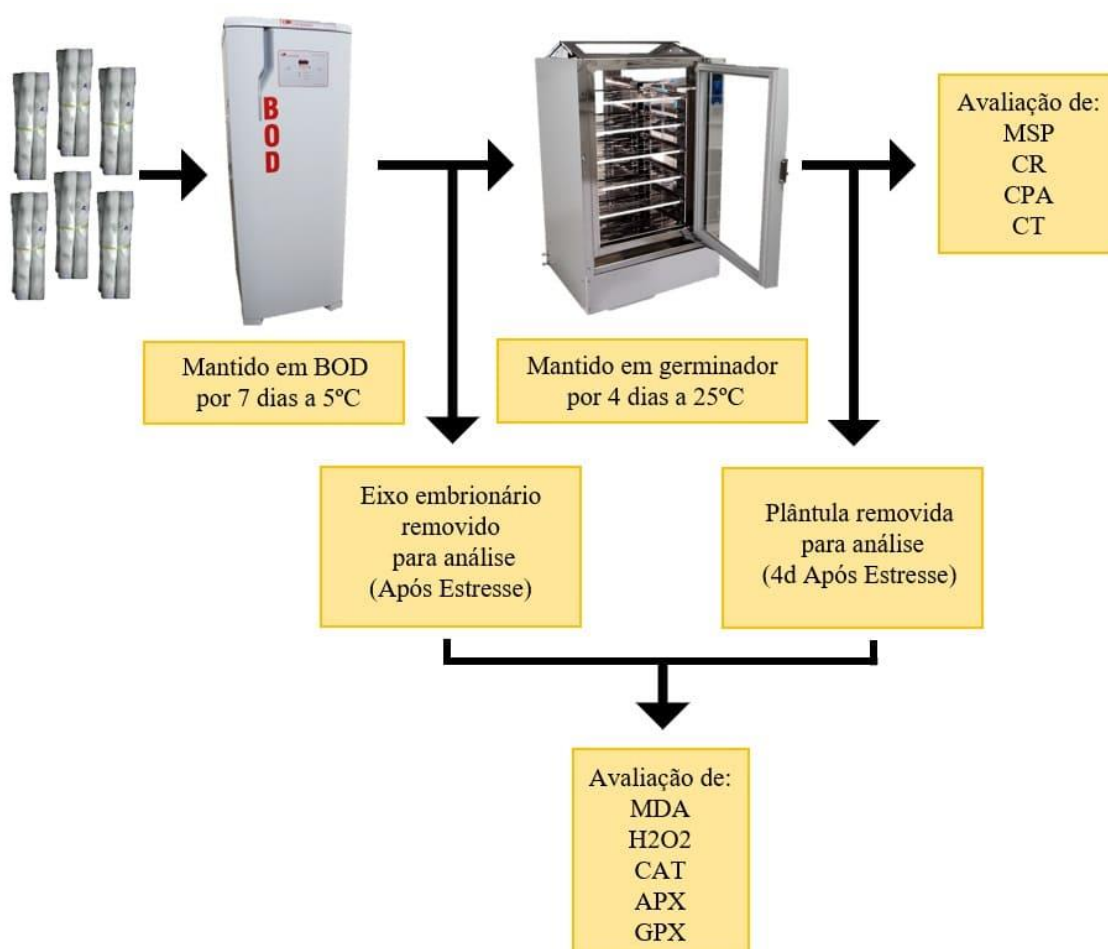
Para o teste de frio, quatro repetições de 50 sementes foram dispostas em papel filtro previamente umedecidos com água destilada na proporção de 2,5 mL de água por grama de papel seco e dispostos em forma de rolo de papel dentro de uma *biological oxygen demand* (BOD) na temperatura de  $5 \pm 0,3$  °C por 7 dias. Após o período de incubação na condição de frio, os rolos de germinação foram realocados em germinador tipo Mangelsdorf em temperatura de  $23 \pm 2$  °C em escuro. As contagens foram realizadas da mesma forma que o teste de germinação.

A resposta fisiológica do vigor de sementes após a submissão das sementes a condição de estresse por frio foi realizada na mesma condição do teste de frio e as avaliações determinadas na saída do estresse por frio (i.e., 7 dias após a incubação no teste de frio) e aos 4 dias após serem realocados em germinador Mangelsdorf conforme descrito anteriormente. O processo de seleção das amostras e avaliações estão descritos na Figura 25.

A avaliação do desempenho das plântulas foi realizada conforme demonstrado na Figura 25, em que, 15 sementes foram dispostas no terço superior do papel toalha previamente umedecido com 2,5 mL de água por grama de papel seco e dispostos em forma de rolo de papel dentro de uma *biological oxygen demand* (BOD) na temperatura de  $5 \pm 0,3$  °C por 7 dias. Após o período de incubação na condição de frio, os rolos de desempenho de plântulas foram realocados em germinador tipo Mangelsdorf em temperatura de  $23 \pm 2$  °C em escuro e, no quarto dia foram avaliados o comprimento de raiz (CR), hipocótilo (CH) e total (CT) das plântulas normais formadas (i.e., plântulas que apresentavam todas as estruturas essenciais e ausência de anomalias). Para determinar o comprimento das plântulas foi utilizado um paquímetro digital, após mensuradas as plântulas foram secas em estufa a 80 °C por 24 h para determinação da massa seca total (MST) (NAKAGAWA, 1999).

Figura 25 – Procedimento de execução para determinar a resposta fisiológica de sementes sob condições de estresse por frio e após a submissão por estresse por frio.

Malondialdeído (MDA); Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); Catalase (CAT); Ascorbato peroxidase (APX); guaiacol peroxidase (GPX); massa seca de plântulas (MSP); comprimento de raiz (CR); comprimento de hipocótilo (CH); comprimento total (CT)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A avaliação de malondialdeído (MDA), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) e catalase (CAT) foram realizadas no momento de saída do estresse por frio em eixo embrionário e aos quatro dias após a submissão ao estresse por frio em plântulas normais formadas conforme demonstrado na Figura 25.

O extrato enzimático obtido de cada repetição biológica foi realizado utilizando 200 mg de amostra fresca e macerado em almofariz com 5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,2; contendo 1 mM de EDTA, 3 mM de DTT e 1% PVP (AZEVEDO *et al.*, 1999).



A determinação de APX foi realizada conforme descrito por Nakano e Asada (1981), com modificações, em que, o meio de incubação foi realizado utilizando 700  $\mu$ l de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,2; 100  $\mu$ L de solução de ácido ascórbico 5 mM e; 100  $\mu$ L de solução de peróxido de hidrogênio 1 mM, sendo a reação iniciada com a adição de 100  $\mu$ L de extrato enzimático. A leitura foi realizada em 290 nm, pelo período de 60 s. Uma unidade de ascorbato peroxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para realizar a oxidação de 1  $\mu$ M de ascorbato por minuto.

Para a quantificação GPX foi realizada utilizando guaiacol como substrato (NAKANO; ASADA, 1981), realizada conforme procedimento de Simões *et al.* (2015) com alterações, em que, o meio de incubação foi realizado utilizando 700  $\mu$ l de tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 6,5; 100  $\mu$ L de guaiacol 40 mM e 100  $\mu$ l de peróxido de hidrogênio 10 mM e, a reação foi iniciada adicionando 100  $\mu$ L de extrato enzimático. A leitura foi realizada em 470 nm pelo período de 30 s. Uma unidade de guaiacol peroxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para realizar a formação de 1  $\mu$ M de tetraguaiacol por min.

Para a quantificação de CAT foi realizada utilizado procedimento proposto por Aebi (1984) com alterações, em que, o meio de incubação foi realizado utilizando 2000  $\mu$ l de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,2; 800  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio 65 mM e 200  $\mu$ l de extrato enzimático. A leitura foi realizada em 240 nm pelo período de 120 s. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para realizar a degradação de 1  $\mu$ M de peróxido de hidrogênio por min.

As enzimas avaliadas foram apresentadas em unidades de enzima por miligrama de proteína ( $U\ mg^{-1}$ ), sendo essa determinada conforme descrito por Bradford (1976).

O malondialdeído foi determinado conforme procedimento descrito por Hodges *et al.*, (1999). Foram utilizados 50 mg de amostra macerada em 1,5 mL de álcool 80% (v/v) as quais foram maceradas em almofariz e centrifugadas. A quantificação foi realizada utilizando 1 mL de extrato propriamente diluído e 1 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) contendo 0,65% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 0,01% (p/v) hidroxitolueno butilado (BHT). A reação foi mantida em banho maria a 95 °C por 25 min e as leituras realizadas em 440, 532 e 600 nm, e posteriormente calculadas conforme especificado em Hodges *et al.* (1999).

A determinação do peróxido de hidrogênio foi realizada conforme descrito por Alexieva *et al.*, (2001) com modificações. 50 mg de amostra previamente macerada foi homogeneizada em 2,5 mL de TCA 0,1% (p/v) e posteriormente centrifugado. Para a leitura foram utilizados 0,5 mL de sobrenadante e adicionados 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) 50 mM e adicionado 1 mL de iodeto de potássio (KI). As amostras ficaram em repouso por 30 min no

escuro e posteriormente realizada a leitura a 390 nm. O teor de peróxido de hidrogênio foi determinado a partir de uma curva padrão.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 3, sendo, dois níveis de vigor (i.e., alto vigor e baixo vigor) e três genótipos (i.e., BAF42, BAF44 e BAF55) com quatro repetições. Os dados foram submetidos a teste de normalidade quando necessário e posteriormente realizada a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na segunda etapa a caracterização dos lotes quanto ao seu vigor foi realizado por análise de agrupamento (*cluster*) e as análises de componentes principais realizadas conforme o agrupamento obtido. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *Software R* (R CORE TEAM, 2022). Os resultados da análise estatística podem ser observados ao final do documento em caso de necessidade (APÊNDICE H).

#### 10.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram efeito significativo para o genótipo e para o nível de vigor para as variáveis fisiológicas avaliadas (Apêndice H).

Os lotes de sementes com maior vigor de todos os genótipos utilizados, apresentaram maior qualidade fisiológica quando avaliado durante o teste de germinação, demonstrando maior porcentagem de primeira contagem de germinação (PCG) e, para a variável plântulas normais (PN) apenas o genótipo BAF55 apresentou valores semelhantes ao lote de baixo vigor (Tabela 1). Resultado semelhante foi verificado para a resposta do vigor do lote de sementes no teste de frio, em que, os lotes de sementes de maior vigor dos genótipos utilizados apresentaram maior velocidade de germinação (PCG) e maior porcentagem de plântulas normais (PN) após a submissão ao teste de frio. Conseqüentemente, os lotes de sementes de menor vigor apresentaram porcentagem de plântulas anormais superior aos lotes de alto vigor (Tabela 25).

Tabela 25 – Primeira contagem de germinação (PCG), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA) e sementes mortas (SM) dos lotes de sementes dos genótipos BAF55, BAF44 e BAF42 com contraste no vigor dos lotes utilizados em condições de ausência de frio e após estresse por frio

Lote	PCG	PN	PA	SM	PCG <sub>Frio</sub>	PN <sub>Frio</sub>	PA <sub>Frio</sub>	SM <sub>Frio</sub>
	%							
BAF55								
Alto (55L1)	85 a	95 a	6 a	0	87 a	90 a	10 b	1 a
Baixo (55L2)	66 b	91 a	9 a	0	54 b	71 b	27 a	2 a
BAF44								
Alto (44L1)	58 a	89 a	11 b	0	51 a	68 a	17 b	16 b
Baixo (44L2)	45 b	84 b	17 a	0	21 b	39 b	37 a	25 a
BAF42								
Alto (42L1)	81 a	96 a	5 b	0	85 a	88 a	12 b	0 a
Baixo (42L2)	54 b	88 b	12 a	0	54 b	73 b	25 a	3 a
CV	7,42	3,14	29,11	-	14,78	8,83	24,28	45,76

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p \geq 0,05$ ). Coeficiente de variação (CV). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A resposta fisiológica do vigor do lote de sementes sob diferentes condições de germinação é conhecida, e o melhor desempenho é em geral observado para as sementes com maior vigor, as quais demonstram maior velocidade e porcentagem de germinação (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). Essa resposta foi confirmada no presente estudo, e todos os lotes envelhecidos artificialmente apresentaram menor qualidade fisiológica em relação aos lotes não envelhecidos. Segundo Xing *et al.* (2023) o vigor é intimamente relacionado ao processo de deterioração do lote de sementes, o qual gera diversas alterações morfológicas, fisiológica, metabólicas e genéticas, as quais geram perda de germinação e vigor. Nesse sentido, o procedimento de envelhecimento artificial simulou uma condição de deterioração a qual permitiu que a germinação se manteve superior a 80% e apresentou diferenças mais acentuadas no vigor do lote de sementes (Tabela 25). Dessa forma, o modelo de estudo apresenta-se como aceitável, visto que, segundo Marcos-Filho (2015b) é importante que em estudos sobre o vigor de sementes os lotes tenham germinação semelhante, mas diferenças efetivas no vigor, avaliado por testes fisiológicos.

Considerando o efeito de genótipo observado, o genótipo BAF44 apresentou a menor qualidade fisiológica entre os lotes de alto vigor, apresentando menor porcentagem de primeira contagem de germinação (PCG) em ambas as condições e menor porcentagem de germinação (PN) na condição de estresse por frio, indicando a menor qualidade fisiológica do lote de sementes do genótipo BAF44 quando comparado ao BAF42 e BAF55 (Tabela 25). Esses

resultados eram esperados visto que segundo Ehrhardt-Brocardo e Coelho (2016) e Gindri *et al.* (2016) o genótipo BAF44 apresenta baixo potencial para produção de sementes de qualidade. Dessa forma, o efeito genótipo está associado a menor qualidade fisiológica inicial observada.

A influência do vigor do lote de sementes dos genótipos utilizados se estende para a avaliação do desempenho das plântulas após a submissão pelo teste de frio, em que todos os lotes de sementes caracterizados como de alto vigor, apresentaram melhor desempenho de plântulas (i.e., comprimento e massa seca de plântulas) quando comparados aos lotes envelhecidos artificialmente (Tabela 26).

Tabela 26 – Desempenho de plântulas aos quatro dias após a condição de estresse por frio por sete dias à 5 °C, demonstrando o comprimento de raiz (CR<sub>Frio</sub>), hipocótilo (CH<sub>Frio</sub>), total (CT<sub>Frio</sub>) e massa seca de plântulas (MSP<sub>Frio</sub>) para os lotes dos genótipos BAF55, BAF44 e BAF42 com contraste no vigor

Vigor	CR <sub>Frio</sub>	CH <sub>Frio</sub>	CT <sub>Frio</sub>	MSP <sub>Frio</sub>
	----- mm plântula <sup>-1</sup> -----			mg plântula <sup>-1</sup>
BAF55				
Alto (55L1)	87,42 a	42,02 a	129,64 a	29,79 a
Baixo (55L2)	48,48 b	29,90 b	78,38 b	18,96 b
BAF44				
Alto (44L1)	37,62 a	28,25 a	65,88 a	20,78 a
Baixo (44L2)	27,76 b	27,68 a	55,44 b	17,75 a
BAF42				
Alto (42L1)	71,94 a	37,39 a	109,34 a	22,85 a
Baixo (42L2)	55,34 b	33,03 b	88,37 b	17,96 b
CV	17,29	10,75	14,00	18,65

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p \geq 0,05$ ). Coeficiente de variação (CV). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A resposta do vigor do lote de sementes em relação a formação de plântulas com desempenho superior durante a germinação é explicada pela maior capacidade de mobilização de reservas dos lotes de maior vigor (PADILHA; COELHO; ANDRADE, 2020; ANDRADE; COELHO; PADILHA, 2019), em que, pelo fato das sementes de menor vigor apresentarem maior nível de deterioração, o processo de reparo de membranas, DNA e RNA é retardado, resultando em menor velocidade de germinação e conseqüentemente desempenho das plântulas (MARCOS-FILHO, 2015b). Nesse contexto, é possível afirmar que mesmo após a condição de estresse por frio, essa relação foi verificada, e as sementes de maior vigor apresentaram maior capacidade de mobilizar reservas e formar plântulas com maior massa seca e comprimento (Tabela 26).

Com os resultados fisiológicos obtidos, é possível afirmar que as sementes de maior vigor apresentam maior capacidade de superação do estresse por frio imposto, gerando maior número de plântulas normais (Tabela 25), assim como, plântulas com maior desempenho (Tabela 26).

Para as variáveis catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) e malondialdeído (MDA) avaliados em eixo embrionário na saída do estresse por frio, não foi verificado o efeito de genótipo, sendo verificado apenas efeito de vigor para a enzima CAT (Apêndice H).

O genótipo BAF55 de alto vigor (55L1) apresentou maior atividade de CAT na saída do estresse por frio, indicando uma possível associação entre o nível de vigor de lote de sementes, e a capacidade de superação do estresse por frio (Tabela 27). Para os genótipos BAF44 e BAF42, não foram verificadas diferenças entre a atividade de catalase, independentemente do nível de vigor.

Para o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) os lotes de sementes com maior vigor do genótipo BAF55 e BAF44 apresentaram menor concentração e, para o genótipo BAF42 não foi verificada diferença significativa entre o nível de vigor, indicando influência do genótipo no acúmulo de  $H_2O_2$  durante por estresse por frio (Tabela 27).

A avaliação das plântulas produzidas após a condição de estresse por frio demonstra que as plântulas produzidas por sementes de baixo vigor dos genótipos BAF44 e BAF42 apresentaram maior atividade de CAT e, não houve diferença significativa para os lotes do genótipo BAF55. Para a enzima APX, para todos os genótipos avaliados, o lote de baixo vigor apresentou maior atividade nas plântulas. E para a enzima GPX a maior atividade foi observada em plântulas originadas por sementes de baixo vigor dos lotes de sementes do genótipo BAF55 e BAF42 (Tabela 27).

A maior peroxidação lipídica (MDA) foi observada para as plântulas originadas por sementes de menor vigor de todos os genótipos avaliados e; a maior concentração de  $H_2O_2$  foi observada em plântulas originadas por sementes de menor vigor do genótipo BAF55 (Tabela 27). Esse resultado pode estar associado a maior suscetibilidade de sementes de menor vigor ao serem submetidas a condições de estresse abiótico. Segundo Xing *et al.*, (2023) lotes de sementes deteriorados apresentam maior acúmulo de espécies reativas de oxigênio, as quais resultam em dano em proteínas, lipídeos e material genético, resultando em perda de vigor e conseqüentemente desempenho. Nesse contexto, a maior suscetibilidade das sementes de menor vigor ao estresse resultou em maior peroxidação lipídica após a submissão a condição de estresse por frio (Tabela 27).

Tabela 27 – Catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) e malondialdeído (MDA) avaliados em eixo embrionário após o estresse por frio por 7 dias a 5 °C (Após o Estresse) e aos 4 dias de germinação após o estresse por frio por 7 dias a 5 °C (4d após o estresse) dos genótipos BAF55, BAF44 e BAF42 com contraste no vigor dos lotes utilizados

Vigor	Após o estresse por frio				
	CAT	APX	GPX	MDA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	U mg <sup>-1</sup> proteína			nmol mL <sup>-1</sup>	ug g <sup>-1</sup> FW
	BAF55				
Alto (55L1)	5,08 a	13,92 a	0,60 a	0,83 a	3,55 b
Baixo (55L2)	4,08 b	14,55 a	0,57 a	0,78 a	5,11 a
	BAF44				
Alto (44L1)	4,46 a	12,67 a	0,58 a	0,81 a	4,86 b
Baixo (44L2)	4,05 a	13,32 a	0,59 a	0,80 a	5,90 a
	BAF42				
Alto (42L1)	4,47 a	15,78 a	0,59 a	0,77 a	5,13 a
Baixo (42L2)	3,88 a	13,33 a	0,62 a	0,83 a	4,89 a
CV	12,40	28,40	36,15	6,21	7,69
Lote	4d após o estresse				
	CAT	APX	GPX	MDA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	U mg <sup>-1</sup> proteína			nmol mL <sup>-1</sup>	ug g <sup>-1</sup> FW
	BAF55				
Alto (55L1)	7,37 a	642,12 b	834,58 b	0,94 b	6,96 b
Baixo (55L2)	7,86 a	861,81 a	1012,05 a	1,36 a	9,19 a
	BAF44				
Alto (44L1)	7,89 b	948,67 b	1175,58 a	1,35 b	11,48 a
Baixo (44L2)	9,18 a	1193,42 a	1154,04 a	1,63 a	13,90 a
	BAF42				
Alto (42L1)	7,59 b	709,90 b	938,86 b	1,09 b	8,98 a
Baixo (42L2)	9,81 a	906,96 a	1112,34 a	1,31 a	11,01 a
CV	7,60	12,65	9,48	13,15	17,23

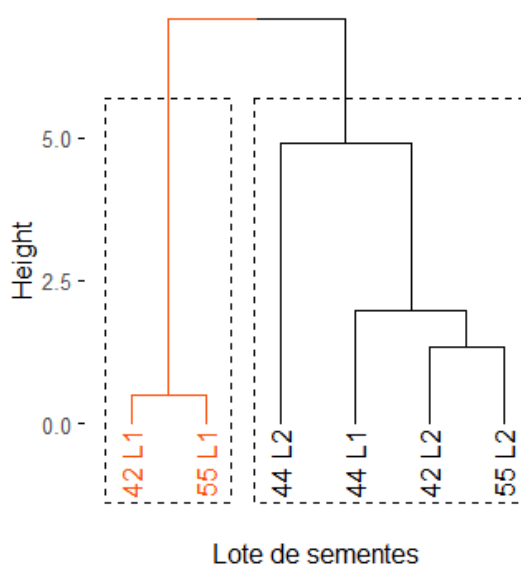
Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p \geq 0,05$ ). Coeficiente de variação (CV). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A maior atividade antioxidante, em geral, observada em plântulas originadas por sementes de menor vigor após a passarem pela condição de frio por 5 °C pode ser o resultado da maior concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na saída do estresse por frio (Tabela 27), em que, foi necessária a maior síntese dessas enzimas para evitar o dano oxidativo após as sementes serem submetidas a temperatura adequada (i.e., 23 ± 2 °C). Segundo Bhat *et al.*, (2022) em condições de estresse por frio o aumento das espécies reativas de oxigênio exige que o metabolismo vegetal sintetize enzimas relacionadas ao sistema antioxidante buscando reestabelecer a homeostase. Dessa forma, as plântulas originadas por sementes de menor vigor, por sofrerem maior dano devido ao acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, necessitaram de maior síntese das enzimas CAT, APX e GPX (Tabela 27) para realizar o controle do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e desempenhar as funções vitais mesmo sobre condições ótimas

(i.e.,  $23 \pm 2$  °C) de temperatura, entretanto, produziram plântulas de menor desempenho (Tabela 26).

