



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (PMBqBM/UFBA - SBBq)**



VALDIR GOMES NETO

**ATIVIDADE DE SUPERÓXIDO DISMUTASE EM SEMENTES
DE MAMONA (*Ricinus communis* L.) SOB RESTRIÇÃO HÍDRICA**

**SALVADOR
2016**

VALDIR GOMES NETO

**ATIVIDADE DE SUPERÓXIDO DISMUTASE EM SEMENTES
DE MAMONA (*Ricinus communis* L.) SOB RESTRIÇÃO HÍDRICA**

Dissertação de mestrado apresentada para o Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular PMBqBM – UFBA/SBBq, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal da Bahia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Suzana Telles da Cunha Lima

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Ione Salgado

**SALVADOR
2016**

ATIVIDADE DE SUPERÓXIDO DISMUTASE EM SEMENTES DE MAMONA (*Ricinus communis* L.) SOB RESTRIÇÃO HÍDRICA

Trabalho de dissertação apresentado como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular, Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

12 de setembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr^a. Suzana Telles da Cunha Lima_____

Doutora em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Brasil). Prof^a. Adjunta da Universidade Federal da Bahia (UFBA, Brasil).

Prof. Dr. Carlos Takeshi Hotta_____

Doutor em Ciência das Plantas pela University of Cambridge (CAM, Inglaterra). Prof. Adjunto da Universidade de São Paulo (USP, Brasil).

Prof. Dr^a Renata Silva-Mann_____

Doutora em Agronomia Fitotecnia pela Universidade Federal de Lavras. Prof^a. Associada da Universidade Federal de Sergipe (UFS, Brasil).

Dedico esta dissertação aos meus pais Maria Rita e Inacio Gomes, que sempre me deram apoio, carinho, dedicação, incentivo durante a minha graduação e agora no mestrado. Tudo que conquistei dedico a vocês, os quais sempre me guiaram nos caminhos corretos da vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus companheiros e amigos do Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB) pela grande amizade e ajuda.

Em especial agradeço aos estudantes de iniciação científica Talita Anunciação, Bianca Bonfim, Gabriel Joaley, Raquel Freitas e Maria Borges que muito dedicaram em seus planos de trabalho em suporte à minha pesquisa e projeto de dissertação de mestrado. Assim como a todos demais estagiários que acompanharam minha jornada, dentre os quais Laizo Silva, Isabele Bispo, Geiva Dória e Bianca Vilas Ricardo Caribé, Matheus Ferreira, Diego Agnelo, Fernando Luiz, Laiana Santiago, Thales Guimarães.

Agradeço aos pós-graduandos do Laboratório LBBB que estão presentes e os que já deixaram o LBBB, Ivana Virgens, Adilson Nunes, Rafael Simões, Cristiane Brito, Marília Mércia. Mas em especial à Cimille Antunes, e ao Paulo Ribeiro pela imensa participação e contribuição do meu trabalho.

Aos professores do Laboratório LBBB por todo suporte e ajuda diária. Mas em especial ao professor Renato Delmondez, a professora Daniele Takahashi, a professora Luzimar Gonzaga Fernandez e a professora Marta Bruno Loureiro, que conheço desde a graduação e sempre foram muito atenciosos comigo. Obrigado ao LBBB pela oportunidade de vínculo e onde pude conduzir iniciação científica e executar o mestrado.

Agradeço ao laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABBIOTEC), em especial a professora Suzana Telles da Cunha Lima, que aceitou a orientação de mestrado junto ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM - UFBA) e por toda atenção e ajuda.

À Universidade Federal da Bahia, por me acolher na minha graduação em Biotecnologia e agora na Pós-graduação junto ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM-UFBA). À secretaria do Colegiado Local do PMBqBM-UFBA pelo tratamento que nos oferece a cada dia, iniciado pela secretária Patrícia Campos, e atualmente por Pedro Nunes.

À Fundação de Amparo a Pesquisa da Bahia (FAPESB, pelo apoio financeiro por meio da bolsa de mestrado. Ao CNPq, CAPES/PNPD e PETROBRÁS pelos recursos financeiros que deram suporte aos projetos ao qual meu projeto de mestrado esteve vinculado.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

LISTAS DE FIGURAS

Revisão de literatura

- Figura 1:** Curva de embebição de sementes.
- Figura 2:** Curva de embebição de sementes incubadas em água ($\Psi_{os} = 0,0$ MPa) e em soluções osmóticas ($\Psi_{os} < 0,0$ MPa), e o efeito de envigoramento ou *priming*.
- Figura 3:** Balanço entre espécies reativas de oxigênio (ERO) e o sistema antioxidante.
- Figura 4:** Mecanismo de defesa antioxidante por diferentes enzimas em plantas.
- Figura 5:** Diversidade e localização de isoformas de superóxido dismutase.

Capítulo 1- Caracterização fenotípica de sementes mamona (*Ricinus communis* L.)

- Figura 1:** Representação dos dados morfométricos (comprimento, largura, espessura e volume) e peso de 100 das sementes dos 19 genótipos de mamona através das componente 1 e componente 2 na análise de componentes principais (ACP).
- Figura 2:** Dendograma de agrupamento gerado a partir do coeficiente de distância euclidiana, utilizando-se o método de associação de wards para dados morfométricos e peso de 100 de sementes de 19 genótipos de mamona.
- Figura 3:** Classificação de sementes de *Ricinus communis* L. quanto ao tamanho.
- Figura 4:** Germinação máxima (gMAX), Uniformidade de germinação entre 84% e 16% (U_{84-16}), Tempo médio de germinação (TMG) e Área abaixo da curva (AAC) de sementes dos 19 genótipos de mamona. Em A) sementes pequenas, B) sementes médias e C) sementes grandes.
- Figura 5:** Análise multivariada do Axis1 da análise de componentes principais (ACP) com a porcentagem de germinação (gMAX) das sementes dos 19 genótipos de mamona.
- Figura 6:** Análise multivariada do Axis1 da análise de componentes principais (ACP) com a uniformidade (U_{84-16}) das sementes dos 19 genótipos de mamona.

