

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Tiéle Stuker Fernandes

**ÁCIDO SALICÍLICO EM SEMENTES DE FEJÓEIRO: QUALIDADE
FISIOLÓGICA E TOLERÂNCIA DE PLÂNTULAS AO ESTRESSE POR
BAIXA TEMPERATURA**

Santa Maria, RS
2018

Tiéle Stuker Fernandes

**ÁCIDO SALICÍLICO EM SEMENTES DE FEIJOEIRO: QUALIDADE
FISIOLÓGICA E TOLERÂNCIA DE PLÂNTULAS AO ESTRESSE POR BAIXA
TEMPERATURA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Agronomia**.

Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Russi Nunes

Santa Maria, RS
2018

Fernandes, Tiéle Stuker

ÁCIDO SALICÍLICO EM SEMENTES DE FEIJOEIRO:QUALIDADE
FISIOLÓGICA E TOLERÂNCIA DE PLÂNTULAS AO ESTRESSE POR
BAIXA TEMPERATURA / Tiéle Stuker Fernandes.- 2018.

74 p.; 30 cm

Orientador: Ubirajara Russi Nunes
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Agronomia, RS, 2018

1. Phaseolus vulgaris 2. Estresse de frio 3.
Qualidade fisiológica 4. Atividade enzimática I. Nunes,
Ubirajara Russi II. Título.

Tiéle Stuker Fernandes

ÁCIDO SALICÍLICO EM SEMENTES DE FEIJOEIRO: QUALIDADE FISIOLÓGICA E TOLERÂNCIA DE PLÂNTULAS AO ESTRESSE POR BAIXA TEMPERATURA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Agronomia**.

Aprovado em data 19 de julho de 2018:



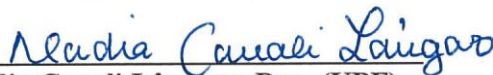
Ubirajara Russi Nunes, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Luciane Almeri Tabaldi, Dra. (UFSM)



Nilson Matheus Mattioni, Dr. (UFSM)



Nádia Canali Lângaro, Dra. (UPF)



Géri Eduardo Meneghello, Dr. (UFPeI)

Santa Maria, RS
2018

*A minha família, pelo incentivo,
carinho e amor de sempre.
Pelo apoio e ajuda dedicado ao
longo deste período.
Por tudo!!*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao meu orientador, professor Dr. Ubirajara Russi Nunes, por toda ajuda e ensinamentos passados durante a execução deste trabalho.

Aos professores coorientadores, Dra. Luciane Almeri Tabaldi e Dr. Alberto Cargnelutti Filho, pela ajuda na execução do trabalho e análise dos dados, sempre que solicitados.

Aos participantes da banca examinadora, Dr. Ubirajara Russi Nunes, Dra. Luciane Almeri Tabaldi, Dra. Nadia Canali Lângaro, Dr. Geri Eduardo Meneghello e Dr. Nilson Matheus Mattioni, pelo auxílio para a melhora deste trabalho. Bem como, aos professores que participaram da banca de qualificação por toda contribuição, Dr. Alberto Cargnelutti Filho e Dr. Marcos Paulo Ludwig.

Ao professor Dr. Rogério Luiz Backes pelos ensinamentos e ajuda na aquisição das sementes de feijão.

Às empresas Fepagro e Epagri pela doação das sementes de feijão utilizadas neste trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório Didático e de Pesquisa em Sementes, por toda ajuda, pela amizade, pelas caminhadas até o RU, pelos mates e intermináveis conversas. Muito obrigada, Priscila Barbieri, Janine Farias Menegaes, Eduardo José Ludwig, Joner Silveira Dalcin, Rodrigo Roso, Nelto Almeida, César Forte, Mariane Comiran, Geovana Facco Barbieri, Rafaela Gai, Cassiano Vasconcelos e Pablo Sangoi.

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Sementes e do Departamento de Fitotecnia.

Aos alunos orientados da professora Dra. Luciane Almeri Tabaldi, pelo auxílio na condução das análises bioquímicas.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

ÁCIDO SALICÍLICO EM SEMENTES DE FEIJOEIRO: QUALIDADE FISIOLÓGICA E TOLERÂNCIA DE PLÂNTULAS AO ESTRESSE POR BAIXA TEMPERATURA

AUTOR: Tiéle Stuker Fernandes
ORIENTADOR: Ubirajara Russi Nunes

O feijão comum quando semeado nos meses de agosto e setembro no Rio Grande do Sul está sujeito a danos e perdas pelo estresse de baixa temperatura, comum neste período. Assim, a germinação e emergência das sementes são prejudicadas e as plântulas apresentam redução do crescimento e desenvolvimento. Os danos provocados pelo estresse podem ser minimizados pela aplicação de hormônios vegetais. O ácido salicílico atua em diferentes processos fisiológicos nas plantas, além de atuar como sinalizador e indutor de tolerância a diversos estresses abióticos, como seca, temperaturas extremas, salinidade e contaminação por metais pesados. Dessa forma, a aplicação de ácido salicílico pode contribuir com a tolerância das plântulas de feijão ao estresse de baixa temperatura durante a germinação e desenvolvimento inicial da cultura. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi estudar a aplicação de diferentes concentrações de ácido salicílico e formas de aplicação do produto em sementes de feijão; bem como, o efeito do ácido salicílico na germinação e desenvolvimento inicial das plântulas submetidas ao estresse de baixa temperatura, avaliando-se a germinação das sementes, crescimento, acúmulo de massa, atividade de enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica das plântulas. No primeiro capítulo, as sementes de feijão das cultivares Fepagro 26 e SCS204 Predileto foram submetidas à germinação com a aplicação de diferentes concentrações de ácido salicílico, sendo: zero, 250, 500, 750, 1000, 3000 e 5000 μM . A embebição das sementes ocorreu de duas formas: [1] papel de germinação umedecido com as soluções de ácido salicílico; [2] embebição das sementes nas soluções de ácido salicílico em caixas plásticas por 24 horas e posterior semeadura em papel de germinação umedecido com água destilada. O material foi mantido em câmara de germinação sob fotoperíodo constante e temperatura de 25 °C. No quinto dia após a semeadura determinou-se o número de plântulas normais (primeira contagem), comprimento, massa fresca e seca de plântula. A porcentagem de germinação foi avaliada aos nove dias após a semeadura. Concluiu-se que o ácido salicílico em concentrações até 1000 μM não prejudica a germinação de sementes de feijão das cultivares Fepagro 26 e SCS204 Predileto, utilizando-se a embebição das sementes por 24 horas e a embebição no papel de germinação. Concentrações de ácido salicílico até 1000 μM e embebição das sementes por 24 horas não afeta o vigor (primeira contagem) das duas cultivares de feijão. Nos experimentos do segundo capítulo objetivou-se estudar a tolerância induzida pelo ácido salicílico em sementes de feijão na germinação e no desenvolvimento inicial de plântulas sob estresse de baixa temperatura, avaliando-se parâmetros fisiológicos e bioquímicos das plântulas. O experimento desenvolvido para avaliar o desempenho fisiológico das sementes foi conduzido em um bifatorial 5 x 4, com concentrações de ácido salicílico (zero, 250, 500, 750 e 1000 μM) e regimes de temperaturas (25, 20, 15, 20-10 °C), utilizando-se sementes das cultivares Fepagro 26 e SCS204 Predileto. Avaliou-se a porcentagem de plântulas normais do teste de germinação (primeira contagem) no quinto dia após a semeadura e a porcentagem de germinação no nono dia. No sétimo dia determinou-se o comprimento, a massa fresca e a massa seca de plântula após a secagem em estufa por 48 horas. Para o experimento bioquímico, utilizou-se apenas as sementes da cultivar Fepagro 26,

conduzido em bifatorial 4 x 3 (zero, 250, 500 e 750 μM x 25, 15 e 20-10 $^{\circ}\text{C}$), avaliando-se aos sete dias após a semeadura a atividade das enzimas superóxido dismutase, guaiacol peroxidase e a peroxidação lipídica das plântulas de feijão. Conclui-se que temperaturas de 15 $^{\circ}\text{C}$ e 20-10 $^{\circ}\text{C}$ prejudicam a germinação e o vigor das sementes de feijão, mas as cultivares Fepagro 26 e SCS204 Predileto apresentam comportamento distinto quanto ao estresse de baixa temperatura. O ácido salicílico exógeno induz a tolerância das plântulas de feijão ao estresse de baixa temperatura durante a germinação e o desenvolvimento inicial, promovendo maior germinação e vigor das sementes nas concentrações de 100 a 400 μM para a cultivar Fepagro 26, e nas concentrações entre 250 a 700 μM para a cultivar SCS204 Predileto. O ácido salicílico induz a ativação da enzima antioxidante guaiacol peroxidase na raiz primária de plântulas de feijão da cultivar Fepagro 26 sob baixa temperatura, mas não induz a ativação da enzima superóxido dismutase e não reduz a peroxidação lipídica.

Palavras-chave: Atividade enzimática. Estresse de frio. *Phaseolus vulgaris*. Qualidade fisiológica.

ABSTRACT

SALICYLIC ACID IN BEAN SEEDS: PHYSIOLOGICAL QUALITY AND TOLERANCE OF SEEDLINGS TO LOW TEMPERATURE STRESS

AUTHOR: Tiéle Stuker Fernandes

ADVISOR: Ubirajara Russi Nunes

The common bean when sown in august and september in Rio Grande do Sul is subject to damages and losses due to the low temperature stress common in this period. Thus, the germination and emergence of the seeds are impaired and the seedlings present reduced growth and development. The damage caused by stress can be minimized by the application of plant hormones. Salicylic acid acts in different physiological processes in plants, besides acting as a signal and inducer of tolerance to several abiotic stresses, such as drought, extreme temperatures, salinity and contamination by heavy metals. Thus, the application of salicylic acid may contribute to the tolerance of bean seedlings to low temperature stress during germination and initial development of the crop. Thus, the objective of this study was to study the application of different concentrations of salicylic acid and forms of application of the product in bean seeds; as well as the effect of salicylic acid on the germination and initial development of seedlings submitted to low temperature stress. Seed germination, growth, mass accumulation, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation of seedlings were evaluated. In the first chapter, the bean seeds of the cultivars Fepagro 26 and SCS204 Predileto were submitted to germination with the application of different concentrations of salicylic acid, being zero, 250, 500, 750, 1000, 3000 and 5000 μM . Seed imbibition occurred in two ways: [1] germination paper moistened with salicylic acid solutions; [2] imbibition of seeds in salicylic acid solutions in plastic boxes for 24 hours and subsequent sowing on germinated paper moistened with distilled water. The material was kept in a germination chamber under constant photoperiod and temperature of 25 ° C. On the fifth day after sowing the number of normal seedlings (first count), length, fresh and dry mass of seedlings were determined. The percentage of germination was evaluated nine days after sowing. It was concluded that the salicylic acid in concentrations up to 1000 μM did not affect the germination of bean seeds of the cultivars Fepagro 26 and SCS204 Predileto, using the soaking of the seeds for 24 hours and the imbibition in the paper of germination. Salicylic acid concentrations up to 1000 μM and soaking the seeds for 24 hours does not affect the vigor (first count) of the two bean cultivars. In the experiments of the second chapter the objective was to study the tolerance induced by salicylic acid in bean seeds in the germination and initial development of seedlings under low temperature stress, evaluating the physiological and biochemical parameters of the seedlings. The experiment developed to evaluate the physiological performance of the seeds was conducted in a 5 x 4 bipatorial, with concentrations of salicylic acid (zero, 250, 500, 750 and 1000 μM) and temperature regimes (25, 20, 15, 20-10 °C), using seeds of the cultivars Fepagro 26 and SCS204 Predileto. The percentage of normal seedlings of the germination test (first count) was evaluated on the fifth day after sowing and the percentage of germination on the ninth day. On the seventh day the length, the fresh mass and the dry mass of the seedling were determined after drying in an oven for 48 hours. For the biochemical experiment, only seeds of the Fepagro 26 cultivar, conducted in a 4 x 3 bifactorial (zero, 250, 500 and 750 μM x 25, 15 and 20-10 ° C) were used, evaluated at seven days after sowing the activity of the enzymes superoxide dismutase, guaiacol peroxidase and the lipid peroxidation of the bean seedlings. It is concluded that temperatures of 15°C and 20-10°C affect the germination and vigor of the bean seeds, but the

cultivars Fepagro 26 and SCS204 Predileto show different behavior regarding low temperature stress. The exogenous salicylic acid induces the tolerance of bean seedlings to low temperature stress during germination and initial development, promoting greater germination and vigor of the seeds in the concentrations of 100 to 400 μM for the Fepagro 26 cultivar, and in the concentrations between 250 a 700 μM for the cultivar SCS204 Predileto. Salicylic acid induces the activation of the antioxidant enzyme guaiacol peroxidase in the primary root of bean seedlings of the Fepagro 26 cultivar under low temperature, but does not induce activation of the enzyme superoxide dismutase and does not reduce lipid peroxidation.

Keywords: Enzymatic activity. Cold stress. *Phaseolus vulgaris*. Physiological quality.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 3.1 - Primeira contagem (vigor) e germinação (A), comprimento de plântula (B), massa fresca de plântula (C) e massa seca de plântula (D) de feijão da cultivar Fepagro 26 submetidas à germinação sob diferentes concentrações de ácido salicílico pelo método de embebição do papel de germinação.36
- Figura 3.2 - Primeira contagem (vigor) e germinação (A), comprimento de plântula (B), massa fresca de plântula (C) e massa seca de plântula (D) de feijão da cultivar Predileto submetidas à germinação sob diferentes concentrações de ácido salicílico pelo método de embebição do papel de germinação.38
- Figura 3.3 - Primeira contagem (vigor) e germinação (A), comprimento de plântula (B), massa fresca de plântula (C) e massa seca de plântula (D) de feijão da cultivar Fepagro 26 submetidas à germinação sob diferentes concentrações de ácido salicílico pelo método de embebição em caixas plásticas por 24 horas.....40
- Figura 3.4 - Primeira contagem (vigor) e germinação (A), comprimento de plântula (B), massa fresca de plântula (C) e massa seca de plântula (D) de feijão da cultivar Predileto submetidas à germinação sob diferentes concentrações de ácido salicílico pelo método de embebição em caixas plásticas por 24 horas.....41

CAPÍTULO II

- Figura 4.1 - Primeira contagem (A), massa fresca de parte aérea (B), massa fresca de raiz primária (C), massa fresca total (D), massa seca de parte aérea (E), massa seca de raiz primária (F) e massa seca total (G), de plântulas de feijão da cultivar Fepagro 26 embebidas em ácido salicílico por 24 horas e submetidas à germinação em diferentes temperaturas.55
- Figura 4.2 - Germinação (A), primeira contagem (B) massa fresca de parte aérea (C) e massa fresca total (D), de plântulas de feijão da cultivar Predileto embebidas em ácido salicílico por 24 horas e submetidas à germinação em diferentes temperaturas. 58
- Figura 4.3 - Peroxidação lipídica (TBARS) da parte aérea (A) e raiz primária (B), atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) da parte aérea (C) e atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) da raiz primária, de plântulas de feijão da cultivar Fepagro 26 embebidas em ácido salicílico por 24 horas e submetidas à germinação em diferentes temperaturas.61
- Figura 4.4 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) da raiz primária e atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) da parte aérea de plântulas de feijão da cultivar Fepagro 26 embebidas em ácido salicílico por 24 horas e submetidas à germinação em diferentes temperaturas.64

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 3.1 - Grau de umidade (U), peso de mil sementes (PMS), germinação (G), primeira contagem (PC), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz primária (CR), comprimento total de plântula (CT), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz primária (MSR), massa seca total de plântula (MST), emergência a campo (EC) e tempo médio de emergência (TME) de sementes das cultivares de feijão Fepagro 26 e Predileto.	35
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 4.1 - Médias de germinação (G, %), comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz primária (CR, cm) e comprimento total (CT, cm), de plântulas de feijão, cultivar Fepagro 26, submetidas à germinação em diferentes temperaturas após embebição em ácido salicílico.....	57
Tabela 4.2 - Médias do comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz primária (CR, cm), comprimento total (CT, cm), massa fresca de raiz primária (MFR, mg pl ⁻¹), massa seca de parte aérea (MSPA, mg pl ⁻¹), massa seca de raiz primária (MSR, mg pl ⁻¹) e massa seca total (MST, mg pl ⁻¹), de plântulas de feijão, cultivar Predileto 26, submetidas à germinação em diferentes temperaturas após embebição em ácido salicílico.....	59

LISTA DE APÊNDICES

- Apêndice A - Resumo da análise de variância para as variáveis: germinação (G), primeira contagem (PC), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz primária (CR), comprimento total (CT), massa fresca de parte aérea (MFPA), massa fresca de raiz primária (MFR), massa fresca total (MFT), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz primária (MSR) e massa seca total (MST) de plântulas de feijão das cultivares Fepagro 26 e Predileto submetidas à embebição em ácido salicílico no papel de germinação.72
- Apêndice B - Resumo da análise de variância para as variáveis: germinação (G), primeira contagem (PC), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz primária (CR), comprimento total (CT), massa fresca de parte aérea (MFPA), massa fresca de raiz primária (MFR), massa fresca total (MFT), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz primária (MSR) e massa seca total (MST) de plântulas de feijão das cultivares Fepagro 26 e Predileto submetidas à embebição em ácido salicílico em caixas plásticas por 24 horas.73
- Apêndice C - Resumo da análise de variância para as variáveis: germinação (G), primeira contagem (PC), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz primária (CR), comprimento total (CT), massa fresca de parte aérea (MFPA), massa fresca de raiz primária (MFR), massa fresca total (MFT), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz primária (MSR) e massa seca total (MST) de plântulas de feijão das cultivares Fepagro 26 e Predileto embebidas em ácido salicílico por 24 horas e submetidas à germinação em diferentes temperaturas.74
- Apêndice D - Resumo da análise de variância para as variáveis: peroxidação lipídica da parte aérea (TBARS PA), peroxidação lipídica da raiz primária (TABRS R), atividade da enzima superóxido dismutase da parte aérea (SOD PA), atividade da enzima superóxido dismutase da raiz primária (SOD R), atividade da enzima guaiacol peroxidase da parte aérea (POD PA) e atividade da enzima guaiacol peroxidase da raiz primária (POD R) de plântulas de feijão da cultivar Fepagro 26 embebidas em ácido salicílico e submetidas à germinação em diferentes temperaturas.75

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 A CULTURA DO FEIJÃO	17
2.2 ESTRESSE ABIÓTICO	18
2.2.1 Estresse de baixa temperatura durante a germinação das sementes	18
2.3 ÁCIDO SALICÍLICO E A TOLERÂNCIA DE PLANTAS À ESTRESSES ABIÓTICOS	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
3. CAPÍTULO I	29
GERMINAÇÃO E VIGOR DE SEMENTES DE FEIJÃO SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO SALICÍLICO	29
3.1 INTRODUÇÃO.....	31
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.4 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
4. CAPÍTULO II	47
ATIVIDADE ENZIMÁTICA E TOLERÂNCIA DE PLÂNTULAS DE FEIJÃO À BAIXA TEMPERATURA INDUZIDA PELO ÁCIDO SALICÍLICO	47
4.1 INTRODUÇÃO.....	49
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.2.1 Análises fisiológicas	51
4.2.2 Análises bioquímicas	52
4.2.3 Análise estatística	53
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.3.1 Análises fisiológicas	53
4.3.2 Análises bioquímicas	60
4.5 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
APÊNDICES	72

1. INTRODUÇÃO

O feijão é cultivado no Rio Grande do Sul (RS) em duas safras. Na safra, ou safra das águas, a semeadura é recomendada entre os meses de agosto a novembro, e na safrinha, ou safra da seca, a semeadura ocorre nos meses de janeiro e fevereiro. A semeadura de outono-inverno não é recomendada para o RS pelo risco de ocorrência de geada durante o ciclo da cultura.

Os principais danos às plantas de feijão por fatores ambientais são causados pela deficiência hídrica, pela temperatura do ar alta durante o florescimento e pela baixa temperatura na emergência e desenvolvimento inicial das plantas, principalmente em semeaduras realizadas nos meses de agosto e setembro. Somado a isso, os produtores do RS realizam a semeadura da safra no início da época recomendada para implantar outra cultura de verão posteriormente, como milho ou soja, aumentando o risco de expor as sementes e plantas jovens de feijão à baixa temperatura.

Entre as alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, o estresse por baixa temperatura durante o início do ciclo da cultura reduz a porcentagem e velocidade de germinação das sementes e aumenta a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células. Com isso, observa-se no campo o estabelecimento desuniforme de plantas, com crescimento e desenvolvimento retardado, podendo acarretar em perdas de produtividade.

O complexo enzimático antioxidante das plantas age controlando o nível das EROs, amenizando os danos causados às células vegetais. No entanto, em condições de estresse elevado e persistente as enzimas antioxidantes não são capazes de diminuir a presença das EROs nas células e nesses casos podem ser observados danos irreversíveis nas plantas.