Considerando o efeito genótipo observado nos resultados fisiológicos (Tabela 25) o agrupamento dos lotes de sementes foi realizado considerando a qualidade fisiológica do lote, independente do genótipo, com isso, dentre os lotes não envelhecidos, o lote de sementes do genótipo BAF44 (44L1) apresentou baixo vigor e apresenta menor vigor em relação aos lotes dos genótipos BAF55 (55L1) e BAF42 (42L1). Considerando isso, a caracterização da qualidade fisiológica realizada pela análise de agrupamento demonstra dois grupos de vigor, sendo 55L1 e 42L1 caracterizados como de alto vigor e; 42L2, 44L1, 44L2 e 55L2, caracterizados como de baixo vigor (Figura 26).

Figura 26 – Agrupamento dos lotes utilizados considerando os parâmetros fisiológicos demonstrados na Tabela 1

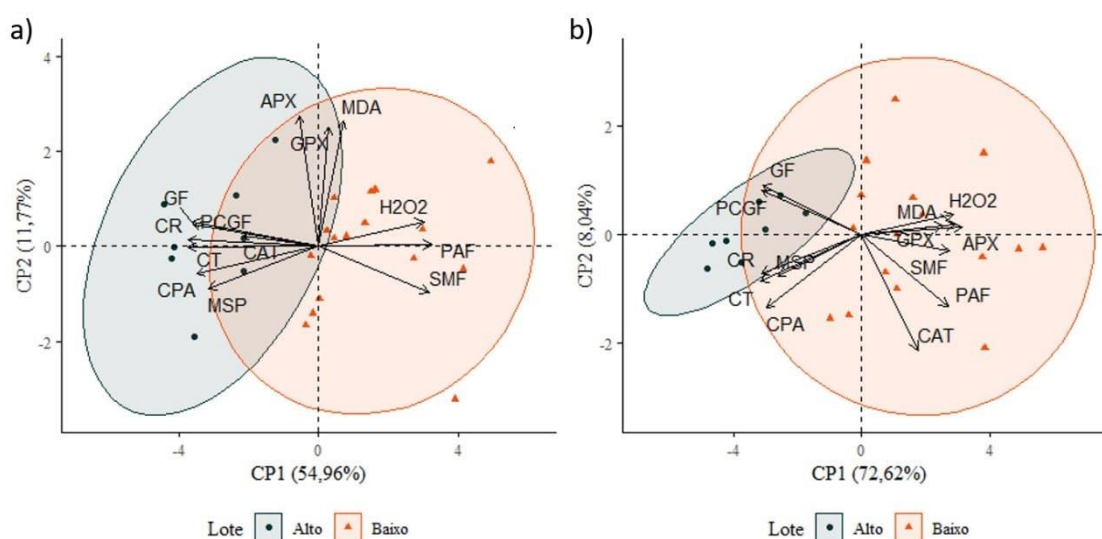


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A análise de componentes principais (ACP) dos grupos de vigor obtidos a partir dos lotes de sementes utilizados, demonstra que os lotes de sementes com maior vigor apresentam associação positiva entre as variáveis, primeira contagem de germinação do teste de frio (PCGF), germinação no frio (GF), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento de raiz (CR), comprimento total (CT) e massa seca de plântulas (MSP) em relação as sementes de menor vigor e; as sementes de maior vigor apresentam menor porcentagem de sementes mortas (SMF),

plântulas anormais formadas (PAF) e menor concentração de  $H_2O_2$  no eixo embrionário das sementes na saída do estresse por frio (Figura 27a).

Figura 27 – Análise de componentes principais demonstrando a associação entre os parâmetros fisiológicos e bioquímicos com os grupos de vigor formados pela análise de agrupamento, considerando as avaliações no eixo embrionário na saída do estresse por frio (a) e em plântulas avaliadas quatro dias após a condição de estresse por frio (b)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Nesse sentido as sementes de menor vigor por apresentarem maior concentração de  $H_2O_2$  em relação as sementes de maior vigor na saída do estresse por frio formaram plântulas com maior quantidade de anomalias, sendo que essas variáveis estão correlacionadas entre si (Figura 27a). Em condições de estresse por frio ocorre o aumento da concentração de  $H_2O_2$  (LONE *et al.*, 2021; FREITAS *et al.*, 2018). O  $H_2O_2$  é uma molécula que pode ser tóxica quando em altas concentrações, sendo que pode resultar em dano em proteínas e material genético, assim como, é precursora do radical hidroxila, o qual resulta em peroxidação lipídica e outros danos celulares (MITTLER, 2017). Nesse sentido, a maior concentração de  $H_2O_2$  observada na saída do estresse resultou em danos que causaram a mortalidade de sementes e anormalidade ao serem submetidas a temperatura de 23 °C (Tabela 25).

As enzimas APX e GPX, não apresentaram associação com o nível de vigor do lote de sementes na saída do estresse por frio, dessa forma, essas enzimas não apresentam relação com o melhor desempenho de sementes e plântulas demonstrado pelas sementes de maior vigor



(Figura 27a). Entretanto, a enzima CAT demonstrou associação positiva com o nível de vigor do lote de sementes, em que os lotes com maior vigor (i.e., 55L1 e 42L1) apresentaram melhor desempenho e menor concentração de peróxido de hidrogênio no eixo embrionário (Figura 27a). As enzimas APX, GPX e CAT possuem como função a degradação do  $H_2O_2$  favorecendo a superação de estresses abióticos, contudo, é dependente das espécies, intensidade de estresse imposto e da estrutura avaliada (VAN DOORN; KETSA, 2014; DREYER; DIETZ, 2018). Dessa forma, durante o período de frio a  $5\text{ }^\circ\text{C}$  a enzima CAT demonstrou-se como a de maior importância para a superação deste estresse.

A análise de componentes principais evidencia a maior necessidade de síntese de enzimas CAT, APX e GPX por plântulas produzidas por sementes de menor vigor durante a germinação, as quais foram negativamente associadas ao maior vigor do lote de sementes (Figura 27b). A maior suscetibilidade das sementes de menor vigor a condição de estresse por frio imposta anteriormente resultou em maior número de plântulas anormais (PAF) e sementes mortas (SMF), assim como, as plântulas normais formadas apresentaram maior peroxidação lipídica (MDA) e  $H_2O_2$  o que gerou a necessidade de síntese das enzimas CAT, APX e GPX para controle de espécies reativas de oxigênio e manter a atividade metabólica e crescimento (Figura 27b). De forma semelhante, Freitas *et al.*, (2018) verificaram aumento do  $H_2O_2$  em condições de estresse por frio e conseqüentemente o aumento da atividade de CAT e GPX. Com isso, essa resposta em sementes de menor vigor é uma forma de alcançar a homeostase vegetal.

O melhor desempenho das plântulas de maior vigor após serem submetidas por estresse por frio é evidenciado na correlação positiva entre o maior vigor e os parâmetros de crescimento (i.e., CR, CH, CT e MST), assim como, na maior germinação (GF) e velocidade de germinação (PCGF) (Figura 27b) e, o sistema antioxidante avaliado não apresentou associação com o crescimento das plântulas de maior vigor após serem submetidas a condição de estresse por frio, indicando menor necessidade de síntese das enzimas para manter a homeostase. A ausência de associação entre o desempenho de plântulas durante a germinação e o sistema antioxidante foi destacado por Sharma *et al.*, (2022) em sementes de trigo. Dessa forma, sugere-se que a menor atividade antioxidante observada em sementes de maior vigor é o resultado do menor dano fisiológico sofrido durante a deterioração e estresse por frio imposto, sendo necessária a menor síntese dessas enzimas para alcançar a homeostase vegetal em relação a sementes de menor vigor.

Nesse sentido, lotes de sementes com menor vigor apresentam maior necessidade de atuação do sistema antioxidante após a condição de estresse imposta e, o melhor desempenho de plântulas e capacidade de superar a condição de estresse por frio pelas sementes de maior

vigor está associada a maior mobilização de reservas (Tabela 26) e atividade da enzima catalase na saída do estresse por frio (Figura 27a), respectivamente.

## 10.5 CONCLUSÃO

A atividade da enzima catalase em eixo embrionário apresenta associação com o maior vigor do lote de sementes em condições de estresse por frio, realizando o controle de peróxido de hidrogênio no eixo embrionário.

Após a condição de estresse por frio as sementes de maior vigor apresentam menor atividade antioxidante (i.e., APX, CAT e GPX) e dano fisiológico (i.e., MDA), e menor necessidade de síntese dessas enzimas para estabelecer a homeostase celular.

## 11 CAPÍTULO 9 – RESPOSTA FISIOLÓGICA E ANTIOXIDANTE DO VIGOR DE SEMENTES DE FEIJÃO DURANTE A GERMINAÇÃO SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE SALINO

### 11.1 RESUMO

O estresse salino é um dos mais presentes nas áreas agricultáveis de regiões tropicais e subtropicais. Esse estresse resulta em perdas na germinação, emergência, desenvolvimento lento e conseqüentemente perda de produtividade. Durante essas condições diversas alterações morfológicas e bioquímicas ocorrem nas plântulas buscando superar essa condição adversa. Nesse sentido o uso de sementes de maior potencial fisiológico pode favorecer a superação desse estresse durante a emergência. Com isso o objetivo do presente estudo foi avaliar como o vigor do lote sementes contribui para a superação do estresse salino, buscando identificar a associação do sistema antioxidante com o vigor do lote de sementes. Foram utilizadas sementes do genótipo BAF55 com dois níveis de vigor. As sementes foram submetidas a germinação em condições de ausência de estresse (0 mmol L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio (NaCl), 75 mmol L<sup>-1</sup> e 150 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl na solução durante a germinação. Aos cinco dias foram avaliadas as alterações morfológicas e desempenho de plântulas, assim como as alterações nas enzimas catalase, ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase, prolina, malondialdeído e peróxido de hidrogênio. Verificou-se aumento da atividade antioxidante com os estresses impostos, com ausência de diferença significativa entre o nível de vigor, exceto na condição de 75 mmol L<sup>-1</sup> no hipocótilo das plântulas e, para prolina na condição de 150 mmol L<sup>-1</sup> em que o baixo vigor apresentou maior concentração. Conclui-se que as plântulas produzidas por sementes de maior vigor não apresentam maior atividade antioxidante em condições de estresse salino, não sendo essa a resposta bioquímica que explica o melhor desempenho das plântulas nessa condição.

### 11.2 INTRODUÇÃO

A cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) apresenta-se como umas das principais espécies de *Phaseolus* a qual é cultivada mundialmente e, apresenta-se como uma determinante fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e antioxidantes para a alimentação humana (NADEEM *et al.*, 2021). Considerando que a cultura é cultivada mundialmente, um dos principais aspectos estudados é a resposta da cultura a estresses abióticos (e.g., estresse hídrico, estresse por calor e estresse salino), sendo o estresse salino presente em diversas regiões

produtoras resultando em perdas de desempenho vegetativo e conseqüentemente produção (NADEEM *et al.*, 2019b; KHATAAR *et al.*, 2018).

O processo de germinação e emergência é um dos pontos mais críticos durante o processo de produção devido as condições de estresse abiótico que podem ocorrer neste momento (MARCOS-FILHO, 2015b). Um dos aspectos determinantes para o sucesso do sistema produtivo é o uso de sementes de maior qualidade fisiológica (i.e., germinação e vigor), favorecendo o estande de plântulas e posterior produtividade (EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019; CAVERZAN *et al.*, 2018). Dentre os aspectos associados ao melhor desempenho de sementes de maior vigor, a mobilização de reservas apresenta-se como um ponto determinante, favorecendo a formação de plântulas com desempenho superior (ANDRADE; COELHO; PADILHA, 2019; CHENG *et al.*, 2018).

Durante a germinação em condições de estresse salino, ocorre a redução da velocidade de germinação, porcentagem de germinação e desempenho das plântulas de feijão (ALSAEEDI *et al.*, 2017), sendo o resultado da restrição osmótica e do acúmulo de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nos tecidos das plantas, resultando em efeito tóxico (ALZAHIRANI *et al.*, 2019). Contudo, mesmo em condições de estresse salino durante a germinação o uso de sementes com maior qualidade fisiológica favorece a superação de condições de estresse salino, a partir da maior germinação, mobilização de reservas e desempenho das plântulas (PADILHA; COELHO; SOMMER, 2022).

Em condições de estresse salino, ocorrem diversas alterações metabólicas que são estratégias do organismo vegetal para realizar a superação ou adaptação ao estresse (NADEEM *et al.*, 2019a). O sistema antioxidante vegetal é composto por enzimas e não-enzimas que favorecem o equilíbrio entre redução e oxidação (redox) durante condições de estresse, buscando manter o crescimento (SOARES *et al.*, 2019). Em condições de estresse abiótico ocorre o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (e.g., peróxido de hidrogênio, radical superóxido, radical hidroxila) as quais resultam em dano em proteínas, lipídeos e material genético (MITTLER, 2017). Para atingir o equilíbrio redox durante as condições de estresse abiótico as plantas sintetizam enzimas (e.g., catalase, peroxidases, superóxido dismutase) e metabólitos (e.g., prolina, açúcares, ácido ascórbico) os quais desempenham uma função antioxidante, neutralizando total ou parcialmente as espécies reativas de oxigênio (SOARES *et al.*, 2019).

A importância do sistema antioxidante durante condições de estresse salino foi verificada por Alzahrani *et al.*, (2019), em que, as plantas de *Vicia faba* L. com maior atividade antioxidante (i.e., catalase, glutathione redutase, superóxido dismutase, prolina) apresentaram

desempenho superior, sendo essa relação associada a tolerância genotípica durante o estresse, mas durante a germinação de sementes de feijão em condições de estresse salino, o maior teor de prolina não foi associado as plântulas produzidas por sementes de maior vigor ou a tolerância genotípica (PADILHA; COELHO; SOMMER, 2022). Resultados semelhantes aos anteriores foram observados para *Vigna radiata* L. (ROHMAN *et al.*, 2019) e feijão (TAÏBI *et al.*, 2021), sendo que os genótipos tolerantes a estresse salino apresentaram maior atividade de catalase e ascorbato peroxidase, mas esses autores não observaram essa associação com o conteúdo de prolina. Os estudos associados a essa temática são, em geral, direcionados a resposta genotípica ao estresse, não sendo destacado a resposta do vigor do lote de sementes em condições de estresse salino ou como o sistema antioxidante é associado ao vigor do lote de sementes nessas condições.

A partir do exposto, sugere-se que lotes de sementes de feijão com maior vigor apresentam maior atividade antioxidante quando comparadas a lotes de sementes de menor vigor, resultando em menor dano fisiológico durante condições de estresse salino e demonstrando, por esse motivo, desempenho superior (i.e., germinação e formação de plântulas). Com isso, o objetivo do presente estudo, foi determinar a resposta fisiológica de sementes de sementes de feijão com contraste no vigor do lote de sementes em condições de estresse salino, para verificar a associação do vigor do lote de sementes com o sistema antioxidante em plântulas durante a germinação.

### 11.3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do experimento foram utilizadas as sementes do genótipo BAF55, o genótipo é originalmente pertencente ao banco ativo de germoplasma de feijão (BAF) do Centro de ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). O genótipo utilizado foi selecionado considerando as suas características agronômicas (ZILIO *et al.*, 2013; MICHELS *et al.*, 2014) e tolerância a estresse hídrico (PADILHA; COELHO; SOMMER, 2022).

O lote de sementes foi produzido na safra 2020/2021 no município de Lages, Santa Catarina, Brasil, na área experimental do CAV-UDESC. Após a colheita o lote de sementes passou pelo processo de limpeza e padronização. O lote obtido foi segregado em dois níveis de vigor utilizando envelhecimento artificial a partir da metodologia de envelhecimento acelerado em solução salina saturada (JIANHUA; McDONALD, 1997). O lote envelhecido foi mantido pelo período de sete dias em câmara de envelhecimento em temperatura de 41 °C. Após cada

período de envelhecimento os lotes foram secos em estufa de circulação de ar até aproximadamente 13% de umidade. Com isso obteve-se dois lotes de sementes do mesmo genótipo, sendo: Lote com alto vigor (AV), o qual não foi envelhecido e; Lote de sementes com baixo vigor (BV), envelhecido por sete dias. Os lotes foram armazenados por 20 dias antes de iniciar os experimentos ( $20 \pm 2$  °C e 60-70% de umidade relativa).

A verificação da qualidade fisiológica, assim como, a resposta fisiológica das sementes a condição de estresse salino foi determinada utilizando solução salina de cloreto de sódio (NaCl) como soluto durante a germinação.

O teste de germinação foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes, em que, essas foram dispostas em papel filtro na forma de rolo de papel os quais foram umedecidos com água destilada (i.e.,  $0 \text{ mmol L}^{-1}$  de NaCl), solução de cloreto de sódio com  $75 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $150 \text{ mmol L}^{-1}$ . Os rolos de papel foram mantidos em germinador na temperatura de  $23 \pm 2$  °C em escuro. A porcentagem de germinação foi determinada avaliando as plântulas normais até os nove dias (i.e., germinação).

A avaliação do desempenho das plântulas foi realizada aos cinco dias após a semeadura, sendo avaliados o comprimento de raiz (CR), hipocótilo (CH) e total (CT). Para determinar o comprimento das plântulas foi utilizado um paquímetro digital, após mensuradas as plântulas e cotilédones foram secas em estufa a 80 °C por 24 h para determinação da massa seca de raiz (MSR), hipocótilo (MSH), total (MST) e massa seca remanescente em cotilédones (MSRC). O teste foi conduzido em rolos de papel conforme descrito no teste de germinação, em que, o procedimento foi realizado conforme descrito por (PEREIRA *et al.*, 2009) utilizando quatro repetições de 20 sementes, sendo consideradas para a mensuração as plântulas normais obtidas. Os resultados foram expressos em centímetros por plântula ( $\text{cm pl}^{-1}$ ) e miligramas por plântula ( $\text{mg pl}^{-1}$ ). Com os dados foram determinadas a redução de reservas da semente (RRS) (SOLTANI; GHOLIPOOR; ZEINALI, 2006), a relação raiz e hipocótilo e; a eficiência de uso de reservas da semente (EURS) (SOLTANI; GHOLIPOOR; ZEINALI, 2006).

A proporção de mobilização de reservas para as raízes (PMRR) e hipocótilo (PMRH) foram determinadas a partir dos dados de MSR, MSH e MST, e expressos em porcentagem. Essas variáveis representam a proporção de massa seca mobilizada para às raízes e hipocótilo em relação a massa seca total de plântulas.

No mesmo período de avaliação fisiológica de desempenho de plântulas (i.e., cinco dias) as plântulas normais obtidas em condições de ausência e presença dos estresses salinos foram coletadas e dissecadas em raiz, hipocótilo e cotilédones, congeladas em nitrogênio líquido e moídas para a realização das análises de malondialdeído (MDA), peróxido de hidrogênio

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX), catalase (CAT) e prolina. Para os cotilédones, o teor de amido e a atividade de alfa-amilase foram também determinados.