- Figura 7:** Análise multivariada do Axis1 da análise de componentes principais (ACP) com o tempo médio de germinação (TMG) das sementes dos 19 genótipos de mamona.
- Figura 8:** Análise multivariada do Axis1 da análise de componentes principais (ACP) com a área abaixo da curva (AAC) das sementes dos 19 genótipos de mamona.
- Figura 9:** Plântulas normais (PPN), tamanho de plântula (TP), massa seca de plântula (MS) de 19 genótipos de mamona. Em A) sementes pequenas, B) sementes médias e C) sementes grandes.
- Figura 10:** Análise multivariada do Axis1 da análise de componentes principais (ACP) com a porcentagem de plântulas normais (PPN) das sementes dos 19 genótipos de mamona.
- Figura 11:** Análise multivariada do Axis1 da análise de componentes principais (ACP) com a tamanho de plântulas normais (TP) das sementes dos 19 genótipos de mamona.
- Figura 12:** Análise multivariada do Axis1 da análise de componentes principais (ACP) com a massa seca de plântulas normais (MP) das sementes dos 19 genótipos de mamona.
- Figura 13:** Viabilidade de sementes de *Ricinus communis* L. avaliadas por meio do teste de tetrazólio.

Capítulo 2- Efeito do osmocondicionamento na germinação e vigor de sementes de mamona dos genótipos cv. MPA 34 e 'BRS PARAGUAÇU' (*Ricinus communis* L.)

- Figura 1:** Efeito do osmocondicionamento em potenciais -0.1 a -1.0 MPa na germinação (gMAX), uniformidade (U8416), tempo médio de germinação (TMG) e área abaixo da curva (AAC) em sementes dos genótipos MPA 34 e 'BRS PARAGUAÇU'.
- Figura 2:** Efeito do osmocondicionamento em potenciais -0.1 a -1.0 MPa na porcentagem de plântulas normais (PPN), tamanho de plântulas (TP) e massa seca de plântulas (MS) em sementes dos genótipos MPA 34 e 'BRS PARAGUAÇU'.

Capítulo 3- Atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD) em sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) sob restrição hídrica.

- Figura 1:** Curva de embebição de sementes dos genótipos MPA 34 e 'BRS PARAGUAÇU' sob os potenciais osmóticos (0.0 MPa em água, e -0.2, -0.6, e -1.0 MPa em PEG 8000).
- Figura 2:** Atividade de SOD (U SOD.µg de proteínas) em radículas e cotilédones de sementes dos genótipo MPA 34 e 'BRS PARAGUAÇU', embebidas

por 12, 24 e 40h, nos potencias 0.0, -0.2, -0.6, -1.0 MPa em PEG 8000.

LISTAS DE TABELAS

Capítulo 1- Caracterização fenotípica de sementes mamona (*Ricinus communis* L.)

Tabela 1: Morfometria de sementes de diferentes genótipos de *Ricinus communis* L.

Tabela 2: Teor de água, peso de 100 sementes de genótipos de *Ricinus communis* L.

Tabela 3: Correlação entre os caracteres aplicados no ACP e os eixos gerados.

Tabela 4: Viabilidade de sementes de *Ricinus communis* L. avaliada pelo teste de tetrazólio para diferentes genótipos.

Capítulo 2- Efeito do osmocondicionamento na germinação e vigor de sementes de mamona dos genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' (*Ricinus communis* L.).

Tabela 1: Concentração de polietilenoglicol (PEG 8000) utilizada para obter os diferentes potenciais osmóticos, à 25°C.

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

- AAC – Área abaixo da curva
APX – Ascorbato peroxidase
ACP – Análise de componentes principais
BAG – Banco de germoplasma
BOD – Câmara de germinação
CAT – Catalase
CEMC – Campo experimental de Montes Claro
Cu – Cobre
DNA – Ácido desoxirribonucléico
EBDA – Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPAMIG – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais.
ERO – Espécies reativas de oxigênio
Fase-I – Primeira fase da germinação
Fase-II – Segunda fase da germinação
Fase-III – Terceira fase da germinação
Fe – Ferro
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
IAC – Instituto Agrônomo de Campinas
ICS – Instituto de Ciências da Saúde
LBBB – Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos
gMAX – Germinação máxima
Mn – Manganês
mRNA – RNA mensageiro
TMG – Tempo médio de germinação
MS – Massa seca
NBT – Nitroblue de tetrazólio
NO – Óxido nítrico
O – Oxigênio atômico
O₂ – Oxigênio molecular
O₂^{•-} – Radical superóxido

OH• – Radical hidroxila

PEG – Polietilenoglicol

PPN – Porcentagem plântulas normais

P100 – Peso de 100 sementes

RAS – Regras de análise de sementes

SOD – Superóxido dismutase

TP – Tamanho de plântulas

TTZ – Teste de tetrazólio

TU – Teor de umidade

U₈₄₋₁₆ – Uniformidade entre 16 e 84% de germinação

UFBA – Universidade Federal da Bahia

Zn – Zinco

(Ψ_{os}) – potencial osmótico

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------|----|
| RESUMO..... | 15 |
| ABSTRACT..... | 16 |
| JUSTIFICATIVA..... | 17 |
| OBJETIVOS..... | 18 |
| INTRODUÇÃO GERAL | 19 |
| CONTEXTUALIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO | 29 |
| REFERÊNCIAS..... | 31 |

CAPÍTULO 1

Caracterização fenotípica de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.)

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 38 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 39 |
| 2.1 Material biológico | 39 |
| 2.1.1 Genótipos | 39 |
| 2.1.2 Armazenamento | 40 |
| 2.2 Teor de água | 40 |
| 2.3 Morfometria das sementes | 41 |
| 2.4 Teste de viabilidade de sementes por tetrazólio | 41 |
| 2.5 Teste de germinação..... | 42 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 43 |
| 3.1 Morfometria das sementes | 43 |
| 3.2 Teste de germinação..... | 50 |
| 3.3 Teste de viabilidade de sementes por tetrazólio | 59 |
| 4. CONCLUSÃO..... | 62 |
| 5. REFERÊNCIAS..... | 63 |

CAPÍTULO 2

Efeito do osmocondicionamento na germinação e vigor de sementes de mamona dos genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' (*Ricinus communis* L.)