Para minimizar os danos causados pelas condições de estresse, as plantas podem aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, ativadas por hormônios vegetais, como o ácido salicílico (AS). O AS é responsável por regular diversos processos fisiológicos e bioquímicos nas plantas, além de atuar como sinalizador de estresses abiótico e biótico. Nesse contexto, a aplicação de AS em sementes de feijão pode induzir respostas de tolerância ao estresse pela baixa temperatura durante a germinação e desenvolvimento inicial das plântulas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi estudar a aplicação de diferentes concentrações de AS e formas de aplicação do produto em sementes de feijão; bem como, o efeito do AS na germinação e desenvolvimento inicial das plântulas submetidas ao estresse de baixa temperatura, avaliando-se a germinação das sementes, crescimento, acúmulo de massa, atividade de enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica das plântulas.

Dessa forma, esta tese apresenta-se dividida em dois capítulos, sendo que o Capítulo I, intitulado “Qualidade fisiológica de sementes de feijão submetidas a diferentes concentrações de ácido salicílico”, teve como objetivo avaliar a influência do AS na germinação e vigor de sementes de feijão submetidas a diferentes concentrações de AS, diretamente no papel de germinação e em embebição por 24 horas antes da semeadura. O Capítulo II, intitulado “Atividade enzimática e tolerância de plântulas de feijão à baixa temperatura induzida pelo ácido salicílico”, teve como objetivo estudar a tolerância induzida pelo AS em sementes de feijão na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas sob estresse de baixa temperatura, avaliando-se parâmetros fisiológicos e bioquímicos das plântulas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DO FEIJÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma espécie anual da família Fabaceae que tem grande destaque para a alimentação humana, por ser uma fonte de proteína de baixo custo, além de apresentar em sua composição carboidratos, fibras e minerais (SATHE; DESPHANDE; SALUNKHE, 1984; WORTHINGTON et al., 2012).

O cultivo é realizado em pequenas, médias e grandes propriedades, em todos os estados brasileiros e em diferentes épocas, conforme as condições ambientais de cada região. No estado do Rio Grande do Sul (RS) seu cultivo é realizado em duas épocas: a safra, com semeadura entre os meses de agosto e novembro, e a safrinha, com semeadura realizada em janeiro e fevereiro. No restante do país, exceto no estado de Santa Catarina, além das épocas já citadas, também pode ser realizada a semeadura de outono-inverno, não sendo recomendada para o RS devido à ocorrência de geada e frio intenso durante o ciclo da cultura (CTSBF, 2012).

Com ampla distribuição geográfica, o feijão possui dois centros de origem, o Mesoamericano e o Andino. O centro de distribuição primário (Mesoamericano) engloba a América Central, México e norte dos Andes, enquanto que o centro secundário (Andino) abrange o norte dos Andes (SINGH; GEPTS; DEBOUCK, 1991; GALVÁN et al., 2006). A distinção entre os grupos gênicos ocorre pelo tipo de proteína (faseolina) e pela massa das sementes. Cultivares que apresentam sementes pequenas (massa de 100 sementes inferior a 25g) são originárias do centro Mesoamericano, e sementes médias (massa de 100 sementes de 25g a 40g) e grandes (massa de 100 sementes superior a 40g) possuem origem Andina (GALVÁN et al., 2001).

A área semeada, bem como a produção final e a produtividade da cultura do feijão sofrem variações ao longo dos anos e das épocas de cultivo. Conforme dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018), na safra 2017/2018 o Rio Grande do Sul semeou 29,5 mil hectares com feijão preto, colhendo 48,7 mil toneladas do grão. Na safrinha foram semeados 19,3 mil hectares e a produção estimada é de 30,9 mil toneladas de grãos.

Porém, a produtividade da cultura ainda é baixa, aproximadamente 1.600 kg ha⁻¹ nas últimas safras, conforme dados da Conab (2018). A baixa produtividade da cultura é resultado do baixo nível tecnológico empregado pela maioria dos produtores, condições ambientais adversas, doenças e pragas que ocorrem durante o ciclo, entre outros. No entanto, em

propriedades mais tecnificadas podem ser obtidas altas produtividades, em função do uso de irrigação, utilização de sementes certificadas, manejo do solo e da cultura adequado e controle de insetos pragas, doenças e plantas invasoras (VIVIAN et al., 2015).

O feijão pode ser dividido em dois grupos segundo a coloração do tegumento dos grãos. O feijão preto, como o nome sugere, possui coloração do tegumento preta, sendo mais cultivado e consumido na região Sul do Brasil. Nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia, São Paulo e Goiás a predominância de cultivo é do feijão de cor, que inclui o tipo carioca (CONAB, 2018).

2.2 ESTRESSE ABIÓTICO

Durante o ciclo as plantas podem ser expostas a diversas condições ambientais desfavoráveis, que prejudicam o seu crescimento e desenvolvimento. Nas plantas cultivadas, vários estudos avaliaram os efeitos dessas condições adversas, tais como, estresse hídrico (KHANG et al., 2012; NAZAR et al., 2015), térmico (FAROOQ et al. 2008, MARTEL; QADERI, 2016), salino (NAZAR et al., 2011; MOLAZEN; BASHIRZADEH, 2014) entre outros.

Na cultura do feijão, os principais danos provocados às plantas por fatores ambientais são causados pela deficiência hídrica, pela temperatura do ar alta durante o florescimento e pela baixa temperatura na emergência e desenvolvimento inicial das plantas, principalmente em sementeiras realizadas nos meses de agosto e setembro.

2.2.1 Estresse de baixa temperatura durante a germinação das sementes

Cada espécie vegetal possui uma faixa de temperatura ótima para a germinação, onde a germinação é máxima em um menor período de tempo. Conforme a temperatura se afasta dessa faixa ótima, a velocidade e a porcentagem de germinação são reduzidas (COCHRANE et al., 2014; MOTA; GARCIA, 2013). Para a maioria das espécies cultivadas a temperatura ótima na fase de germinação das sementes situa-se entre 20 e 30 °C, as temperaturas máximas entre 35 e 40 °C e as mínimas geralmente abaixo de 15 °C. Para o feijão, conforme Machado Neto (2006), a temperatura ideal nessa fase é 25 °C, e a temperatura mínima entre 8 e 13 °C, enquanto que em temperatura acima de 40 °C a germinação é inibida.

Conforme Lopez et al. (2006), o estresse causado pelas baixas temperaturas pode afetar o desenvolvimento das plântulas de feijão durante a germinação, gerando alterações

fisiológicas, bioquímicas e moleculares em seu metabolismo. De acordo com Su et al. (2010), as alterações que ocorrem em plântulas sob estresse podem ser divididos em três níveis: i) perturbações relacionadas à integridade das membranas, levando a um aumento da perda de metabólitos; ii) alterações na atividade enzimática e iii) mudanças nos padrões de proteínas. As plântulas possuem estratégias metabólicas que auxiliam na prevenção e atenuação dos danos do estresse, sendo a maioria dessas estratégias baseadas na regulação da expressão gênica. O produto dessa expressão gênica induzida pelo estresse geralmente são proteínas, que atuam na resposta da plântula (YAN et al., 2006).

Baixas temperaturas reduzem a porcentagem final e a velocidade de germinação e emergência das plântulas. Essa redução deve-se a embebição das sementes ocorrer lentamente em temperatura baixa, da mesma forma que a mobilização de reservas durante o processo germinativo (CRUZ et al., 2007; ZUCARELI et al., 2011). Assim, a emissão da raiz primária é retardada e o estabelecimento das plântulas é prejudicado (MARINI et al., 2012).

Zabot et al. (2008) avaliaram a influência da temperatura na germinação e crescimento de plântulas de feijão, testando as temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C. Esses autores verificaram que a máxima germinação e crescimento das plântulas ocorreram na temperatura de 25 °C, enquanto que em temperaturas baixas, especialmente 10 e 15 °C, a porcentagem de germinação e o número de plântulas normais na primeira contagem do teste de germinação, o índice de velocidade de germinação, o comprimento e a massa seca de plântulas foram reduzidos. Da mesma forma, Facin et al. (2014) estudaram a emergência, desenvolvimento inicial e a expressão de enzimas em sementes de duas cultivares de feijão e, concluíram que a temperatura de 17 °C reduz esses parâmetros avaliados.

A redução da velocidade de emergência e desenvolvimento inicial das plântulas em condição de baixa temperatura pode ainda afetar o estabelecimento da lavoura pela ação de insetos e microrganismos, pois as sementes e plântulas permanecem por um período maior de tempo abaixo da superfície do solo, aumentando as chances de ataque desses organismos danosos. Essa redução da germinação e crescimento inicial das plântulas é tão proeminente que sementes de feijão demoraram 16 dias para emitir a raiz primária em temperatura de 10 °C, enquanto que na temperatura ótima (25 °C) a emissão da radícula ocorreu em 48 horas (BADOWIEC; WEIDNER, 2014).

Além disso, sob condição de baixa temperatura as plantas são submetidas ao estresse oxidativo, em que espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas, tais como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (OH^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e oxigênio singlete ($1O_2$) (JALLEL et al., 2009; MIURA; TADA, 2014). A formação das EROs dá-se pela excitação do

oxigênio molecular (O_2), formando $1O_2$, ou pela adição sucessiva de elétrons ao O_2 , reduzindo-o ao radical $O_2^{\bullet-}$, radical OH^{\bullet} e H_2O_2 (D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007). As EROs são produzidas naturalmente nas células vegetais, porém, quando as plantas são submetidas a alguma condição de estresse, biótico ou abiótico, ocorre um aumento na produção (BONIFÁCIO et al., 2011; NOCTOR; MHAMDI; FOYER, 2014).

Para minimizar o efeito tóxico das EROs as plantas fazem uso de um sistema antioxidante, composto por enzimas que neutralizam a ação desses radicais gerados sob condições de estresse, entre elas a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX) e a guaiacol peroxidase (POD) (APEL; HIRT, 2004; HAYAT et al., 2010). Além das enzimas, as plantas também possuem antioxidantes não enzimáticos, que auxiliam no combate às EROs, como ascorbato, glutatona, β -caroteno e α -tocoferol (BARBOSA et al., 2014). Resumidamente, o estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes da planta, resultando em danos sobre as proteínas, carboidratos, lipídeos e DNA.

A enzima SOD catalisa a dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , menos reativo que o superóxido. No entanto o H_2O_2 ainda pode causar danos às células e, portanto, também deve ser removido. As enzimas CAT, POD e POX são responsáveis pela conversão do H_2O_2 em O_2 e água, sem produção de radicais livres (APEL; HIRT, 2004; NOCTOR; MHAMDI; FOYER, 2014).

Outra alteração que ocorre em plantas sob estresse é com relação à presença de hormônios vegetais, pois as plantas sintetizam vários compostos, entre os quais se incluem as auxinas, giberelinas, ácido abscísico, citocininas e etileno (KERBAUY, 2012). O ácido salicílico, incluído recentemente no grupo de hormônios vegetais, é fundamental para o crescimento e desenvolvimento das plantas, mas também desempenha um importante papel na indução de vários sinais de estresse e de tolerância a esses estresses (AMIN et al., 2013; CORCUERA; GIL-PELEGRIN; NOTIVOL, 2012; SYEED et al., 2011).

2.3 ÁCIDO SALICÍLICO E A TOLERÂNCIA DE PLANTAS À ESTRESSES ABIÓTICOS

O ácido salicílico (AS) pertence ao grupo bastante diverso dos compostos fenólicos, definidos como substâncias com um anel aromático ligado a um grupo hidroxil (COLLI, 2012). Sua síntese na planta ocorre a partir do aminoácido fenilalanina, que é um intermediário da biossíntese da maioria dos compostos fenólicos. As plantas possuem duas rotas metabólicas envolvidas na síntese de compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico e

a rota do ácido malônico, sendo que a maioria dos compostos fenólicos são sintetizados pela primeira rota, incluindo o AS (TAIZ; ZEIGER, 2004). Essa rota gera aminoácidos aromáticos como a fenilalanina, que por meio da eliminação de uma molécula de amônia forma ácido cinâmico, o qual pode ser convertido em ácido orto-cumárico ou em ácido benzóico, os quais geram AS (ARTECA, 1995; WILDERMUTH et al., 2001). Dependendo dos compostos intermediários gerados, a síntese do AS pode ocorrer apenas nos cloroplastos, ou nos cloroplastos e peroxissomos das células vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Considerado um hormônio vegetal amplamente distribuído entre os vegetais, o AS atua em diversos processos fisiológicos e bioquímicos da planta (VLOT; DEMPSEY; KLESSING, 2009; HAYAT et al., 2010; BOATWRIGHT; PAJEROWSKA-MUKHTAR, 2013; KANG; LI; GUO, 2014; KHAN et al., 2015). Entre os processos regulados pelo AS podem ser citados o fechamento estomático, absorção de nutrientes, síntese de clorofila e proteínas, inibição da síntese de etileno, desenvolvimento e produção de frutos, transpiração e fotossíntese, inibição da germinação de sementes e do crescimento de plantas, redução da transpiração e abscisão foliar (ASHRAF et al., 2010; KADIOGLU et al. 2011; KABIRI; FARAHDAKSHI; NASIBI, 2012; KERBAUY, 2012; AMIN et al., 2013; SHARAFIZAD et al., 2013).

O AS também desempenha importante papel na sinalização e resposta à estresses abióticos e bióticos durante a ciclo de cultivo de espécies agrícolas (ASHRAF et al., 2010; HAYAT et al., 2010; KHAN et al., 2015). No entanto, a eficiência do AS para esse propósito é dependente da concentração utilizada, da forma de aplicação, e da fase de desenvolvimento das plantas (MIURA; TADA, 2014).

Pesquisas recentes avaliaram o papel do AS exógeno na resposta das plantas a vários estresses abióticos, como deficiência hídrica (KADIAGLU et al., 2011; SARUHAM; SAGLAM; KADIAGLU, 2012; ANTONIC et al., 2016), salinidade (KHAN; ASGHER; KHAN, 2014; JAYAKANNAM et al., 2015; ANAYA et al., 2018), calor (KHAN et al., 2013) e metais pesados (PARASHAR et al., 2014; MORAVCOVÁ et al., 2018). Sob condição de baixa temperatura, estudou-se o efeito da aplicação de AS em milho (HORVÁTH et al., 2002; FAROOQ et al., 2008), tomate (DING et al., 2002), trigo (TASGÍN et al., 2006; ESIM; ATICI, 2015), pepino (LEI et al., 2010) e cevada (MUTLU et al., 2013, 2016).

Conforme Horváth et al. (2015) e Jayakannam et al. (2015), o AS endógeno e/ou exógeno em baixas concentrações, causa estresse moderado nas plantas, gerando EROs, especialmente H₂O₂, levando à ativação de vias de sinalização e induzindo o sistema antioxidante enzimático e não enzimático, que combate as EROs, minimizando os danos

provocados pelo estresse. Dessa forma, a aplicação de AS promove a ativação de enzimas antioxidantes nas plantas, como SOD, CAT, POD, e APX, permitindo maior tolerância das plantas ao estresse, conforme relatado por Mutlu et al. (2016) e Mellouk, Benammar e Hernandez (2016) em plantas de cevada e canola, respectivamente. No entanto, se a aplicação de AS for realizada em concentrações elevadas, o estresse oxidativo, gerado pela produção de EROs, será muito intenso, podendo ocasionar a morte celular (POÓR et al., 2011; MIURA; TADA, 2014).

Nesse sentido, estudos demonstram que aplicações exógenas de AS podem diminuir os sintomas induzidos por estresse abiótico em espécies vegetais, entre eles o estresse de baixa temperatura. Senaratna et al. (2000) estudaram a aplicação de AS em sementes de feijão e a indução de tolerância ao estresse por baixa temperatura em plantas com 21 dias. Esses autores embeberam sementes de feijão em solução de 500 μM de AS durante 24 horas, posteriormente, as plantas com 21 dias foram submetidas à temperatura de 0° C por 48 horas e nenhum dano foi verificado. Enquanto que as plantas oriundas de sementes não embebidas com o hormônio vegetal mostraram sintomas típicos de danos pelo frio, como murcha das folhas, necrose e dessecação da maior parte das folhas.

Resultados satisfatórios também foram observados em plântulas de milho submetidas à germinação sob baixa temperatura (15 °C) com a embebição das sementes em 2000 μM de AS por 24 horas antes da semeadura (WANG et al., 2012). Com a aplicação de AS, esses autores obtiveram maior porcentagem de germinação, crescimento e acúmulo de massa de plântulas, comparado às sementes sem embebição antes da semeadura.

Em milho e cevada, Farooq et al. (2008) e Mutlu et al. (2013, 2016), respectivamente, observaram que a aplicação de AS promoveu a ativação de enzimas antioxidantes, como CAT, SOD e POD, além de reduzir a peroxidação lipídica nas plantas submetidas ao estresse por baixa temperatura. Baseado nisso, os autores concluíram que o AS pode ser utilizado para reduzir os danos provocados pelo estresse de baixa temperatura nas plantas.

O AS tem-se mostrado eficiente na tolerância de plantas a outros estresses abióticos, além de baixa temperatura e, em diferentes estádios de desenvolvimento das plantas. Nazar et al. (2011) constataram que a aplicação de 500 μM de AS em plantas de feijão, submetidas ao estresse salino, promoveu maior assimilação de nutrientes e aumentou a atividade das enzimas APX e glutathione redutase (GR), contribuindo com a tolerância das plantas ao estresse. No entanto, a concentração de 1000 μM de AS inibiu a tolerância das plantas ao estresse, demonstrando que em concentrações elevadas o AS provoca efeito inverso ao esperado, tornando-se tóxico às plantas. Sob estresse hídrico, Agostini, Machado Neto e Custódio

(2013) concluíram que a embebição das sementes por 48 horas em AS (10 μ M) promoveu maior crescimento e massa seca das plântulas de feijão, porém não alterou a porcentagem de germinação das sementes.

Como se verifica na literatura, estudos sobre a tolerância de plantas a estresses abióticos utilizando AS vêm sendo realizados para as mais diversas espécies e tipos de estresse. Porém, mais pesquisas envolvendo concentrações de AS, formas e época de aplicação devem ser realizadas para contribuir com pesquisas já existentes. Dessa forma, se fazem necessários estudos que busquem estas informações para a cultura do feijoeiro, na fase inicial de seu desenvolvimento sob condição de baixa temperatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, E. A. T.; MACHADO NETO, N. B.; CUSTODIO, C. C. Induction of water deficit tolerance by cold shock and salicylic acid during germination in the common bean. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 2, p. 209–219, 2013.

ANAYA, F. et al. Influence of salicylic acid on seed germination of *Vicia faba* L. under salt stress. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2018.

AMIN, A. A. et al. Physiological effects of salicylic acid and thiourea on growth and productivity of maize plants in sandy soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 44, n. 7, p. 1141-1155, 2013.

ANTONIC, D. et al. Effects of exogenous salicylic acid on *Impatiens walleriana* L. grown *in vitro* under polyethylene glycol-imposed drought. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 226-223, 2016.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373-399, 2004.

ARTECA, R. N. **Plant growth substances; principles and applications**. New York: Chapman; Hall, 1995. 332p.

ASHRAF, M. et al. Physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 29, n. 3, p. 162-190, 2010.

BADOWIEC, A; WEIDNER, S. Proteomic changes in the roots of germinating *Phaseolus vulgaris* seeds in response to chilling stress and post-stress recovery. **Journal of Plant Physiology**. v. 171, n. 6, p. 389-398, 2014.

BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v.44, n.3, p.453-460, 2014.

BOATWRIGHT, J. L.; PAJEROWSKA-MUKHTAR, K. Salicylic acid: an old hormone up to new tricks. **Molecular Plant Pathology**, v.14, n. 6, p. 623–634, 2013.

BONIFÁCIO, A.; et al. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, n. 10, p. 1705-1722, 2011.

COCHRANE, A. et al. Predicting the impact of increasing temperatures on seed germination among populations of Western Australian *Banksia* (Proteaceae). **Seed Science Research**, v. 24, n. 3, p. 195-205, 2014.

COLLI, S. Outros reguladores: brassinosteróides, poliaminas, ácidos jasmônico e salicílico. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 296-302.

COMISSÃO TÉCNICA SUL BRASILEIRA DE FEIJÃO. **Informações técnicas para o cultivo de feijão na Região Sul brasileira**. Florianópolis: Epagri. 2012. 157p.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, Brasília. Abr., v.5, n.7, 144p. 2018.

CORCUERA, L.; GIL-PELEGRIN, E.; NOTIVOL, E. Aridity promotes differences in proline and phytohormone levels in *Pinus pinaster* populations from contrasting environments. **Trees**, v, 26, n. 3, p. 799-808, 2012.

CRUZ, H. L. et al. Avaliação de genótipos de milho para semeadura precoce sob influência de baixa temperatura. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 1, p. 52-60, 2007.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M.B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.8, p.813-824, 2007.

DING, C. K. et al. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. **Planta**, v. 214, n. 6, p. 895-901, 2002.

ESIM, N.; ATICI, O. Effects of exogenous nitric oxide and salicylic acid on chilling-induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum*). **Frontiers Life Science**, v. 8, n. 2, p. 124-130, 2015.