O extrato enzimático obtido de cada repetição biológica foi realizado utilizando 200 mg de amostra fresca e macerado em almofariz com 5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,2; contendo 1 mM de EDTA.

A determinação de APX foi realizada conforme descrito por Nakano e Asada (1981), com modificações, em que, o meio de incubação foi realizado utilizando 700 µl de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,2; 100 µL de solução de ácido ascórbico 4 mM e; 100 µL de solução de peróxido de hidrogênio 1 mM, sendo a reação iniciada com a adição de 100 µL de extrato enzimático. A leitura foi realizada em 290 nm, pelo período de 60 s. Uma unidade de ascorbato peroxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para realizar a oxidação de 1 µM de ascorbato por minuto.

Para a quantificação GPX foi realizada utilizando guaiacol como substrato (NAKANO; ASADA, 1981), realizada conforme procedimento de Simões et al. (2015) com alterações. O meio de incubação foi realizado utilizando 700 µl de tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 6,0; 100 µL de guaiacol 40 mM e 100 µl de peróxido de hidrogênio 10 mM e, a reação foi iniciada adicionando 100 µL de extrato enzimático. A leitura foi realizada em 470 nm pelo período de 30 s. Uma unidade de guaiacol peroxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para realizar a formação de 1 µM de tetraguaiacol por min.

Para a quantificação de CAT foi realizada utilizado procedimento proposto por Aebi (1984) com alterações. O meio de incubação foi realizado utilizando 2000 µl de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,2; 800 µL de peróxido de hidrogênio 65 mM e 200 µl de extrato enzimático. A leitura foi realizada em 240 nm pelo período de 120 s. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para realizar a degradação de 1 µM de peróxido de hidrogênio por min.

As enzimas avaliadas foram apresentadas em unidades de enzima por miligrama de proteína (U mg<sup>-1</sup>), sendo essa determinada conforme descrito por Bradford (1976).

O teor de prolina foi determinado conforme descrito por Bates, Waldren e Teare (1973).

O malondialdeído foi determinado conforme procedimento descrito por Hodges *et al.* (1999). Foram utilizados 50 mg de amostra macerada em 1 mL de álcool 80% (v/v) as quais foram maceradas em almofariz e centrifugadas. A quantificação foi realizada utilizando 1 mL de extrato propriamente diluído e 1 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) contendo 0,65% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 0,01% (p/v) hidroxitolueno butilado

(BHT). A reação foi mantida em banho maria a 95 °C por 25 min e as leituras realizadas em 440, 532 e 600 nm, e posteriormente calculadas conforme especificado em Hodges *et al.* (1999).

A determinação do peróxido de hidrogênio foi realizada conforme descrito por Alexieva *et al.* (2001) com modificações. 100 mg de amostra previamente macerada foi homogeneizada em 4 mL de TCA 0,1% (p/v) e posteriormente centrifugado. Para a leitura foram utilizados 0,5 mL de sobrenadante e adicionados 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) 50 mM e adicionado 1 mL de iodeto de potássio (KI). As amostras ficaram em repouso por 30 min no escuro e posteriormente realizada a leitura a 390 nm. O teor de peróxido de hidrogênio foi determinado a partir de uma curva padrão.

O teor de amido das amostras de cotilédones foi determinado conforme descrito por McCready *et al.* (1950). A extração do amido foi realizada utilizando extração dupla com ácido perclórico 52%. A quantificação foi realizada com 1 mL do extrato propriamente diluído e 3 mL de reagente antrona, seguido de agitação em vortex por 3 segundos. Os tubos de ensaio foram mantidos em banho-maria a 95 °C por 450 s. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em absorbância de 630 nm. Com os resultados obtidos a taxa de redução de amido foi determinada conforme Nerling, Coelho e Brummer (2022).

A atividade de alfa-amilase foi realizada utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959) utilizando o procedimento de Monerri e Guardiola (1986) com alterações. Para obtenção do extrato enzimático, 300 mg de amostra foram submetidas a extração com 5 mL de tampão acetato de sódio pH 5,6 com presença de 10 mmol de CaCl<sub>2</sub>. As amostras foram mantidas em agitação por 1 h em presença de gelo e posteriormente centrifugados. O extrato foi submetido a temperatura de 70 °C por 15 minutos. A quantificação foi realizada utilizando-se 0,25 mL do extrato enzimático e 0,25 mL de solução de amido solúvel contendo 2,0% (p/v), as amostras ficaram em banho-maria por 20 min a 38 °C. Após, foram adicionados 0,5 mL de solução DNS e as amostras foram mantidas em banho-maria por 6 min a 95 °C. A reação foi paralisada em banho de gelo e, após resfriar, foram adicionados 4 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com absorbância de 540 nm. Uma unidade de enzima foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a produção de um µmol de maltose por minuto na condição avaliada. Os resultados foram expressos em unidade de enzima por miligrama de proteína (U mg<sup>-1</sup>).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 3, sendo, dois lotes (i.e., AV e BV) e três condições de germinação (i.e., 0, 75 e 150 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl) com quatro repetições. Os dados foram submetidos a teste de normalidade quando necessário e posteriormente realizada a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas



pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o *software* Sisvar (FERREIRA, 2011). Os resultados da análise estatística podem ser observados ao final do documento em caso de necessidade (APÊNDICE I).

#### 11.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os lotes apresentaram diferença significativa em sua qualidade fisiológica ao observar os dados de germinação, em que, as sementes com maior vigor (i.e., não deterioradas artificialmente) apresentaram porcentagem de germinação superior ao lote de sementes de baixo vigor nas condições de presença de estresse salino. Na condição de ausência de estresse, ambos os lotes apresentaram germinação semelhante (Tabela 28). Segundo Marcos-Filho (2015b), lotes de sementes com maior vigor apresentam maior capacidade de superação dos estresses abióticos impostos durante a germinação e emergência. Nesse sentido, o lote de sementes utilizado com maior vigor demonstrou essa maior capacidade de formar plântulas normais nas condições de estresse salino impostas durante a germinação, expressado pelo seu maior potencial fisiológico.

Tabela 28 – Germinação dos lotes de sementes do genótipo BAF55 com alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) submetidos a condições de estresse por cloreto de sódio (NaCl)

Concentração NaCl (mmol L <sup>-1</sup> )	Germinação (%)	
	Alto Vigor	Baixo Vigor
0	88 aA	80 aA
75	85 aA	70 bAB
150	80 aA	65 bB
CV	7,88	

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação (CV). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A diferença na qualidade fisiológica dos lotes de sementes utilizados pode ser observada nos parâmetros de crescimento avaliados aos cinco dias após a semeadura, em que, o lote de sementes com maior vigor apresentou maior capacidade de formação de plântulas com maior comprimento de raiz (CR), parte aérea (CPA) e total (CT), assim como maior massa seca de raiz (MSR), hipocótilo (MSH) e massa seca total (MST) na condição de ausência de estresse salino (Tabela 29).

O melhor desempenho das sementes com maior vigor em condições de estresse salino em 75 e 150 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl foi também observado, principalmente nas variáveis

comprimento de raiz, massa seca de raiz, hipocótilo e total, demonstrando o maior potencial das sementes com vigor superior em superar essas condições (Tabela 29). Padilha, Coelho e Sommer (2022) destacam que as sementes de maior vigor em condições de estresse apresentam maior capacidade de mobilização de reservas, favorecendo assim o crescimento nessas condições de estresse salino. Essa relação entre a mobilização de reservas pode ser observada nos resultados de redução de reservas da semente (RRS), em que, as sementes de maior vigor apresentaram maior redução de reservas o que favoreceu a formação de plântulas com desempenho superior. Segundo Cheng *et al.*, (2018) a maior RRS é um fator determinante para a formação de plântulas com maior massa seca e; no presente estudo, essa relação foi verificada para as sementes de vigor superior em condições de estresse abiótico (Tabela 29).

A resposta das plântulas formadas durante a condição de estresse pode ser verificada pela proporção de mobilização de reservas e pela relação entre a raiz e hipocótilo. Na condição de ausência de estresse a mobilização de reservas das sementes apresentou aproximadamente 80% e 20%, para hipocótilo (PMRH) e raízes (PMRR) respectivamente e, ao serem submetidas às condições de estresse salino, a PMRH foi reduzida de acordo com a intensidade do estresse e, a PMRR aumentou nos estresses. Essa associação demonstra que ocorre alteração da mobilização de reservas nas condições de estresse salino, onde, maior parte da mobilização foi destinada às raízes (Tabela 29). Segundo Kakar *et al.* (2019) o investimento em sistema radicular é uma estratégia para a superação do estresse salino. Considerando que o genótipo é o mesmo, a resposta da proporção de mobilização para as estruturas (i.e., raiz e hipocótilo) foi a mesma, isso indica que não houve influência do vigor na alteração do destino das reservas durante a condição de estresse.

A relação entre raiz e hipocótilo (RH) reduziu nos estresses 75 e 150 mmol L<sup>-1</sup>, indicando que o comprimento do sistema radicular foi mais afetado em termos de comprimento em relação a parte aérea. Nesse contexto, o crescimento em profundidade foi afetado de forma mais severa e, por esse motivo a maior necessidade de mobilização de reservas para a raiz (PMRR) ocorreu, buscando favorecer o desempenho radicular para superar o estresse (Tabela 29).

Tabela 29 – Comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT), massa seca de raiz (MSR), massa seca de hipocótilo (MSH), massa seca total (MST), proporção de mobilização de reservas para raiz (PMRR), hipocótilo (PMRH), relação raiz e hipocótilo (RH), massa seca remanescente em cotilédones (MSRC), redução de reservas da semente (RRS) e eficiência de uso de reservas da semente (EURS) dos lotes de semente com alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) submetidos a condições de estresse por cloreto de sódio (NaCl)

Concentração NaCl (mmol L <sup>-1</sup> )	CR (cm pl <sup>-1</sup> )		CH (cm pl <sup>-1</sup> )		CT (cm pl <sup>-1</sup> )	
	AV	BV	AV	BV	AV	BV
0	14,27 aA	13,06 bA	8,01 aA	6,35 bA	22,28 aA	19,94 bA
75	5,20 aB	4,56 bB	3,42 aB	2,98 bB	8,61 aB	7,56 bB
150	3,04 aC	2,73 bC	1,88 aC	1,07 aC	4,92 aC	4,44 aC
CV	5,33		4,21		3,70	
Concentração NaCl (mmol L <sup>-1</sup> )	MSR (mg pl <sup>-1</sup> )		MSH (mg pl <sup>-1</sup> )		MST (mg pl <sup>-1</sup> )	
	AV	BV	AV	BV	AV	BV
0	10,73 aA	8,21 bA	46,19 aA	34,42 bA	56,93 aA	42,64 bA
75	7,44 aB	7,09 aB	22,28 aB	19,39 bB	29,73 aB	26,48 bB
150	5,02 aC	4,07 bC	11,28 aC	9,81 bC	16,31 aC	13,88 bC
CV	5,97		6,94		5,83	
Concentração NaCl (mmol L <sup>-1</sup> )	PMRR (%)		PMRH (%)		RH	
	AV	BV	AV	BV	AV	BV
0	18,85 aC	19,29 aB	81,15 aA	80,71 aA	1,79 bA	2,06 aA
75	25,03 aB	26,83 aA	74,97 aB	73,17 aB	1,52 aB	1,53 aB
150	30,85 aA	29,41 aA	69,15 aC	70,60 aB	1,61 aB	1,60 aB
CV	6,36		2,12		5,56	
Concentração NaCl (mmol L <sup>-1</sup> )	MSRC (mg semente <sup>-1</sup> )		RRS (mg semente <sup>-1</sup> )		EURS (mg mg <sup>-1</sup> )	
	AV	BV	AV	BV	AV	BV
0	95,78 bC	109,40 aC	75,56 aA	59,16 bA	0,75 aA	0,72 aA
75	128,89 aB	130,44 aB	39,54 aB	33,60 bB	0,75 aA	0,73 aA
150	147,16 aA	149,98 aA	23,28 aC	18,26 bC	0,71 aA	0,77 aA
CV	2,22		6,62		7,62	

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação (CV). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

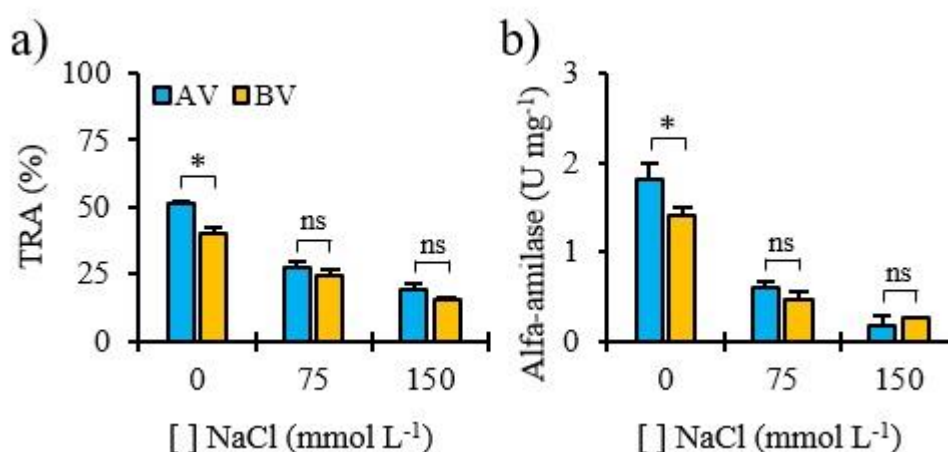
A eficiência de uso de reservas (EURS) não apresentou diferença significativa entre os lotes, assim como, não foi influenciada pela condição de germinação em estresse salino (Tabela 29). Esses resultados indicam que a eficiência não foi determinante para a formação de

plântulas, dessa forma, a redução de reservas (i.e., maior capacidade de hidrólise) é determinante para o melhor desempenho em condições de estresse abiótico.

Com isso, a atividade de alfa-amilase e a degradação de amido, apresentaram diferença significativa na condição controle entre os níveis de vigor e, nas condições de estresse salino não foi observada diferença significativa entre a atividade de alfa-amilase e redução de amido, indicando pouca relação da atividade dessa enzima e a hidrólise do amido nas condições de estresse salino. Contudo, nas condições de estresse foi verificada redução da atividade enzimática (Figura 28a) e da hidrólise de amido (Figura 28b), corroborando com os resultados de RRS (Tabela 29). A ausência de relação entre a atividade de alfa-amilase, a hidrólise de amido e o vigor do lote de sementes em condições de estresse salino foi verificada por Padilha, Coelho, Ehrhardt-Brocardo (2021), sendo esse resultado explicado pelo retardo no processo de germinação e hidrólise. Segundo Bewley *et al.*, (2013) a hidrólise do amido em dicotiledôneas ocorre inicialmente por outras enzimas como por exemplo, a enzima amido fosforilase e, após o quinto dia de germinação ocorre um aumento acentuado na síntese de alfa-amilase. Essa relação explica a ausência de diferença na atividade de alfa-amilase entre os níveis de vigor na condição de estresse.

Figura 28 – Taxa de redução de amido (TRA) e atividade de alfa-amilase avaliada em cotilédones para os lotes de sementes com alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) do genótipo BAF55 em condições de estresse salino aos cinco dias de germinação.

\*:indica diferença significativa entre os níveis de vigor



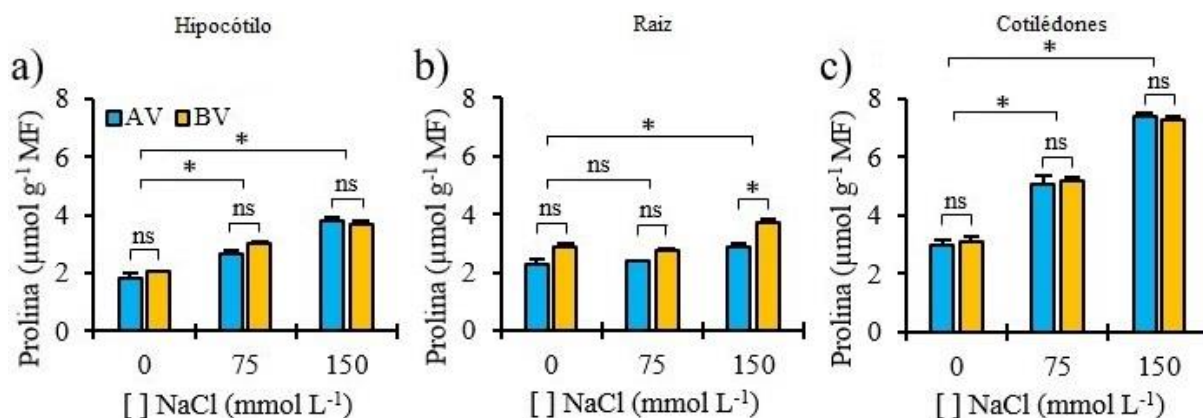
Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

O teor de prolina determinado nas plântulas e cotilédones demonstraram incremento na condição de estresse salino. No hipocótilo (Figura 29a) e cotilédones (Figura 29c) foi crescente

à medida que o estresse aumentou e, para as raízes o aumento foi observado apenas na condição de 150 mmol L<sup>-1</sup> (Figura 29b). Não foi verificada diferença significativa entre os níveis de vigor na condição de 75 mmol L<sup>-1</sup> em nenhuma das estruturas avaliadas. Na condição de 150 mmol L<sup>-1</sup> foi verificada diferença significativa entre os níveis de vigor quando o teor de prolina foi determinado em raízes (Figura 29b).

A prolina é um aminoácido o qual é produzido em condições de estresse abiótico e, em condição de estresse salino a maior concentração de prolina é observada devido a necessidade de regulação osmótica nas células (NADEEM *et al.*, 2019a). A maior concentração de prolina em plântulas originadas por sementes de feijão com baixo vigor foi observada por Padilha, Coelho e Sommer (2022). Os resultados obtidos destacam que as sementes de menor vigor apresentaram maior necessidade de síntese de prolina em raízes para manter a homeostase vegetal, principalmente quando em condições de estresse mais severo (i.e., 150 mmol L<sup>-1</sup>) (Figura 29).

Figura 29 – Concentração de prolina determinado em hipocótilo (a), raiz (b) e cotilédones (c) aos cinco dias de germinação os lotes de sementes com alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) do genótipo BAF55 em condições de estresse salino. \*:indica diferença significativa

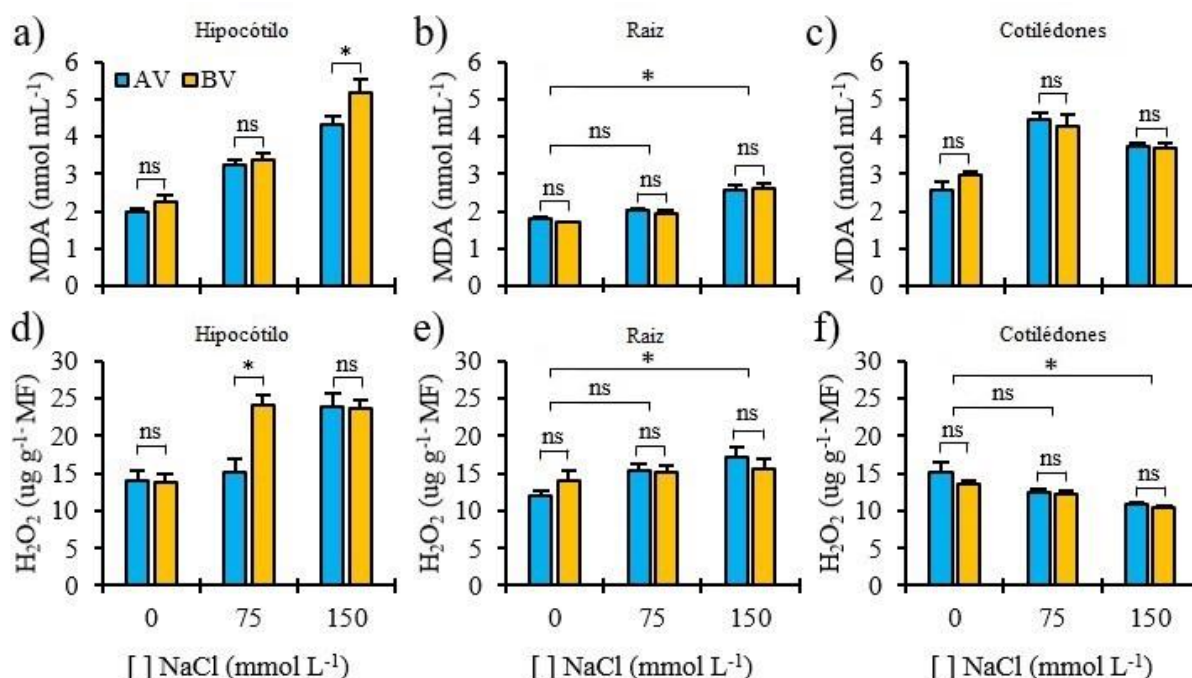


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

O teor de malondialdeído (MDA) aumentou nas condições de estresse utilizadas quando comparado ao controle, sendo essa resposta observada em ambos os lotes de sementes utilizados. A diferença significativa entre os níveis de vigor foi observada na condição de 150 mmol L<sup>-1</sup> no hipocótilo das plântulas (Figura 30a). A peroxidação lipídica (MDA) em raízes (Figura 30b) e cotilédones (Figura 30c) demonstrou incremento, contudo, não foi verificada diferença entre os níveis de vigor.