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 67 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 68 |
| 2.1 Material biológico | 68 |
| 2.2 Osmocondicionamento e reidratação de sementes | 68 |
| 2.3 Análise estatística | 70 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 70 |
| 4. CONCLUSÃO..... | 74 |
| 5. REFERÊNCIAS..... | 75 |

CAPÍTULO 3

Atividade enzimática de superóxido dismutase em sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) sob déficit hídrico

| | |
|--|-----|
| 1. INTRODUÇÃO | 79 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 80 |
| 2.1. Material biológico | 80 |
| 2.2 Curvas de embebição em diferentes potenciais osmóticos..... | 80 |
| 2.3 Coleta de material biológico para ensaios bioquímicos e moleculares .. | 80 |
| 2.4 Extração e quantificação de proteínas totais..... | 81 |
| 2.5. Atividade de superóxido dismutase | 82 |
| 2.9 Análise estatística | 83 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 83 |
| 3.1 Curva de embebição em diferentes potenciais osmóticos..... | 83 |
| 3.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)..... | 86 |
| 4. CONCLUSÃO..... | 90 |
| 5. REFERÊNCIAS..... | 91 |
| CONSIDERAÇÕES GERAIS | 95 |
| REFERÊNCIAS..... | 100 |
| ANEXOS | 102 |

ATIVIDADE DE SUPERÓXIDO DISMUTASE EM SEMENTES DE MAMONA (*Ricinus communis* L.) SOB RESTRIÇÃO HÍDRICA

RESUMO

O óleo obtido através das sementes de mamona possui diversas aplicações industriais, produzido na sua maior parte por pequenos agricultores na região do semiárido nordestino. A mamona possui boa adaptação a condições abióticas distintas sendo cultivada em todo território nacional, porém, em regiões com pouca disponibilidade de água sua produtividade é reduzida. Possui grande variabilidade genética, fisiológica e morfológica, que podem ser melhor exploradas para melhoramento genético. O estresse por déficit hídrico tem sido apontado como principal causa da perda de produtividade, onde a melhor capacidade adaptativa a esse estresse tem sido associado com a melhor resposta de enzimas antioxidantes. A superóxido dismutase (SOD) primeira linha de defesa enzimática antioxidante tem sido apontada como uma enzima chave na melhor tolerância de plantas a estresses. O objetivo desse trabalho foi caracterizar genótipos de mamona através da morfologia e fisiologia de suas sementes, a partir disso, escolher dois genótipos contrastantes em vigor de sementes e avaliar o efeito do osmocondicionamento no vigor através do vigor de sementes e da atividade de superóxido dismutase. A partir da caracterização morfométrica das sementes foi possível categorizá-las em três grupos pelo seu volume (pequenas, médias e grandes). O genótipo IAC226, (semente pequena), e os genótipos NORDESTINA, 'MPA34' e 'MPA11' (semente média) apresentaram-se como melhores genótipos nos parâmetros fisiológicos, houve uma prevalência de genótipos com sementes de tamanho médio que obtiveram melhores resultados. Os genótipos 'MPA34' (maior vigor) e 'BRS PARAGUAÇU' (menor vigor) foram escolhidos para os teste de osmocondicionamento por por apresentarem diferença no vigor de sementes, após o osmocondicionamento mostraram resposta diferente ao osmocondicionamento, o genótipo 'MPA34' não apresentou melhoria na sua qualidade fisiológica enquanto que o genótipo 'BRS PARAGUAÇU' melhorou a porcentagem de plântulas normais (PPN) e massa seca (MS) alcançando o efeito de *priming* após o osmocondicionamento. As sementes de mamona mostraram padrão trifásico de embebição, porém, sementes do genótipo 'BRS PARAGUAÇU' demonstraram embeber mais água durante a germinação. O genótipo 'BRS PARAGUAÇU' obteve menor variação da atividade de SOD tanto em radícula quanto em cotilédone que o genótipo 'MPA34' entre os potenciais osmóticos e tempo de embebição. A menor variação da atividade de SOD em radícula e cotilédone nos diferentes tempos de embebição e potenciais osmóticos e o efeito de *priming* alcançado pelo genótipo 'BRS PARAGUAÇU' pode indicar uma melhor tolerância a estresse hídrico em relação ao genótipo 'MPA34'.

Palavras chave: Melhoramento genético. Osmocondicionamento. Embebição de sementes. Enzimas antioxidantes.

SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY IN CASTOR BEAN SEEDS
(Ricinus communis L.) UNDER WATER RESTRICTION

ABSTRACT

The oil obtained from the castor bean has multiple industrial applications, and is produced mostly by small farmers in the northeastern semiarid region of Brazil. Castor has good adaptation to different abiotic conditions being cultivated throughout the country, but in areas with limited availability of water the productivity is reduced. It has great genetic, physiological and morphological variability, which can be better exploited for breeding. The drought stress has been appointed as a major cause of productivity loss, where the best adaptive capacity to this stress has been associated with the best response of antioxidant enzymes. Superoxide dismutase (SOD) is the first line of antioxidant defense enzymes and has been identified as a key enzyme in better tolerance of plants to abiotic stresses. The objective of this study was to characterize the seed morphophysiology of castor bean genotypes, choose two contrasting genotypes in seed vigor and evaluate the effect of *priming* by means of seed vigor and activity of superoxide dismutase. From the morphometric characterization of the seeds was possible categorize them into three groups by their size (small, medium and large). The IAC226 (small seeds), and NORDESTINA, 'MPA34' and 'MPA11' genotypes (medium seeds) were presented as best genotypes in physiological parameters, where the prevalence of genotypes with medium-sized seeds have shown best germinability profiles. Genotypes 'MPA34' (best vigor) and 'BRS PARAGUAÇU' (lowest vigor) were chosen for the *priming* test for because of their contrasting differences in seed vigor, but which showed opposite physiological responses after *priming*, i.e. the 'MPA34' genotype did not present improvement in their physiological quality, while 'BRS PARAGUAÇU' genotype improved the percentage of normal seedlings (PPN) and dry matter (DM) as positive *priming* effects. Castor seeds showed the standard three-phase germination profile, however, seeds of 'BRS PARAGUAÇU' imbibed more water during germination. 'BRS PARAGUAÇU' had lower variation of SOD activity in both radicle as in cotyledons. The smallest variation of SOD activity in radicle and cotyledon in different times of imbibition and osmotic potential and the effect of *priming* reached by 'BRS PARAGUAÇU' may indicate a better tolerance to drought stress in relation to 'MPA34'.

Keywords: Genetic improvement, *Priming*. Imbibition. Antioxidant Enzymes.