FACIN, F. et al. Vigor de sementes e crescimento inicial de plantas de feijão sob efeito de baixa temperatura. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 8, n. 4, p. 35-40, 2014.

FAROOQ, M. et al. Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid. **Journal Agronomy Crop Science**, v. 194, n. 2, p. 161-168, 2008.

GALVÁN, M. Z. et al. Genetic diversity among northwestern Argentinian cultivars of common bean *Phaseolus vulgaris* L. as revealed by RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 48, n. 3, p. 251-260, 2001.

GALVÁN, M. Z. et al. Genetic diversity among wild common beans from northwestern Argentina based on morphoagronomic and RAPD data. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, p. 891-900, 2006.

HAYAT, Q. et al. Effect of exogenous salicylic acid under changing environmental: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, n. 1, p. 14-25, 2010.

HORVÁTH, E. et al. *In vitro* salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. **Plant Science**, v. 163, n. 3, p. 1129-1135, 2002.

HORVÁTH, E. et al. Hardening with salicylic acid induces concentration-dependent changes in abscisic acid biosynthesis of tomato under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 183, p. 54-63, 2015.

JALEEL, C. A. et al. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 11, n. 1, p. 100-105, 2009.

JAYAKANNAN, M. et al. Salicylic acid in plant salinity stress signaling and tolerance. **Plant Growth Regulation**, v. 76, n. 1, p. 25-40, 2015.

KABIRI, R.; FARAHDAKSHI, H.; NASIBI, F. Effect of drought stress and its interaction with salicylic acid on black cumin (*Nigella sativa*) germination and seedling growth. **World Applied Sciences Journal**, v.18, n.4, p.520-527, 2012

KADIOGLU, A. et al. Exogenous salicylic acid alleviates effects of long term drought stress and delays leaf rolling by inducing antioxidant system. **Plant Growth Regulation**, v. 64, n. 1, p. 27-37, 2011.

KANG, G.; LI, G.; GUO, T. Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.36, n.9, p.2287-2297, 2014.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 431p.

KHAN, M. I. R.; ASGHER, M.; KHAN, N. A. Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 67-74, 2014.

KHAN, M. I. R. et al. Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 11, 2013.

KHAN, M. I. R. et al. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanism plants. **Frontier in Plant Science**, v. 6, n. 462, 2015.

KHAN, S. U. et al. Abscisic acid and salicylic acid seed treatment as potent inducer of drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, Special Issue, p. 43-49, 2012.

- LEI, T et al. The alternative pathway in cucumber seedlings under low temperature stress was enhanced by salicylic acid. **Plant Growth Regulation**, v. 60, p. 35-42, 2010.
- LÓPEZ, A. M. L. et al. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 4, p. 277-283. 2006.
- MACHADO NETO, N.B. et al. Temperature effects on seed germination in races of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, n. 2, p.155-164, 2006.
- MARINI, P. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de arroz submetidas ao estresse térmico. **Revista Ciência Agrônômica**, v, 43, n. 4, p. 722-730, 2012.
- MARTEL, A. B.; QADERI, M. M. Does salicylic acid mitigate the adverse effects of temperature and ultraviolet-B radiation on pea (*Pisum sativum*) plants? **Environmental and Experimental Botany**, v. 122, p. 39-48, 2016.
- MELLOUK, Z.; BENAMMAR, I.; HERNANDEZ, Y. Effects of foliar application with salicylic acid on the biochemical parameters and redox status in two canola plant varieties exposed to cold stress. **International Journal of Agronomy and Agricultural Research**, v. 8, n. 5, p. 77-87, 2016.
- MIURA, K.; TADA, Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. **Frontiers Plant Science**, v. 5, n. 4, p. 1-12, 2014.
- MOLAZEM, D; BASHIRZADEH, A. Effects of salicylic acid and salinity on growth of maize plant (*Zea mays* L.).**International Journal of Biosciences**, v. 4, n. 9, p. 76-82, 2014
- MORAVCOVÁ, S. et al. Influence of salicylic acid pretreatment on seeds germination and some defence mechanisms of *Zea mays* plants under copper stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 122, n. 1, p. 19-30, 2018.
- MOTA, L. A. S. da, GARCIA, Q. S. Germination patterns and ecological characteristics of *Vellozia* seeds from high-altitude sites in south-eastern Brazil. **Seed Science Research**, v. 23, n. 1, p. 67-74, 2013.
- MUTLU, S. et al. Exogenous salicylic acid alleviates cold damage by regulating antioxidative system in two barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. **Frontiers in Life Science**, v. 9, n. 2, p. 99-109, 2016.
- MUTLU, S. et al. Protective role of salicylic acid applied before cold stress on antioxidative system and protein patterns in barley apoplast. **Biologia Plantarum**, v. 57, n. 3, p. 507-513, 2013.
- NAZAR, R. et al. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 8, p. 807-815, 2011.

NAZAR, R. et al. Salicylic acid supplementation improves photosynthesis and growth in mustard through changes in proline accumulation and ethylene formation under drought stress. **South African of Botany**, v. 98, p. 84-94, 2015.

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C. H. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. **Plant Physiology**, v. 164, n. 4, p. 1636-1648, 2014.

PARASHAR, A. et al. Salicylic acid enhances antioxidant system in *Brassica juncea* grown under different levels of manganese. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 551-558, 2014.

POÓR, P. et al. Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with stomatal response, CO₂ fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato, and decrease harmful effects of subsequent salt stress. **Plant biology**, v. 13, n. 1, p. 105-114, 2011.

SARUHAM, N.; SAGLAM, A.; KADIAGLU, A. Salicylic acid pretreatment induces drought tolerance and delays leaf rolling by inducing antioxidant systems in maize genotypes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 1, p. 97-106, 2012.

SATHE, S. K.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. Dry beans of Phaseolus. A review. Part 2. Chemical composition: Carbohydrates, fiber, minerals, vitamins and lipids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 21, n. 2, p. 41-91, 1984.

SENARATNA, T. et al. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. **Plant Growth Regulation**. v. 30, n. 2, p. 157-161. 2000.

SHARAFIZAD, M. et al. Effect of salicylic acid pretreatment on germination of wheat under drought stress. **Journal of Agricultural Science**, v.5, n.3, p.179-199, 2013.

SINGH, S. P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, v. 45, n. 3, p. 379-396, 1991.

SU, F. C. et al. A novel MYBS3-dependent pathway confers cold tolerance in rice. **Plant Physiology**, v. 153, n. 1, p. 145–158, 2010.

SYEED, S. et al. Salicylic acid-mediated changes in photosynthesis, nutrients content and antioxidant metabolism in two mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in salt tolerance. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 3, p. 877-886, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TASGIN, E. et al. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. **Phytochemistry**, v. 67, n. 7, p. 710-715, 2006.

VLOT, A. C.; DEMPSEY, D. A.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, n. 1, p. 177–206, 2009.

VIVAN, F. A. et al. Rendimento e rentabilidade das culturas da soja, milho e feijão cultivados em condições de sequeiro. **Semina**, v. 36, n. 5, p. 2943-2950, 2015.

WANG, Y. et al. Salicylic acid analogues with biological activity may induce chilling tolerance of maize (*Zea mays*) seeds. **Botany**, v. 90, n. 9, p. 845-855, 2012.

WILDERMUTH, M. C. et al. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, v. 414, n. 19, p. 562-565, 2001.

WORTHINGTON, M. et al. Genetic composition and spatial distribution of farmer-managed *Phaseolus vulgaris* bean plantings: an example from a Village in Oaxaca, México. **Crop Science**, v. 52, n. 4, p. 1721-1735, 2012.

YAN, S. P. et al. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 3, p. 484-496, 2006.

ZABOT, L. et al. Temperatura e qualidade fisiológica no crescimento de plântulas de feijoeiro. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 14, n. 4, p. 60-64, 2008.

ZUCARELI, C. et al. Métodos e temperaturas de hidratação na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 3, p. 684-692, 2011.

3. CAPÍTULO I

QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE FEIJÃO SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO SALICÍLICO

RESUMO

O ácido salicílico atua em diversos processos fisiológicos nas plantas, além de agir na sinalização e indução de tolerância de plantas aos estresses bióticos e abióticos, como doenças, deficiência hídrica, salinidade e temperaturas extremas. Dessa forma, faz-se necessário conhecer o efeito do ácido salicílico na qualidade fisiológica de sementes de feijão, pois em concentrações adequadas este produto pode ser utilizado na germinação das sementes e no desenvolvimento das plântulas em condição estressante. Assim, o objetivo desse estudo foi determinar se o ácido salicílico interfere na qualidade fisiológica de sementes de feijão embebidas em diferentes concentrações, testando-se duas metodologias de embebição das sementes. Utilizou-se sementes de feijão das cultivares Fepagro 26 e SCS204 Predileto. As sementes foram embebidas em soluções de ácido salicílico com concentrações de zero, 250, 500, 750, 1000, 3000 e 5000 μM . A embebição das sementes ocorreu de duas formas: [1] papel de germinação umedecido com as soluções de ácido salicílico, e [2] embebição das sementes nas soluções de ácido salicílico em caixas plásticas por 24 horas e posterior semeadura em papel de germinação umedecido com água destilada. O experimento foi mantido em câmara de germinação sob a temperatura de 25 °C e com luz constante. No quinto dia após a semeadura determinou-se o número de plântulas normais (primeira contagem), comprimento, massa fresca e seca de plântula. A porcentagem de germinação foi avaliada aos nove dias após a semeadura. Utilizaram-se quatro repetições com 50 sementes para cada tratamento, sendo o estudo conduzido no delineamento inteiramente casualizado. Realizou-se análise de regressão para as concentrações de ácido salicílico, não comparando-se as cultivares. Concluiu-se que o ácido salicílico em concentrações até 1000 μM não prejudica a germinação de sementes de feijão das cultivares Fepagro 26 e Predileto, utilizando-se a embebição das sementes por 24 horas e a embebição no papel de germinação. Concentrações de ácido salicílico até 1000 μM e embebição das sementes por 24 horas não afeta o vigor (primeira contagem) das duas cultivares de feijão.

Palavras-chaves: Embebição. Germinação. *Phaseolus vulgaris*. Vigor.

PHYSIOLOGICAL QUALITY OF BEAN SEEDS SUBMITTED TO DIFFERENT SALICYLIC ACID CONCENTRATIONS

ABSTRACT

Salicylic acid acts on several physiological processes in plants, besides acting on the signaling and induction of plant tolerance to biotic and abiotic stresses, such as diseases, water deficiency, salinity and extreme temperatures. Thus, it is necessary to know the effect of salicylic acid on the physiological quality of bean seeds, because in adequate concentrations this product can be used in seed germination and seedling development under stressful conditions. Thus, the purpose of this study was to determine if salicylic acid interferes with the physiological quality of bean seeds imbibed at different concentrations by testing two seed imbibition methodologies. Bean seeds of the cultivars Fepagro 26 and SCS204 Predileto were used. The seeds were soaked in solutions of salicylic acid with concentrations of zero, 250, 500, 750, 1000, 3000 and 5000 μM . Seed imbibition occurred in two ways: [1] germination paper moistened with salicylic acid solutions, and [2] imbibition of the seeds in salicylic acid solutions in plastic boxes for 24 hours and subsequent sowing on germination paper moistened with distilled water. The experiment was kept in a germination chamber under a temperature of 25 °C and with constant light. On the fifth day after sowing the number of normal seedlings (first count), length, fresh and dry mass of seedlings were determined. The percentage of germination was evaluated nine days after sowing. Four replicates with 50 seeds were used for each treatment, and the study was conducted in a completely randomized design. Regression analysis was performed for salicylic acid concentrations, not comparing the cultivars. It was concluded that the salicylic acid in concentrations up to 1000 μM does not affect the germination of bean seeds of the cultivars Fepagro 26 and Predileto, using the soaking of the seeds for 24 hours and the imbibition in the paper of germination. Salicylic acid concentrations up to 1000 μM and soaking the seeds for 24 hours does not affect the vigor (first count) of the two bean cultivars.

Keywords: Imbibition. Germination. *Phaseolus vulgaris*. Vigor.

3.1 INTRODUÇÃO

O ácido salicílico (AS) é considerado um hormônio vegetal amplamente distribuído entre os vegetais, que em baixas concentrações atua em diversos processos fisiológicos e bioquímicos da planta (BOATWRIGHT; PAJEROWSKA-MUKHATR, 2013; KHAN et al., 2015). Entre os processos regulados pelo AS podem ser citados o fechamento estomático, absorção de nutrientes, síntese de clorofila e proteínas, desenvolvimento de frutos, abscisão foliar, inibição da síntese de etileno, da germinação de sementes e do crescimento de plantas (ASHRAF et al., 2010; KADIAGLU et al., 2011; KABIRI; FARAHDAKHS; NASIBI, 2012; SHARAFIZAD et al., 2013).

Além disso, o AS também está envolvido na obtenção de respostas específicas de plantas sob estresse biótico (VLOT; DEMPSEY; KLESSING, 2009) e abiótico (AZOOZ; YOUSSEF, 2010; NAZAR et al., 2011; SYEED et al., 2011; VICENTE; PLASENCIA, 2011; CORCUERA; GILL-PELEGRIN; NOTIVOL, 2012; AMIN et al., 2013). Conforme Hayat et al. (2010) e Kang et al. (2014) o AS atua como uma molécula sinalizadora de estresse, mediando processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares em plantas sob condições ambientais desfavoráveis ao desenvolvimento. O AS é responsável pela ativação de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase, catalase, entre outras, que atuam sobre radicais livres presentes nas células, reduzindo as espécies reativas de oxigênio (EROs) e a peroxidação lipídica (BONIFÁCIO et al., 2011; JAYAKANNAN et al., 2015).

Estudos têm demonstrado que a aplicação exógena de baixas concentrações de AS em plantas promove alterações fisiológicas, como acréscimo na estatura de plantas, na área foliar e no diâmetro do caule (HUSSEIN; BALBAA; GABALLAH, 2007), incremento no teor de pigmentos fotossintetizantes (HAYAT et al., 2005) e aumento da germinação e do crescimento de plântulas (SHAKIROVA et al., 2003).

No entanto, o efeito do AS na germinação de sementes tem sido controverso, pois há relatos sugerindo que ele pode inibir ou aumentar o potencial de germinação das sementes. Os resultados contraditórios podem estar relacionados às concentrações de AS utilizadas e forma de aplicação do produto nas sementes (HE et al., 2010; MARCINSKA et al., 2013; HORVÁTH et al., 2015; HUANG et al., 2016). Em *Arabidopsis thaliana*, Rajjou et al. (2006) constataram que a aplicação exógena de 1000 μM de AS inibiu a germinação de sementes dessa espécie. Em cevada, concentração de 250 μM de AS inibiu a germinação das sementes (XIE et al., 2007), enquanto que no milho a germinação é completamente inibida quando

utilizadas concentrações de AS mais elevadas, variando de 3000 a 5000 μM (GUAN; SCANDALIOS, 1995).

Trabalhando com *Vicia faba*, Anaya et al. (2018) também observaram redução na germinação com a utilização de AS na concentração de 250 a 1000 μM , na embebição de sementes por oito horas. No entanto, sementes de trigo tratadas com 50 μM de AS expressaram maior vigor, obtendo-se plântulas com maior crescimento (SHAKIROVA, 2007).

Na grande maioria das pesquisas utiliza-se a aplicação de AS na embebição das sementes por um determinado período de tempo, geralmente horas (AGOSTINI; MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2013; YAMAMOTO et al., 2014). Nesse caso, o AS é absorvido juntamente com a água durante o início do processo de embebição das sementes e, posteriormente, as sementes são submetidas à germinação em substratos com ausência de AS. Porém, em alguns casos, o AS é fornecido às sementes de forma contínua durante a germinação, por umedecimento do substrato utilizado. Assim, o AS fica em contato com as sementes por mais tempo, sendo a interferência sobre a germinação e o vigor mais proeminente (CARVALHO et al., 2007).

Como se verifica na literatura, muitos estudos estão sendo conduzidos com o objetivo de elucidar o efeito da aplicação exógena de AS sobre parâmetros de germinação e desempenho de plântulas de diversas espécies agrícolas, mas ainda surgem dúvidas com relação às concentrações utilizadas e a forma de aplicação desse produto sobre as sementes. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi determinar se o AS interfere na qualidade fisiológica de sementes de feijão embebidas em diferentes concentrações, testando-se duas metodologias de embebição das sementes.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório Didático e de Pesquisas em Sementes (LDPS), do Departamento de Fitotecnia, na Universidade Federal de Santa Maria. Foram utilizadas sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) das cultivares Fepagro 26 e SCS204 Predileto. As sementes utilizadas nesse estudo foram produzidas na área experimental do Departamento de Fitotecnia, no período de setembro a dezembro de 2016, sendo os tratamentos culturais realizados conforme as indicações técnicas para a cultura. Após a colheita manual, as sementes foram separadas por tamanho visando uniformizar o material utilizado no estudo.

Inicialmente as sementes foram avaliadas quanto às características físicas e fisiológicas, pelos seguintes testes:

Peso de mil sementes: oito repetições de 100 sementes foram pesadas, determinando-se o peso de 1000 sementes, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009).

Grau de umidade: determinado pelo método de estufa 105 °C por 24 horas, utilizando-se duas subamostras de 5 g, conforme Brasil (2009).

Teste de germinação: foram semeadas quatro repetições de 50 sementes, em rolo de papel de germinação umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram mantidos em câmara de germinação (BOD), sob luz constante e temperatura de 25 °C. A avaliação de germinação foi feita no nono dia após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

Primeira contagem da germinação: realizada conjuntamente com o teste de germinação, sendo determinada a porcentagem de plântulas normais no quinto dia após a instalação do teste (BRASIL, 2009).

Comprimento de plântula: foi realizado com quatro repetições de 20 sementes, semeadas em duas linhas desencontradas no terço superior do papel de germinação, e mantidas na mesma condição do teste de germinação. No quinto dia após a semeadura foi medido o comprimento da parte aérea e da raiz primária de dez plântulas normais de cada repetição, com uma régua graduada, conforme Nakagawa (1999).

Massa seca de plântula: as dez plântulas normais oriundas do teste de comprimento foram separadas em parte aérea e raiz primária e levadas para estufa a 65 °C por 48 horas para determinação da massa seca de plântulas (NAKAGAWA, 1999).

Emergência a campo: quatro repetições de 50 sementes foram semeadas em linhas de 1 m, com espaçamento entre si de 0,2 m e em sulcos de 0,03 m de profundidade. Diariamente foi avaliado o número de plântulas emergidas para determinação do tempo médio de emergência (TME) conforme descrita por Edmond e Drapala (1958). A avaliação de emergência foi feita no nono dia após a semeadura, considerando-se emergidas as plântulas cujos cotilédones não mais tocavam a superfície do solo. O resultado foi expresso em porcentagem de emergência.

Após a caracterização, as sementes foram submetidas à germinação sob diferentes concentrações de ácido salicílico (AS) (Sigma-Aldrich®): zero, 250, 500, 750, 1000, 3000 e 5000 µM. O AS foi fornecido às sementes de duas formas: [1] no papel de germinação umedecido com as soluções de AS; [2] embebição das sementes nas soluções de AS em

plásticas por 24 horas. No primeiro caso, foi realizada a semeadura de 50 sementes em rolos de papel de germinação umedecido com as soluções de AS já citadas, na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos em câmara de germinação (BOD) sob luz constante e temperatura de 25 °C.

No segundo caso, 50 sementes foram colocadas para embeber em caixas plásticas (gerbox) sobre três folhas de papel de germinação umedecidas com 25 mL de solução de AS nas concentrações já mencionadas. As sementes permaneceram embebendo durante 24 horas, em BOD sob luz constante e temperatura de 25 °C. Após esse período de embebição, as sementes foram colocadas para germinar em papel de germinação umedecido apenas com água destilada, na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram embalados em sacos plásticos, mantidos em BOD, sob luz contínua e temperatura de 25 °C.

Para ambos os casos, no quinto dia após a semeadura foi avaliada a porcentagem de plântulas normais da primeira contagem (vigor) e no nono dia a porcentagem de germinação, conforme Brasil (2009). Também no quinto dia 10 plântulas normais de cada repetição, retiradas da linha superior do teste de germinação, foram medidas com o auxílio de uma régua milimétrica, para obtenção do comprimento de parte aérea e raiz primária de plântula. Foram retirados os cotilédones dessas plântulas e as mesmas foram seccionadas em parte aérea e raiz primária, para posterior pesagem e determinação da massa fresca. Para a determinação da massa seca, as partes das plântulas foram colocadas em sacos de papel e levadas para a estufa com temperatura de 65 °C, onde permaneceram por 48 horas. Após esse tempo foram pesadas para obtenção da massa seca de parte aérea e raiz primária de plântula (NAKAGAWA, 1999).

O estudo foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por 50 sementes. Inicialmente, foi realizada a verificação das pressuposições do modelo matemático, pelo software Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2016). No caso do não atendimento da normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias, os dados foram transformados pela metodologia \sqrt{x} . Os dados em porcentagem foram transformados pela equação: arco-seno $\sqrt{\%/100}$.