O teor de MDA pode ser utilizado como um indicador de estresse abiótico determinando o dano em membranas celulares sofrido por um tecido vegetal durante uma condição de estresse abiótico (SOARES *et al.*, 2019). Durante a germinação em condições de estresse salino o aumento do teor de MDA foi verificado em plântulas de algodão (CHEN *et al.*, 2020). Segundo Alzahrani *et al.*, (2019), cultivares de *Vicia faba* L. com maior tolerância a estresse salino, apresentam menor peroxidação lipídica (i.e., MDA) e consequentemente melhor desempenho durante as condições de estresse. Nesse sentido, as plântulas produzidas por sementes de maior vigor na condição de estresse 150 mmol L<sup>-1</sup> apresentaram menor peroxidação lipídica em relação as plântulas produzidas por sementes de baixo vigor, indicando uma maior suscetibilidade das plântulas originadas por sementes de baixo vigor em condições severas de estresse salino.

Figura 30 – Concentração de malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) determinado em hipocótilo (a, d), raiz (b, e) e cotilédones (c, f) aos cinco dias de germinação para os lotes de sementes com alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) do genótipo BAF55 em condições de estresse salino. \*:indica diferença significativa



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

O acúmulo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em hipocótilo aumentou com os níveis de estresse principalmente para o lote de sementes com baixo vigor, em que, na condição de 75

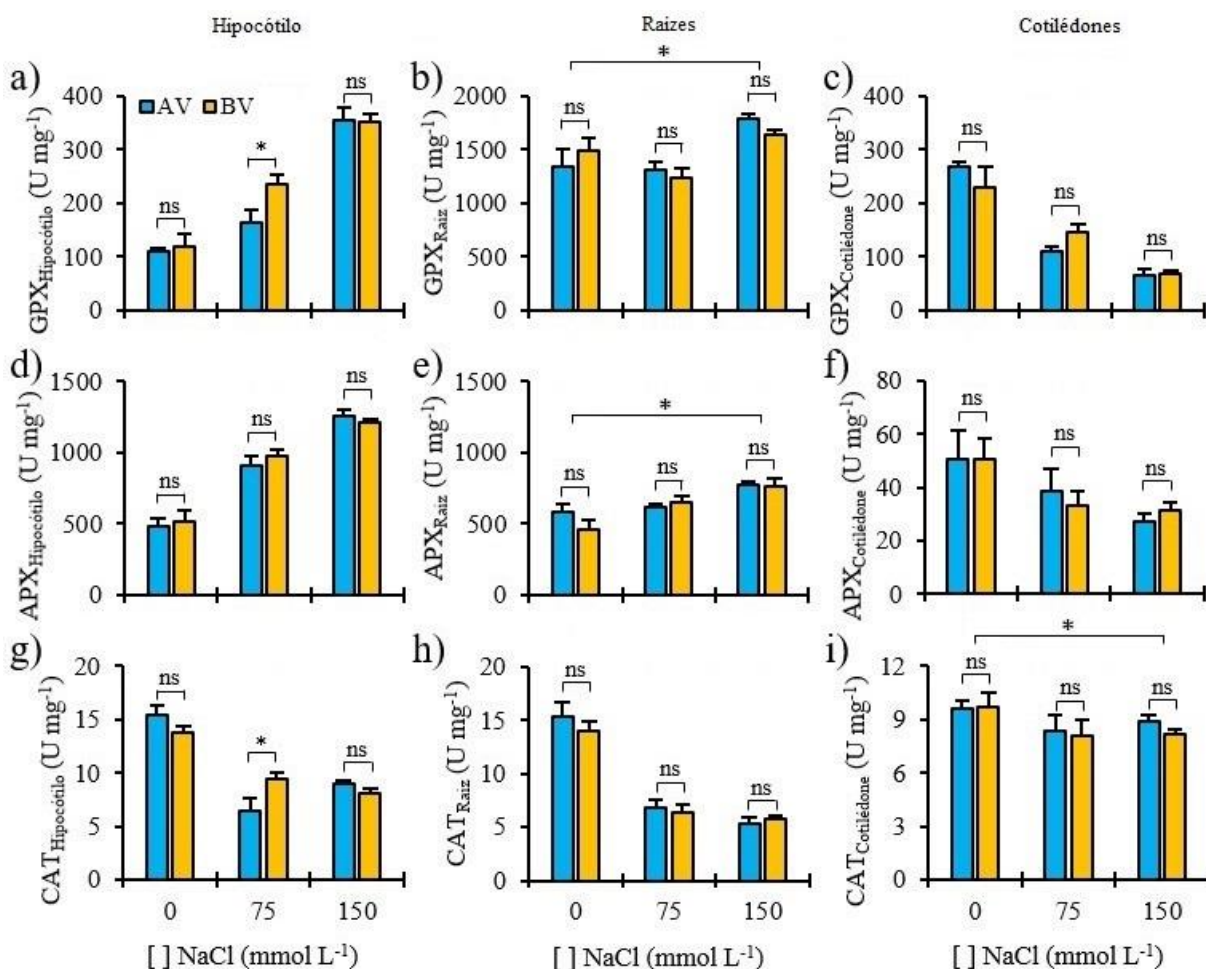
mmol L<sup>-1</sup> as sementes com menor vigor apresentaram maior concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na condição de 150 mmol L<sup>-1</sup> não houve diferença significativa entre os níveis de vigor avaliados (Figura 30d). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> determinado em raízes (Figura 30e) e cotilédones (Figura 30f) não apresentou diferença significativa entre os níveis de vigor.

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é uma molécula sinalizadora envolvida em diversos processos fisiológicos e bioquímicos e, é considerada uma espécie reativa de oxigênio, a qual pode gerar dano oxidativo reagindo com proteínas e DNA (KHAN *et al.*, 2018; MITTLER, 2017). A maior concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi verificada em plântulas durante a germinação de sementes de algodão, sendo o resultado do estresse salino imposto, o que resultou em menor desempenho germinativo (CHEN *et al.*, 2020). Nesse sentido, o aumento do teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plântulas principalmente na condição de 150 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl favoreceu a perda de desempenho fisiológico (Tabela 29). Dessa forma, a maior concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na condição de 75 mmol L<sup>-1</sup> para as plântulas produzidas por sementes de menor vigor, indica maior quantidade dessa molécula para ser metabolizada ou gerar dano fisiológico.

A enzimas guaiacol peroxidase (GPX) e ascorbato peroxidase (APX) apresentaram resposta semelhante quanto ao estresse salino, em que, a sua atividade nas condições de estresse salino em hipocótilo foi superior a condição controle (Figura 31a, Figura 31d). Entretanto, a diferença significativa entre o vigor do lote de sementes foi observada apenas na concentração de 75 mmol L<sup>-1</sup> para a atividade da enzima GPX, em que, as sementes de baixo vigor apresentaram maior atividade. Quando avaliada em raízes, a atividade das enzimas APX e GPX foi superior ao controle apenas na condição de 150 mmol L<sup>-1</sup> e, não foi verificada diferença significativa entre o vigor do lote de sementes em nenhuma condição de germinação (Figura 31b, Figura 31e). Em cotilédones a atividade dessas duas enzimas foi inferior nos estresses utilizados, demonstrando que a resposta ao estresse salino não ocorreu nessa estrutura (Figura 31c, Figura 31f).

A enzima catalase (CAT) demonstrou redução em todas as estruturas avaliadas em ambos os níveis de estresse e vigor (Figura 31g, Figura 31h, Figura 31i). A diferença significativa entre o vigor do lote de sementes foi verificada na atividade da CAT em hipocótilo em 75 mmol L<sup>-1</sup>, a qual foi superior em sementes de baixo vigor.

Figura 31 – Atividade de guaiacol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em hipocótilo (a, d, g), raiz (b, e, h) e cotilédones (c, f, i) aos cinco dias de germinação para os lotes de sementes com alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) do genótipo BAF55 em condições de estresse salino. \*:indica diferença significativa



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A maior atividade de GPX e CAT em 75 mmol L<sup>-1</sup> em hipocótilo (Figura 31a, Figura 31g) para as sementes de baixo vigor está associada a maior concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 30d) visto que, segundo Nadeem *et al.* (2019a) durante condições de estresse salino ocorre a maior necessidade de produção de enzimas associadas ao sistema antioxidante para evitar o dano oxidativo gerado por espécies reativas de oxigênio como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e retornar ao equilíbrio entre oxidação e redução. Com isso, a maior atividade enzimática em 75 mmol L<sup>-1</sup> demonstrada por sementes de baixo vigor é uma resposta para evitar o dano oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e manter as condições vitais em equilíbrio das plântulas originadas por essas sementes.

Na condição de 150 mmol L<sup>-1</sup> não foi verificada diferença significativa entre as enzimas avaliadas e, a maior peroxidação lipídica (MDA) foi verificada para sementes de menor vigor



em hipocótilo (Figura 30a), indicando que, mesmo apresentando atividade enzimática de GPX, APX, CAT (Figura 31a, Figura 31d, Figura 31g) e concentração de prolina (Figura 29a) sem diferença significativa, as plântulas originadas por sementes de menor vigor apresentaram maior suscetibilidade ao estresse de 150 mmol L<sup>-1</sup>. Essa associação indica que outros mecanismos podem estar associados as plântulas originadas por sementes de maior vigor, o qual evitou a peroxidação lipídica nas plântulas. Segundo Alzahrani *et al.*, (2019) o teor de moléculas antioxidantes (i.e., ácido ascórbico) e enzimas (i.e., glutathione redutase e superóxido dismutase) favorecem a condição de superação de um estresse evitando a peroxidação lipídica em estresse salino.

O aumento do nível de estresse salino resulta em maior necessidade síntese de enzimas (e.g., APX) e moléculas (e.g., Prolina) associados ao sistema antioxidante, visto que, aumenta a intensidade do estresse imposto as plântulas (TAÏBI *et al.*, 2021). Nesse contexto, o estresse de 150 mmol L<sup>-1</sup> apresentou maior severidade em sementes de baixo vigor, resultando na maior peroxidação lipídica nas plântulas formadas (Figura 30a) e, resultando em plântulas com menor desempenho (Tabela 29).

Nesse sentido, o melhor desempenho em germinação (Tabela 28) e desempenho de plântulas (Tabela 29) demonstrado pelas sementes com maior vigor não foi relacionado à maior atividade do sistema antioxidante em plântulas aos cinco dias de germinação, sendo que, é possível que outro mecanismo esteja associado ao melhor desempenho. De forma semelhante Sharma *et al.*, (2022), não verificaram associação do sistema antioxidante com o maior crescimento de plântulas ou a germinação de sementes de trigo em condições de alta temperatura. Contudo, durante o processo de deterioração de sementes, diversas alterações bioquímicas ocorrem, as quais resultam em perda de desempenho fisiológico durante a germinação, dentre essas, a peroxidação lipídica e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio são observadas durante a deterioração de sementes (EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019; XING *et al.*, 2023) e, essa relação foi verificada nos lotes de sementes utilizados, sendo observada a maior peroxidação lipídica no eixo embrionário e cotilédones de sementes de baixo vigor após a deterioração. Não foi verificada diferença significativa entre a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas sementes utilizadas (Tabela 30). Dessa forma, sugere-se que a maior peroxidação lipídica inicial favoreceu o aumento das plântulas anormais nas sementes de baixo vigor (Tabela 28) o que gerou a maior sensibilidade ao estresse imposto.

Tabela 30 – Malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) determinados em eixo embrionário e cotilédones dos lotes de sementes de alto e baixo vigor após o envelhecimento artificial

Estrutura	Malondialdeído (MDA) (nmol mL <sup>-1</sup> )			CV
	Alto vigor	Baixo Vigor	<i>p</i> -valor	
Eixo embrionário	4,72	5,90	0,013	8,99
Cotilédones	2,47	2,73	0,021	4,56
Estrutura	Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (ug g <sup>-1</sup> MF)			CV
	Alto vigor	Baixo Vigor	<i>p</i> -valor	
Eixo embrionário	5,74	5,17	0,687	34,76
Cotilédones	5,03	4,63	0,604	21,48

Legenda: CV: Coeficiente de variação. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Nesse sentido, a maior peroxidação lipídica após a condição de estresse em eixo embrionário observada no lote de sementes de baixo vigor, favoreceu a maior suscetibilidade durante a germinação nas condições de estresse salino, sendo: na condição de 75 mmol L<sup>-1</sup> pelo maior acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 30d) atividade de CAT e GPX em hipocótilo (Figura 31a, Figura 31g) e; no estresse por 150 mmol L<sup>-1</sup> pela maior peroxidação lipídica em hipocótilo (Figura 30a) e concentração de prolina em raízes (Figura 29b). Em geral, lotes de sementes com maior nível de deterioração apresentam menor velocidade de reparo de membranas estruturas das sementes durante a embebição, o que, resulta em perda de solutos, germinação lenta e desuniforme; assim como, maior peroxidação lipídica em sementes e danos no material genético (MARCOS-FILHO, 2015b; EBONE, CAVERZAN, CHAVARRIA, 2019). Com isso, os resultados indicam que as sementes de menor vigor quando submetidas a condições de estresse salino apresentam maior necessidade de síntese de enzimas (Figura 31a; Figura 31g) e prolina (Figura 29b) em relação ao lote de alto vigor buscando superar a condição de estresse abiótico.

Os resultados destacam que o melhor desempenho das plântulas observado pelas sementes de maior vigor é parcialmente explicado pela maior capacidade de hidrólise (i.e., RRS) (Tabela 29) mesmo sobre condições de estresse salino, o que favorece o desempenho de plântulas superiores. Contudo, a associação entre outras moléculas e enzimas associadas ao sistema antioxidante durante a germinação podem ajudar a entender a melhor resposta do vigor do lote de sementes quanto a germinação e desempenho de plântulas em condições de estresse abiótico.

## 11.5 CONCLUSÃO

Sementes com maior vigor apresentam melhor desempenho durante a germinação em condições de estresse salino.

As plântulas normais originadas por sementes de maior vigor não apresentam maior atividade das enzimas associadas ao sistema antioxidante em condições de estresse salino.

## 12 CONCLUSÃO

Sementes com maior vigor apresentam menor suscetibilidade as condições de estresse abiótico o que confere maior potencial de crescimento e desenvolvimento durante a germinação.

Os estresses abióticos durante a germinação resultam em perda de desempenho fisiológico independente do vigor do lote de sementes e, as sementes de maior vigor apresentam melhor performance.

A maior eficácia de hidrólise e utilização de reservas apresenta relação positiva com o vigor do lote sementes, sendo determinante para o melhor desempenho de plântulas em condições de estresse abiótico.

A atividade antioxidante avaliada em plântulas normais formadas pelas sementes com níveis de vigor distintos não demonstra relação com o melhor desempenho das plântulas durante a germinação em condições de estresse abiótico, em que, a atividade antioxidante durante a germinação não está relacionada ao maior vigor do lote de sementes durante a germinação.

### 13 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que os lotes de sementes com maior qualidade fisiológica apresentam maior capacidade de superação dos estresses abióticos, formando maior número de plântulas normais, assim como, plântulas com desempenho superior (i.e., comprimento e massa seca). O melhor desempenho observado é o resultado da maior hidrólise e mobilização de reservas, o que favorece o crescimento na condição controle e, em condições de estresse.

Considerando as condições de estresse, independentemente do nível de vigor do lote de sementes ocorre perda de desempenho fisiológico, contudo sementes com vigor superior, apresentam melhor desempenho fisiológico, o que sugere papel essencial da hidrólise dos componentes de reserva para manter o crescimento nas condições de estresse, visto que a resposta antioxidante entre os níveis de vigor foi semelhante.

Nesse sentido, a resposta fisiológica de sementes com contraste no vigor em condições de estresse abiótico deve ser melhor estudada, buscando identificar a resposta de outras espécies vegetais nas condições avaliadas ou semelhantes ao presente estudo, elucidando assim, a resposta do vigor de um lote de sementes a condição de estresses. Nesse contexto, a comparação entre as espécies da família *Fabaceae* e *Poaceae* considerando a estrutura morfológica de sementes dessas espécies a resposta antioxidante enzimática ou não enzimática pode ser divergente e, dessa forma, determinar como lotes de sementes com níveis de vigor distintos respondem a estresse, explicando assim, as diferenças entre a família botânica e o vigor. Essa abordagem de identificar as diferenças metabólicas durante a germinação, contribui para o entendimento da importância do vigor para o estabelecimento do estande de plantas e posterior produtividade. Nesse caso, a resposta do vigor a estresses abióticos após o estabelecimento de pode ser uma alternativa para o entendimento da resposta do vigor a campo.

## REFERÊNCIAS

- ABRASEM. Associação Brasileira de Sementes e Mudanças. **Estatísticas**. Brasília, 2021. Disponível em: <http://www.abrasem.com.br/estatisticas/#>. Acesso em: 01 mar. 2019.
- ADDA, A. *et al.* Effect of salt stress on  $\alpha$ -amylase activity, sugars mobilization and osmotic potential of *Phaseolus vulgaris* L. seeds var. 'Cocorose' and 'Djadida' during germination. **Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 5, p. 370-375, 2014.
- AEBI, H. Catalase in vitro. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1984. p. 121-126.
- AFLAKI, F. *et al.* Investigation of seed germination indices for early selection of salinity tolerant genotypes: A case study in wheat. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 29, n. 3, p. 222-226, 2017.
- ALI, A S.; ELOZEIRI, A. A. Metabolic processes during seed germination. In: JIMENEZ-LOPES José. (Ed.). **Advances in Seed Biology**. Croatia, Intech, 2017. cap. 8 p. 141-166.
- ALI, Kashir *et al.* Chilling stress effects on structure, function and development of different plant processes. **Acta Scientific Agriculture**, v. 6, n. 2, p. 50-58, 2022.
- ALI, Qasim *et al.* Drought tolerance potential of *Vigna mungo* L. lines as deciphered by modulated growth, antioxidant defense, and nutrient acquisition patterns. **Brazilian Journal of Botany**, v. 39, p. 801-812, 2016.
- ALSAEEDI, Abdullah H. *et al.* Engineered silica nanoparticles alleviate the detrimental effects of Na<sup>+</sup> stress on germination and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 21917-21928, 2017.
- ALZHRANI, Saud M. *et al.* Physiological, biochemical, and antioxidant properties of two genotypes of *Vicia faba* grown under salinity stress. **Pakistan Journal of Botany**, v. 51, n. 3, p. 786-798, 2019.
- AL-AMERY, Maythem *et al.* Near-infrared spectroscopy used to predict soybean seed germination and vigour. **Seed Science Research**, v. 28, n. 3, p. 245-252, 2018.
- ALEXIEVA, V. *et al.* The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, 2001.
- ALVAREZ, María E.; SAVOURÉ, Arnould; SZABADOS, László. Proline metabolism as regulatory hub. **Trends in Plant Science**, v. 27, n. 1, p. 39-55, 2022.
- ANDRADE, Gisiane Camargo de; COELHO, Cileide Maria Medeiros; PADILHA, Matheus Santin. Seed reserves reduction rate and reserves mobilization to the seedling explain the vigour of maize seeds. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 4, p. 488-497, 2019.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Vitamins and other nutrients. In: AOAC. **Official methods of analysis**. 16. ed. Vol. II. AOAC International, Arlington, cap. 45, p.58-61, 1995.

AOSA. Association of Official Seed Analysts. Seed Vigor Testing Handbook. AOSA, Ithaca, New York, USA, 1995. 88p.

ARAUJO-NETO, A. C. *et al.* Germinação e crescimento inicial de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. sob estresse salino. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 43, n. 3, p. 283-292, 2020

AREFIAN, Mohammad *et al.* Comparative analysis of the reaction to salinity of different chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes: a biochemical, enzymatic and transcriptional study. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 37, p. 391-402, 2018.

ARTEAGA, Sugenith *et al.* The use of proline in screening for tolerance to drought and salinity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. **Agronomy**, v. 10, n. 6, p. 817, 2020.