JUSTIFICATIVA

A caracterização da diversidade genética é de grande importância para melhor compreensão dos parâmetros fenotípicos visando ao melhoramento genético da espécie. A caracterização das sementes de mamona por aspectos morfométricos é bem descrita na literatura, porém pouco explorada em associação com parâmetros fisiológicos relacionados a melhor germinabilidade e vigor de sementes e mudas dentre genótipos. A técnica de pré-tratamento por osmocondicionamento tem sido utilizada para o envigoreamento ou *priming* de sementes, em que a restrição hídrica induzida por agentes osmóticos leva à (re)ativação parcial do metabolismo podendo induzir melhorias nos parâmetros de qualidade fisiológica de sementes e mudas, podendo conferir melhor tolerância de sementes e plântulas às condições de estresses abióticos. Os níveis de estresses oxidativos resultantes de estresses abióticos em sementes e plântulas podem estar relacionados ao aumento da atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD) a qual atua como a primeira linha de defesa contra espécies reativas de oxigênio (ERO). O aumento da atividade de SOD pode estar associado a melhor tolerância ao estresse abiótico. Diante do exposto, o projeto visou a caracterização morfofisiológica de 19 genótipos de mamona, buscando dois genótipos contrastantes em germinabilidade e vigor de sementes para então submetê-los a diferentes condições de osmocondicionamento e posterior reidratação, analisando-se o efeito da restrição hídrica pelo osmocondicionamento na germinação de sementes e vigor de plântulas, incluindo-se avaliação bioquímica da atividade de SOD em radícula e cotilédones embrionários em sementes de ambos genótipos. A partir dos resultados, procurou-se estabelecer uma relação de melhor entendimento entre parâmetros morfométricos, fisiológicos e bioquímicos envolvidos na resposta de sementes de mamona ao osmocondicionamento em mamona.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar a morfologia, germinação e o estabelecimento de plântulas de mamona, avaliando-se o vigor e a atividade de superóxido dismutase em condições de restrição hídrica.

Objetivos específicos

- Caracterizar os aspectos morfológicos, germinação de sementes e estabelecimento de plântulas de 19 genótipos de mamona.
- Selecionar dois genótipos contrastantes quanto ao vigor de sementes.
- Estabelecer a curva de embebição de água pelas sementes dos genótipos contrastantes ('MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU') sob diferentes potenciais osmóticos.
- Avaliar os efeitos do osmocondicionamento por sete dias na germinação e desenvolvimento de plântulas dos genótipos ('MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU').
- Avaliar a atividade da enzima superóxido dismutase em radículas e cotilédones embrionários de sementes em três tempos de embebição sob potenciais osmóticos de restrição hídrica.
- Estabelecer a relação entre a atividade da superóxido dismutase e a germinação e o vigor de sementes e plântulas sob condições de restrição hídrica.

INTRODUÇÃO GERAL: Germinação de Sementes de Mamona sob Restrição Hídrica

Variabilidade genética e fenotípica em sementes de mamona

Conhecida como carrapateira, enxerida, rícino, palma-de-cristo ou mamona, a *Ricinus communis* L. pertence à família Euphorbiaceae. O nome *Ricinus*, de origem latina, significa carrapato, devido à forma das suas sementes que remetem ao ácaro. Sua origem ainda é desconhecida, porém estima-se que tenha origem no continente africano ou asiático (EMBRAPA, 2010; SOUZA, 2012).

As principais instituições de pesquisa no Brasil, que possuem bancos de germoplasma de mamona são Instituto agrônomo de Campinas (IAC), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA) atualmente extinta, e o Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) (VIEIRA e LIMA, 2011).

A avaliação de cultivares para o estabelecimento de diferenças ou semelhanças entre acessos de germoplasma, bem como para estimular sua utilização para resgatar o desenvolvimento da cultura. A variabilidade em características botânicas e agrônomicas deve ser conhecida e conservada, pois podem tornar-se fonte de genes alvos para futuros programas de melhoramento (FIGUEIREDO NETO et al., 2005).

Os caracteres morfoagronômicos são eficientes para estudos da diversidade genética, pois proporcionam uma simplificação da quantificação da variação genética e possibilitam avaliar o desempenho dos genótipos no ambiente de crescimento (FUFA et al., 2005).

A certificação de variabilidade com base na diversidade genética é uma estratégia bastante utilizada em programas de melhoramento. Entretanto, a avaliação da diversidade genética como critério de escolha de genitores nos programas de melhoramento genético da mamoneira tem sido pouco realizada (BAHIA et al., 2008). Essa quantificação da diversidade genética pode ser realizada por meio de caracteres agrônomicos, morfológicos e moleculares entre outros (AMORIM et al., 2007).

A diversidade genética relaciona-se com o grau em que as populações se distanciam umas das outras quanto ao conjunto de caracteres que lhes são peculiares. Podendo assim, serem avaliadas em termos da distância entre as populações que estão sendo comparadas (MOREIRA et al., 1994).

Em sementes de mamona muitos descritores morfológicos estão sendo utilizados pela EMBRAPA algodão, dentre eles pode-se citar: comprimento, largura, espessura, peso das sementes, padrão e formato das sementes (MILANI, 2008).

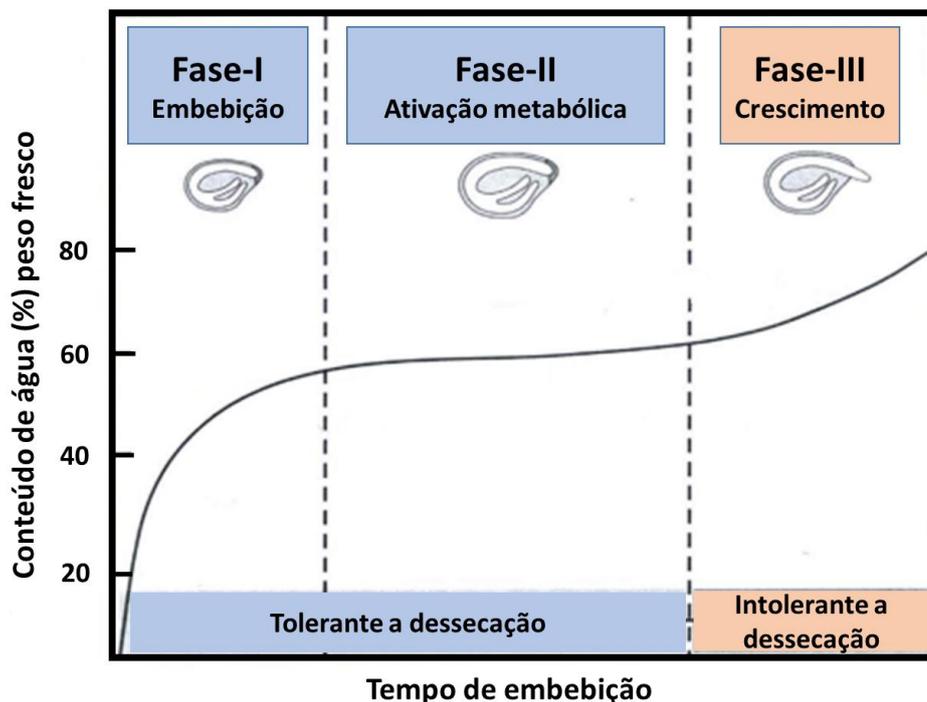
Fases da germinação de sementes e regulação hídrica