As formas de embebição das sementes com AS (papel de germinação e em caixas plásticas por 24 horas) e as cultivares foram analisadas separadamente. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) e análise de regressão ($p < 0,05$) através do software Sisvar[®] (FERREIRA, 2011).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que as sementes de ambas as cultivares apresentaram umidade adequada para o armazenamento e condução dos demais testes, conforme Bragantini (2005) e Silva et al. (2010); além disso, as sementes apresentaram elevado vigor e germinação (Tabela 3.1). Os dados da caracterização dos lotes de sementes não foram submetidos à análise estatística, pois o objetivo foi demonstrar a qualidade física e fisiológica inicial das sementes.

Tabela 3.1 - Grau de umidade (U), peso de mil sementes (PMS), germinação (G), primeira contagem (PC), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz primária (CR), comprimento total de plântula (CT), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz primária (MSR), massa seca total de plântula (MST), emergência a campo (EC) e tempo médio de emergência (TME) de sementes das cultivares de feijão Fepagro 26 e Predileto.

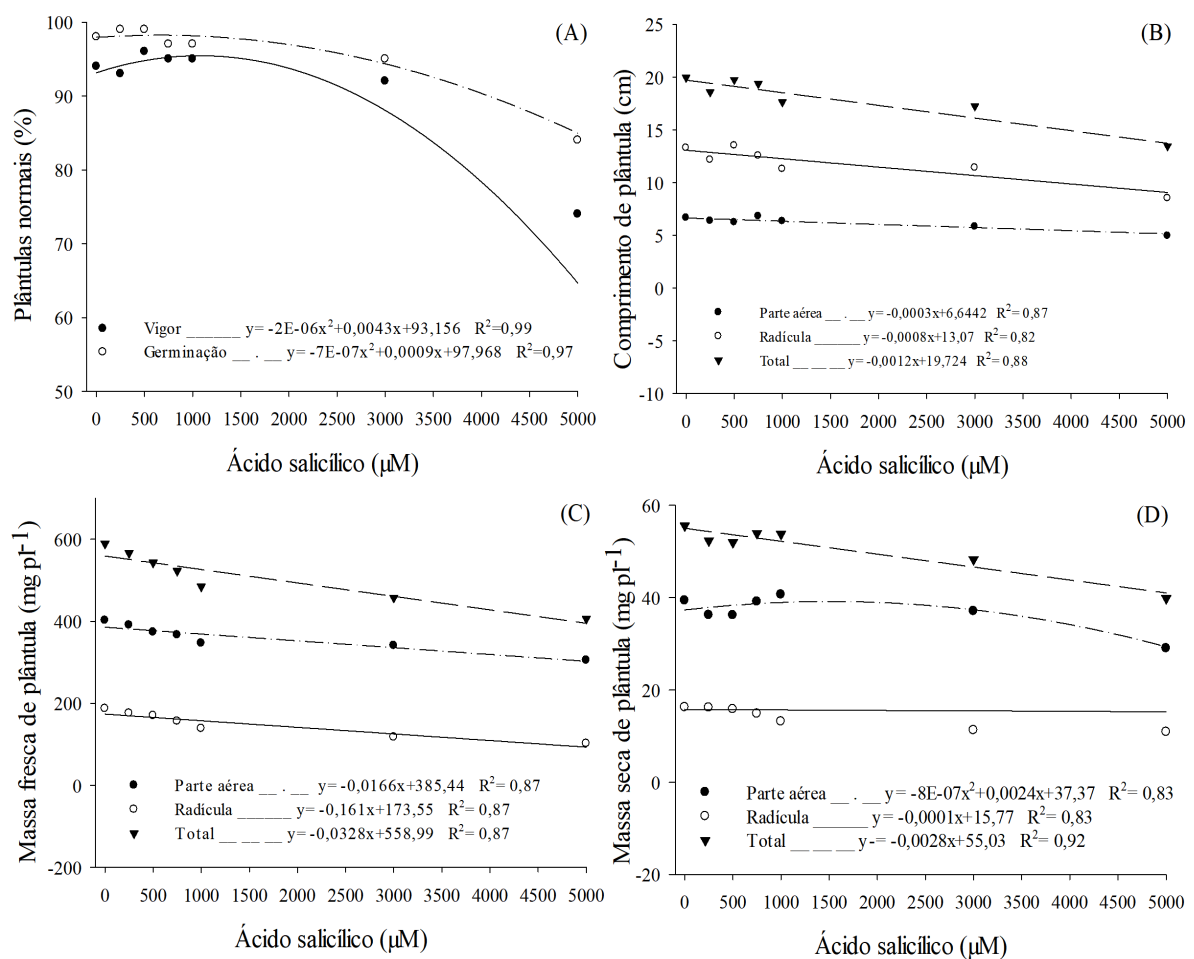
	Fepagro 26	Predileto
U (%)	10,9	10,9
PMS (g)	206,9	232,3
G (%)	96	97
PC (%)	90	91
CPA (cm)	5,63	6,63
CR (cm)	14,32	13,90
CT (cm)	19,95	20,54
MSPA (mg pl ⁻¹)	35,62	34,57
MSR (mg pl ⁻¹)	18,20	16,95
MST (mg pl ⁻¹)	53,82	51,52
EC (%)	100	98
TME (dias)	2,12	1,85

* Dados não submetidos à análise estatística.

Utilizando-se o método de embebição no papel de germinação, verificou-se que a máxima germinação e vigor (primeira contagem) das sementes da cultivar Fepagro 26 foram obtidas com as concentrações de 642 e 1075 μM de AS, respectivamente (Figura 3.1A). Porém, como pode-se observar, os valores obtidos para essas variáveis mantiveram-se estáveis até concentrações próximas à 1000 μM , demonstrando que a aplicação exógena de AS, quando em baixas concentrações, não prejudica a germinação das sementes dessa espécie,

em condições de temperatura ou umidade ótima para a germinação. Corroborando com isso, Alonso-Ramírez et al. (2009), afirmam que a aplicação de AS em sementes só apresenta efeito positivo na germinação em condições de estresse, pois esse hormônio vegetal não é essencial para a germinação e o crescimento das plântulas em condições ideais (LEE; KIM; PARK, 2010).

Figura 3.1 - Primeira contagem (vigor) e germinação (A), comprimento de plântula (B), massa fresca de plântula (C) e massa seca de plântula (D) de feijão da cultivar Fepagro 26 submetidas à germinação sob diferentes concentrações de ácido salicílico pelo método de embebição do papel de germinação.



Nas concentrações de 3000 μM e 5000 μM de AS a porcentagem de plântulas normais na primeira contagem e na germinação sofreu redução. O efeito negativo do AS sobre a germinação é, provavelmente, devido ao estresse oxidativo induzido pelo produto. Segundo Poór et al (2011) e Miura e Tada (2014), quando a concentração de AS utilizada é muito elevada, ocorre a produção de EROs, especialmente peróxido de hidrogênio (H_2O_2), acarretando em intenso estresse oxidativo, que provoca a degradação de lipídeos de

membrana, morte celular e, culmina inviabilizando ou reduzindo a germinação das sementes. Em plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas com 1000 a 5000 μM de AS observou-se que os níveis de H_2O_2 triplicou, devido ao aumento da atividade da enzima superóxido dismutase e inativação das enzimas degradantes de H_2O_2 , a catalase e ascorbato peroxidase (RAO et al., 1997).

Observou-se para o comprimento de plântulas um comportamento decrescente com o aumento da concentração de AS, ajustando-se equações lineares para o comprimento da raiz primária, parte aérea e total de plântula (Figura 3.1B). Esses resultados vão de encontro com Yamamoto et al. (2014) que observaram um incremento no comprimento de plântulas de feijão oriundas de sementes embebidas em AS por 48 horas, porém não diferindo do tratamento testemunha, sem AS.

Os resultados obtidos para a massa fresca de plântula (Figura 3.1C) correlacionam-se com o comprimento, ou seja, houve redução do acúmulo de massa fresca com a aplicação de AS. Esses resultados já eram esperados, visto que, a redução do comprimento das plântulas (Figura 3.1B), conseqüentemente implica em menor taxa de mobilização de reservas dos cotilédones para as plântulas, originando plântulas com menor massa.

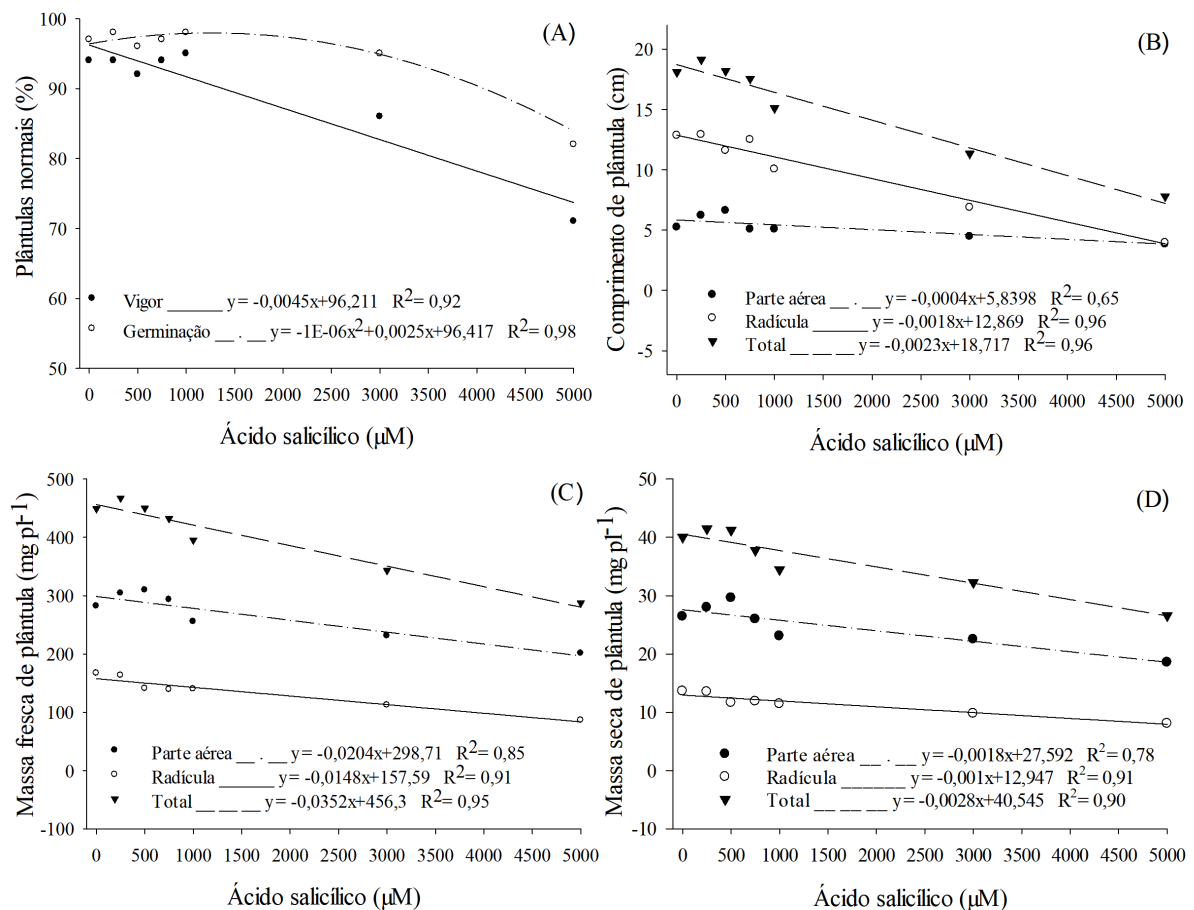
A massa seca de raiz primária e massa seca total de plântula sofreram redução linear com o aumento da concentração de AS utilizada (Figura 3.1D). No entanto, a massa seca da parte aérea de plântula apresentou comportamento quadrático, sendo obtido um ponto de máxima em 1500 μM de AS. Em estudos conduzidos com trigo e feijão, El-Tayeb e Ahmed (2010) e Agostini, Machado Neto e Custódio (2013), respectivamente, também observaram incremento na massa seca de plântulas com a aplicação de AS. Porém, nesses casos os autores também verificaram aumento no comprimento das plântulas, o que não foi observado nesse trabalho.

Para a porcentagem de germinação de sementes de feijão da cultivar Predileto submetidas à germinação com a aplicação de AS pelo método de embebição do papel de germinação (Figura 3.2A), ajustou-se aos dados uma equação quadrática com um ponto de máxima em 1250 μM de AS, obtendo-se 98% de germinação. Conforme Kabiri, Farahdakhsh e Nasibi (2012), determinadas concentrações de AS, dependendo da espécie, podem promover a ativação de enzimas antioxidantes, que controlam as EROs durante o processo de germinação das sementes, reduzindo a peroxidação lipídica e assim, estimulando a germinação. Com trigo, Sharafizad et al. (2013) verificaram que a embebição das sementes em solução de 700 μM de AS por 24 horas antes da semeadura promoveu um aumento no potencial de germinação das sementes, sendo que concentrações maiores de AS inibiram a

germinação.

No entanto, a porcentagem de plântulas normais na primeira contagem do teste de germinação (vigor) sofreu redução com o aumento da concentração de AS (Figura 3.2A). Pode-se observar que a primeira contagem por ser um teste de vigor é mais sensível aos tratamentos com AS quando comparada à porcentagem de germinação. Novamente, sob concentrações de AS acima de 3000 μM , a redução da germinação e do vigor acentuou-se, confirmando o efeito tóxico exercido pelo produto sobre a qualidade fisiológica das sementes.

Figura 3.2 - Primeira contagem (vigor) e germinação (A), comprimento de plântula (B), massa fresca de plântula (C) e massa seca de plântula (D) de feijão da cultivar Predileto submetidas à germinação sob diferentes concentrações de ácido salicílico pelo método de embebição do papel de germinação.



Assim como para a cultivar Fepagro 26, o crescimento das plântulas da cultivar Predileto submetidas ao AS foi prejudicado, reduzindo o comprimento das mesmas (Figura 3.2B). Nesse caso, destaca-se que o comprimento da raiz primária foi mais afetado comparado ao comprimento da parte aérea. Esse resultado concorda com Tonel et al. (2013) que

observaram redução do crescimento de plântulas de milho oriundas de sementes embebidas em 1000 μM de AS durante uma hora antes da semeadura, sendo essa redução mais acentuada no comprimento da raiz primária das plântulas.

Observou-se redução no acúmulo de massa fresca e seca de plântulas com a utilização de AS (Figuras 3.2C e 3.2D), ajustando para todas essas variáveis equações lineares. Assim, o AS reduziu o crescimento e a alocação de reservas dos cotilédones para a plântula. Esses resultados corroboram com Ashraf et al. (2010), que demonstraram que o AS tende a inibir o crescimento das plantas através da regulação da síntese de lignina, resultando no endurecimento da parede celular (GALLEGO-GIRALDO et al., 2011) ou por meio da síntese do hormônio ácido indolacético (AIA), que atua na inibição do crescimento (IGLESIAS; TERRILE; CASALONGUÉ, 2011).

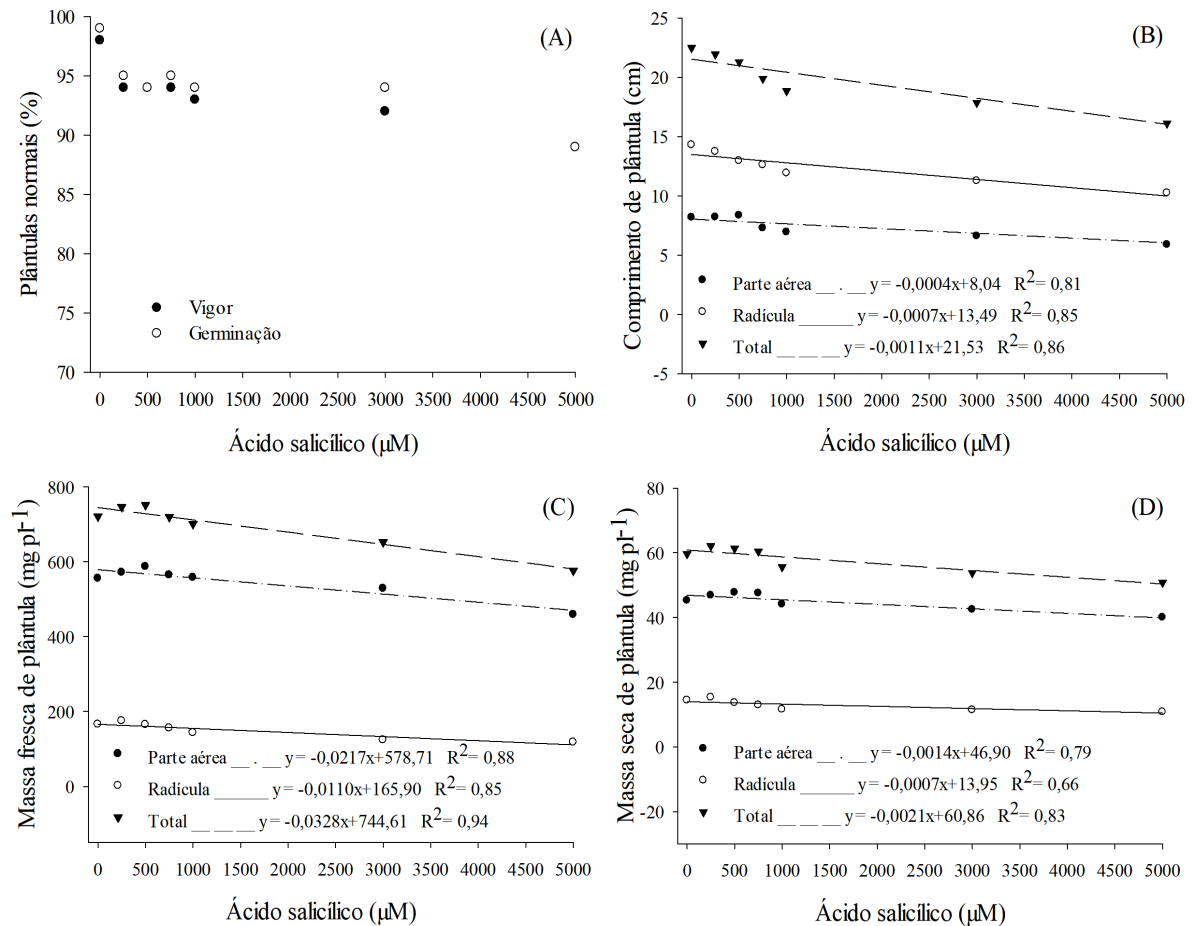
O AS não afetou a germinação e a porcentagem de plântulas normais da primeira contagem (vigor) da cultivar Fepagro 26 quando as sementes foram embebidas em soluções com AS por 24 horas em caixas plásticas (Figura 3.3A). Isso pode ser explicado pelo fato de que as sementes submetidas à embebição com AS por apenas 24 horas absorveram menor quantidade do produto, e com isso, não ocasionou alteração na germinação das sementes. Dessa forma, a embebição atuou como um condicionamento das sementes, permitindo que essas expressassem seu potencial máximo.

No entanto, as demais variáveis foram afetadas pela aplicação do AS, conforme demonstrado na Figura 3. Para o comprimento de plântula (Figura 3.3B) foram ajustadas equações lineares decrescentes, corroborando com os resultados da massa fresca (Figura 3.3C) e seca de plântula (Figura 3.3D), demonstrando que o AS prejudica o crescimento e o acúmulo de massa das plântulas de feijão.

Esses resultados corroboram com os encontrados em sorgo sacarino (LISBOA et al., 2017), em que a aplicação de AS reduziu os parâmetros de crescimento e acúmulo de massa das plântulas, entre eles, o comprimento de parte aérea e raiz primária e a massa seca de parte aérea e raiz primária.

Conforme Kerbauy (2008), o AS é um hormônio vegetal antagônico às auxinas que são responsáveis pelo alongamento celular. Portanto, a aplicação exógena do AS, especialmente em concentrações elevadas, inibe o crescimento das plântulas e, consequentemente a massa fresca e seca, devido à redução de concentrações endógenas de auxinas nas plântulas.