ASSEFA, Teshale *et al.* A review of breeding objectives, genomic resources, and marker-assisted methods in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, v. 39, p. 1-23, 2019.

AVCI, Süleyman; İLERI, Onur; DEMIRKAYA, Mehmet. Determination of Genotypic Variation among Sorghum Cultivars for Seed Vigor, Salt and Drought Stresse. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 23, n. 3, p. 335-343, 2017.

AZEVEDO, R. A. de *et al.* 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. **Physiologia Plantarum**, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998.

BAGHEL, Lokesh; KATARIA, Sunita; JAIN, Meeta. Mitigation of adverse effects of salt stress on germination, growth, photosynthetic efficiency and yield in maize (*Zea mays* L.) through magnetopriming. **Acta Agrobotanica**, v. 72, n. 1, 2019.

BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central Brasileira: 2012-2014**. Documentos/Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, 2012. 247 p.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BEEBE, Stephen E. *et al.* Phenotyping common beans for adaptation to drought. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 35, 2013.

BEGUM, Naheeda *et al.* Seed germination behavior, growth, physiology and antioxidant metabolism of four contrasting cultivars under combined drought and salinity in soybean. **Antioxidants**, v. 11, n. 3, p. 498, 2022.

BERNFELD, Peter. Amylase,  $\alpha$  and  $\beta$ . **Methods in enzymology**, v. 1, p. 149-158, 1955.

BEWLEY, J. Derek *et al.* **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. Springer Science & Business Media, 2012. 392p.

BHAT, Kaisar Ahmad *et al.* Low temperature stress tolerance: An insight into the omics approaches for legume crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

BISBIS, M. B.; GRUDA, N.; BLANKE, M. Potential impacts of climate change on vegetable production and product quality—A review. **Journal of Cleaner Production**, v.170, p.1602-1620, 2018.

BLUM, A.; SINMENA, B. Wheat seed endosperm utilization under heat stress and its relation to thermotolerance in the autotrophic plant. **Field Crops Research**, v.37, n.3, p.185-191, 1994.

BOUAJILA, Aida *et al.* Changes in phytase activity, phosphorus and phytate contents during grain germination of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. **Agroforestry Systems**, v. 94, p. 1151-1159, 2020.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009, 395p.

BRASIL. Lei n. 10.711, de 5 de agosto de 2003. Dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças e dá outras providências. Diário Oficial da União, seção 1, n.150, p.1- 4, 2003.

BRASIL, Instrução Normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 20 set. 2013. Seção I, 38p.

BROWN, J. W. S. *et al.* Genetic variation in the subunits of globulin-1 storage protein of French bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 59, p. 83-88, 1981.

BUCKERIDGE, M.S. *et al.* Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

CARVALHO, Kenia *et al.* The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrímelo. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 3269-3279, 2013.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5.ed. FUNEP: Jaboticabal, 2012. 590p.

CASSIA, Raúl *et al.* Climate change and the impact of greenhouse gases: CO<sub>2</sub> and NO<sub>x</sub>, friends and foes of plant oxidative stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 273, 2018.

CASTAN, Danielle Otte Carrara; GOMES-JUNIOR, Francisco Guillien; MARCOS-FILHO, Julio. Vigor-S, a new system for evaluating the physiological potential of maize seeds. **Scientia Agricola**, v. 75, p. 167-172, 2018.



CASTRO, Renato Delmondez de; BRADFORD, Kent J.; HILHORST, Henk WM. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. **Germinação: Do básico ao aplicado** (AG Ferreira & F. Borghetti, eds.). Artmed, Porto Alegre, p. 51-68, 2004.

CAVERZAN, Andréia *et al.* How does seed vigor affect soybean yield components?. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 4, p. 1318-1327, 2018.

CHAUDHARY, Shikha *et al.* Identification and characterization of contrasting genotypes/cultivars for developing heat tolerance in agricultural crops: Current status and prospects. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 587264, 2020.

CHEN, Lin *et al.* Metabolomic analysis of energy regulated germination and sprouting of organic mung bean (*Vigna radiata*) using NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 286, p. 87-97, 2019.

CHEN, Jibao *et al.* Molecular cloning and characterization of a gene encoding the proline transporter protein in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **The Crop Journal**, v. 4, n. 5, p. 384-390, 2016.

CHEN, Li *et al.* Exogenous melatonin promotes seed germination and osmotic regulation under salt stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **PLoS One**, v. 15, n. 1, p. e0228241, 2020.

CHEN, P. S.; TORIBARA, T. Y.; WARNER, Huber. Microdetermination of phosphorus. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 11, p. 1756-1758, 1956.

CHEN, Lei Tai *et al.* Relationships of wheat seed vigor with enzyme activities and gene expression related to seed germination under stress conditions. **Ying Yong Sheng tai xue bao/The Journal of Applied Ecology**, v. 28, n. 2, p. 609-619, 2017.

CHENG, Xinxin *et al.* Dynamic quantitative trait loci analysis of seed reserve utilization during three germination stages in rice. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80002, 2013.

CLEGG, K. M. The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in cereals. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 7, n. 1, p. 40-44, 1956.

CHENG, Xinxin *et al.* Seed reserve utilization and hydrolytic enzyme activities in germinating seeds of sweet corn. **Pakistan Journal of Botany**, v. 50, n. 1, p. 111-116, 2018.

CHENG, Xiaoyan *et al.* A rice lectin receptor-like kinase that is involved in innate immune responses also contributes to seed germination. **The Plant Journal**, v. 76, n. 4, p. 687-698, 2013.

CHENG, Jinping *et al.* Physiological characteristics of seed reserve utilization during the early seedling growth in rice. **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, p. 751-759, 2015.

CHOUDHURY, Feroza K. *et al.* Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 856-867, 2017.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Produção e balanço de oferta e demanda de grãos**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>. Acesso em: 10 mai. 2023.

COPELAND, L.O.; MCDONALD, M.B. Seed vigor and vigor testing. In: COPELAND, L.O. **Principles of Seed Science and Technology**. Springer, Boston, MA, 2001. p.165-191.

CORBINEAU, Françoise. Markers of seed quality: from present to future. **Seed Science Research**, v. 22, n. S1, p. S61-S68, 2012.

COSTA, Giovana Ermetice de Almeida *et al.* Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. **Food Chemistry**, v. 94, n. 3, p. 327-330, 2006.

DANTAS, S. A. G. *et al.* Strategy for selection of soybean genotypes tolerant to drought during germination. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 4-8, 2017.

DARKWA, Kwabena *et al.* Evaluation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes for drought stress adaptation in Ethiopia. **The Crop Journal**, v. 4, n. 5, p. 367-376, 2016.

DELARMELINO-FERRARESI, Leisli M.; VILLELA, Francisco A.; AUMONDE, Tiago Z. Desempenho fisiológico e composição química de sementes de soja. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 1, p. 14-18, 2014.

DELGADO, Carolina Maria Luzia; COELHO, Cileide Maria Medeiros de; BUBA, Gesieli Priscila. Mobilization of reserves and vigor of soybean seeds under desiccation with glufosinate ammonium. **Journal of Seed Science**, v. 37, p. 154-161, 2015.

DE RON, Antonio M. *et al.* History of the common bean crop: its evolution beyond its areas of origin and domestication. **Arbor**, v. 192, n. a317, 2016.

DECROS, Guillaume *et al.* Get the balance right: ROS homeostasis and redox signalling in fruit. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1091, 2019.

DONG, Q. *et al.* Seedling growth, physiological characteristics, nitrogen fixation, and root and nodule phytase and phosphatase activity of a low-phytate soybean line. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 149, p. 225-232, 2020.

DUTTA, T. *et al.* Response of pulses to drought and salinity stress response: a physiological perspective. In: **Pulse Improvement**. Springer, Cham, 2018. p. 77-98.

DREYER, Anna; DIETZ, Karl-Josef. Reactive oxygen species and the redox-regulatory network in cold stress acclimation. **Antioxidants**, v. 7, n. 11, p. 169, 2018.

EBONE, Luciano Antônio; CAVERZAN, Andréia; CHAVARRIA, Geraldo. Physiologic alterations in orthodox seeds due to deterioration processes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 145, p. 34-42, 2019.

EHRHARDT-BROCARDO, Natalia Carolina Moraes; COELHO, Cileide Maria Medeiros. Hydration patterns and physiologic quality of common bean seeds. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 1791-1799, 2016.

EHRHARDT-BROCARDO, Natalia Carolina Moraes et al. Callose accumulation in roots of soybean seedlings under water deficit. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 31, n. 4, p. 475-481, 2019.

EL-MOUKHTARI, Ahmed *et al.* How does proline treatment promote salt stress tolerance during crop plant development?. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 1127, 2020.

EL-MOWAFY, M. R.; KISHK, A. M. S. Effect of Soaking Treatments and Temperature During Germination on Germinability and Rice (*Oryza sativa* L.) Seed Quality. **Journal of Plant Production**, v. 8, n. 4, p. 537-540, 2017.

ERBAŞ, Sabri; TONGUÇ, Muhammet; ŞANLI, Arif. Mobilization of seed reserves during germination and early seedling growth of two sunflower cultivars. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 89, 2016.

ESSEMINE, Jemaa *et al.* Effect of temperature on root and shoot development in wheat seedlings during early growth stage. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 9, n. 6, p. 375, 2010.

FAO. Food and Agriculture Organization. **FAOSTAT on-line database**. 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat>. Acesso em: 02 abr. 2023.

FAROOQ, Muhammad *et al.* Effects, tolerance mechanisms and management of salt stress in grain legumes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 199-217, 2017.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FINCH-SAVAGE, William E.; BASSEL, George W. Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 567-591, 2016.

FREITAS, Gabriela Moraes *et al.* Cold tolerance response mechanisms revealed through comparative analysis of gene and protein expression in multiple rice genotypes. **PLoS One**, v. 14, n. 6, p. e0218019, 2019.

FRANÇA-NETO, José de Barros *et al.* A. **Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/151223/1/Documentos-380-OL1.pdf>. Acesso em: 13 set. 2019.

FURLAN, Ana Laura *et al.* Proline metabolic dynamics and implications in drought tolerance of peanut plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 151, p. 566-578, 2020.

- GALOTTA, María Florencia *et al.* Subtilase activity and gene expression during germination and seedling growth in barley. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 139, p. 197-206, 2019.
- GARCIA-CAPARROS, Pedro *et al.* Oxidative stress and antioxidant metabolism under adverse environmental conditions: a review. **The Botanical Review**, v. 87, p. 421-466, 2021.
- GEPTS, P.; BLISS, F. A. F1 hybrid weakness in the common bean: Differential geographic origin suggests two gene pools in cultivated bean germplasm. **Journal of Heredity**, v.76, n.6, p.447-450, 1985.
- GEPTS, Paul *et al.* Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. **Economic Botany**, v.40, n.4, p.451-468, 1986.
- GEPTS, Paul. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) beans. **Economic Botany**, v.44, n.3, p.28-38, 1990.
- GEPTS, Paul *et al.* Genomics of Phaseolus Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics. In: DELMER, D. P. **Genomics of tropical crop plants**. P. H. Moore, & R. Ming (Eds.). Springer Science + Business Media, LLC. 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-0-387-71219-2.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2019.
- GIBSON, Rosalind S.; RABOY, Victor; KING, Janet C. Implications of phytate in plant-based foods for iron and zinc bioavailability, setting dietary requirements, and formulating programs and policies. **Nutrition Reviews**, v. 76, n. 11, p. 793-804, 2018.
- GILL, Sarvajeet Singh *et al.* Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 204-212, 2013.
- GINDRI, Diego Medeiros *et al.* Seed quality of common bean accessions under organic and conventional farming systems. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, p. 152-160, 2017.
- GOMMERS, Charlotte M. M.; MONTE, Elena. Seedling establishment: a dimmer switch-regulated process between dark and light signaling. **Plant Physiology**, v. 176, n. 2, p. 1061-1074, 2018.
- GRZYBOWSKI, Camila Ribeiro de Souza *et al.* Efeito do potencial osmótico na interação genótipo e vigor de sementes de milho. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science/Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 12, n. 3, 2019.
- GUZMÁN-ORTIZ, Fabiola Araceli *et al.* Enzyme activity during germination of different cereals: A review. *Food Reviews International*, v. 35, n. 3, p. 177-200, 2019.
- HAMPTON, John G. *et al.* Climate change: seed production and options for adaptation. **Agriculture**, v. 6, n. 3, p. 33, 2016.

- HARSH, A. *et al.* Effect of short-term heat stress on total sugars, proline and some antioxidant enzymes in moth bean (*Vigna aconitifolia*). **Annals of Agricultural Sciences**, v. 61, n. 1, p. 57-64, 2016.
- HEATH, Robert L.; PACKER, Lester. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: II. Role of electron transfer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n. 3, p. 850-857, 1968.
- HENNING, Fernando Augusto *et al.* Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. **Bragantia**, v. 69, p. 727-734, 2010.
- HUANG, M. *et al.* Review of seed quality and safety tests using optical sensing technologies. **Seed Science and Technology**, v. 43, n. 3, p. 337-366, 2015.
- HUI, Qianru *et al.* Gibberellic acid promoting phytic acid degradation in germinating soybean under calcium lactate treatment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 2, p. 644-651, 2018.
- HODGES, D. Mark *et al.* Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, p. 604-611, 1999.
- IGNATENKO, Anna *et al.* Exogenous salicylic acid treatment induces cold tolerance in wheat through promotion of antioxidant enzyme activity and proline accumulation. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, p. 1-10, 2019.
- IBRAHIM, Ehab A. Seed priming to alleviate salinity stress in germinating seeds. **Journal of Plant Physiology**, v. 192, p. 38-46, 2016.
- IMRAN, Qari Muhammad *et al.* Abiotic stress in plants; stress perception to molecular response and role of biotechnological tools in stress resistance. **Agronomy**, v. 11, n. 8, p. 1579, 2021.
- ISTA. International Seed Testing Association. Seed Vigour Testing. International Rules for Seed Testing, Zurich, Switzerland, 2014.
- JIANHUA, Zhang; MCDONALD, M. B. The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. **Seed Science and Technology**, v. 25, p. 123-131, 1997.
- JOVOVIĆ, Mirjana *et al.* Effect of salinity and drought stress on germination and early seedlings growth of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetika-Belgrade*, v. 50, n. 1, p. 285-298, 2018.
- KAKAR, Naqeebullah *et al.* Evaluating rice for salinity using pot-culture provides a systematic tolerance assessment at the seedling stage. **Rice**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2019.
- KALAI, Tawba *et al.* Salicylic acid alleviates the toxicity of cadmium on seedling growth, amylases and phosphatases activity in germinating barley seeds. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 62, n. 6, p. 892-904, 2016.

KAYA, Mehmet Demir *et al.* Efficiency of vigor tests and seed elemental concentrations to estimate field emergence in soybean (*Glycine max*). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 18, n. 5, 2016.

KARMOUS, Inès; EL FERJANI, Ezzedine; CHAOUI, Abdelilah. Copper excess impairs mobilization of storage proteins in bean cotyledons. **Biological Trace Element Research**, v. 144, p. 1251-1259, 2011.

KHAN, T. A.; YUSUF, M.; FARIDUDDIN, Q. Hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism: Signalling and its effect under abiotic stress. **Photosynthetica**, v. 56, n. 4, p. 1237-1248, 2018.

KHAN, Muhammad Wajid; HUSSAIN, Zahoor; FAROOQ, Muhammad. Maintenance of Tissue Water Status, Osmoregulation, and Antioxidant Defence System Improves Heat Tolerance in Okra Genotypes with Contrast Heat Tolerance. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 22, n. 4, p. 4273-4281, 2022.

KRAUS, Trevor E.; MCKERSIE, Bryan D.; FLETCHER, R. Austin. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 570-576, 1995.

KOLASINSKA, Krystyna; SZYRMER, Jerzy; DUL, Stefania. Relationship between laboratory seed quality tests and field emergence of common bean seed. **Crop Science**, v. 40, n. 2, p. 470-475, 2000.

KRZYZANOWSKI, Francisco Carlos, FRANÇA-NETO, José de Barros, GOMES JUNIOR, Francisco Guilhien.; NAKAGAWA, João. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: F. C. KRZYZANOWSKI, R. D. VIEIRA, J. B. FRANÇA-NETO, J. MARCOS-FILHO, (Eds.), **Vigor de sementes: conceitos e testes** (pp. 79-140). Londrina, PR: ABRATES, 2020.

KRZYZANOWSKI, Francisco Carlos; FRANÇA-NETO, José de Barros; HENNING, Ademir Assis. **A alta qualidade da semente de soja: fator importante para a produção da cultura**. Circular técnica, v. 136, n. 1, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1091765/a-alta-qualidade-da-semente-de-soja-fator-importante-para-a-producao-da-cultura>>. Acesso em: 12 jan 2020.

LAEMMLI, U. K. Preparation of slab gels for one-or two-dimensional Polyacrylamide sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMBERS, Hans. Phosphorus acquisition and utilization in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 73, p. 17-42, 2022.

LATTA, Mi; ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1313-1315, 1980.

LAXA, Miriam *et al.* The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. **Antioxidants**, v. 8, n. 4, p. 94, 2019.

LI, Junpeng *et al.* Exogenous melatonin improves seed germination in *Limonium bicolor* under salt stress. **Plant Signaling & Behavior**, v. 14, n. 11, p. 1659705, 2019.

LIANG, Wenji *et al.* Plant salt-tolerance mechanism: A review. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, n. 1, p. 286-291, 2018.

LIU, Yang *et al.* Physiological responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) germination to elevated ammonium concentrations: reserve mobilization, sugar utilization, and antioxidant metabolism. **Plant Growth Regulation**, v. 81, p. 209-220, 2017.

LIU, Li *et al.* Salinity inhibits rice seed germination by reducing  $\alpha$ -amylase activity via decreased bioactive gibberellin content. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 275, 2018.

LONE, Ajaz A. *et al.* Common beans and abiotic stress challenges. **Current Journal of Applied Science and Technology**, v. 40, n. 15, p. 41-53, 2021.

LOS, Francine Gomes Basso *et al.* Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 63-71, 2018.

MCCREADY, R. M. *et al.* Determination of starch and amylose in vegetables. **Analytical Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 1156-1158, 1950.

MCDONALD, M.B. The history of seed vigor testing. **Journal of Seed Technology** v.17, p.93-101, 1993.

MAIA, Josemir Moura *et al.* Seca e salinidade na resposta antioxidativa de raízes de feijão caupi. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 11, n. 1, p. 59-93, 2015.

MAITY, Aniruddha *et al.* Climate change impacts on seed production and quality: current knowledge, implications, and mitigation strategies. **Seed Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 65-96, 2023.

MARCHI, José Luís de; CICERO, Silvio Moure; GOMES JUNIOR, Francisco Guilhien. Utilização da análise computadorizada de plântulas na avaliação do potencial fisiológico de sementes de amendoim tratadas com fungicida e inseticida. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, p. 652-662, 2011.

MARCOS-FILHO, Julio. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola**, v. 72, p. 363-374, 2015b.

MARCOS-FILHO, Julio. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, Francisco Carlos *et al.* (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 2

MARCOS-FILHO, Julio. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina, PR: ABRATES, 2015a. p. 660.

MARTINS, Andréa Bicca Noguez *et al.* Analysis of seed quality: a nonstop evolving activity. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 49, p. 3549-3554, 2014.

MATTHEWS, Stan et al. Evaluation of seed quality: from physiology to international standardization. **Seed Science Research**, v. 22, n. S1, p. S69-S73, 2012.

MAVI, K.; DEMIR, I.; MATTHEWS, S. Mean germination time estimates the relative emergence of seed lots of three cucurbit crops under stress conditions. **Seed Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 14-25, 2010.

MELO, Rita Carolina de *et al.* Genetic variation in the trait root distribution over segregating generations of common bean. **Euphytica**, v. 207, n. 3, p. 665-674, 2016.

MENG, Aiju; WEN, Daxing; ZHANG, Chunqing. Dynamic Changes in Seed Germination under Low-Temperature Stress in Maize. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, p. 5495, 2022.

MENTEN, J.O.M.; MORAES, M.H.D.; NOVENBRE, A.D.L.C.; ITO, M.A. **Qualidade das sementes de feijão no Brasil**. 2006. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2006\\_2/SementesFeijao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/SementesFeijao/index.htm)>. Acesso em: 05 set. 2021.

MAMBRIN, Riteli Baptista *et al.* Seleção de linhagens de feijão com base no padrão e na qualidade de sementes. **Revista Caatinga**, v. 28, p. 147-156, 2015.

MICHELS, Adelina Ferreira *et al.* Qualidade fisiológica de sementes de feijão crioulo produzidas no oeste e planalto catarinense. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p. 620-632, 2014.

MITTLER, Ron. ROS are good. *Trends in plant science*, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MONDO, Vitor Henrique Vaz; NASCENTE, Adriano Stephan; CARDOSO NETO, Manoel Oliveira. Common bean seed vigor affecting crop grain yield. **Journal of Seed Science**, v. 38, p. 365-370, 2016.