A germinação é caracterizada pela retomada das atividades anabólicas e catabólicas, incluindo a respiração, síntese de proteínas e mobilização das reservas após a absorção da água, possibilitando o crescimento do eixo embrionário, culminando com a protrusão da radícula. (BEWLEY e BLACK, 1994; DE CASTRO e HILHORST, 2004).

As principais substâncias de reserva nas sementes são carboidratos, proteínas e lipídios. A proporção dessa composição pode variar de espécie para espécie e até entre espécies de uma mesma família (BEWLEY e BLACK, 1994). Essas substâncias são mobilizadas durante a germinação, e no decorrer do desenvolvimento das plântulas seus produtos de degradação são usados para diferentes propósitos, como a geração de energia e a produção de matéria-prima para a construção de novas células e tecidos (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1975).

Para que ocorra a germinação é necessário que as sementes absorvam água, desencadeando os processos metabólicos (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). A germinação é um processo composto por três fases (Figura 1), que consistem na embebição (Fase-I), reativação dos processos metabólicos (Fase-II), e e crescimento do embrião por meio de expansão e/ou divisões celulares culminando com a protrusão radicular ou germinação *per se* (Fase-III) (DE CASTRO e HILHORST, 2004).

Figura 1: Curva de embebição de sementes.



Fonte: Modificato a partir de: (DE CASTRO e HILHORST, 2004).

Alguns fatores influenciam na quantidade de água que é absorvida pela semente, como por exemplo, as diferenças entre as espécies, cultivares, fatores ambientais, além de características da própria semente como composição química, teor de água inicial e constituição do tegumento (ZUCHI et al., 2012). O tempo de duração de cada fase durante a embebição varia conforme propriedades inerentes da semente, tais como o nível de hidratação do substrato, permeabilidade do tegumento, tamanho da semente e absorção de oxigênio (PINHO et al., 2004).

A germinação das sementes é regulada por vários fatores ambientais, como por exemplo, a umidade, oxigênio, temperatura, luz e nutrientes (SEO et al., 2009), sendo avaliada por alguns parâmetros para interpretar o desempenho da germinação como tempo médio de germinação (TMG), porcentagem máxima de germinação (Gmax), uniformidade de germinação no intervalo entre 84% e 16% de sementes viáveis para germinar (U_{84-16}), área abaixo da curva (AAC) (JOOSEN et al., 2010).

Segundo Oliveira et al. (2004) a mamona é considerada uma planta rústica, onde as variedades selecionadas para o cultivo apresentam, em geral, sementes com

germinação lenta e desuniforme, ficando por mais tempo expostas aos patógenos de solo e às intempéries, o que resulta em estande final irregular. A germinação lenta e irregular representa uma desvantagem na competição inicial com plantas invasoras e vulnerabilidade à estiagem durante a emergência em campo, que pode chegar a 20 dias, nas principais regiões produtoras. Portanto, emergência rápida e uniforme é importante, visto que permite a obtenção de estandes adequados, com plantas bem desenvolvidas, o que facilitará, posteriormente, o manejo durante a colheita e processamento, com reflexos positivos na produtividade da lavoura e no rendimento de óleo.

Restrição hídrica em sementes: osmocondicionamento e *priming*

O osmocondicionamento baseia-se no controle da hidratação das sementes em níveis que permitam o reinício da atividade metabólica pré-germinativa, mas sem que permita a protrusão da radícula, ou a germinação *per se* (Figura 2). Em geral as sementes são postas em contato com soluções aquosas de compostos quimicamente inertes, mas osmoticamente ativos tais como o manitol ou o polietilenoglicol. De modo que as sementes iniciam a embebição, porém paralisando o processo assim que entram em equilíbrio com o potencial osmótico da solução, o qual é regulado a fim de possibilitar que ocorram os processos iniciais da germinação, mas que não haja expansão e divisões celulares o suficientes para que ocorra a protrusão da radícula embrionária. Ou seja, sem que a germinação seja concluída (MARCOS-FILHO, 2005; CASTRO et al, 2004) (Figura 2).

A característica comum entre as técnicas de osmocondicionamento é que todas envolvem a absorção controlada de água. Os processos metabólicos associados ao osmocondicionamento são diferentes no que diz respeito a sua dinâmica quando comparados aos que ocorrem durante a germinação, onde a absorção de água não é controlada (VARIER et al., 2010).

O início da embebição pode resultar em rápido influxo de água para o interior das células da semente seca podendo resultar em perturbações estruturais temporárias, particularmente durante a transição das membranas da fase gel rígida para a fase líquida cristalina, podendo levar à lixiviação e liberação de solutos e metabólitos para

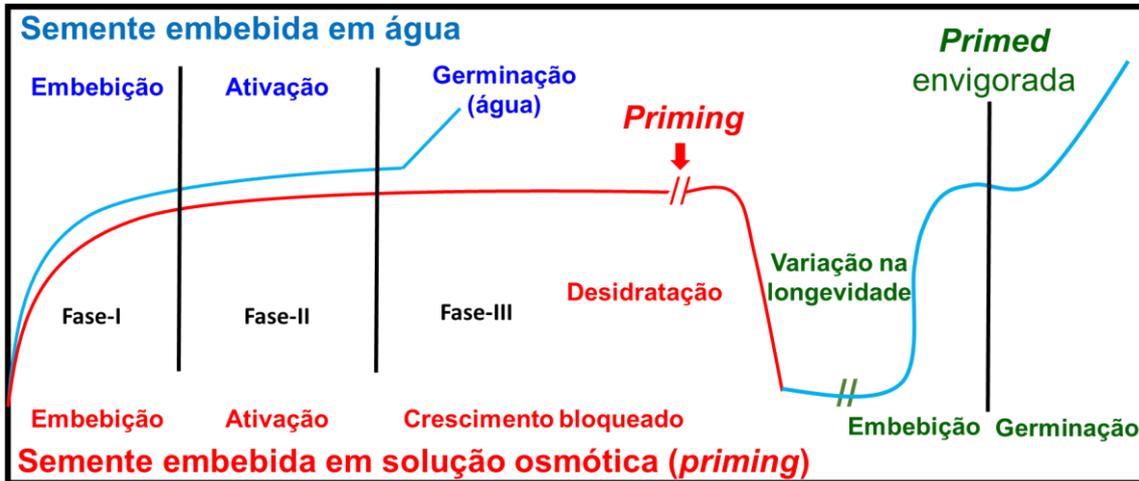
a solução circundante, interferindo na qualidade germinativa das sementes (KRANNER, 2010).