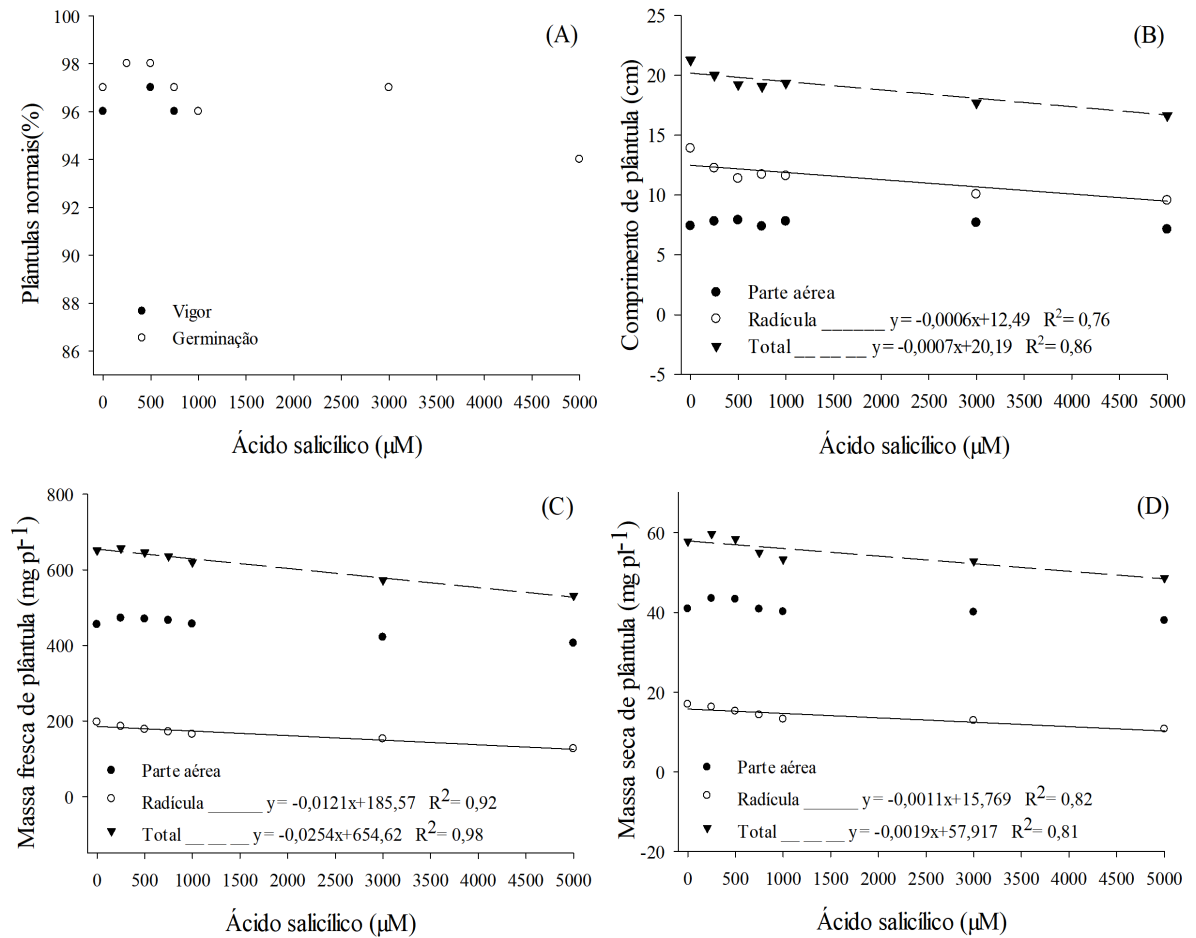
Figura 3.3 - Primeira contagem (vigor) e germinação (A), comprimento de plântula (B), massa fresca de plântula (C) e massa seca de plântula (D) de feijão da cultivar Fepagro 26 submetidas à germinação sob diferentes concentrações de ácido salicílico pelo método de embebição em caixas plásticas por 24 horas.



A germinação e o vigor (primeira contagem) das sementes da cultivar Predileto submetidas à embebição em AS por 24 horas em caixas plásticas não foram afetadas pelo AS (Figura 3.4A). Nesse caso, além destas, o AS também não causou efeito significativo no comprimento de parte aérea (Figura 3.4B), massa fresca de parte aérea (Figura 3.4C) e massa seca de parte aérea de plântula (Figura 3.4D).

Para o comprimento de raiz primária e total (Figura 3.4B), massa fresca de raiz primária e total (Figura 3.4C) e, massa seca de raiz primária e total de plântula (Figura 3.4D), ajustaram-se equações lineares decrescente, visto que, verificou-se redução dessas variáveis com o aumento da concentração de AS utilizada, confirmando os demais resultados verificados nesse estudo.

Figura 3.4 - Primeira contagem (vigor) e germinação (A), comprimento de plântula (B), massa fresca de plântula (C) e massa seca de plântula (D) de feijão da cultivar Predileto submetidas à germinação sob diferentes concentrações de ácido salicílico pelo método de embebição em caixas plásticas por 24 horas.



Apesar de não ser realizada análise comparando-se as cultivares utilizadas no estudo, pode-se observar que os resultados obtidos foram semelhantes para ambas cultivares. Portanto, o efeito do AS sobre a qualidade fisiológica de sementes de feijão é similar em cultivares com material genético distinto.

Futuramente, novas pesquisas devem ser conduzidas com o objetivo de estudar a tolerância de plântulas de feijão ao estresse por baixa temperatura induzida pela aplicação de AS, utilizando-se concentrações que não causam prejuízo à germinação das sementes. Pesquisas nessa linha vêm apresentando resultados positivos, sugerindo que o uso de AS pode ser de grande valia para a agricultura em condições adversas (SYEED et al., 2011; VICENTE; PLASENCIA, 2011; AMIN et al., 2013).

Baseado nos resultados desse trabalho, pode-se inferir de modo geral, que concentrações de AS até 1000 μM não causam prejuízo à qualidade fisiológica das sementes

de feijão e, portanto, podem ser utilizadas em pesquisas futuras. Da mesma forma, a aplicação de AS pela embebição das sementes por 24 horas antes da semeadura causa menor alteração na germinação e vigor das sementes e, torna-se uma opção para a condução de novos trabalhos utilizando esse produto.

3.4 CONCLUSÕES

Concluiu-se que o ácido salicílico em concentrações até 1000 μM não afeta negativamente a germinação de sementes de feijão das cultivares Fepagro 26 e Predileto, utilizando-se a embebição das sementes por 24 horas e a embebição no papel de germinação.

Concentrações de ácido salicílico até 1000 μM e embebição das sementes por 24 horas não afeta o vigor (primeira contagem) das duas cultivares de feijão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, E. A. T.; MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. Induction of water deficit tolerance by cold shock and salicylic acid during germination in the common bean. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 2, p. 209–219, 2013.

ALONSO-RAMÍREZ, A. et al. Evidence for a role of gibberellins in salicylic acid-modulated early plant responses to abiotic stress in *Arabidopsis* seeds. **Plant Physiology**, v. 150, n. 3, p. 1335-1344, 2009.

AMIN, A. A. et al. Physiological effects of salicylic acid and thiourea on growth and productivity of maize plants in sandy soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 44, n. 7, p. 1141–1155, 2013.

ANAYA, F. et al. Influence of salicylic acid on seed germination of *Vicia faba* L. under salt stress. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2018.

ASHRAF, M. et al. The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 3, p. 162-190, 2010.

AZOOZ, M. M.; YOUSSEF, M. M. Evaluation of heat shock and salicylic acid treatments as inducers of drought stress tolerance in hassawi wheat. **American Journal of Plant Physiology**, v. 5, n. 2, p. 56-70, 2010.

BOATWRIGHT, J. L.; PAJEROWSKA-MUKHTAR, K. Salicylic acid: an old hormone up to new tricks. **Molecular Plant Pathology**, v.14, n. 6, p. 623–634, 2013.

BONIFÁCIO, A. et al. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate

peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, n. 10, p. 1705-1722, 2011.

BRAGANTINI, C. **Alguns Aspectos do Armazenamento de Sementes e Grãos de Feijão**. Embrapa Arroz e Feijão, Goiás, 2005. 28p.

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

CARVALHO, P. R.; MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. Ácido salicílico em sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.) sob diferentes estresses. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p.114-124, 2007.

CORCUERA, L.; GIL-PELEGRIN, E.; NOTIVOL, E. Aridity promotes differences in proline and phytohormone levels in *Pinus pinaster* populations from contrasting environments. **Trees**, v. 26, n. 3, p. 799-808, 2012.

EDMUND, J. B.; DRAPALA, W. J. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seeds. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v. 71, p. 428-434, 1958.

EL-TAYEB, M. A.; AHMED, N. L. Response of wheat cultivars to drought and salicylic acid. **American-Eurasian Journal of Agronomy**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2010.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p.1039-1042, 2011.

GALLEGO-GIRALDO, L. et al. Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin down-regulated plants. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 108, n. 51, p. 20814-20819, 2011.

GUAN, L.; SCANDALIOS, J. G. Developmentally related responses of maize catalase genesto salicylic acid. **Proceedings of National Academy of Science**, v. 92, n. 13, p. 5930–5934, 1995.

HAYAT, Q. et al. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, n. 1, p. 14-25, 2010.

HAYAT, S. et al. Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. **Acta Agronomica Hungarica**, v. 53, n. 4, p. 433–437, 2005.

HE, J, et al. Salicylic acid alleviates the toxicity effect of cadmium on germination, seedling growth and amylase activity of rice. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 173, n. 2, p. 300-305, 2010.

HORVÁTH, E. et al. Hardening with salicylic acid induces concentration-dependent changes in abscísico acid biosynthesis of tomato under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 183, p. 54-63, 2015.

- HUANG, C. et al. Effects of exogenous salicylic acid on the physiological characteristics of *Dendrobium officinale* under chilling stress. **Plant Growth Regulation**, v. 79, n. 2, p. 199-208, 2016.
- HUSSEIN, M. M.; BALBAA, L. K.; GABALLAH, M. S. Salicylic acid and salinity effects on growth of maize plants. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 3, n. 4, p. 321–328, 2007.
- IGLESIAS, M. J.; TERRILE, M. C.; CASALONGUÉ, C. A. Auxin and salicylic acid signalling counteract during the adaptive response to stress. **Plant Signalling and Behavior**, v. 6, n. 3, p. 452-454, 2011.
- JAYAKANNAN, M. et al. Salicylic acid in plant salinity stress signaling and tolerance. **Plant Growth Regulation**, v. 76, n. 1, p. 25-40, 2015.
- KABIRI, R.; FARAHDAKSHI, H.; NASIBI, F. Effect of drought stress and its interaction with salicylic acid on black cumin (*Nigella sativa*) germination and seedling growth. **World Applied Sciences Journal**, v.18, n.4, p.520-527, 2012.
- KADIOGLU, A. et al. Exogenous salicylic acid alleviates effects of long term drought stress and delays leaf rolling by inducing antioxidant system. **Plant Growth Regulation**, v. 64, n. 1, p. 27–37, 2011.
- KANG, G.; LI, G.; GUO, T. Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.36, n.9, p.2287-2297, 2014.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 431p.
- KHAN, M. I. R. et al. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanism plants. **Front Plant Science**, v. 6, n. 462, p. 1-35. 2015.
- LEE, S.; KIM, S. G.; PARK, C. M. Salicylic acid promotes seed germination under high salinity by modulating antioxidant activity in Arabidopsis. **New Phytologist**, v. 188, n. 2, p. 626-637, 2010.
- LISBOA, L. A. M. et al. Influência do ácido salicílico no processo germinativo de sementes de cultivares de sorgo sacarino. **Acta Iguazu**, v. 6, n. 2, p. 37-49, 2017.
- MARCINSKA, I. et al. Alleviation of osmotic stress effects by exogenous application of salicylic or abscisic acid on wheat seedling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 13171-13193, 2013.
- MIURA, K.; TADA, Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. **Frontiers Plant Science**, v. 5, n. 4, p. 1-12, 2014.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. de B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES. 1999. p. 2-1-2-21.

NAZAR, R. et al. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mung bean cultivars. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 8, p. 807–815, 2011.

POÓR, P. et al. Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with stomatal response, CO₂ fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato, and decrease harmful effects of subsequent salt stress. **Plant biology**, v. 13, n. 1, p. 105-114, 2011.

RAJJOU, L. et al. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on Arabidopsis seed germination and establishment of early defense mechanisms. **Plant Physiology**, v. 141, n. 3, p. 910–923, 2006.

RAO, M. V. et al. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes. **Plant Physiology**, v. 115, n. 1, p. 137-149, 1997.

SHAKIROVA, F. M. et al. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. **Plant Science**, v.164, n.3, p.317-322, 2003.

SHAKIROVA, F. M. Role of hormonal system in the manifestation of growth promoting and anti-stress action of salicylic acid. In: HAYAT, S; AHMAD, L. (Ed.). **A plant hormone**. Dordrecht: Springer, 2007. P. 69-89.

SHARAFIZAD, M. et al. Effect of salicylic acid pretreatment on germination of wheat under drought stress. **Journal of Agricultural Science**, v.5, n.3, p.179-199, 2013.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assisat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agriculture Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SILVA, F. S. et al. Viabilidade do armazenamento de sementes em diferentes embalagens para pequenas propriedades rurais. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 8, n. 1, p. 45-56, 2010.

SYEED, S. et al. Salicylic acid-mediated changes in photosynthesis, nutrients content and antioxidant metabolism in two mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in salt tolerance. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 3, p. 877-886, 2011.

TONEL, F. R. et al. Salicylic acid: physiological and biochemical changes in seeds and seedling subjected to salt stress. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 4, p. 457-465, 2013.

VICENTE, M. R. S.; PLASENCIA, J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3321–3338, 2011.

VLOT, A. C.; DEMPSEY, D. A.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, n. 1, p. 177–206, 2009.

XIE, Z. et al. Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid inducible WRKY gene. **Plant Molecular Biology**, v. 64, n. 3, p. 293–303, 2007.

YAMAMOTO, C. J. T. et al. Water-deficit tolerance induction during germination of Jalo Precoce bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 11, p. 2897–2904, 2014.

4. CAPÍTULO II

ATIVIDADE ENZIMÁTICA E TOLERÂNCIA DE PLÂNTULAS DE FEIJÃO À BAIXA TEMPERATURA INDUZIDA PELO ÁCIDO SALICÍLICO

RESUMO

O estresse por baixa temperatura pode provocar prejuízos à emergência e ao desenvolvimento inicial das plântulas de feijão quando a semeadura ocorre no início do período recomendado para o estado do Rio Grande do Sul, ou seja, nos meses de agosto e setembro. A aplicação de ácido salicílico nas sementes pode ser alternativa para minimizar os danos do estresse, pois este atua como indutor da tolerância das plântulas ao estresse, ativando as enzimas antioxidantes e permitindo que as sementes expressem seu máximo potencial fisiológico. Desta forma, objetivou-se estudar o efeito de baixas temperaturas e a tolerância induzida pelo ácido salicílico em sementes de feijão na germinação e no desenvolvimento inicial de plântulas, avaliando-se parâmetros fisiológicos e bioquímicos de plântulas. Utilizaram-se sementes das cultivares Fepagro 26 e SCS204 Predileto. O experimento desenvolvido para avaliar o desempenho fisiológico das sementes foi conduzido em um bifatorial 5 x 4, com concentrações de ácido salicílico (zero, 250, 500, 750 e 1000 μM) e regimes de temperaturas (25, 20, 15, 20-10 $^{\circ}\text{C}$). No quinto e nono dia após a semeadura realizaram-se a avaliação da primeira contagem do teste de germinação e da porcentagem de germinação, respectivamente. O comprimento e massa fresca das plântulas foram determinados no sétimo dia após a semeadura e após a secagem das plântulas em estufa por 48 horas obteve-se a massa seca de plântula. Para o experimento bioquímico, realizado apenas com as sementes da cultivar Fepagro 26, utilizou-se um bifatorial 4 x 3 (zero, 250, 500 e 750 μM x 25, 15 e 20-10 $^{\circ}\text{C}$), avaliando-se aos sete dias após a semeadura a atividade das enzimas superóxido dismutase, guaiacol peroxidase e a peroxidação lipídica das plântulas de feijão. Os dois experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 50 sementes. Conclui-se que as temperaturas de 15 $^{\circ}\text{C}$ e 20-10 $^{\circ}\text{C}$ prejudicam a germinação e o vigor das sementes de feijão, mas as cultivares Fepagro 26 e SCS204 Predileto apresentam comportamento distinto quanto ao estresse de baixa temperatura. O ácido salicílico exógeno induz a tolerância das plântulas de feijão ao estresse de baixa temperatura durante a germinação e o desenvolvimento inicial, promovendo maior germinação e vigor das sementes nas concentrações de 100 a 400 μM para a cultivar Fepagro 26, e nas concentrações entre 250 e 700 μM para a cultivar SCS204 Predileto. O ácido salicílico induz a ativação da enzima antioxidante guaiacol peroxidase na raiz primária de plântulas de feijão da cultivar Fepagro 26 sob baixa temperatura, mas não induz a ativação da enzima superóxido dismutase e não reduz a peroxidação lipídica.

Palavras-chaves: Estresse de frio. Qualidade fisiológica. *Phaseolus vulgaris*. Parâmetros bioquímicos.

ENZYMATIC ACTIVITY AND TOLERANCE OF LOW-TEMPERATURE BEAN SEEDLINGS INDUCED BY SALICYLIC ACID

ABSTRACT

Low temperature stress can cause damage to the emergence and early development of bean seedlings when sowing occurs at the beginning of the recommended period for the state of Rio Grande do Sul, that is, in august and september. The application of salicylic acid in seeds may be an alternative to minimize stress damage, since it acts as an inducer of seedling tolerance to stress, activating the antioxidant enzymes and allowing the seeds to express their maximum physiological potential. The objective of this study was to study the effect of low temperatures and the tolerance induced by salicylic acid in bean seeds on germination and initial seedling development, evaluating physiological and biochemical parameters of seedlings. Seeds of the cultivars Fepagro 26 and SCS204 Predileto were used. The experiment developed to evaluate the physiological performance of the seeds was conducted in a 5 x 4 bipartial, with concentrations of salicylic acid (zero, 250, 500, 750 and 1000 μM) and temperature regimes (25, 20, 15, 20-10 $^{\circ}\text{C}$). On the fifth and ninth day after sowing, the first germination test and the germination percentage, respectively, were evaluated. The seedling length and fresh mass were determined on the seventh day after sowing and after drying the seedlings in a greenhouse for 48 hours the seedling dry mass was obtained. For the biochemical experiment, using only Fepagro 26 seeds, a 4 x 3 bifactorial (zero, 250, 500 and 750 μM x 25, 15 and 20-10 $^{\circ}\text{C}$) was used, evaluated at 7 days after sowing the activity of the enzymes superoxide dismutase, guaiacol peroxidase and the lipid peroxidation of the bean seedlings. The two experiments were conducted in a completely randomized design with four replicates of 50 seeds. It was concluded that the temperatures of 15 $^{\circ}\text{C}$ and 20-10 $^{\circ}\text{C}$ affect the germination and vigor of the bean seeds, but the cultivars Fepagro 26 and SCS204 Predileto present different behavior regarding the low temperature stress. Exogenous salicylic acid induces the tolerance of bean seedlings to low temperature stress during germination and initial development, promoting greater germination and vigor of the seeds in the concentrations of 100 to 400 μM for the Fepagro 26 cultivar, and in the concentrations between 250 and 700 μM for the cultivar SCS204 Predileto. Salicylic acid induces the activation of the antioxidant enzyme guaiacol peroxidase in the primary root of bean seedlings of the Fepagro 26 cultivar under low temperature, but does not induce activation of the enzyme superoxide dismutase and does not reduce lipid peroxidation.

Keywords: Cold stress. Physiological quality. *Phaseolus vulgaris*. Biochemical parameters.

4.1 INTRODUÇÃO

O feijão é cultivado no Rio Grande do Sul em duas safras. Na safra a semeadura é recomendada entre os meses de agosto a novembro, e na safrinha entre os meses de janeiro e fevereiro. Os principais danos às plantas de feijão por fatores ambientais são causados pela deficiência hídrica, temperatura do ar acima de 32 °C durante o florescimento e baixa temperatura na emergência e desenvolvimento inicial das plantas, principalmente em semeaduras realizadas nos meses de agosto e setembro (LOPEZ et al., 2006).

Sob condição de baixa temperatura, a germinação e o crescimento das plântulas de feijão são afetados negativamente, conforme observado por Zabet et al. (2008) e Facin et al. (2014). Além disso, nessa condição, as plântulas são submetidas ao estresse oxidativo, em que espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas, tais como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (OH^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2) (JALLEL et al., 2009). O estresse oxidativo, segundo Noctor, Mhamdi e Foyer (2014) é responsável por provocar danos sobre as proteínas, lipídeos e DNA, podendo causar a morte das células.

Com o objetivo de minimizar o efeito tóxico das EROs as plântulas fazem uso de um sistema antioxidante, composto por enzimas que neutralizam a ação desses radicais, entre elas a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX) e a guaiacol peroxidase (POD) (HAYAT et al., 2010).

A alternativa para minimizar os danos provocados pelo estresse nas plântulas é a indução do aumento da atividade de enzimas antioxidantes através da aplicação de hormônios vegetais, como o ácido salicílico (AS) (ASHRAF et al., 2010; HAYAT et al., 2010; GILL; TUTEJA, 2010). Neste contexto, a aplicação de AS em sementes de feijão pode induzir respostas de tolerância ao estresse pela baixa temperatura durante a germinação e desenvolvimento inicial das plântulas.