MONERRI, C.; GUARDIOLA, J. L. Estudio electroforético de las amilasas del guisante. **Revista Agroquímica y de Tecnología de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 424-434, 1986.

MONTOYA, Carlos A. *et al.* Susceptibility of phaseolin to in vitro proteolysis is highly variable across common bean varieties (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 2183-2191, 2008.

MONTZKA, S.A.; DLUGOKENCKY, E.J.; BUTLER, J.H. Non-CO<sub>2</sub> greenhouse gases and climate change. **Nature**, v.476, n.7358, p.43, 2011.

MOROSAN, Mihaela *et al.* Comparative analysis of drought responses in *Phaseolus vulgaris* (common bean) and *P. coccineus* (runner bean) cultivars. **The EuroBiotech Journal**, v. 1, n. 3, p. 247-252, 2017.



MUKANKUSI, Clare *et al.* Genomics, genetics and breeding of common bean in Africa: A review of tropical legume project. **Plant Breeding**, v. 138, n. 4, p. 401-414, 2019.

MUNAWEERA, T. I. K. *et al.* Modern plant biotechnology as a strategy in addressing climate change and attaining food security. **Agriculture & Food Security**, v. 11, n. 1, p. 1-28, 2022.

NADARAJAH, Kalaivani K. ROS homeostasis in abiotic stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5208, 2020.

NADEEM, Muhammad Azhar *et al.* Common bean as a potential crop for future food security: an overview of past, current and future contributions in genomics, transcriptomics, transgenics and proteomics. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 35, n. 1, p. 759-787, 2021.

NADEEM, Muhammad *et al.* Grain legumes and fear of salt stress: Focus on mechanisms and management strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 799, 2019a.

NADEEM, Muhammad *et al.* Research progress and perspective on drought stress in legumes: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2541, 2019b.

NAGUIB, Deyala Mohamed; ABDALLA, Hanan. Metabolic status during germination of nano silica primed Zea mays seeds under salinity stress. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 22, p. 415-423, 2019.

NAKAGAWA, João. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, Francisco Carlos.; VIEIRA, Roberval Dalton.; FRANÇA NETO, José de Barros (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 2, p. 1-24.

NAKANO, Yoshiyuki; ASADA, Kozi. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NERLING, Daniele; COELHO, Cileide Maria Medeiros; BRÜMMER, Adriele. Biochemical profiling and its role in physiological quality of maize seeds. **Journal of Seed Science**, v. 40, p. 07-15, 2018.

NIE, Lixiao *et al.* Enhancement in rice seed germination via improved respiratory metabolism under chilling stress. **Food and Energy Security**, v. 9, n. 4, p. e234, 2020.

NONOGAKI, Hiro. Seed germination and reserve mobilization, in: Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 2008. Disponível em: doi:10.1002/9780470015902.a0002047.pub2. Acesso em: 03 maio 2019.

OLIVEIRA, Gustavo Evangelista *et al.* Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, p. 40-48, 2013.

OU, Keqin *et al.* Phytase activity in brown rice during steeping and sprouting. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 598-603, 2011.

PADILHA, Matheus Santin; COELHO, Cileide Maria Medeiros; ANDRADE, Gisiane Camargo de. Seed reserve mobilization evaluation for selection of high-vigor common bean cultivars. **Revista Caatinga**, v. 433, n. 4, p. 927-935, 2020.

PADILHA, Matheus Santin; COELHO, Cileide Maria Medeiros; EHRHARDT-BROCARD, Natalia Carolina Moraes. Vigor and alpha-amylase activity in common bean seeds under salt stress conditions. **Semina: Ciências Agrárias**, p. 3633-3650, 2021.

PADILHA, Matheus Santin; COELHO, Cileide Maria Medeiros; SOMMER, Ânderson Scalvi. Seed vigor, genotype and proline in common bean seedling formation under drought and saline stress. **Revista Ciência Agronômica**, v. 53, 2022.

PANTOLA, Suman; BARGALI, K. Vibhuti; BARGALI, Surendra S. Screening of three leguminous crops for drought stress tolerance at germination and seedling growth stage. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 87, n. 4, p. 467-472, 2017.

PEREIRA, Welison Andrade *et al.* Influência da disposição, número e tamanho das sementes no teste de comprimento de plântulas de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, p. 113-121, 2009.

PEREIRA, Tamara *et al.* Diversity in common bean landraces from south Brazil. **Acta Botanica Croatica**, v. 68, n. 1., p. 79-92, 2009.

PEREIRA, Tamara. *et al.* Diversidade no teor de nutrientes em grãos de feijão crioulo no Estado de Santa Catarina. **Acta Scientiarum Agronomy**. v.33, n.3, p. 477-485, 2011.

PESKE, Silmar Teichert; VILLELA, Francisco Amaral; MENEGHELLO, Geri E. **Sementes: Fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas: Becker e Peske, 2019. 579 p.

PER, Tasir S. *et al.* Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 115, p. 126-140, 2017.

PEREIRA, Welison Andrade; PEREIRA, Sara Maria Andrade; DIAS, Denise Cunha Fernandes dos Santos. Dynamics of reserves of soybean seeds during the development of seedlings of different commercial cultivars. **Journal of Seed Science**, v. 37, p. 63-69, 2015.

PINHEIRO, Daniel Teixeira *et al.* Weathering deterioration in pre-harvest of soybean seeds: physiological, physical, and morpho-anatomical changes. **Scientia Agricola**, v. 78, 2021.  
 PRAZERES, Camila Segalla; COELHO, Cileide Maria Medeiros. Hydration curve and physiological quality of maize seeds subjected to water deficit. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 1179-1186, 2017.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. AGIPLAN. Brasília, 289p. 1985.

PUTHUR, Jos T. Antioxidants and cellular antioxidation mechanism in plants. **South Indian Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 9-13, 2016.

PUNIA, Himani *et al.* Discerning morpho-physiological and quality traits contributing to salinity tolerance acquisition in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **South African Journal of Botany**, v. 140, p. 409-418, 2021.

R CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2022.

RAZA, Ali *et al.* Can omics deliver temperature resilient ready-to-grow crops?. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 8, p. 1209-1232, 2021.

RAMPIM, Leandro *et al.* Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja comercial e salva. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 4, p. 476-486, 2016.

RABOY, Victor. Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. **Plant Science**, v. 177, n. 4, p. 281-296, 2009.

REJEB, Kilani Ben; ABDELLY, Chedly; SAVOURÉ, Arnould. How reactive oxygen species and proline face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 278-284, 2014.

REN, Yongbing *et al.* DFR1-mediated inhibition of proline degradation pathway regulates drought and freezing tolerance in Arabidopsis. **Cell Reports**, v. 23, n. 13, p. 3960-3974, 2018.

ROCHA, Cartiane Rubshirley Macêdo da; SILVA, Vanessa Neumann; CICERO, Silvio Moure. Avaliação do vigor de sementes de girassol por meio de análise de imagens de plântulas. **Ciência Rural**, v. 45, p. 970-976, 2015.

ROHMAN, M. M. *et al.* Evaluation of salt tolerant mungbean (*Vigna radiata* L.) Genotypes on growth through bio-molecular approaches. **Bangladesh Journal of Agricultural Research**, v. 44, n. 3, p. 469-492, 2019.

SAGLAM, A. *et al.* The relations between antioxidant enzymes and chlorophyll fluorescence parameters in common bean cultivars differing in sensitivity to drought stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 58, p. 60-68, 2011.

SAKO, Y. *et al.* A system for automated seed vigour assessment. **Seed Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 625-636, 2001.

SANGHERA, Gulzar S. *et al.* Engineering cold stress tolerance in crop plants. **Current Genomics**, v. 12, n. 1, p. 30, 2011.

SANTOS, Candice Mello Romero; MENEZES, Nilson Lemos de; VILLELA, Francisco Amaral. Teste de deterioração controlada para avaliação do vigor de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, p. 28-35, 2003.

SARKER, Umakanta; OBA, Shinya. Catalase, superoxide dismutase and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of *Amaranthus tricolor*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16496, 2018.

- SBRUSSI, Cesar Augusto Gasparetto et al. Germination of corn seeds with different levels of vigor in response to different temperatures. **Semina: Ciências Agrárias** (Londrina), v. 35, n. 1, p. 215-226, 2014.
- SCAPPA-NETO, Angelo *et al.* Efeito do teor inicial de água de sementes de feijão e da câmara no teste de envelhecimento acelerado. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 747-751, 2001.
- SHAIBU, A. S. *et al.* Genetic variability and heritability of seedling vigor in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in sudan savanna. **International Journal of Agricultural Policy and Research**, v. 4, n. 4, p. 62-66, 2016.
- SHAIK, Shahnoor S. *et al.* Starch bioengineering affects cereal grain germination and seedling establishment. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 9, p. 2257-2270, 2014.
- SHARAFI, Saed. Germination, seed reserve utilization and seedling growth rate of five crop species as affected by salinity and drought stress. **Life Science Journal**, v. 1, n. 9, p.94-101, 2012.
- SHARMA, Sushma *et al.* Impact of High Temperature on Germination, Seedling Growth and Enzymatic Activity of Wheat. **Agriculture**, v. 12, n. 9, p. 1500, 2022.
- SIGEF. Sistema de Gestão da Fiscalização. **Indicadores**. Controle da Produção de Sementes e Mudanças. Disponível em: <<http://indicadores.agricultura.gov.br/sigefsementes/index.htm>>. Acesso em: 25 jun. 2018.
- SINDHU, Swati *et al.* Mitigation of abiotic stress in legume-nodulating rhizobia for sustainable crop production. **Agricultural Research**, v. 9, p. 444-459, 2020.
- SIMÕES, Adriano do Nascimento *et al.* The effects of storage temperature on the quality and phenolic metabolism of whole and minimally processed kale leaves. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 37, p. 101-107, 2015.
- SILVA, Rosemeire Carvalho da; GRZYBOWSKI, Camila Ribeiro de Souza; PANOBIANCO, Maristela. Vigor de sementes de milho: influência no desenvolvimento de plântulas em condições de estresse salino. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, p. 491-499, 2016.
- SILVA, K. F. O. *et al.* Darkness and low-light alter reserve mobilization during the initial growth of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 33, n. 1, p.
- SILVA, Laércio Junio da; MEDEIROS, André Dantas de; OLIVEIRA, Ariadne Morbeck Santos. SeedCalc, a new automated R software tool for germination and seedling length data processing. **Journal of Seed Science**, v. 41, p. 250-257, 2019.
- SNIDER, John L. *et al.* The impact of seed size and chemical composition on seedling vigor, yield, and fiber quality of cotton in five production environments. **Field Crops Research**, v. 193, p. 186-195, 2016.

SOARES, Cristiano *et al.* Plants facing oxidative challenges—A little help from the antioxidant networks. **Environmental and Experimental Botany**, v. 161, p. 4-25, 2019.

SOLTANI, A.; GHOLIPOOR, M.; ZEINALI, E. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 55, n. 1-2, p. 195-200, 2006.

SRIVASTAVA, Vandana; SONI, Anish; SONAM, Kumari. Analysis on effect of cold stress in bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). **American Journal of BioScience**, v. 3, n. 4, p. 145-166, 2015.

STRUKER, Steven *et al.* Influence of seeds vigor in the attributes of soybean yield. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 3, p. 698-703, 2019.

SUN, Zhuotao; HENSON, Cynthia A. A quantitative assessment of the importance of barley seed  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, debranching enzyme, and  $\alpha$ -glucosidase in starch degradation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 284, n. 2, p. 298-305, 1991.

TAÏBI, Khaled *et al.* Salt-tolerance of *Phaseolus vulgaris* L. is a function of the potentiation extent of antioxidant enzymes and the expression profiles of polyamine encoding genes. **South African Journal of Botany**, v. 140, p. 114-122, 2021.

TAIZ, Lincoln *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6 ed. Artmed Editora, p. 8758, 2017.

TAN-WILSON, Anna L.; WILSON, Karl A. Mobilization of seed protein reserves. **Physiologia Plantarum**, v. 145, n. 1, p. 140-153, 2012.

TAYADE, Rupesh *et al.* Insight into the prospects for the improvement of seed starch in legume—a review. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1213, 2019.

THALMANN, Matthias; SANTELIA, Diana. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. **New Phytologist**, v. 214, n. 3, p. 943-951, 2017.

TEDESCO, M. J.; VOLKWEISS, S. J.; BOHNEN, H. Análises de solo, plantas e outros materiais. 1 ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.

TEKRONY, D.M. Seed vigor testing - 1982. **Journal of Seed Technology**, v. 8, n. 1, p. 55-60, 1983.

UL-HASSAN, Mahmood *et al.* Linking plants functioning to adaptive responses under heat stress conditions: a mechanistic review. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-18, 2021.

VAN DOORN, Wouter G.; KETSA, Saichol. Cross reactivity between ascorbate peroxidase and phenol (guaiacol) peroxidase. **Postharvest Biology and Technology**, v. 95, p. 64-69, 2014.

VAN DER HOORN, R. A. L. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.191-223, 2008.

- VARGAS, Yulieth *et al.* Physiological and genetic characterization of heat stress effects in a common bean RIL population. **PLoS One**, v. 16, n. 4, p. e0249859, 2021.
- VILLELA, Francisco Amaral; DONI FILHO, Luiz; SEQUEIRA, Eliseo Leclerc. Tabela de Potencial Osmótico em Função da Concentração de Polietileno Glicol 6000 e da Temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 6, p. 1957-1968, 1991.
- VERBRUGGEN, Nathalie; HERMANS, Christian. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, p. 753-759, 2008.
- VERMA, Giti *et al.* Reactive oxygen species mediate axis-cotyledon signaling to induce reserve mobilization during germination and seedling establishment in *Vigna radiata*. **Journal of Plant Physiology**, v. 184, p. 79-88, 2015.
- VOIGT, Eduardo Luiz *et al.* Source–sink regulation of cotyledonary reserve mobilization during cashew (*Anacardium occidentale*) seedling establishment under NaCl salinity. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 1, p. 80-89, 2009.
- WANG, L. L. *et al.* Effects of exogenous gibberellic acid and abscisic acid on germination, amylases, and endosperm structure of germinating wheat seeds. **Seed Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 64-76, 2016.
- WANG, Lu; PATRICK, John W.; RUAN, Yong-Ling. Live long and prosper: roles of sugar and sugar polymers in seed vigor. **Molecular Plant**, v. 11, n. 1, p. 1-3, 2018b.
- WANG, Yaliang *et al.* Reduced bioactive gibberellin content in rice seeds under low temperature leads to decreased sugar consumption and low seed germination rates. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 133, p. 1-10, 2018a.
- WANG, Yunxia; FREI, Michael. Stressed food–The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 141, n. 3-4, p. 271-286, 2011.
- WAQAS, Muhammad Ahmed *et al.* Thermal stresses in maize: effects and management strategies. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 293, 2021.
- WEI, Xiaoshuang *et al.* Soybean mutants lacking abundant seed storage proteins are impaired in mobilization of storage reserves and germination. **ACS omega**, v. 5, n. 14, p. 8065-8075, 2020.
- WILCOX, James R. *et al.* Isolation of high seed inorganic P, low-phytate soybean mutants. **Crop Science**, v. 40, n. 6, p. 1601-1605, 2000.
- XING, Muye *et al.* Physiological Alterations and Nondestructive Test Methods of Crop Seed Vigor: A Comprehensive Review. **Agriculture**, v. 13, n. 3, p. 527, 2023.
- YADAV, Shiv Poojan *et al.* Impact of salt stress on growth, productivity and physicochemical properties of plants: A Review. **International Journal of Chemical Studies**, v. 7, n. 2, p. 1793-1798, 2019.

YU, Su-May; LO, Shuen-Fang; HO, Tuan-Hua David. Source–sink communication: regulated by hormone, nutrient, and stress cross-signaling. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 12, p. 844-857, 2015.

ZEID, I. M. *et al.* Promotive effect of ascorbic acid, gallic acid, selenium and nano-selenium on seed germination, seedling growth and some hydrolytic enzymes activity of cowpea (*Vigna unguiculata*) seedling. **Journal of Plant Physiology and Pathology** 7, v. 1, p. 2, 2019.

ZILIO, Marcio *et al.* Cycle, canopy architecture and yield of common bean genotypes (*Phaseolus vulgaris*) in Santa Catarina State. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, p. 21-30, 2013.

ZULFIQAR, Faisal; ASHRAF, Muhammad. Bioregulators: unlocking their potential role in regulation of the plant oxidative defense system. **Plant Molecular Biology**, v. 105, p. 11-41, 2021.

ZHAO, Ming *et al.* Mobilization and role of starch, protein, and fat reserves during seed germination of six wild grassland species. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 234, 2018.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 1

Abaixo são apresentadas as tabelas informando o resumo da análise de variância (Tabela 1) e os valores de correlações das análises de componentes principais (Tabela 2 e 3). Para essa última foram descartadas as correlações menores que 0,25 conforme proposto por Jolliffe (1986), e por esse motivo não discutidos durante o texto.

Tabela A1. Resumo do quadro de análise de variância informando a significância obtida pelo valor de  $p$  para as variáveis analisadas.

FV	GL	G	IV	CT	MSP	MSRC	RRS	TRRS	TMR	MSS	AF	TRA	$\alpha$
Cultivar (F1)	6	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Estresse (F2)	1	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	*
F1 x F2 erro	6	ns	*	**	*	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	*
Total	28												
	41												
C.V.	-	3,29	4,56	4,96	4,76	3,89	7,53	6,88	4,07	2,71	11,52	14,00	11,84
Média Geral		88	628	173,5	49,01	63,88	69,23	36,12	25,59	194,3	50,70	47,81	1,49

FV: Fonte de Variação; GL: Graus de Liberdade; C.V.: Coeficiente de Variação. \*, \*\*, ns: significativo a 1%, 5% e não significativo, respectivamente. Germinação (G); Índice de Vigor (IV); comprimento total (CT); massa seca de plântulas (MSP); massa seca restante em cotilédones (MSRC); redução de reservas da semente (RRS); taxa de redução de reservas da semente (TRRS); taxa de mobilização de reservas (TMR); Amido Final (AF); taxa de redução de amido (TRA) e atividade de alfa amilase ( $\alpha$ ).

Tabela A2. Resultados da correlação entre as variáveis e o componente principal 1 (CP1) e 2 (CP2) da análise de componentes principais na condição sem estresse (Controle).

	Importância dos componentes	
	CP1	CP2
<i>Eigenvalue</i>	2,44	1,63
Proporção da Variância	59,82	26,83
Variância Cumulativa	59,82	86,66
Variáveis	Correlações entre as variáveis e os componentes	
	CP1	CP2
CP	0,93	-0,24
MSP	0,59	-0,76
MSRC	-0,94	-0,24
MSS	-0,26	-0,94
RRS	0,56	-0,79
TRRS	0,94	0,23
TMR	0,95	0,12
IV	0,87	-0,22
Alfa amilase	0,75	0,29
TRA	0,59	0,48

Tabela A3. Resultados da correlação entre as variáveis e os componentes 1 (CP1) e 2 (CP2) da análise de componentes principais na condição com estresse salino (NaCl).