Alternativamente, quando a embebição de sementes ocorre na presença de um agente osmótico, a hidratação é desacelerada ou mais lenta, reduzindo assim o nível de danos celulares normalmente causados pela rápida absorção de água pelas sementes secas (RAJJOU et al., 2012).

Ademais, a reidratação na presença de agentes osmóticos como o polietilenoglicol (PEG), pode favorecer à ativação transiente de mecanismos de reparos contra os possíveis danos causados nas sementes secas, seja pelos diferentes graus de maturação ou imaturidade das sementes secas, pela secagem *per se*, ou pela exposição das sementes secas às intempéries ou condições de estresses a que são geralmente submetidas. Tais mecanismos de reparos incluem a ativação de respostas antioxidantes contra espécies reativas de oxigênio (ERO), e reparos de membranas e de DNA, de modo a preservar ou restaurar total ou parcialmente a integridade do genoma e de membranas (BALESTRAZZI et al., 2011). Conseqüentemente, possibilitando recuperar, manter ou mesmo melhorar a qualidade fisiológica das sementes.

A perda, a manutenção, a recuperação ou a melhoria da qualidade fisiológica como resultado da pré-exposição das sementes às condições de estresses em geral, podem ser avaliados por meio dos parâmetros fisiológicos mensuráveis de germinação e vigor, tais como a uniformidade, velocidade e porcentagem de germinação final, o que por sua vez infere no desenvolvimento de plântulas sob condições de estresses abióticos. Em contrapartida, a melhoria da qualidade de sementes resultante da exposição a condições de estresses abióticos é um fenômeno que pode ocorrer e que é tido hoje como uma tecnologia ou *priming* pela indústria de sementes, e que geralmente resulta da contribuição eficaz dos mecanismos de defesa ativados contra danos comumente causados (Figura 2) (VARIER et al., 2010; JISHA et al., 2013).

Figura 2: Curva de embebição de sementes ortodoxas incubadas em água ($\Psi_{os} = 0,0$ MPa) e em soluções osmóticas ($\Psi_{os} < 0,0$ MPa), e o efeito de envigoramento ou *priming*.



Fonte: Modificado a partir de: <http://www.seedbiology.de/seedtechnology.asp>.

Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio

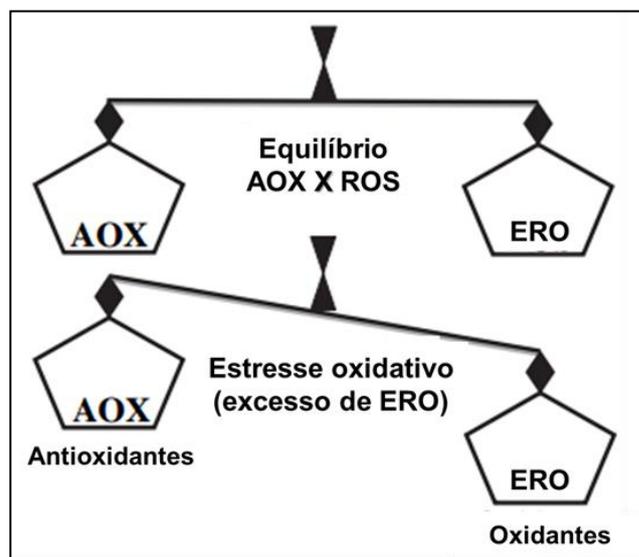
As espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas durante a absorção de água, e são umas das possíveis causas que geralmente afetam prejudicialmente a germinação (WOJTYLA, Ł. et al., 2006). No início da embebição ocorre aumento rápido na captação de oxigênio e na fosforilação oxidativa (TOMMASI et al., 2001). Esta e a mobilização de reservas geram espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem causar dano estrutural e funcional às células (PRODANOVIC et al., 2007).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) afetam vários aspectos da fisiologia de sementes, exibindo duas grandes funções: como uma espécie de citotoxina e como um papel especial no desenvolvimento da semente, quebra de dormência, e na defesa contra estresses bióticos e abióticos (APEL e HIRT, 2004). São produzidos em organismos aeróbicos dentro da célula e estão, normalmente, em equilíbrio com moléculas antioxidantes. O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre geração e eliminação de ERO. Esta citotoxicidade ERO ativada pode perturbar seriamente o metabolismo normal através de dano oxidativo a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (MITTLER et al., 2004; FENG, 2011).

Em condições normais na célula, as ERO são componentes de diversas vias de sinalização, sendo produzidas continuamente como subprodutos das reações de oxidação-redução em níveis menores em organelas tais como: cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Porém durante condições estressantes, a taxa de produção destas espécies se eleva consideravelmente, como consequência do desequilíbrio entre a sua produção e os mecanismos de eliminação (GILL e TUJETA, 2010; SILVA, 2012). O excesso de ERO causa danos oxidativo em proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos, caracterizando estresse oxidativo (MAIA, 2012) (Figura 3).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de ERO e da defesa antioxidante contra esses ERO. A consequência do estresse oxidativo é um aumento na oxidação de macromoléculas celulares. Para prevenir o dano oxidativo aos componentes celulares, as células dispõem de vários mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para desintoxicação (KIBINZA et al., 2011) (Figura 3).

Figura 3: Balanço entre espécies reativas de oxigênio (ERO) e o sistema antioxidante.