Pesquisas recentes sugerem que esse hormônio vegetal possui grande potencial agrônomo para melhorar a tolerância de culturas agrícolas aos diversos estresses impostos ao longo do ciclo de cultivo, como deficiência hídrica (NAZAR et al., 2015; ANTONIC et al., 2016; SEDAGHAT et al., 2017), temperaturas extremas (FAROOQ et al., 2008; MARTEL; MELLOUK et al., 2016; MUTLU et al. 2013; 2016), salinidade (JINI; JOSEPH, 2017; SHAKI; MABOUD; NIKNAM, 2018; FARHANGI-ABRIZ; GHASSEMI-GOLEZANI, 2018) e metais pesados (PARASHAR et al., 2014; SHAKIROVA et al., 2015). No entanto, a eficiência do AS para esse propósito é dependente da concentração utilizada, da forma de aplicação, e da fase de desenvolvimento das plantas (MIURA; TADA, 2014).

A aplicação de AS em baixas concentrações causa estresse moderado nas plantas, gerando EROs, especialmente H₂O₂, levando à ativação de vias de sinalização e induzindo o sistema antioxidante enzimático e não enzimático, que combate as EROs, minimizando os danos provocados pelo estresse (HORVÁTH et al., 2015; JAYAKANNAN et al., 2015). No entanto, se a aplicação de AS for realizada em concentrações elevadas, o estresse oxidativo, gerado pela produção de EROs, será muito intenso, podendo ocasionar a morte celular (POÓR et al., 2011; MIURA e TADA, 2014).

Senaratna et al. (2000) verificaram que a aplicação de AS nas sementes de feijão favoreceu a tolerância de plantas com 21 dias à baixa temperatura, reduzindo os danos provocados pelo frio, como murcha e necrose nas folhas. Em milho e cevada, Farooq et al. (2008) e Mutlu et al. (2013; 2016), respectivamente, observaram que a aplicação de AS promoveu a ativação de enzimas antioxidantes, como CAT, SOD e POD, além de reduzir a peroxidação lipídica nas plantas submetidas ao estresse por baixa temperatura. Baseando-se nisso, os autores concluíram que o AS pode ser utilizado para reduzir os danos provocados pelo estresse de baixa temperatura nas plantas.

Como se verifica na literatura, estudos sobre a tolerância de plantas a estresses abióticos utilizando AS vêm sendo realizados para diversas espécies. Porém, mais pesquisas envolvendo concentrações, formas e época de aplicação devem ser realizadas para contribuir com os estudos já existentes e se fazem necessários para a cultura do feijoeiro, na fase inicial de seu desenvolvimento sob condição de baixa temperatura. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito de baixas temperaturas na germinação de sementes de feijão e a tolerância induzida pelo ácido salicílico na germinação e no desenvolvimento inicial de plântulas submetidas ao estresse de frio, avaliando-se parâmetros fisiológicos e bioquímicos de plântulas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório Didático e de Pesquisas em Sementes (LDPS), do Departamento de Fitotecnia, e no Laboratório de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia, ambos na Universidade Federal de Santa Maria. Foram utilizadas sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) das cultivares Fepagro 26 e SCS204 Predileto. As sementes utilizadas neste estudo foram produzidas na área experimental do Departamento de Fitotecnia, no período de setembro a dezembro de 2016, sendo os tratamentos culturais realizados conforme as recomendações técnicas para a cultura. Após a colheita

manual, as sementes foram separadas por tamanho para a uniformização do material utilizado no estudo.

As sementes da cultivar Fepagro 26 e Predileto apresentavam 90 e 91% de vigor no teste de primeira contagem e, 96 e 97% de germinação, respectivamente. Ambas a cultivares apresentavam 10,9% de umidade, conforme metodologia proposta por Brasil (2009).

4.2.1 Análises fisiológicas

Para estudar a indução de tolerância de plântulas de feijão ao estresse por baixa temperatura pela aplicação de ácido salicílico (AS) foi realizado um experimento bifatorial 5 x 4 (AS x temperaturas). O primeiro fator refere-se às concentrações de AS (Sigma-Aldrich®): zero, 250, 500, 750 e 1000 μM ; e, o segundo fator a quatro temperaturas: 25 °C constante, 20 °C constante, 15 °C constante e 20-10 °C alternada (12/12 horas).

O AS foi fornecido às sementes pela embebição nas soluções por 24 horas antes da semeadura. Para isso, foram colocadas 50 sementes sobre três folhas de papel de germinação em caixa plásticas (gerbox). Adicionou-se, em cada caixa, 25 mL de solução de AS para umedecer o papel, conforme as concentrações já citadas. As caixas foram tampadas e levadas para a câmara de germinação (BOD) regulada a temperatura de 25 °C e com luz constante.

Após 24 horas de embebição, as sementes foram semeadas em rolos de papel de germinação, umedecido com água destilada no volume de 2,5 vezes a massa do papel seco. O material foi mantido em BOD com luz, nas temperaturas já mencionadas, permanecendo durante a condução do teste.

No quinto dia após a semeadura foi avaliada a porcentagem de plântulas normais da primeira contagem (vigor) e no nono dia a porcentagem de germinação, conforme Brasil (2009). No sétimo dia, dez plântulas normais de cada repetição, retiradas da linha superior do teste de germinação, foram medidas com o auxílio de uma régua milimétrica, para obtenção do comprimento de parte aérea e raiz primária de plântula. Posteriormente, os cotilédones das plântulas foram retirados, as plântulas foram seccionadas em parte aérea e raiz primária e pesadas para determinar a massa fresca. Para a determinação da massa seca, as partes das plântulas foram colocadas em sacos de papel e levadas para a estufa regulada em 65 °C, onde permaneceram por 48 horas. Após esse tempo foram pesadas para obtenção da massa seca de parte aérea e raiz primária de plântula (NAKAGAWA, 1999).

4.2.2 Análises bioquímicas

Para estudar as alterações bioquímicas causadas pelo estresse de baixa temperatura e aplicação de AS, foi conduzido um experimento bifatorial 4 x 3 (AS x temperaturas). O primeiro fator refere-se às concentrações de ácido salicílico (AS): zero, 250, 500 e 750 μM ; e, o segundo a três temperaturas: 25 °C constante, 15 °C constante e 20-10 °C alternada (12/12 horas). A condução do experimento deu-se da mesma forma que no experimento onde foram realizadas avaliações fisiológicas, conforme descritas anteriormente. No entanto, para a análise enzimática e de peroxidação lipídica foram utilizadas somente as sementes da cultivar Fepagro 26, em função desta cultivar se mostrar mais tolerante ao estresse de baixa temperatura nas avaliações fisiológicas.

No sétimo dia após a semeadura as plântulas de cada repetição foram seccionadas em parte aérea e raiz primária, congeladas em ultra freezer (-80 °C) e, posteriormente, maceradas em nitrogênio líquido. Desse material, utilizou-se 0,5 g que foram homogeneizadas em 3 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,8) 0,05 M, contendo 1 mM de EDTA e 2% (w/v) de polivinilpirrolidona (PVP). O homogeneizado foi centrifugado 13.000 rpm por 20 minutos a temperatura de 4 °C e o sobrenadante foi coletado e armazenado em tubo tipo “Eppendorf”, sob congelamento até a determinação da atividade das enzimas e de proteínas (ZHU et al., 2004).

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com a metodologia de Gianopolitis e Ries (1977), com modificações. Alíquotas de 100 μL de extrato enzimático foram transferidas para um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina (13 mM), riboflavina (2 μM), nitrobluetetrazólio (NBT) (75 μM), EDTA (0,1 mM). A reação foi iniciada pela adição de 60 μL de riboflavina (2 μM). A produção fotoquímica da formazana azul a partir do NBT foi monitorada pelo incremento da absorbância a 560 nm em espectrofotômetro. A reação ocorreu em tubos de ensaio a 25 °C, dentro de uma câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Como controle, tubos com a mistura de reação foram mantidos no escuro. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe a fotorredução do NBT em 50%, conforme Beauchamp e Fridovich (1971) e os resultados foram expressos em unidade de atividade por mg de proteína (U mg^{-1} de proteína).

A atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) foi avaliada conforme Zeraik, Souza e Fatibello Filho (2008), utilizando-se o guaiacol como substrato, de acordo com o método espectrofotométrico. A mistura de reação foi composta por 1,0 mL de tampão fosfato

de potássio (100 mM, pH 6,5), 1,0 mL de guaiacol (15 mM) e 1,0 mL de H₂O₂ (3 mM). Após homogeneização, foram adicionados 50 µL de extrato vegetal das plântulas a esta solução. A atividade da enzima foi medida através da oxidação do guaiacol a tetraguaiacol, no aumento na absorbância a 470 nm. Para o cálculo, foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹, e os resultados foram expressos em unidade de enzima por mg de proteína (U mg⁻¹ proteína).

A peroxidação lipídica (TBARS) foi estimada seguindo o método de El-Moshaty et al. (1993). Amostras de folhas e raízes (0,5 g) de plântulas maceradas em nitrogênio líquido foram homogeneizadas em 4 mL de 0,2 M de tampão citrato (pH 6,5) contendo 0,5% de Triton X-100. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 x g por 15 minutos a 4 °C. Adicionou-se 1,5 mL do sobrenadante a 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% (w/v) contendo 0,5% (w/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA). A mistura foi aquecida a 95 °C por 40 min e então resfriada em banho de gelo por 15 minutos, sendo centrifugada a 10,000 x g por 15 minutos. As leituras da absorbância do sobrenadante foram realizadas em 532 e 600 nm (para corrigir a turbidez não específica). A peroxidação lipídica foi expressa como nmol de malonaldeído (MDA) por mg de proteína (nmol MDA mg⁻¹ proteína).

4.2.3 Análise estatística

O estudo foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por 50 sementes. As cultivares foram analisadas separadamente. Os dados em percentagem foram transformados pela equação: arco-seno $\sqrt{\%/100}$.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F (p<0,05) através do software Sisvar[®] (Ferreira, 2011). Realizou-se análise de regressão para o fator ácido salicílico (p<0,05) e teste de média Scott-Knott para as temperaturas e para os resultados obtidos nas análises bioquímicas, a 5% de probabilidade.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Análises fisiológicas

A partir da análise dos dados da cultivar Fepagro 26, obteve-se interação significativa entre os fatores concentrações de AS e temperaturas para as variáveis primeira contagem do

teste de germinação, massa fresca da parte aérea, raiz primária e total e, massa seca da parte aérea, raiz primária e total de plântula (Figura 4.1). Para as variáveis germinação, comprimento de parte aérea, raiz primária e total de plântula apenas o fator temperatura foi significativo (Tabela 4.1).

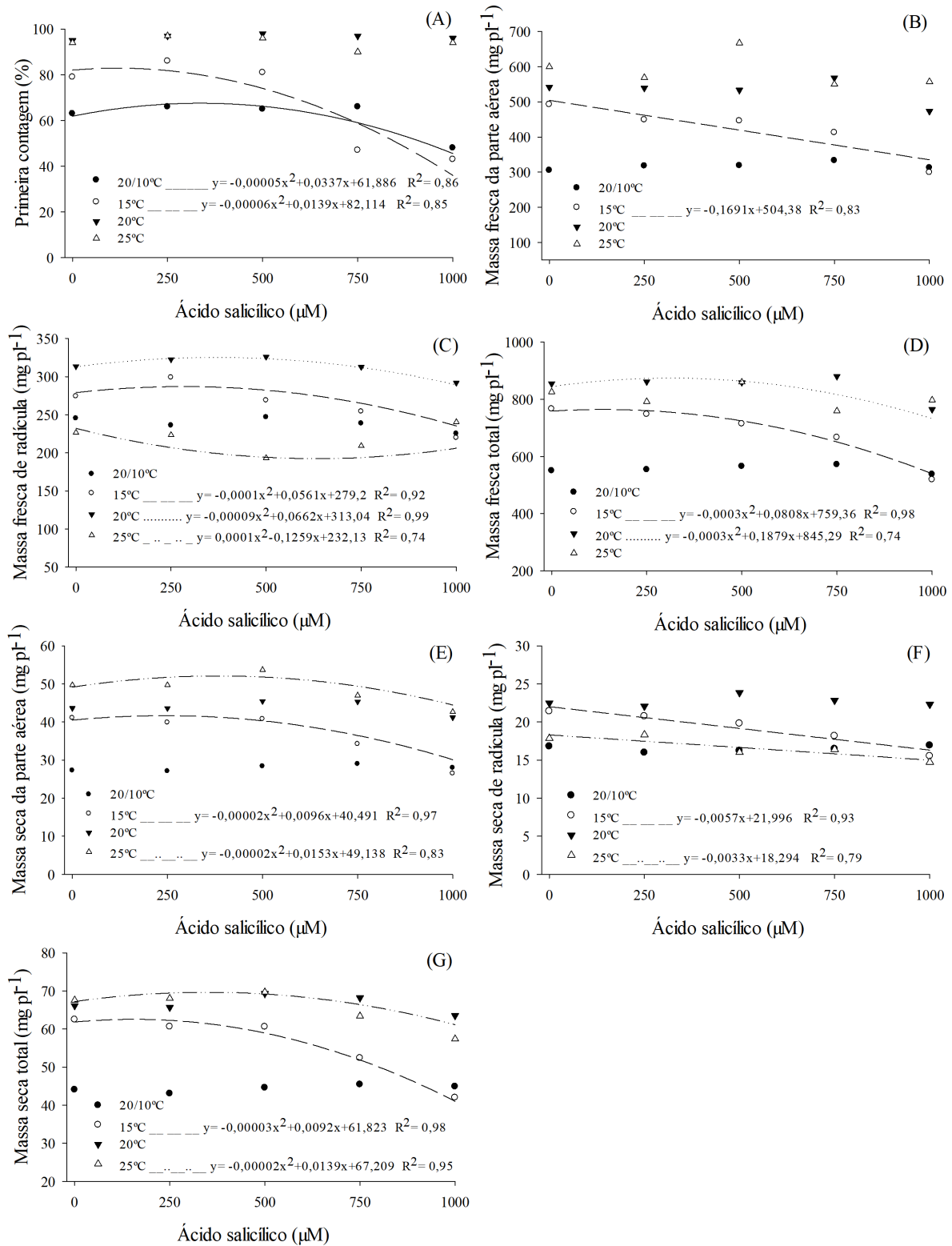
Para a variável primeira contagem ajustou-se equações quadráticas para as temperaturas de 15 °C e 20-10 °C (Figura 4.1A). Utilizando-se a temperatura de 15 °C o ponto de máxima foi determinado em 115 µM de AS, obtendo-se 83% de plântulas normais; enquanto que para a temperatura 20-10 °C a máxima porcentagem de plântulas normais na primeira contagem (67%) foi obtida com a concentração de 337 µM de AS.

As sementes submetidas à germinação sob as temperaturas de 20 °C e 25 °C apresentaram elevados valores de vigor pelo teste de primeira contagem, independentemente da concentração de AS, visto que essas temperaturas são recomendadas para a germinação das sementes dessa espécie, conforme Brasil (2009).

A massa fresca de parte aérea de plântulas submetidas à temperatura de 15 °C sofreu redução com a aplicação de AS (Figura 4.1B), ajustando-se uma equação linear decrescente. Nas demais temperaturas nenhuma equação ajustou-se aos dados. Aos dados da massa fresca de raiz primária foram ajustadas equações quadráticas para as temperaturas de 15 °C, 20 °C e 25 °C (Figura 4.1C), sendo que, nas temperaturas de 15 °C e 20 °C os pontos de máxima foram determinados em 280 µM e 368µM de AS, respectivamente; enquanto que, na temperatura de 25 °C o ponto de mínima ocorreu com a utilização de 630 µM de AS. Da mesma forma, para a massa fresca total de plântulas, nas temperaturas de 15 °C e 20 °C ajustaram-se equações quadráticas, sendo o máximo acúmulo de massa obtido nas concentrações de 135 µM e 313 µM de AS, respectivamente (Figura 4.1D).

Para a massa seca de parte aérea ajustaram-se equações quadráticas aos dados das temperaturas de 15 °C e 25 °C; sendo os pontos de máxima determinados em 240 µM e 382 µM de AS, respectivamente (Figura 4.1E). No entanto, para a massa seca de raiz primária, nas temperaturas de 15 °C e 25 °C, as equações ajustadas foram lineares decrescentes, ou seja, houve redução no acúmulo de massa nas raiz primárias das plântulas com o aumento da concentração de AS (Figura 4.1F). Já aos dados da massa seca total de plântula, os pontos de máxima foram determinados em 153 µM e 347 µM de AS, para as temperaturas de 15 °C e 25 °C, respectivamente (Figura 4.1G).

Figura 4.1 - Primeira contagem (A), massa fresca de parte aérea (B), massa fresca de raiz primária (C), massa fresca total (D), massa seca de parte aérea (E), massa seca de raiz primária (F) e massa seca total (G), de plântulas de feijão da cultivar Fepagro 26 embebidas em ácido salicílico por 24 horas e submetidas à germinação em diferentes temperaturas.



Conforme os resultados da Figura 4.1, pode-se observar que a temperatura alternada 20-10 °C foi mais estressante para o vigor das sementes de feijão da cultivar Fepagro 26, comparada à temperatura constante de 15 °C, visto que os valores obtidos nas avaliações nessa temperatura foram menores. Além disso, percebe-se que na temperatura de 20-10 °C as concentrações de AS que permitiram melhor expressão do vigor estão situadas entre 300 µM e 400 µM, enquanto que para a temperatura de 15 °C concentrações mais baixas de AS, entre 100 µM e 300 µM, foram suficientes para induzir a tolerância das plântulas de feijão ao frio. Dessa forma, percebe-se que sob temperatura mais estressante são necessárias concentrações mais elevadas de AS para que os danos da baixa temperatura sejam reduzidos nas plântulas, evidenciando o efeito do AS exógeno aplicado nas sementes.

Os resultados deste estudo indicam que a aplicação de AS durante a embebição das sementes tem potencial para conferir tolerância das plântulas expostas à baixa temperatura. Esses resultados corroboram com Wang et al. (2012), que observaram que plântulas de milho oriundas de sementes embebidas em AS por 24 horas antes da semeadura suportaram o estresse de baixa temperatura durante a germinação, apresentando maior crescimento e acúmulo de massa fresca e seca.

No entanto, conforme os resultados da massa fresca de parte aérea e massa seca de raiz primária, o AS não contribuiu com a tolerância das plântulas de feijão ao frio. Kang e Saltveit (2002) também verificaram que a aplicação de AS em concentrações entre 500 µM à 2000 µM, não induziu a tolerância de plântulas de arroz e pepino ao choque frio de 2,5 °C por quatro dias. Esses autores também verificaram redução do crescimento da raiz primária de plântulas submetidas à baixa temperatura com a aplicação de AS, porém, em plântulas cultivadas em temperatura de 25 °C o AS não afetou o crescimento.

Conforme os resultados encontrados neste estudo e, Alonso-Ramirez et al. (2009) e Lee et al. (2010), em temperatura ótima o AS não afeta a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas, desde que não seja em concentração considerada tóxica (POÓR et al., 2011; MIURA; TADA, 2014).

A temperatura de 20 °C proporcionou maior germinação e crescimento das plântulas de feijão da cultivar Fepagro 26, conforme os resultados da porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea, raiz primária e total de plântula, porém, o comprimento de parte aérea não diferiu da temperatura de 25 °C (Tabela 4.1).

As baixas temperaturas reduziram a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas de feijão, sendo que sob a temperatura alternada de 20-10 °C o crescimento das plântulas sofreu maior redução. Segundo Zucareli et al. (2011) e Marini et al. (2012), em

condição de baixa temperatura a embebição das sementes ocorre lentamente, da mesma forma que a mobilização de reservas, resultando em redução do crescimento e acúmulo de massa das plântulas. Seibeneichler et al. (2000) também constataram que o estresse de baixa temperatura reduziu o crescimento, o acúmulo de massa fresca e seca de plantas de feijão em diferentes estádios de desenvolvimento.

Tabela 4.1 - Médias de germinação (G, %), comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz primária (CR, cm) e comprimento total (CT, cm), de plântulas de feijão, cultivar Fepagro 26, submetidas à germinação em diferentes temperaturas após embebição em ácido salicílico.