	Importância dos componentes	
	CP1	CP2
<i>Eigenvalue</i>	2,31	1,32



Proporção da Variância	53,73	22,97
Variância Cumulativa	53,73	76,70
Correlações entre as variáveis e os componentes		
	CP1	CP2
CP	0,88	0,24
MSP	0,63	0,70
MSRC	-0,94	0,19
MSS	-0,40	0,87
RRS	0,57	0,69
TRRS	0,94	-0,19
TMR	0,91	-0,21
IV	0,82	-0,05
Alfa amilase	0,54	0,14
TRA	0,30	-0,58

## APÊNDICE B – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 2

**Figura B.** Diferença fisiológica obtida aos três dias de germinação para os genótipos BAF07 (Acima) e BAF55 (Abaixo) evidenciando a diferença no vigor pelo índice de vigor



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

**Tabela B1.** Resumo do quadro de análise de variância informando a segregação fisiológica entre os genótipos para envelhecimento acelerado (EA), comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT), índice de vigor (IV)

	FV	GL	EA	CR	CH	CT	IV
Cultivar	1		*	*	*	*	*
Erro	14						
Total	15						

Legenda: Fonte de variação (FV), Graus de liberdade (GL). \*, \*\*: diferença significativa pelo teste F ( $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ ; respectivamente). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela B2. Resumo do quadro de análise de variância informando a significância entre os fatores cultivar (F1) e estresse (F2) para a variável germinação, prolina e grau de umidade, sendo os dois últimos avaliados aos 8 dias de germinação em cotilédones

FV	GL	Germinação	Prolina	Umidade
Cultivar (F1)	1	*	*	**
Estresse (F2)	1	ns	*	*
F1 x F2	1	ns	ns	**
erro	12			
Total	15			

Legenda: Fonte de variação (FV), Graus de liberdade (GL). \*, \*\*: diferença significativa pelo teste F ( $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ ; respectivamente). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela B3. Resumo do quadro de análise de variância com a significância obtida para as variáveis analisadas em relação ao fator tempo (F1), estresse (F2) e genótipo (F3) obtidas para as variáveis fisiológicas analisadas

FV	GL	MSP	RRS	MSRC	GM
Tempo (F1)	3	*	*	*	*
Estresse (F2)	1	*	*	*	*
Genótipo (F3)	1	*	*	*	*
F1 x F2	3	*	*	*	ns
F1 x F3	3	*	*	*	**
F2 x F3	1	ns	*	*	**
F1 x F2 x F3	3	*	ns	ns	ns
Erro	48				
Total	63				
C.V.%		12,49	10,32	6,12	40,06

Legenda: Fonte de variação (FV), Graus de liberdade (GL). \*, \*\*: diferença significativa pelo teste F ( $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ ; respectivamente). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela B4. Resumo do quadro de análise de variância com a significância obtida para as variáveis Açúcar solúvel total em cotilédones (ASTcot) e eixo (ASTEix), redução de amido e redução de proteína analisadas para o fator tempo (F1), estresse (F2) e cultivar (F3) obtidas para as variáveis fisiológicas analisadas

FV	GL	ASTcot	ASTEix	Redução de amido	Redução de proteína
Tempo (F1)	4	*	*	*	*
Estresse (F2)	1	*	ns	*	*
Cultivar (F3)	1	*	*	*	*
F1 x F2	4	*	*	*	*
F1 x F3	4	ns	*	*	*
F2 x F3	1	ns	ns	**	*
F1 x F2 x F3	4	ns	ns	ns	*
Erro	40				
Total	59				
C.V.%		15,11	11,32	6,95	4,32

Legenda: Fonte de variação (FV), Graus de liberdade (GL). \*, \*\*: diferença significativa pelo teste F ( $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ ; respectivamente). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela B5. Resumo do quadro de análise de variância com a significância obtida para proteína solúvel em cotilédones (PScot) e eixo (PSeix) e atividade de alfa amilase para o fator tempo (F1), estresse (F2) e cultivar (F3) obtidas para as variáveis fisiológicas analisadas

FV	GL	PScot	PSeix	Alfa amilase
Tempo (F1)	4	*	*	*
Estresse (F2)	1	*	*	*
Cultivar (F3)	1	*	*	*
F1 x F2	4	*	*	*
F1 x F3	4	*	ns	*
F2 x F3	1	*	ns	*
F1 x F2 x F3	4	ns	ns	*
Erro	40			
Total	59			
C.V.%		24,31	16,85	69,67

Legenda: Fonte de variação (FV), Graus de liberdade (GL). \*, \*\*: diferença significativa pelo teste F ( $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ ; respectivamente). Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela B6. Massa seca de plântulas (MSP) no tempo

Massa seca de plântulas (mg g <sup>-1</sup> MS)						
Tempo em dias						
Tratamento	0	2	4	6	8	MÉDIA GERAL
BAF07 - C	-	5,63 a	27,19 b	42,72 b	63,68 b	42,04 a
BAF55 - C	-	11,77 a	43,24 a	61,77 a	80,31 a	
Média	-	8,70 D	35,21 C	52,24 B	72,00 A	
PS em Eixo (mg g <sup>-1</sup> MS)						
BAF07 - PEG	-	5,36 a	21,27 a	36,77 b	41,33 b	32,92 b
BAF55 - PEG	-	11,32 a	25,82 a	52,85 a	76,62 a	
Média	-	8,34 D	23,55 C	44,81 B	58,97 A	

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela B7. Massa seca remanescente nos cotilédones (MSRC) no tempo

Massa seca Remanescente em cotilédones (mg semente <sup>-1</sup> )						
Tempo em dias						
Tratamento	0	2	4	6	8	MÉDIA GERAL
BAF07 - C	-	161,63 a	123,29 a	102,44 a	80,20 a	111,66 b
BAF55 - C	-	166,38 a	127,25 a	73,61 b	57,71 b	
Média	-	164 D	125,27 C	88,02 B	68,95 A	
PS em Eixo (mg g <sup>-1</sup> MS)						
BAF07 - PEG	-	156,67 b	142,89 a	113,98 a	91,14 a	126,64 a
BAF55 - PEG	-	173,79 a	153,67 a	104,24 a	76,74 b	
Média	-	165,2 D	148,28 C	109,11 B	83,94 A	

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela B8. Redução de reservas da semente (RRS) no tempo

Massa seca Remanescente em cotilédones (mg semente <sup>-1</sup> )						
Tempo em dias						
Tratamento	0	2	4	6	8	MÉDIA GERAL
BAF07 - C	-	10,87 a	40,71 b	67,19 b	90,60 b	64,75 a
BAF55 - C	-	10,65 a	57,30 a	108,34 a	125,36 a	
Média	-	10,76 D	49,00 C	87,76 B	107,9 A	
PS em Eixo (mg g <sup>-1</sup> MS)						
BAF07 - PEG	-	9,34 b	26,02 a	52,73 a	77,60 b	49,73 b
BAF55 - PEG	-	15,66 a	31,73 a	76,27 b	108,52 a	
Média	-	12,50 D	28,87 C	64,50 B	93,06 A	

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela B9. Gasto metabólico (GM) no tempo

Massa seca Remanescente em cotilédones (mg semente <sup>-1</sup> )						
Tempo em dias						
Tratamento	0	2	4	6	8	MÉDIA GERAL
BAF07 - C	-	5,24 a	13,51 a	24,51 b	26,91 b	22,71 a
BAF55 - C	-	5,88 a	14,05 a	46,54 a	45,04 a	
Média	-	5,56 B	13,68 B	35,52 A	35,98 A	
PS em Eixo (mg g <sup>-1</sup> MS)						
BAF07 - PEG	-	3,98 b	4,73 a	16,46 a	29,39 a	15,55 b
BAF55 - PEG	-	4,29 a	5,90 a	23,41 a	36,27 a	
Média	-	4,13 C	5,32 C	19,94 B	32,83 A	

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela B10. Redução de Amido em porcentagem

Depleção/Redução de Amido (%)					
Tempo em dias					
Tratamento	0	2	4	6	8
BAF07 - C	100,00 aA	93,39 aA	71,90 aB	56,10 aC	42,59 aD
BAF55 - C	100,00 aA	93,79 aB	68,25 aC	38,61 bD	27,06 bE
Média	100,00 A	93,59 B	70,07 C	47,35 D	34,82 E
Depleção/Redução de Amido (%)					
BAF07 - PEG	100,00 aA	90,66 aA	79,21 aB	65,03 aC	49,21 aD
BAF55 - PEG	100,00 aA	97,90 aA	88,84 bB	55,02 bC	38,05 bD
Média	100,00 A	94,28 A	82,02 B	60,03 C	43,63 D
Depleção/Redução de Amido (%)					
BAF07 - C	100,00 a	93,39 a	71,90 a	56,10 b	42,59 a
BAF07 - PEG	100,00 a	90,66 a	79,21 a	65,03 a	49,21 a
Média	100,00 A	92,02 B	75,56 C	60,57 D	45,90 E
Depleção/Redução de Amido (%)					
BAF55 - C	100,00 a	93,79 a	68,25 b	38,61 b	27,06 b
BAF55 - PEG	100,00 a	97,90 a	88,84 a	55,02 a	38,05 a
Média	100,00 A	95,84 A	78,54 B	46,81 C	32,56 D

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela B11. Depleção de proteína em porcentagem

Depleção/Redução de Proteína (%)					
Tempo em dias					
Tratamento	0	2	4	6	8
BAF07 - C	100,00 aA	96,10 aA	72,36 aB	63,88 aC	45,02 aD
BAF55 - C	100,00 aA	88,44 aB	58,61 bC	28,98 bD	19,46 bE
Média	100,00 A	92,27 B	65,48 C	46,43 D	32,24 E
Depleção/Redução de Proteína (%)					
BAF07 - PEG	100,00 aA	95,86 aA	88,41 aB	67,42 aC	58,73 aD
BAF55 - PEG	100,00 aA	88,64 aA	80,73 bB	53,56 bC	33,71 bD
Média	100,00 A	92,25 B	84,57 C	60,49 D	46,22 E
Depleção/Redução de Proteína (%)					
BAF07 - C	100,00 a	96,10 a	72,36 b	63,88 a	45,02 a
BAF07 - PEG	100,00 a	95,86 a	88,41 a	67,42 a	58,73 a
Média	100,00 A	95,98 B	75,56 C	65,65 D	51,75 E
Depleção/Redução de Proteína (%)					
BAF55 - C	100,00 a	88,44 a	58,61 b	28,98 b	19,46 b
BAF55 - PEG	100,00 a	88,64 a	80,73a	53,56 a	33,71 a
Média	100,00 A	88,54 B	69,67 C	41,27 D	26,59 E

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela B12. Açúcares solúveis totais (AST) em cotilédones

AST em Cotilédone (mg g <sup>-1</sup> MS)						
Tempo em dias						
Tratamento	0	2	4	6	8	MÉDIA
BAF07 - C	66,92 a	69,34 a	73,19 a	80,86 a	84,86 b	75,04 b
BAF55 - C	76,79 a	68,03 a	81,35 a	98,72 a	107,18 a	86,00 a
Média	71,85 B	68,69 B	77,27 B	89,79 A	96,02 A	80,52 a
AST em Cotilédone (mg g <sup>-1</sup> MS)						
BAF07 - PEG	66,92 a	73,86 a	62,76 a	60,84 a	73,86 a	66,92 a
BAF55 - PEG	76,79 a	74,71 a	68,91 a	73,89 a	75,87 a	73,62 a
Média	71,85 A	74,29 A	65,84 A	67,36 A	72,99 A	70,26 b

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela B13. Açúcares solúveis totais (AST) em eixo embrionário

AST em Eixo (mg g <sup>-1</sup> MS)						
Tempo em dias						
Tratamento	0	2	4	6	8	MÉDIA
BAF07 - C	173,67 a	148,40 a	187,82 a	182,20 b	213,33 b	181,08 b
BAF55 - C	170,32 a	184,48 a	222,92 a	265,61 a	251,55 a	218,97 a
Média	171,99 B	166,44 B	205,37 A	223,90 A	232,44 A	
AST em Eixo (mg g <sup>-1</sup> MS)						
BAF07 - PEG	173,67 a	128,05 a	210,53 a	216,12 b	220,89 b	189,55 b
BAF55 - PEG	170,32 a	134,32 a	239,74 a	271,17 a	312,01 a	225,51 a
Média	171,99 C	131,19 D	225,13 B	243,65 B	266,45 A	

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela B14. Proteína total em quantificada em plântulas

Proteína total (mg plântula <sup>-1</sup> )					
Tempo em dias					
Tratamento	0	2	4	6	8
BAF07 - C	1,32 aD	2,22 bD	11,20 bC	17,32 bB	26,17 bA
BAF55 - C	1,51 aE	5,05 aD	14,07 aC	20,23 aB	29,06 aA
Média					
Proteína total (mg plântula <sup>-1</sup> )					
BAF07 - PEG	1,32 aD	2,26 bD	8,04 bC	15,94 bB	18,39 bA
BAF55 - PEG	1,51a E	4,63 aD	9,33 aC	19,18 aB	29,40 aA
Média					
Proteína total (mg plântula <sup>-1</sup> )					
BAF07 - C	1,32 a	2,22 a	11,20 a	17,32 a	26,17 a
BAF07 - PEG	1,32 a	2,26 a	8,04 b	15,94 b	18,39 b
Média	1,32 E	2,24 D	9,62 C	16,63 B	22,28 A
Proteína total (mg plântula <sup>-1</sup> )					
BAF55 - C	1,51 a	5,05 a	14,07 a	20,23 a	29,06 a
BAF55 - PEG	1,51a	4,63 a	9,33 b	19,18 b	29,40 a
Média	1,51 E	4,84 D	11,70 C	19,70 B	29,23 A

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela B14. Açúcares solúveis totais quantificados em plântulas

AST em Eixo (mg plântula <sup>-1</sup> )					
Tratamento	0	2	4	6	8
BAF07 - C	0,53 aD	0,83 bD	5,10 bC	7,78 bB	13,58 bA
BAF55 - C	0,60 aE	2,17 aD	9,64 aC	16,40 aB	19,13 aA
Média	0,57 D	1,50 D	7,37 C	12,09 B	16,36 A
AST em Eixo (mg plântula <sup>-1</sup> )					
BAF07 - PEG	0,53 aD	0,68 aD	4,48 bC	7,84 bB	9,13 bA
BAF55 - PEG	0,60 aD	1,52 aD	6,19 aC	14,33 aB	23,91 aA
Média	0,57 D	1,10 D	5,33 C	11,08 B	16,52 A
AST em Eixo (mg plântula <sup>-1</sup> )					
Tratamento	0	2	4	6	8
BAF07 - C	0,53 a	0,83 a	5,10 a	7,78 a	13,58 a
BAF07 - PEG	0,53 a	0,68 a	4,48 a	7,84 a	9,13 b
Média	0,53 D	0,76 D	4,79 C	7,81 B	11,35 A
AST em Eixo (mg plântula <sup>-1</sup> )					
BAF55 - C	0,60 a	2,17 a	9,64 a	16,40 a	19,13 b
BAF55 - PEG	0,60 a	1,52 a	6,19 b	14,33 b	23,91 a
Média	0,60 E	1,84 D	7,91 C	15,37 B	21,52 A

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela B15. Proteína solúvel (PS) em cotilédones

PS em Cotilédone (mg g <sup>-1</sup> MS)					
Tempo em dias					
Tratamento	0	2	4	6	8
BAF07 - C	52,50 aA	55,55 aA	51,76 aA	50,68 aA	38,98 aB
BAF55 - C	47,83 aA	42,79 bA	33,35 bB	32,03 bB	15,84 bC
Média	50,16 A	49,17 A	42,55 B	41,35 B	27,41 C
PS em Cotilédone (mg g <sup>-1</sup> MS)					
BAF07 - PEG	52,50 aB	66,62 aA	71,57 aA	64,86 aA	57,06 aB
BAF55 - PEG	47,83 aB	59,68 aA	48,40 bB	40,70 bC	34,89 bC
Média	50,16 B	63,15 A	59,98 A	52,78 B	45,97 B
PS em Cotilédone (mg g <sup>-1</sup> MS)					
BAF07 - C	52,50 a	55,55 b	51,76 b	50,68 b	38,98 b
BAF07 - PEG	52,50 a	66,62 a	71,57 a	64,86 a	57,06 a
Média	52,50 B	61,06 A	61,66 A	57,77 A	48,02 B
PS em Cotilédone (mg g <sup>-1</sup> MS)					
BAF55 - C	47,83 a	42,79 b	33,35 b	32,03 b	15,84 b
BAF55 - PEG	47,83 a	59,68 a	48,40 a	40,70 a	34,89 a
Média	47,83 A	51,24 A	40,87 B	36,37 C	25,36 D

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela B16. Proteína solúvel (PS) em eixo embrionário

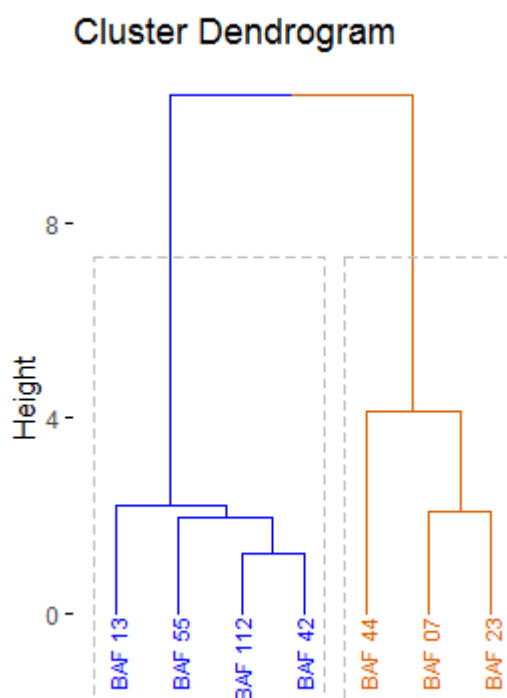
PS em Eixo (mg g <sup>-1</sup> MS)					
Tempo em dias					
Tratamento	0	2	4	6	8
BAF07 - C	93,30 a	72,93 a	37,11 a	34,23 a	35,21 a
BAF55 - C	106,61 a	50,34 b	30,00 a	31,91 a	25,29 a
Média	99,96 A	61,64 B	33,55 C	33,07 C	30,25 C
PS em Eixo (mg g <sup>-1</sup> MS)					
BAF07 - PEG	93,30 a	94,15 a	77,21 a	48,90 a	39,37 a
BAF55 - PEG	106,61 a	86,16 b	53,54 b	34,98 a	29,89 a
Média	99,96 A	90,15 A	65,37 B	41,94 C	34,63 C

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.



### APÊNDICE C – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 3

Figura C. Análise de cluster utilizada como complemento para a segregação dos genótipos utilizados quanto ao vigor. As variáveis utilizadas para realizar essa análise foram a primeira contagem de germinação (PC), germinação (G%), crescimento (G), uniformidade (U), comprimento de raiz aos 3 dias (CR), comprimento de hipocótilo aos 3 dias (CH), comprimento total aos 3 dias (CT)



Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela C1. Resumo do quadro de análise de variância informando em relação as cultivares e as variáveis comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT), crescimento (C), uniformidade (U), índice de vigor (IV), índice de resposta cumulativa ao estresse salino (IRCES) e índice de resposta cumulativa ao estresse hídrico (IRCEH)

FV	CR	CH	CT	C	U	IV	IRCES	IRCEH
Genótipo	6	*	*	*	*	*	*	*
Erro	14							
Total	20							

Legenda: Fonte de variação (FV), Graus de liberdade (GL). \*diferença significativa pelo teste F ( $p \leq 0,01$ ).

Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela C2. Resumo do quadro de análise de variância informando os resultados entre o fator genótipo (F1) e condição de estresse (F2) para as variáveis, primeira contagem de germinação (PCG), Germinação (G), comprimento de raiz (CR), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento total (CT), massa seca de raiz (MSR), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), número de raízes secundárias (NRS), taxa de mobilização de reservas (TMR) e taxa de redução de reservas da semente (TRRS) e teor de prolina

FV	GL	PCG	G	CR	CPA	CT	MSR	MSPA	MST
F1	6	*	*	*	*	*	*	*	*
F2	2	*	*	*	*	*	*	*	*
F1 x F2	12	ns	**	*	**	*	*	*	*
Erro	42								
Total	62								

Legenda: Fonte de variação (FV), Graus de liberdade (GL). \*,\*\*diferença significativa pelo teste F a 1% e 5%, respectivamente. Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela C3. Resumo do quadro de análise de variância informando os resultados entre o fator genótipo (F1) e condição de estresse (F2) para as variáveis, número de raízes secundárias (NRS), taxa de mobilização de reservas (TMR) e taxa de redução de reservas da semente (TRRS) e teor de prolina

FV	GL	NRS	TMR	TRRS	Prolina
F1	6	*	*	*	*
F2	2	*	*	*	*
F1 x F2	12	*	*	*	*
Erro	42				
Total	62				

Legenda: Fonte de variação (FV), Graus de liberdade (GL). \*,\*\*diferença significativa pelo teste F a 1% e 5%, respectivamente. Elaborado pelo autor, 2023.

## APÊNDICE D – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 4

Tabela D1. Resumo do quadro de análise de variância com a significância obtida para as variáveis fisiológicas analisadas em relação ao fator Genótipo (F1), Tempo (F2) e Estresse (F3) obtidas para as variáveis comprimento total (CT), massa seca de plântulas (MSP) e redução de reservas da semente (RRS)

FV	GL	CT	MSP	RRS
Genótipo (F1)	1	*	*	*
Tempo (F2)	3	*	*	*
Estresse (F3)	1	*	*	*
F1 x F2	3	*	*	ns
F1 x F3	1	*	*	ns
F2 x F3	3	*	*	*
F1 x F2 x F3	3	*	*	ns
Erro	32			
Total	47			
C.V.%		8,72	5,79	16,68

Legenda: Fonte de variação (FV), Graus de liberdade (GL). \*:diferença significativa pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ).  
Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela D2. Resumo do quadro de análise de variância com a significância obtida para as variáveis Açúcar solúvel total em cotilédones (ASTcot) e eixo (ASTEix), redução de amido (TRA) e redução de proteína (TRP), proteína solúvel em cotilédones (PScot), proteína solúvel em eixo (PSeix) e alfa-amilase (Amy) analisadas para o fator Genótipo (F1), Tempo (F2) e Estresse (F3) obtidas para as variáveis fisiológicas analisadas

FV	GL	ASTcot	ASTEix	TRA	TRP	PSeix	PScot	Amy
Genótipo (F1)	1	*	ns	*	*	*	*	*
Tempo (F2)	4	*	*	*	*	*	*	*
Estresse (F3)	1	*	ns	*	*	*	*	*
F1 x F2	4	*	*	*	*	ns	ns	*
F1 x F3	1	ns	ns	*	*	ns	ns	*
F2 x F3	4	*	*	*	*	*	*	*
F1 x F2 x F3	4	ns	*	*	*	ns	*	*
Erro	40							
Total	59							
C.V.%		8,62	7,71	7,07	4,64	8,88	5,63	29,69

Legenda: Fonte de variação (FV), Graus de liberdade (GL). \*:diferença significativa pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ).  
Elaborado pelo autor, 2023.