Fonte: Modificado a partir de: (GILL, S. S. et al., 2010)

As principais ERO distribuem-se em dois grupos, radicais livres e os não radicais. Radicais livres são definidos como moléculas e/ou átomos de oxigênio ou nitrogênio que apresentam um ou mais elétrons não pareados na última camada de valência, tornando-se, assim, altamente instáveis e quimicamente reativos. O oxigênio

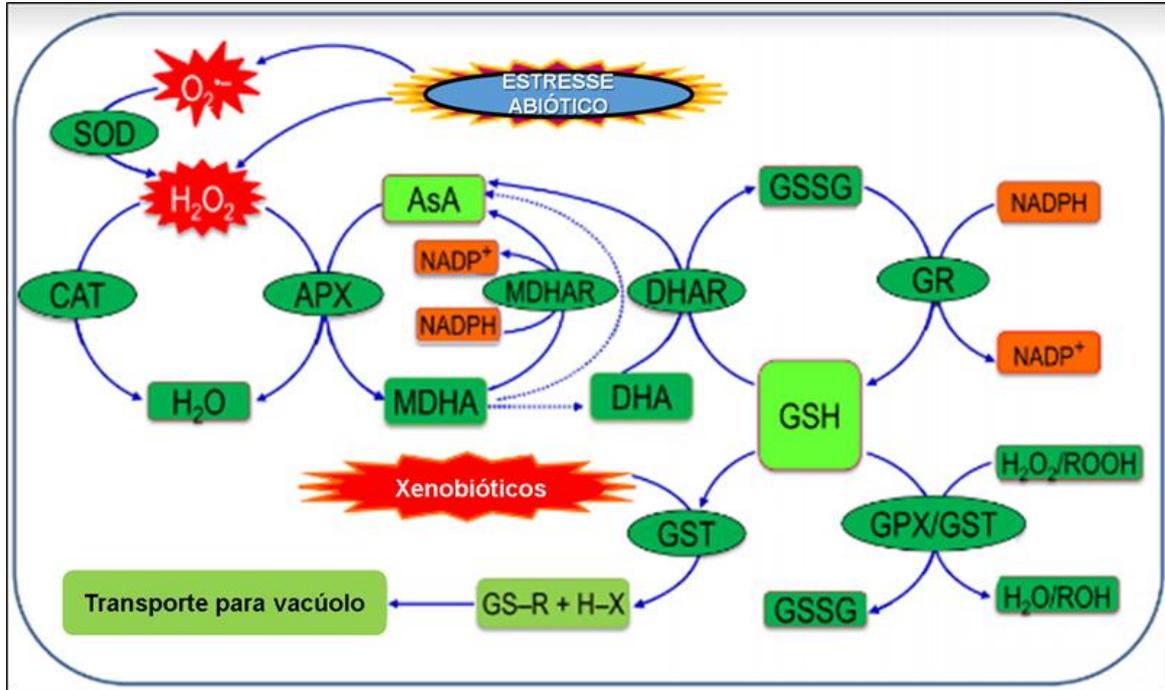
molecular (O_2) é relativamente não reativo e não tóxico, devido a estabilidade dos elétrons na sua camada externa. No entanto, alterações na distribuição dos elétrons podem provocar a sua ativação e influenciar os sistemas biológicos. As ERO podem ser geradas dentro das plantas como resultado da excitação ou um “leve toque” no elétron externo, formando oxigênio atômico (O) ou de uma sucessiva adição de elétrons ao oxigênio molecular produzindo superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou hidroxila (OH^-) (RESENDE et al., 2003; GILL e TUTEJA, 2010).

A capacidade de acionar mecanismos de defesa antioxidantes pode prevenir acúmulo de ERO e o estresse oxidativo extremo (BHATTACHARJEE, 2010). O sistema antioxidante tem função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais, sendo que o último pode ter origem endógena ou exógena (BARBOSA et al., 2010).

A regulação da expressão de genes codificantes de enzimas antioxidantes, cuja atividade evita ou reduz os danos potenciais causados pelas ERO, faz parte da resposta a esse estresse (CYRNE et al., 2003) (Figura 4).

Enzimas são proteínas que catalisam reações químicas e mediam praticamente toda a enorme variedade de reações bioquímicas que constituem a vida, portanto, são essenciais para a manutenção adequada de qualquer organismo. As enzimas antioxidantes estão presentes em diferentes compartimentos celulares e contribuem para o controle das ERO em plantas, o que confere um estágio de homeostase redox no sistema. Destacam-se entre as enzimas antioxidantes a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.1), glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2), peroxidases (POD, EC 1.11.1.7), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e polifenoloxidase (PPO, EC 1.14.18.1) (MITTLER, 2002; KIM e KWAK, 2010) (Figura 4).

Figura 4: Mecanismo de defesa antioxidante por diferentes enzimas em plantas.

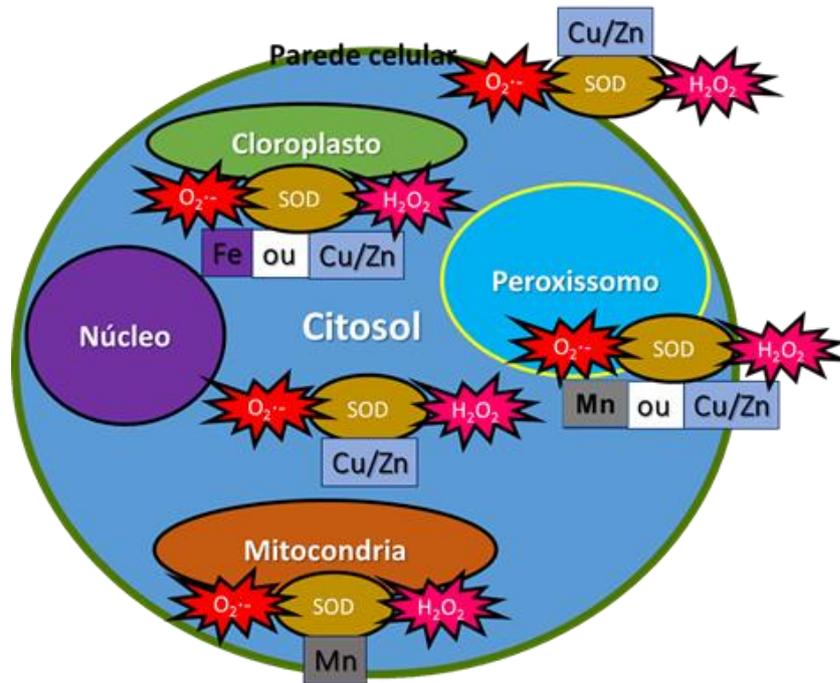


Fonte: Modificado a partir de: (GILL, S. S. et al., 2015)

Superóxido dismutase: importância e função

A superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), é uma metaloenzima do sistema antioxidante enzimático intracelular eficaz, que catalisa a dismutação de radicais superóxido (radicais com tempo de vida curto) em peróxido de hidrogênio (ERO mais estável) e são classificadas pelos seus cofatores de metal, em três tipos: cobre/zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD), que estão localizados em diferentes compartimentos celulares (GILL e TUTEJA, 2010). A Cu/Zn-SOD está localizada principalmente no citoplasma das células eucarióticas, Mn-SOD existe na mitocôndria de células eucarióticas e citoplasma de células procarióticas, e a Fe-SOD ocorre principalmente nos procariotos e cloroplastos de plantas (ARORA e BHATLAS., 2015) (Figura 5).