Temperaturas (°C)	G ²	CPA	CR	CT
25 ³	97 b	8,66 a	14,75 b	23,42 b
20 ³	99 a	8,04 a	17,56 a	25,60 a
15 ³	97 b	7,34 b	14,04 b	21,38 c
20-10 ⁴	95 b	5,34 c	12,14 c	17,49 d
CV (%) ⁵	7,17	13,68	5,68	6,78

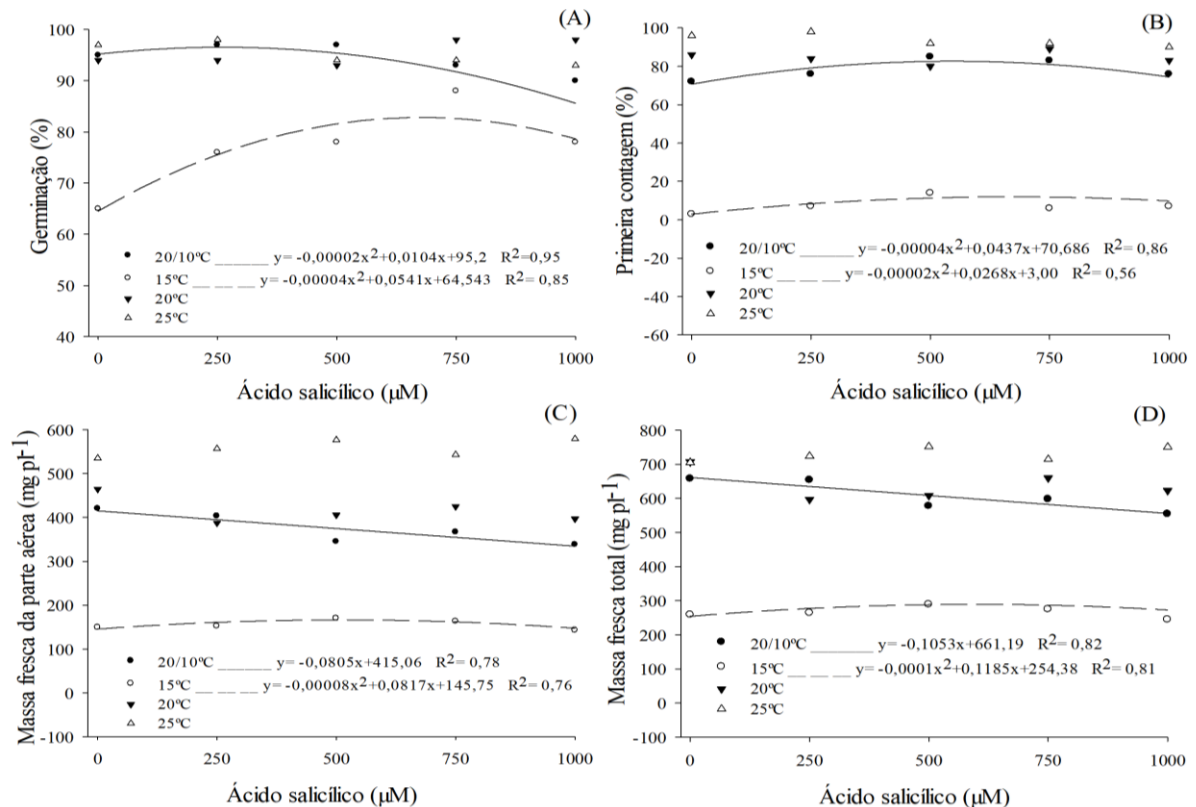
¹ Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, $p < 0,05$. ² Dados transformados. ³ Temperatura constante. ⁴ Temperatura alternada 12/12 horas. ⁵ Coeficiente de variação.

Para a cultivar Predileto houve interação significativa entre as concentrações de AS e as temperaturas para as variáveis germinação, primeira contagem da germinação, massa fresca de parte aérea e total de plântula (Figura 4.2). No entanto, para as variáveis comprimento de parte aérea, raiz primária e total, massa fresca de raiz primária e massa seca de parte aérea, raiz primária e total de plântula houve apenas efeito do fator temperatura (Tabela 4.2).

As concentrações de AS que propiciaram a máxima germinação nas temperaturas de 15 °C e 20-10 °C foram 676 µM e 260 µM, respectivamente (Figura 4.2A). Nessas concentrações foram obtidas 83% de germinação em 15 °C e 97% na temperatura de 20-10 °C. No caso da temperatura de 15 °C, a aplicação de AS (676 µM) promoveu um incremento de 18 pontos percentuais na porcentagem de germinação das sementes submetidas a essa temperatura, comparando-se ao tratamento sem AS na mesma temperatura.

Os resultados da primeira contagem do teste de germinação permitiram ajustar equações quadráticas para as temperaturas de 15 °C e 20-10 °C, sendo a máxima porcentagem de plântulas normais no quinto dia após a sementeira (12% e 83%, respectivamente) obtida com as concentrações de 670 µM e 546 µ de AS, respectivamente (Figura 4.2B).

Figura 4.2 - Germinação (A), primeira contagem (B) massa fresca de parte aérea (C) e massa fresca total (D), de plântulas de feijão da cultivar Predileto embebidas em ácido salicílico por 24 horas e submetidas à germinação em diferentes temperaturas.



Na massa fresca de parte aérea ajustou-se uma equação linear decrescente para a temperatura de 20-10 °C, e uma equação quadrática para a temperatura de 15 °C, tendo-se obtido o ponto de máxima na concentração de 510 μM de AS (Figura 4.2C). Da mesma forma, para a massa fresca total de plântulas, o máximo acúmulo de massa foi obtido na concentração de 592 μM de AS para a temperatura de 15 °C; enquanto que, na temperatura de 20-10 °C a ausência de AS proporcionou maior translocação de reservas dos cotilédones para a plântula, ajustando-se uma equação linear decrescente (Figura 4.2D).

Para a cultivar Predileto o AS também indicou ser um potencial recurso na tolerância das plântulas de feijão ao estresse de baixa temperatura. Concentrações de AS entre 500 μM e 700 μM reduziram os danos provocados pelo frio e permitiram maior expressão da qualidade fisiológica das sementes na temperatura de 15 °C, que conforme os resultados obtidos teve efeito mais drástico sobre a germinação e o vigor das sementes. No entanto, na temperatura alternada de 20-10 °C os resultados foram contraditórios, pois a germinação foi favorecida com a aplicação de 260 μM de AS, enquanto que na avaliação de vigor pelo teste de primeira contagem a concentração de aproximadamente 550 μM de AS promoveu maior porcentagem de plântulas normais. Esses resultados concordam com Senaratna et al. (2000), que

verificaram que plantas de feijão com 21 dias oriundas de sementes embebidas em 500 μM de AS antes da semeadura não sofreram injúrias por baixa temperatura.

Conforme os resultados da cultivar Predileto, a temperatura de 25 °C proporcionou maior desempenho das sementes pelos teste de comprimento de parte aérea, raiz primária e total de plântula, massa seca de parte aérea e total de plântula, enquanto que para a massa fresca da raiz primária as temperaturas de 20 °C e 20-10 °C não diferiram entre si, e na massa seca de raiz primária a temperatura de 20-10 °C propiciou maior acúmulo de massa (Tabela 4.2).

A temperatura de 15 °C prejudicou a germinação, o crescimento e o acúmulo de massa fresca e seca das plântulas, devido ao retardamento da embebição das sementes e dos processos bioquímicos responsáveis pela degradação e mobilização de reservas. Zobot et al. (2008) também avaliaram a influência da temperatura na germinação e crescimento de plântulas de feijão, testando as temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30°C, confirmando o prejuízo das baixas temperaturas à germinação das sementes. Esses autores verificaram que a máxima germinação e crescimento das plântulas ocorreu na temperatura de 25°C, enquanto que em temperaturas baixas, especialmente 10 e 15°C, a porcentagem de germinação e a alongação do hipocótilo das plântulas foram reduzidos.

Tabela 4.2 - Médias do comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz primária (CR, cm), comprimento total (CT, cm), massa fresca de raiz primária (MFR, mg pl^{-1}), massa seca de parte aérea (MSPA, mg pl^{-1}), massa seca de raiz primária (MSR, mg pl^{-1}) e massa seca total (MST, mg pl^{-1}), de plântulas de feijão, cultivar Predileto 26, submetidas à germinação em diferentes temperaturas após embebição em ácido salicílico.

Temperaturas (°C)	CPA	CR	CT	MFR	MSPA	MSR	MST
25 ²	9,01 a	15,54 a	24,56 a	170,93 b	52,14 a	15,41 b	67,56 a
20 ²	7,22 b	14,57 b	21,80 b	223,10 a	35,50 b	16,12 b	50,62 b
15 ²	3,06 d	8,76 d	11,82 d	110,80 c	15,79 c	8,66 c	24,45 c
20-10 ³	6,71 c	13,51 c	20,22 c	233,73 a	34,17 b	17,64 a	51,81 b
CV (%) ⁴	9,95	6,99	6,69	9,78	9,79	9,87	8,87

¹ Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, $p < 0,05$. ² Temperatura constante. ³ Temperatura alternada 12/12 horas. ⁴ Coeficiente de variação.

A partir dos resultados apresentados para as cultivares de feijão, percebeu-se que a temperatura alternada 20-10 °C foi mais estressante para a germinação e vigor das sementes da cultivar Fepagro 26 e a temperatura de 15 °C para a cultivar Predileto. Esses resultados devem-se provavelmente às diferenças genéticas das cultivares, visto que o feijão possui dois

centros de origem, o Mesoamericano e o Andino, e as cultivares descendentes de cada centro de origem possuem diferentes níveis de tolerância às baixas temperaturas (SINGH; GEPTS; DEBOUCK, 1991). Porém, é difícil a identificação das características provenientes de cada grupo, pois para a obtenção das cultivares melhoradas, atualmente são realizados cruzamentos de genótipos de diferentes origens no melhoramento genético de feijão.

O AS promove a tolerância das plântulas de feijão ao estresse por baixa temperatura, reduzindo os danos provocados pelo frio e permitindo maior expressão do potencial de germinação e vigor das sementes. Porém, as concentrações de AS variam dependendo da cultivar e da temperatura utilizada para simular o estresse de baixa temperatura, considerando temperaturas constantes e alternadas. Dessa forma, novos estudos devem ser realizados concentrando-se em estudar a sensibilidade das cultivares de feijão ao AS e ao estresse causado por baixas temperaturas constantes e alternadas.

4.3.2 Análises bioquímicas

Conforme os dados das análises bioquímicas, houve interação entre as temperaturas e as concentrações de AS para a peroxidação lipídica da parte aérea e raiz primária, atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) da parte aérea e atividade da enzima guaicol peroxidase (POD) da raiz primária de plântulas (Figura 4.3).

A peroxidação lipídica foi avaliada pela quantificação de malondialdeído (MDA), que consiste em um dos produtos da peroxidação de ácidos graxos, sendo que, um aumento no conteúdo de MDA indica um aumento da peroxidação lipídica na membrana celular (BALOGLU et al., 2012).

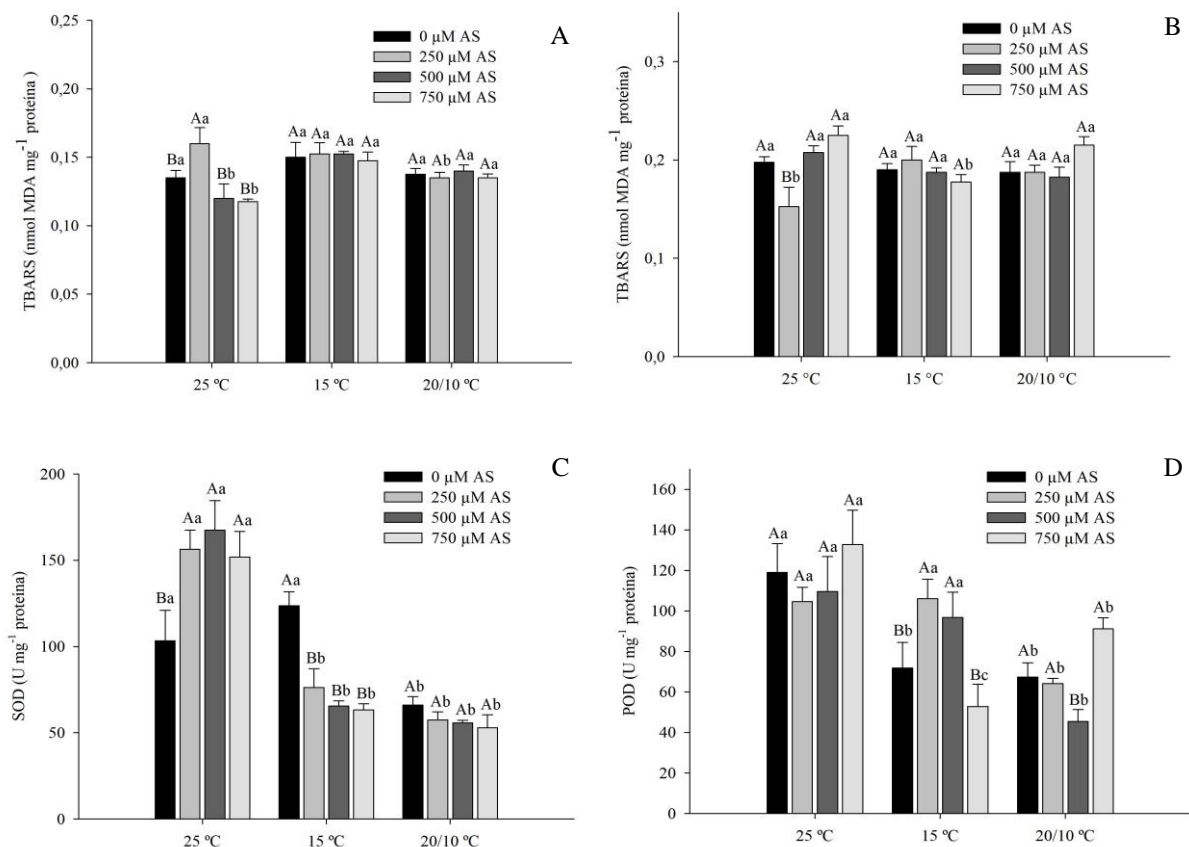
Na temperatura de 25 °C, verificou-se aumento da peroxidação lipídica da parte aérea de plântulas de feijão submetidas à aplicação de 250 µM de AS, diferindo das demais concentrações de AS (Figura 4.3A). Com a aplicação de 250 µM de AS houve redução da peroxidação lipídica da parte aérea de plântulas submetidas à temperatura de 20-10 °C, enquanto que as concentrações de 500 µM e 750 µM de AS promoveram redução da peroxidação lipídica na temperatura de 25 °C e, na ausência de AS a peroxidação não diferiu entre as temperaturas.

No geral, na temperatura de 25 °C a peroxidação lipídica da parte aérea de plântulas de feijão foi menor, demonstrando que em condição ótima de temperatura os danos celulares são reduzidos, enquanto que, em condição subótima de desenvolvimento das plântulas a

peroxidação lipídica é aumentada, concordando com Esim e Atici (2015) e Mutlu et al. (2016).

Esses dados corroboram com as avaliações da qualidade fisiológica das sementes, visto que na temperatura de 25 °C também verificou-se maior acúmulo de massa seca da parte aérea (Figura 4.1D) e comprimento de parte aérea (Tabela 4.1) de plântula. Provavelmente, esses resultados devem-se aos menores danos nos lipídios de membrana, possibilitando assim, as sementes expressarem seu máximo potencial fisiológico.

Figura 4.3 - Peroxidação lipídica (TBARS) da parte aérea (A) e raiz primária (B), atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) da parte aérea (C) e atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) da raiz primária, de plântulas de feijão da cultivar Fepagro 26 embebidas em ácido salicílico por 24 horas e submetidas à germinação em diferentes temperaturas.



*Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de ácido salicílico dentro da mesma temperatura e, letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as temperaturas dentro da mesma concentração de ácido salicílico, pelo teste Scott-Knott, $p < 0,05$.

A peroxidação lipídica da raiz primária de plântulas (Figura 4.3B) na temperatura de 25 °C foi reduzida pela aplicação de 250 μM de AS, ao contrário do que ocorreu na parte aérea de plântula (Figura 4.3A). Esses resultados sugerem que a ação do AS foi mais

acentuada na raiz primária das plântulas, reduzindo o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica neste parte das plântulas. Nas temperaturas que simularam o estresse por baixa temperatura, não observaram-se diferença significativa entre as concentrações de AS sobre a peroxidação lipídica da raiz primária das plântulas.

A concentração de 250 μM de AS promoveu redução da peroxidação lipídica da raiz primária de plântulas na temperatura de 25 °C, e a concentração de 750 μM de AS minimizou os danos celulares na temperatura de 15 °C. Porém, na ausência de AS e com a utilização de 500 μM não houve diferença na peroxidação lipídica para as temperaturas estudadas.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na parte aérea de plântulas de feijão aumentou com a aplicação de AS na temperatura de 25 °C (Figura 4.3C). Quando as sementes foram submetidas à germinação na temperatura de 20-10 °C não houve diferença com a aplicação de AS, e na temperatura de 15 °C, o AS promoveu a redução da SOD da parte aérea, indicando um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e aumento do estresse oxidativo nessas plântulas, representado pela redução da massa fresca e seca de parte aérea das plântulas, conforme observado na Figura 4.1B e Figura 4.1E.

Mutlu et al. (2016) também verificaram redução na atividade da SOD da parte aérea em plantas de cevada de cultivar tolerante à baixa temperatura, ao contrário de plantas de cultivar sensível, onde observaram aumento da atividade dessa enzima. No entanto, conforme os resultados deste trabalho, não há indícios que a cultivar de feijão Fepagro 26 seja tolerante ao estresse por baixa temperatura.

Nas temperaturas baixas a atividade da SOD foi reduzida, exceto na temperatura de 15 °C e ausência de AS. Esses resultados discordam de autores que verificaram aumento dessa enzima em condição de estresse por baixa temperatura com a aplicação de AS, como Mellouk et al. (2016) e Mutlu et al. (2016), trabalhando com canola e cevada, respectivamente. Conforme Hayat et al. (2010) a tolerância das plantas ao estresse ocorre pelo aumento da atividade enzimática, redução das EROs e do estresse oxidativo.

Nesse caso, a não ativação da SOD pode ser em função da concentração de AS utilizada e do tempo de exposição das sementes ao produto, pois em 24 horas de embebição a quantidade de AS absorvido pelas sementes pode ser inferior a quantidade necessária para induzir a ativação da enzima e os mecanismos fisiológicos de resposta ao estresse. No entanto, essa hipótese não pode ser comprovada, pois não realizou-se quantificação do AS no material vegetal.

Kim et al. (2018) constataram aumento da atividade da SOD em plantas de arroz submetidas ao AS e estresse salino em solução hidropônica, mas também verificaram redução

das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). Segundo os autores a redução da atividade dessas enzimas deu-se pela concentração de AS (500 μM e 1000 μM) ser muito elevada e pelo tempo de exposição das plantas ao produto, pois as plantas ficaram em solução com AS durante quatro dias. Nesse caso, o estresse combinado de salinidade e AS promoveu aumento da concentração de EROs e da peroxidação lipídica, provocando a morte celular.

Outro fator que deve ser levado em consideração é o tempo de ativação das enzimas antioxidantes, visto que conforme Jha et al. (2015) as enzimas possuem um tempo variável entre 24 e 72 horas de ativação após as plantas serem submetidas ao estresse. Assim, a avaliação apenas no sétimo dia após a semeadura, como realizada no trabalho, não permite acompanhar a atividade da enzima durante o período em que as plântulas foram submetidas ao estresse de baixa temperatura, sendo possível que a atividade da SOD tenha sofrido alteração no período anterior ao da avaliação.

Com base nos resultados da guaiacol peroxidase (POD) na raiz primária de plântulas (Figura 4.3D), pode-se observar que na temperatura ótima (25 °C) para a germinação das sementes de feijão não houve diferença nas concentrações de AS. No geral, a atividade da POD foi maior nessa temperatura, apesar de nesta condição ser observada redução no acúmulo de massa fresca e seca de raiz primária de plântula (Figura 4.1C e 4.1F). Dessa forma, ainda que a atividade da POD fosse alta, podemos considerar que as plântulas sofreram algum outro estresse ou dano que não permitiu o desenvolvimento da raiz primária das plântulas nesta condição.

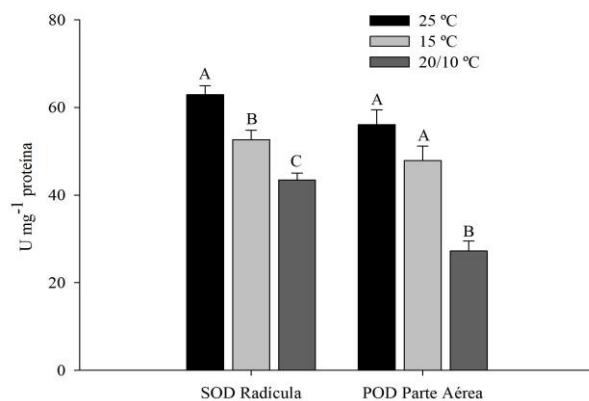
Na temperatura de 15 °C a aplicação de 250 μM e 500 μM de AS promoveu um aumento da atividade da POD, podendo indicar redução da concentração de H_2O_2 e maior tolerância dessas plântulas ao estresse de baixa temperatura. Confirmando esses resultados, observou-se que a utilização de 250 μM de AS promoveu um aumento do acúmulo de massa fresca de raiz primária de plântulas (Figura 4.1C), possivelmente em função do redução do estresse oxidativo. Na temperatura de 20-10 °C a concentração de 750 μM de AS também promoveu um aumento da atividade da POD na raiz primária das plântulas, mas não diferiu do tratamento sem AS e aplicação de 250 μM de AS.

Esses resultados sugerem que a ativação da enzima antioxidante POD na raiz primária das plântulas é induzida pela aplicação de AS, contribuindo com a redução do estresse nas plântulas. No entanto, essa ativação é variável em função da temperatura e da concentração de AS utilizada, conforme já relatado em outros estudos (CHEN et al., 2011; ZHANG et al., 2011; MUTLU et al., 2013; 2016).