## APÊNDICE E – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 5

Tabela E1. Resumo do quadro de análise de variância informando a segregação fisiológica entre os lotes do genótipo BAF42 para germinação (G), germinação em estresse hídrico (GPEG), envelhecimento acelerado (EA), comprimento total aos 3 dias (CT<sub>3dias</sub>), massa seca de plântulas aos 3 dias (MSP<sub>3dias</sub>) e índice de vigor (IV)

FV	GL	G	GPEG	EA	CT <sub>3dias</sub>	MSP <sub>3dias</sub>	IV
Vigor	2	*	*	*	*	*	*
Erro	21						
Total	23						
CV	-	3,71	5,14	9,03	7,17	15,37	6,46

Legenda: Fonte de variação (FV), Graus de liberdade (GL). \*: diferença significativa pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ).  
Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela E2. Resumo do quadro de análise de variância com a significância obtida para as variáveis fisiológicas analisadas em relação ao fator Genótipo (F1), Tempo (F2) e Estresse (F3) obtidas para as variáveis comprimento total (CT), massa seca de plântulas (MSP) e massa seca remanescente em cotilédones (MSRC)

FV	GL	CT	MSP	MSRC
Tempo (F1)	2	*	*	*
Vigor (F2)	2	*	*	*
Estresse (F3)	1	*	*	*
F1 x F2	4	*	*	ns
F1 x F3	2	*	*	*
F2 x F3	2	*	*	*
F1 x F2 x F3	4	ns	ns	ns
Erro	36			
Total	53			
C.V.%		4,38	5,58	3,91

Legenda: Fonte de variação (FV), Graus de liberdade (GL). \*: diferença significativa pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ).  
Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela E3. Resumo do quadro de análise de variância com a significância obtida para as variáveis fisiológicas analisadas em relação ao fator Genótipo (F1), Tempo (F2) e Estresse (F3) obtidas para as variáveis comprimento total (CT), massa seca de plântulas (MSP) e massa seca remanescente em cotilédones (MSRC)

FV	GL	Pi <sub>cot</sub>	Pi <sub>eix</sub>	Fitase	Fitato
Tempo (F1)	3	*	*	*	*
Vigor (F2)	2	*	*	*	ns
Estresse (F3)	1	*	*	*	*
F1 x F2	6	*	*	*	ns
F1 x F3	3	*	*	*	*
F2 x F3	2	ns	*	*	ns
F1 x F2 x F3	6	ns	ns	*	ns
Erro	48				
Total	71				
		6,52	7,31	84,33	11,50

Legenda: Fonte de variação (FV), Graus de liberdade (GL). \*: diferença significativa pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ).  
Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela E4. Resumo do quadro de análise de variância com a significância obtida para as variáveis fisiológicas analisadas em relação ao fator Vigor (F1) e Estresse (F2) obtidas para as variáveis comprimento total (CT), massa seca de plântulas (MSP) e massa seca remanescente em cotilédones (MSRC)

FV	GL	Prolina
Vigor (F1)	2	*
Estresse (F2)	1	*
F1 x F2	2	ns
Erro	12	
Total	17	
C.V.%		8,78

Legenda: Fonte de variação (FV), Graus de liberdade (GL). \*:diferença significativa pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ).

Elaborado pelo autor, 2023.

## APÊNDICE F – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 6

Tabela F1. Resumo do quadro de análise de variância demonstrando o valor de F-calculado para as variáveis envelhecimento acelerado (EA), comprimento de raiz (CR<sub>3dias</sub>), hipocótilo (CR<sub>3dias</sub>) e total (CT<sub>3dias</sub>) e índice de vigor (IV)

FV	GL	EA	CR <sub>3dias</sub>	CH <sub>3dias</sub>	CT <sub>3dias</sub>	IV <sub>3dias</sub>
Vigor	1	27,24*	21,67*	17,28*	30,34*	23,17*
Erro	14					
Total	15					
CV	-	12,43	8,04	6,26	6,24	5,00

Legenda: \*Indica diferença significativa pelo teste F a 5% de probabilidade. Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela F2. Resumo do quadro de análise de variância demonstrando o valor de F-calculado para as variáveis germinação (G), comprimento total (CT) massa seca de plântulas (MSP), redução de reservas da semente (RRS), alfa-amilase (Amy), eficiência de uso de reservas (EURS), malondialdeído (MDA), Catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX)

FV	GL	G	CT	MSP	RRS	Amy	EURS
Temperatura (F1)	4	54,56*	1129,80*	1128,79*	377,60*	314,24*	0,83 <sup>ns</sup>
Vigor (F2)	1	21,35*	83,64*	95,16*	31,26*	53,41*	35,72*
F1 X F2	4	0,59 <sup>ns</sup>	8,68*	27,45*	6,31*	17,13*	1,96 <sup>ns</sup>
Erro	30						
Total	39						
CV	-	4,46	6,04	6,58	9,57	17,18	10,28
FV	GL	MDA <sub>Plântula</sub>	CAT <sub>Plântula</sub>	APX <sub>Plântula</sub>	GPX <sub>Plântula</sub>		
Temperatura (F1)	4	87,84*	13,43*	11,75*	299,76*		
Vigor (F2)	1	32,22*	1,45 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>		
F1 X F2	4	2,61 <sup>ns</sup>	3,97*	0,42 <sup>ns</sup>	7,48*		
Erro	30						
Total	39						
CV	-	6,07	24,15	20,09	16,13		
FV	GL	MDA <sub>Cotilédone</sub>	CAT <sub>Cotilédone</sub>	APX <sub>Cotilédone</sub>	GPX <sub>Cotilédone</sub>		
Temperatura (F1)	4	8,97*	135,64*	11,34*	196,53*		
Vigor (F2)	1	0,06 <sup>ns</sup>	0,29 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	17,19*		
F1 X F2	4	0,49 <sup>ns</sup>	0,51 <sup>ns</sup>	1,91 <sup>ns</sup>	9,51*		
Erro	30						
Total	39						
CV	-	12,61	18,55	32,77	32,23		

Legenda: \*Indica diferença significativa pelo teste F a 5% de probabilidade. <sup>ns</sup>: não significativo. Elaborado pelo autor, 2023.

## APÊNDICE G – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 7

Tabela G1. Resumo do quadro de análise de variância demonstrando o valor de F-calculado para as variáveis de raiz (CR), hipocótilo (CH) e total (CT), massa seca de plântulas (MSP), malondialdeído (MDA), guaiacol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e teor de prolina determinados em eixo/plântulas (EIX) e cotilédones (COT) aos quatro dias após a semeadura em condições de ausência e presença de estresse hídrico

FV	GL	CR	CH	CT	MSP	MDA <sub>cot</sub>	MDA <sub>eix</sub>	GPX <sub>eix</sub>
Vigor (F1)	2	25,96*	7,79*	21,10*	59,47*	4,73*	19,41*	0,45ns
Estresse (F2)	1	279,80*	303,69*	314,84*	488,36*	20,21*	217,50*	19,16*
F1 x F2	2	3,68*	2,27ns	3,25ns	6,05ns	0,96ns	1,51ns	1,09ns
Erro	18							
Total	23							
CV	-	12,48	13,36	12,14	6,54	27,61	8,28	15,52
FV	GL	GPX <sub>cot</sub>	APX <sub>eix</sub>	APX <sub>cot</sub>	CAT <sub>eix</sub>	CAT <sub>cot</sub>	Prolina <sub>Eix</sub>	Prolina <sub>Cot</sub>
Vigor (F1)	2	0,93ns	0,57ns	0,01ns	4,04*	4,93*	15,75*	11,02*
Estresse (F2)	1	32,40*	47,00*	0,84ns	42,18*	18,93*	280,02*	95,84*
F1 x F2	2	0,08ns	4,81*	0,36ns	0,36*	1,36ns	10,68*	4,58*
Erro	18							
Total	23							
CV	-	55,17	17,71	27,48	24,73	20,68	17,24	17,03

Legenda: FV: Fonte de variação; GL: Graus de liberdade; C.V.: Coeficiente de variação. \*Indica diferença significativa pelo teste F a 5% de probabilidade. ns: não significativo. Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela G2. Resumo do quadro de análise de variância demonstrando o valor de F-calculado para as variáveis de raiz (CR), hipocótilo (CH) e total (CT), massa seca de plântulas (MSP), malondialdeído (MDA), guaiacol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e teor de prolina determinados em eixo/plântulas (EIX) e cotilédones (COT) aos sete dias após a semeadura em condições de ausência e presença de estresse hídrico

FV	GL	CR	CH	CT	MSP	MDA <sub>cot</sub>	MDA <sub>eix</sub>	GPX <sub>eix</sub>
Vigor (F1)	2	23,32*	11,90*	28,50*	16,42*	8,45*	1,68ns	0,06ns
Estresse (F2)	1	200,42*	367,84*	397,66*	409,58*	56,79*	65,44*	34,05*
F1 x F2	2	0,22ns	2,55ns	1,23ns	0,62ns	4,18*	0,84ns	6,34*
Erro	18							
Total	23							
CV	-	7,26	11,55	6,82	9,06	24,51	12,64	20,62
FV	GL	GPX <sub>cot</sub>	APX <sub>eix</sub>	APX <sub>cot</sub>	CAT <sub>eix</sub>	CAT <sub>cot</sub>	Prolina <sub>Eix</sub>	Prolina <sub>Cot</sub>
Vigor (F1)	2	4,70*	3,65*	0,65ns	5,56*	3,68*	6,56*	1,04ns
Estresse (F2)	1	84,43*	24,20*	4,31ns	9,63*	47,80*	483,57*	106,17*
F1 x F2	2	2,83ns	5,66*	0,61ns	0,81ns	2,09ns	3,93ns	0,81ns
Erro	18							
Total	23							
CV	-	56,10	18,35	26,36	16,23	19,81	15,38	22,10

Legenda: FV: Fonte de variação; GL: Graus de liberdade; C.V.: Coeficiente de variação. \*Indica diferença significativa pelo teste F a 5% de probabilidade. ns: não significativo. Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela G2. Resumo do quadro de análise de variância demonstrando o valor de F-calculado para as variáveis de raiz (CR), hipocótilo (CH) e total (CT), massa seca de plântulas (MSP), malondialdeído (MDA), guaiacol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e teor de prolina determinados em raízes e hipocótilo aos sete dias após a semeadura em condições de ausência e presença de estresse hídrico

FV	GL	MDA hipo	MDA raiz	GPX hipo	GPX raiz	APX hipo
Vigor (F1)	1	8,66*	6,54*	3,71ns	5,67*	0,02ns
Estresse (F2)	1	58,14*	75,84*	10,58*	46,79*	25,68*
F1 x F2	1	0,47ns	0,18ns	0,31ns	3,38 ns	0,06ns
Erro	12					
Total	15					
CV		13,21	9,75	19,02	26,33	16,77
FV	GL	APX raiz	CAT hipo	CAT raiz	PRO eix	PRO raiz
Vigor (F1)	1	5,23*	1,29ns	2,01ns	21,52*	17,67*
Estresse (F2)	1	59,83*	13,37*	22,34*	170,23*	273,99*
F1 x F2	1	4,00ns	0,35ns	8,53*	11,90*	9,24*
Erro	12					
Total	15					
CV		20,54	15,80	13,34	17,26	16,48

Legenda: FV: Fonte de variação; GL: Graus de liberdade; C.V.: Coeficiente de variação. \*Indica diferença significativa pelo teste F a 5% de probabilidade. ns: não significativo. Elaborado pelo autor, 2023.



## APÊNDICE H – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 8

Tabela H1. Resumo do quadro de análise de variância demonstrando o valor de F-calculado para as variáveis Primeira contagem de germinação (PCG; PCG<sub>TF</sub>), germinação (G; G<sub>TF</sub>), plântulas anormais (PA; PA<sub>TF</sub>) e sementes mortas (SM; SM<sub>TF</sub>) dos lotes de sementes utilizados dos genótipos BAF42, BAF44 e BAF55 com nível de vigor distinto em condições normais de execução (i.e., 23 °C +/- 2) e após a submissão das sementes a 5 °C por 7 dias (TF)

FV	GL	PCG	G	PA	SM	PCG <sub>TF</sub>	G <sub>TF</sub>	PA <sub>TF</sub>	SM <sub>TF</sub>
Genótipo (F1)	2	52,18*	12,16*	12,16*	-	40,68*	50,45*	7,45*	79,59*
Vigor (F2)	1	97,50*	22,53*	22,53*	-	78,77*	65,74*	61,38*	9,56*
F1 x F2	2	4,61*	0,99ns	0,99ns	-	0,06ns	2,68ns	1,07ns	2,81ns
Erro	18								
Total	23								
CV	-	7,42	3,14	29,11	-	14,78	8,83	24,28	45,76

Legenda: FV: Fonte de variação; GL: Graus de liberdade; C.V.: Coeficiente de variação. \*Indica diferença significativa pelo teste F a 5% de probabilidade. ns: não significativo. Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela H2. Resumo do quadro de análise de variância demonstrando o valor de F-calculado para as variáveis comprimento de raiz (CR<sub>TF</sub>), hipocótilo (CH<sub>TF</sub>), total (CT<sub>TF</sub>) e massa seca de plântulas (MSP<sub>TF</sub>) dos lotes de sementes com nível de vigor utilizados dos genótipos BAF42, BAF44 e BAF55 avaliados aos 4 dias após a submissão das sementes a 5 °C por 7 dias (TF)

FV	GL	CR <sub>TF</sub>	CH <sub>TF</sub>	CT <sub>TF</sub>	MSP <sub>TF</sub>
Genótipo (F1)	2	33,10*	12,33*	29,64*	3,62*
Vigor (F2)	1	31,97*	15,36*	30,10*	14,76*
F1 x F2	2	5,23*	5,48*	5,93*	2,09ns
Erro	18				
Total	23				
CV	-	17,29	10,75	14,00	18,65

Legenda: FV: Fonte de variação; GL: Graus de liberdade; C.V.: Coeficiente de variação. \*Indica diferença significativa pelo teste F a 5% de probabilidade. ns: não significativo. Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela H3. Resumo do quadro de análise de variância demonstrando o valor de F-calculado para as variáveis malondialdeído (MDA), guaiacol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) em eixo e plântulas dos lotes de sementes com nível de vigor distinto utilizadas dos genótipos BAF42, BAF44 e BAF55 determinados na após o estresse por sete dias a 5 °C (Saída do estresse por frio) e aos 4 dias após o estresse por frio 5 °C por 7 dias

Saída do Estresse por Frio						
FV	GL	CAT	GPX	APX	MDA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Genótipo (F1)	2	1,29ns	0,02ns	0,34ns	0,07 ns	15,92*
Vigor (F2)	1	9,18*	0,01ns	0,59ns	0,02 ns	26,10*
F1 x F2	2	0,62ns	0,04ns	0,14ns	1,94 ns	11,97*
Erro	18					
Total	23					
CV	-	12,40	36,15	28,40	6,21	7,69
4 Dias Após o Estresse por Frio						
FV	GL	CAT	GPX	APX	MDA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Genótipo (F1)	2	6,94*	12,14*	18,84*	9,26*	13,79*
Vigor (F2)	1	26,76*	7,47*	23,69*	19,33*	9,51*
F1 x F2	2	3,74*	2,67ns	0,092ns	0,77ns	0,02ns
Erro	18					
Total	23					
CV	-	7,60	9,48	12,65	13,15	17,23

Legenda: FV: Fonte de variação; GL: Graus de liberdade; C.V.: Coeficiente de variação. \*Indica diferença significativa pelo teste F a 5% de probabilidade. ns: não significativo. Elaborado pelo autor, 2023.

## APÊNDICE I – ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CAPÍTULO 9

Tabela I1. Resumo do quadro de análise de variância demonstrando o valor de F-calculado para as variáveis de Comprimento de raiz (CR), comprimento de hipocótilo (CH), comprimento total (CT), massa seca de raiz (MSR), massa seca de hipocótilo (MSH), massa seca total (MST), proporção de mobilização de reservas para raiz (PMRR), hipocótilo (PMRH), relação raiz e hipocótilo (R/H), massa seca remanescente em cotilédones (MSRC), redução de reservas da semente (RRS) e eficiência de uso de reservas da semente (EURS) dos lotes de semente com alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) submetidos a condições de estresse por cloreto de sódio (NaCl)

FV	GL	G	CR	CH	CT	MSR	MSH	MST
Vigor (F1)	1	25,48*	21,37*	117,83*	74,88*	54,24*	72,11*	81,26*
Estresse (F2)	2	7,04*	1818,75*	2140,05*	3372,61*	270,81*	759,39*	751,62*
F1 x F2	2	0,86ns	2,86ns	42,68*	17,91*	13,82*	25,86*	26,80*
Erro	18							
Total	23							
CV	-	7,88	5,33	4,21	3,70	5,97	6,49	5,83
FV	GL	PMRR	PMRH	R/H	MSRC	RRS	EURS	-
Vigor (F1)	1	0,16ns	0,17ns	4,88*	26,90*	50,63*	0,03ns	-
Estresse (F2)	2	98,33*	98,39*	35,13*	540,36*	572,11*	0,01ns	-
F1 x F2	2	2,09ns	2,10ns	5,04*	11,18*	13,68*	1,52ns	-
Erro	18							-
Total	23							-
CV	-	6,36	2,12	5,87	2,22	6,62	7,62	-

Legenda: FV: Fonte de variação; GL: Graus de liberdade; C.V.: Coeficiente de variação. \*Indica diferença significativa pelo teste F a 5% de probabilidade. ns: não significativo. Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela I2. Resumo do quadro de análise de variância demonstrando o valor de F-calculado para as variáveis taxa de redução de amido (TRA), alfa-amilase (Amy), prolina (PRO), malondialdeído (MDA), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ascorbato peroxidase (APX), guaicol peroxidase (GPX), catalase (CAT) avaliados em cotilédones (cot), raízes (raiz) e hipocótilo (hipo) dos lotes de semente com alto vigor (AV) e baixo vigor (BV) submetidos a condições de estresse por cloreto de sódio (NaCl)

FV	GL	TRA	Amy	PROcot	MDAcot	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> cot	APXcot	GPXcot	CATcot
Vigor (F1)	1	19,38*	1,99ns	0,09ns	0,10ns	2,10ns	0,00ns	0,01ns	0,36ns
Estresse (F2)	2	159,77*	159,70*	335,53ns	33,50*	15,51*	4,67*	49,00*	3,67*
F1 x F2	2	2,91ns	3,60*	0,44ns	1,29ns	0,56ns	0,22ns	1,98ns	0,24ns
Erro	18								
Total	23								
CV	-	10,84	28,46	4,21	10,62	10,48	6,49	25,26	12,53
FV	GL	PROhipo	MDAhipo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> hipo	APXhipo	GPXhipo	CAThipo		
Vigor (F1)	1	5,31*	6,01*	2,71*	0,20ns	4,62*	0,06ns		
Estresse (F2)	2	224,95*	73,89*	22,59*	89,12*	122,52*	47,76*		
F1 x F2	2	2,91ns	1,50ns	6,68*	0,55ns	3,24ns	5,35*		
Erro	18								
Total	23								
CV	-	5,97	12,66	15,21	12,38	14,14	14,69		
FV	GL	PROraiz	MDAraiz	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> raiz	APXraiz	GPXraiz	CATraiz		
Vigor (F1)	1	76,71*	0,42ns	0,00ns	0,85ns	0,11ns	0,35ns		
Estresse (F2)	2	50,11*	40,24*	4,88*	13,57*	10,40*	66,01*		
F1 x F2	2	3,94*	0,40ns	1,46ns	1,45ns	1,29ns	0,51ns		
Erro	18								
Total	23								
CV	-	5,87	9,09	14,54	15,01	13,42	19,48		

Legenda: FV: Fonte de variação; GL: Graus de liberdade; C.V.: Coeficiente de variação. \*Indica diferença significativa pelo teste F a 5% de probabilidade. ns: não significativo. Elaborado pelo autor, 2023.