Para a SOD na raiz primária e POD na parte aérea das plântulas verificou-se efeito significativo apenas para o fator temperatura, ou seja, a aplicação de AS não interferiu na atividade dessas enzimas (Figura 4.4). Nesses casos, houve redução da atividade da SOD e POD, na raiz primária e parte aérea, respectivamente, com a utilização de temperaturas baixas durante a germinação e desenvolvimento inicial das plântulas de feijão. Essa menor atividade enzimática nas plântulas submetidas às baixas temperaturas certamente apresenta influência na redução da germinação, crescimento e massa fresca e seca das plântulas, conforme os resultados apresentados na Figura 4.1 e Tabela 4.1, devido ao aumento de EROs e do estresse oxidativo.

Porém, esses resultados vão de encontro com outros estudos que verificaram aumento da atividade das enzimas POD e SOD em condição de baixa temperatura (ZHANG et al., 2011; ESIM; ATICI, 2015), pois em condição de estresse ocorre aumento da produção de EROs e, conseqüentemente, as enzimas antioxidantes, como a SOD e a POD são ativadas, com o objetivo de reduzir o estresse oxidativo.

Figura 4.4 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) da raiz primária e atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) da parte aérea de plântulas de feijão da cultivar Fepagro 26 embebidas em ácido salicílico por 24 horas e submetidas à germinação em diferentes temperaturas.



*Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as temperaturas, pelo teste Scott-Knott, $p < 0,05$.

4.5 CONCLUSÕES

As temperaturas de 15 °C e 20-10 °C prejudicam a germinação e o vigor das sementes de feijão, mas as cultivares Fepagro 26 e Predileto apresentam comportamento distinto quanto ao estresse de baixa temperatura.

O ácido salicílico exógeno induz a tolerância das plântulas de feijão ao estresse de baixa temperatura durante a germinação e o desenvolvimento inicial, promovendo maior germinação e vigor das sementes.

Concentrações de ácido salicílico entre 100 µM e 400 µM promovem a tolerância de plântulas de feijão da cultivar Fepagro 26 ao estresse de baixa temperatura, e concentrações entre 250 µM e 700 µM de ácido salicílico favorecem a germinação e o vigor das sementes da cultivar Predileto sob baixa temperatura.

O ácido salicílico induz a ativação da enzima antioxidante guaiacol peroxidase na raiz primária de plântulas de feijão da cultivar Fepagro 26 sob baixa temperatura, mas não induz a ativação da enzima superóxido dismutase e não reduz a peroxidação lipídica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO-RAMÍREZ, A. et al. Evidence for a role of gibberellins in salicylic acid-modulated early plant responses to abiotic stress in *Arabidopsis* seeds. **Plant Physiology**, v. 150, n. 3, p. 1335-1344, 2009.

ANTONIC, D. et al. Effects of exogenous salicylic acid on *Impatiens walleriana* L. grown *in vitro* under polyethylene glycol-imposed drought. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 226-223, 2016.

ASHRAF, M. et al. The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 3, p. 162-190, 2010.

BALOGLU, M. C. et al. Antioxidative and physiological responses of two sunflower (*Helianthus annuus*) cultivars under PEG-mediated drought stress. **Turkish Journal of Botany**, v. 36, n. 1, p. 707-714, 2012.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochemistry**, v. 8, n. 44, p. 276-287, 1971.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF: MAPA, 395p, 2009.

- CHEN, S. et al. Alleviation of chilling-induced oxidative damage by salicylic acid pretreatment and related gene expression in eggplant seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 65, n. 1, p.101-108, 2011.
- EL-MOSHATY, F. I. B. et al. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 43, n. 2, p. 109-119, 1993.
- ESIM, N.; ATICI, O. Effects of exogenous nitric oxide and salicylic acid on chilling-induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum*). **Frontiers Life Science**, v. 8, n. 2, p. 124-130, 2015.
- FACIN, F. et al. Vigor de sementes e crescimento inicial de plantas de feijão sob efeito de baixas temperaturas. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 8, n. 4, p. 35-40, 2014.
- FARHANGI-ABRIZ, S.; GHASSEMI-GOLEZANI, K. How can salicylic acid and jasmonic acid mitigate salt toxicity in soybean plants? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 1010-1016, 2018.
- FAROOQ, M. et al. Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 194, n. 2, p. 161-168, 2008.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p.1039-1042, 2011.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p.309-14, 1977.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.
- HAYAT, Q. et al. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, n. 1, p. 14-25, 2010.
- HORVÁTH, E. et al. Hardening with salicylic acid induces concentration-dependent changes in abscisic acid biosynthesis of tomato under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 183, p. 54-63, 2015.
- JALEEL, C. A. et al. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 11, n. 1, p. 100-105, 2009.
- JAYAKANNAN, M. et al. Salicylic acid in plant salinity stress signaling and tolerance. **Plant Growth Regulation**, v. 76, n. 1, p. 25-40, 2015.
- JHA, P. et al. Differential expression of antioxidant enzymes during degradation of azo dye reactive black 8 in hairy roots of *Physalis minima* L. **International Journal of Phytoremediation**, v. 17, p. 305-312, 2015.

- JINI, D.; JOSEPH, B. Physiological mechanism of salicylic acid for alleviation of salt stress in rice. **Rice Science**, v. 24, n.2, p. 97–108, 2017.
- KANG, H. M.; SALTVEIT, M. E. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. **Physiologia Plantarum**, v. 115, n. 4, p. 571-576, 2002.
- KIM, Y. et al. Regulation of reactive oxygen and nitrogen species by salicylic acid in rice plants under salinity stress conditions. **Plos One**, v. 13, n. 3, p. 1-20, 2018.
- LEE, S.; KIM, S. G.; PARK, C. M. Salicylic acid promotes seed germination under high salinity by modulating antioxidant activity in Arabidopsis. **New Phytologist**, v. 188, n. 2, p. 626-637, 2010.
- LÓPEZ, A. M. L. et al. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 4, p. 277-283. 2006.
- MARINI, P. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de arroz submetidas ao estresse térmico. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 722-730, 2012.
- MELLOUK, Z.; BENAMMAR, I.; HERNANDEZ, Y. Effects of foliar application with salicylic acid on the biochemical parameters and redox status in two canola plant varieties exposed to cold stress. **International Journal of Agronomy and Agricultural Research**, v. 8, n. 5, p. 77-87, 2016.
- MIURA, K.; TADA, Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. **Frontiers Plant Science**, v. 5, n. 4, p. 1-12, 2014.
- MOLAZEM, D; BASHIRZADEH, A. Effects of salicylic acid and salinity on growth of maize plant (*Zea mays* L.) **International Journal of Biosciences**, v. 4, n. 9, p. 76-82, 2014.
- MUTLU, S. et al. Exogenous salicylic acid alleviates cold damage by regulating antioxidative system in two barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. **Frontiers in Life Science**, v. 9, n. 2, p. 99-109, 2016.
- MUTLU, S. et al. Protective role of salicylic acid applied before cold stress on antioxidative system and protein patterns in barley apoplast. **Biologia Plantarum**, v. 57, n. 3, p. 507-513, 2013.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F. C. et al. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES. 1999.
- NAZAR, R. et al. Salicylic acid supplementation improves photosynthesis and growth in mustard through changes in proline accumulation and ethylene formation under drought stress. **South African of Botany**, v. 98, p. 84-94, 2015.
- NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C. H. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. **Plant Physiology**, v. 164, n. 4, p. 1636-1648, 2014.

- PARASHAR, A. et al. Salicylic acid enhances antioxidant system in *Brassica juncea* grown under different levels of manganese. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 551-558, 2014.
- POÓR, P. et al. Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with stomatal response, CO₂ fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato, and decrease harmful effects of subsequent salt stress. **Plant biology**, v. 13, n. 1, p. 105-114, 2011.
- SEDAGHAT, M. et al. Physiological and antioxidant responses of winter wheat cultivars to strigolactone and salicylic acid in drought. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 119, p. 59-69, 2017.
- SENARATNA, T. et al. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. **Plant Growth Regulation**. v. 30, n. 2, p. 157-161. 2000.
- SHAKI, F.; MABOUD, H. E.; NIKNAM, V. Growth enhancement and salt tolerance of safflower (*Carthamus tinctorius* L.), by salicylic acid. **Current Plant Biology**, v. xx, n. x, p. xx-xx, 2018.
- SHAKIROVA, F. M. et al. Salicylic acid-induced protection against cadmium toxicity in wheat plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.122, p. 19-28, 2015.
- SIEBENEICHLER, S. C. et al. Efeitos da baixa temperatura no crescimento e nos teores de açúcares solúveis e de prolina em dois cultivares de feijão. **Revista Ceres**, v. 47, n. 273, p. 495-509, 2000.
- SINGH, S. P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, v. 45, n. 3, p. 379-396, 1991.
- SYEED, S. et al. Salicylic acid-mediated changes in photosynthesis, nutrients content and antioxidant metabolism in two mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in salt tolerance. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 3, p. 877-886, 2011.
- WANG, Y. et al. Salicylic acid analogues with biological activity may induce chilling tolerance of maize (*Zea mays*) seeds. **Botany**, v. 90, n. 9, p. 845-855, 2012.
- ZABOT, L. et al. Temperatura e qualidade fisiológica no crescimento de plântulas de feijoeiro. **Revista Brasileira Agrocências**, v. 14, n. 4-4, p. 60-64, 2008
- ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v.31, n. 4, p.731-734, 2008.
- ZHANG, W. P. et al. Impact of salicylic acid on the antioxidant enzyme system and hydrogen peroxide production in *Cucumis sativus* under chilling stress. **Journal of Sciences**, v. 7, n. 8, p. 413-422, 2011.

ZHU, Z. et al. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, v.167, p.527-533, 2004.

ZUCARELI, C. et al. Métodos e temperaturas de hidratação na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 3, p. 684-692, 2011.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados deste trabalho foi possível observar que a aplicação exógena de ácido salicílico (AS) em sementes de feijão afeta negativamente a germinação e o vigor das sementes das cultivares Fepagro 26 e Predileto. A redução da qualidade fisiológica, no entanto, é mais acentuada em concentrações de AS acima de 1000 μM e utilizando-se o método de embebição no papel de germinação.

O objetivo do primeiro capítulo era verificar se o AS causa redução da qualidade fisiológica das sementes para ser utilizado posteriormente em condição de baixa temperatura, assim optou-se por utilizar concentrações de AS até 1000 μM e a embebição das sementes por 24 horas antes da semeadura para a condução dos experimentos do segundo capítulo.

Sementes das cultivares foram submetidas à germinação em temperaturas baixas observando-se redução da germinação, comprimento e acúmulo de massa nas plântulas de feijão. No entanto, as cultivares Fepagro 26 e Predileto apresentaram comportamento distinto quanto ao estresse de baixa temperatura. A germinação e o vigor das sementes da cultivar Fepagro 26 foram mais prejudicados na temperatura alternada de 20-10 °C, enquanto que, na temperatura constante de 15 °C observou-se maior redução da germinação e do vigor das sementes da cultivar Predileto. Esses resultados demonstram a importância do estudo com diferentes cultivares, visto que, materiais genéticos distintos podem apresentar diferentes níveis de tolerância às baixas temperaturas durante a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas.

Conforme os resultados apresentados no segundo capítulo, percebeu-se que o AS aplicado nas sementes, induz a tolerância das plântulas de feijão ao estresse de baixa temperatura durante a germinação e o desenvolvimento inicial, promovendo maior germinação e vigor das sementes. Porém, as concentrações de AS variam dependendo da cultivar e da temperatura utilizada para simular o estresse de baixa temperatura, considerando temperaturas constantes e alternadas. Concentrações de AS entre 100 μM e 400 μM promovem a tolerância de plântulas de feijão da cultivar Fepagro 26 ao estresse de baixa temperatura, e concentrações entre 250 μM e 700 μM de AS favorecem a germinação e o vigor das sementes da cultivar Predileto sob baixa temperatura.

O AS também induziu a ativação da enzima antioxidante guaiacol peroxidase na raiz primária de plântulas de feijão da cultivar Fepagro 26 sob baixa temperatura, confirmando seu efeito benéfico em condição estressante, visto que, essa é uma das enzimas responsáveis por controlar as espécies reativas de oxigênio (EROs) e reduzir o estresse oxidativo nas plântulas

submetidas ao estresse. No entanto, esperava-se que o AS também promovesse a ativação da enzima superóxido dismutase e a redução da peroxidação lipídica nas plântulas de feijão, porém, esses resultados não foram observados.

Novas pesquisas podem ser conduzidas buscando esclarecer o efeito do AS e estresse de baixa temperatura na atividade de enzimas antioxidantes de plantas de feijão, realizando-se análise enzimática, de peroxidação lipídica e do conteúdo de peróxido de hidrogênio em intervalos regulares durante o período de estresse, com o objetivo de verificar o tempo de ativação do sistema enzimático antioxidante da planta. Além do sistema antioxidante enzimático, é importante realizar análise de antioxidantes não enzimáticos, como a prolina, que também atua em condição de estresse abiótico.

APÊNDICES

Apêndice A - Resumo da análise de variância para as variáveis: germinação (G), primeira contagem (PC), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz primária (CR), comprimento total (CT), massa fresca de parte aérea (MFPA), massa fresca de raiz primária (MFR), massa fresca total (MFT), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz primária (MSR) e massa seca total (MST) de plântulas de feijão das cultivares Fepagro 26 e Predileto submetidas à embebição em ácido salicílico no papel de germinação.

Quadrados médios												
Fepagro 26												
FV	GL	G ¹	PC ¹	CPA	CR	CT ²	MFPA	MFR	MFT	MSPA	MSR	MST
AS	6	174,79*	194,95*	1,54*	11,35*	0,31*	4353,29*	4028,49*	16556,00*	59,00*	21,15*	114,31*
Erro	21	36,67	25,57	0,54	1,50	0,04	1465,54	220,30	1755,21	12,28	1,03	13,02
CV (%)		7,50	6,77	11,99	10,39	5,21	10,62	9,94	8,22	9,53	7,26	7,10
Predileto												
FV	GL	G ¹	PC ¹	CPA ²	CR ²	CT ²	MFPA	MFR	MFT	MSPA ²	MSR	MST
AS	6	164,61*	220,38*	0,17*	1,48*	1,39*	6599,98*	3162,05*	17527,33*	0,57*	15,65*	120,74*
Erro	21	50,92	41,86	0,01	0,01	0,00	898,81	70,25	1140,21	0,09	0,42	11,57
CV (%)		8,93	8,86	5,75	3,69	2,54	11,18	6,19	8,37	6,09	5,71	9,38

FV= fator de variação; GL= grau de liberdade; AS= ácido salicílico; CV= coeficiente de variação. *Significativo a 5% de probabilidade. ^{ms} Não significativo a 5% de probabilidade.

¹Dados transformados arco-seno $\sqrt{\%/100}$. ²Dados transformados \sqrt{x} .

Apêndice B - Resumo da análise de variância para as variáveis: germinação (G), primeira contagem (PC), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz primária (CR), comprimento total (CT), massa fresca de parte aérea (MFPA), massa fresca de raiz primária (MFR), massa fresca total (MFT), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz primária (MSR) e massa seca total (MST) de plântulas de feijão das cultivares Fepagro 26 e Predileto submetidas à embebição em ácido salicílico em caixas plásticas por 24 horas.

Quadrados médios												
Fepagro 26												
FV	GL	G ¹	PC ¹	CPA	CR ²	CT	MFPA	MFR	MFT	MSPA ²	MSR	MST
AS	6	100,98 ^{ns}	64,36 ^{ns}	3,53*	0,16*	21,47*	7202,66*	1926,91*	15392,62*	0,18*	11,30*	73,62*
Erro	21	57,95	63,92	0,12	0,00	0,45	1388,19	305,78	2104,15	0,02	1,81	5,22
CV (%)		9,64	10,27	4,90	2,04	3,41	6,82	11,71	6,60	2,16	10,49	3,96
Predileto												
FV	GL	G ¹	PC ¹	CPA	CR	CT	MFPA	MFR	MFT	MSPA	MSR	MST
AS	6	29,93 ^{ns}	30,23 ^{ns}	0,32 ^{ns}	8,15*	9,07*	2651,82 ^{ns}	2128,38*	8821,21*	14,81 ^{ns}	18,44*	59,61*
Erro	21	38,76	36,89	0,44	0,72	1,23	1433,26	416,38	2230,00	6,50	1,52	7,80
CV (%)		7,63	7,50	8,79	7,41	5,84	8,43	12,19	7,66	6,24	8,70	5,07

FV= fator de variação; GL= grau de liberdade; AS= ácido salicílico; CV= coeficiente de variação. *Significativo a 5% de probabilidade. ^{ns} Não significativo a 5% de probabilidade.

¹Dados transformados arco-seno $\sqrt{\%/100}$. ²Dados transformados \sqrt{x} .

Apêndice C - Resumo da análise de variância para as variáveis: germinação (G), primeira contagem (PC), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz primária (CR), comprimento total (CT), massa fresca de parte aérea (MFPA), massa fresca de raiz primária (MFR), massa fresca total (MFT), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz primária (MSR) e massa seca total (MST) de plântulas de feijão das cultivares Fepagro 26 e Predileto embebidas em ácido salicílico por 24 horas e submetidas à germinação em diferentes temperaturas.

Quadrados médios												
Fepagro 26												
FV	GL	G ¹	PC ¹	CPA	CR	CT	MFPA	MFR	MFT	MSPA	MSR	MST
AS	4	31,75 ^{ns}	385,80*	1,22 ^{ns}	2,47*	4,83 ^{ns}	16194,78*	1615,18*	25354,04*	128,00*	1234,95*	209,34*
T	3	190,20*	4310,88*	41,41*	100,95*	238,05*	289534,31*	33593,94*	342302,22*	1621,92*	169,48*	2104,40*
AS*T	12	35,40 ^{ns}	154,68*	1,50 ^{ns}	1,01 ^{ns}	3,74 ^{ns}	6534,31*	1362,94*	9568,99*	36,12*	6,93*	68,10*
Erro	60	34,62	46,01	1,01	0,68	2,22	3090,68	531,94	3925,63	13,09	2,62	18,53
CV (%)		7,17	10,16	13,68	5,68	6,78	11,99	8,93	8,67	9,23	8,65	7,43
Predileto												
FV	GL	G ¹	PC ¹	CPA	CR	CT	MFPA	MFR	MFT	MSPA	MSR	MST
AS	4	47,21 ^{ns}	37,21 ^{ns}	0,98 ^{ns}	0,33 ^{ns}	1,68 ^{ns}	1639,85 ^{ns}	295,70 ^{ns}	3175,33 ^{ns}	17,55 ^{ns}	5,26*	40,93 ^{ns}
T	3	1364,18*	15118,35*	124,97*	180,70*	601,96*	554741,64*	63526,16*	821566,42*	4406,90*	315,74*	6379,11*
AS*T	12	93,59*	68,70*	0,73 ^{ns}	1,57 ^{ns}	2,41 ^{ns}	3111,50*	541,58 ^{ns}	5420,78*	18,49 ^{ns}	3,51 ^{ns}	34,40 ^{ns}
Erro	60	37,81	22,94	0,41	0,83	1,72	1442,76	325,93	2398,51	11,18	2,03	18,60
CV (%)		8,23	8,63	9,95	6,99	6,69	10,10	9,78	8,73	9,79	9,87	8,87

FV= fator de variação; GL= grau de liberdade; AS= ácido salicílico; T= temperatura; AS*T= interação ácido salicílico e temperatura; CV= coeficiente de variação. *Significativo a 5% de probabilidade. ^{ns} Não significativo. ¹Dados transformados.

Apêndice D - Resumo da análise de variância para as variáveis: peroxidação lipídica da parte aérea (TBARS PA), peroxidação lipídica da raiz primária (TABRS R), atividade da enzima superóxido dismutase da parte aérea (SOD PA), atividade da enzima superóxido dismutase da raiz primária (SOD R), atividade da enzima guaiacol peroxidase da parte aérea (POD PA) e atividade da enzima guaiacol peroxidase da raiz primária (POD R) de plântulas de feijão da cultivar Fepagro 26 embebidas em ácido salicílico e submetidas à germinação em diferentes temperaturas.

Quadrados médios							
FV	GL	TBARS	TBARS	SOD PA	SOD R	POD PA	POD R
AS	3	0,0005 ^{ns}	0,0013*	173,38 ^{ns}	42,65 ^{ns}	122,37 ^{ns}	202,46 ^{ns}
T	2	0,0013*	0,0001 ^{ns}	32071,28*	1517,10*	3535,84*	10324,25*
AS*T	6	0,0005*	0,0018*	3184,37*	46,91 ^{ns}	257,60 ^{ns}	2076,39*
Erro	36	0,0002	0,0004	420,57	65,58	128,87	469,18
CV		10,14	10,81	21,59	15,28	25,96	25,18

FV= fator de variação; GL= grau de liberdade; AS= ácido salicílico; T= temperatura; AS*T= interação ácido salicílico e temperatura; CV= coeficiente de variação. *Significativo a 5% de probabilidade. ^{ns} Não significativo.