Figura 5: Diversidade e localização de isoformas de superóxido dismutase.



Fonte: Modificado a partir de: (ARORA e BHATLAS., 2015).

Está bem estabelecido que vários estresses ambientais muitas vezes levam ao aumento da geração de ERO. A SOD tem sido proposta por sua importância na tolerância ao estresse de plantas e por fornecer a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos dos níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (MITTLER, 2002).

Ao remover o radical $O_2^{\bullet-}$, a enzima SOD diminui o risco de formação do radical OH^{\bullet} através do metal catalizado do tipo reação Haber-Weiss porque esta reação tem uma taxa 10.000 vezes mais rápida do que a espontânea (GILL e TUTEJA, 2010). O resultado da reação é a geração de H_2O_2 , que também é uma (ERO) tendo papel duplo (toxicidade e sinalização). H_2O_2 pode ser eficientemente desintoxicado, se defesa antioxidante celular forem suficientes. Num certo sentido, esta enzima é única, já que a sua atividade determina as concentrações de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , os dois substratos da reação de Haber-Weiss, e é, por conseguinte propensos a ter um papel central no mecanismo de defesa (BOWLER et al.1992).

A enzima superóxido dismutase foi isolada pela primeira vez em 1938 por Mann e Keilin, na época cogitava-se que fosse uma proteína de armazenamento de cobre. No entanto, sua função catalítica só foi descoberta em 1969 por McCord e Fridovich (CASTRO, 2002).

Há relatos do aumento da atividade da SOD em plantas superiores sob estresse de seca, tais como arroz (WANG et al., 2005), trigo (SHAO et al., 2005), e milho (JIANG e ZHANG, 2002).

Meloni et al. (2003), trabalhando com duas cultivares de algodão com tolerância diferencial à salinidade, mostraram que a cultivar mais tolerante apresentou maior indução do sistema enzimático antioxidativo envolvendo a SOD, a GR e a G-POD (peroxidase do guaiacol, também conhecida como GPX), que permitiu menor dano oxidativo, como comprovado pela menor taxa de peroxidação de lipídios de membrana, em comparação à cultivar sensível.

Em mamona foi observado diferentes padrões de expressão de SOD observados em três genótipos, em resposta ao déficit hídrico causado por PEG (MORAES et al., 2015).

Contextualização da dissertação

A pesquisa apresentada nessa dissertação explorou a caracterização morfofisiológica de sementes de genótipos de mamona, o efeito do osmocondicionamento na germinação e estabelecimento de plântulas, e a atividade de superóxido dismutase durante a embebição sob diferentes condições osmóticas. Inicialmente, foi feita a caracterização biométrica (comprimento, largura, espessura, volume) e categorização das sementes em três grupos distintos (sementes pequenas, médias e grandes), a partir dos quais foi realizada a comparação com parâmetros fisiológicos de germinação e vigor. A comparação dos resultados morfológicos com os fisiológicos possibilitou selecionar dois genótipos contrastantes, os quais apresentaram-se com alta porcentagem de germinação ('MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU'), porém distintos quanto ao vigor de sementes e plântulas. As sementes dos dois genótipos foram então submetidas a embebição em diferentes condições de restrição hídrica (0,0 em água, e de -0.1 a -1,0 MPa) por meio de

osmocondicionamento em diferentes potenciais osmóticos, e subsequentemente submetidas à reidratação, tendo sido avaliados os parâmetros fisiológicos de germinação e de vigor de sementes, e a atividade de superóxido dismutase em tecidos embrionários de sementes nos diferentes potenciais (0,0 MPa em água, e - 0.2, -0.6, e -1,0 MPa em PEG 8000), e em diferentes períodos de embebição (0, 12, 24 e 40h).

CAPÍTULO 1 – Neste capítulo foi realizada a caracterização morfofisiológica de 19 genótipos de mamona através da avaliação biométrica (volume e peso) das sementes possibilitou a classificação dos genótipos em três grupos (sementes pequena, média e grande), a partir das quais foi feita a correlação do tamanho das sementes com os parâmetros fisiológicos de germinação e vigor, e seleção de dois genótipos contrastantes ('MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU'), o quais apresentaram boa porcentagem de germinação, porém, sendo divergentes quanto ao vigor.

CAPÍTULO 2 – Osmocondicionamento dos genótipos ('MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU') em diferentes potenciais osmóticos (-0.1 a -1.0 MPa) por meio da embebição de sementes em soluções de polietilenoglicol durante sete dias, e posterior reidratação. Foi observado o efeito de envigorente ou *priming* apenas no genótipo que apresentava-se inicialmente com menor vigor ('BRS PARAGUAÇU').

CAPÍTULO 3 – Foi realizado a determinação da curva de embebição de sementes dos genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' em diferentes potenciais osmóticos (0.0, -0.2, -0.6, -1.0 MPa). Os genótipos apresentaram perfis de embebição trifásico, germinaram ao atingirem a Fase-III em água (48 e 53h, respectivamente); as sementes sob osmocondicionamento não germinaram após sete dias e mantiveram-se na Fase-II em todos os potenciais osmóticos -0.2, -0.6, -1.0 MPa). A atividade de SOD foi realizada em radículas e cotilédones em 12h (Fase-I), em 24h (início da Fase-II) e 40h (final da Fase-II). Foi observado que o genótipo 'BRS PARAGUAÇU' mostrou ter a atividade de SOD mais alta em semente seca que o genótipo 'MPA34', mantendo essa atividade estável durante os tempos de embebição e potenciais osmóticos aplicados em radículas. A atividade de SOD em cotilédones foi menos intensa do que em radícula para ambos os genótipos.

REFERÊNCIAS

AMORIM, E. P.; RAMOS, N. P.; UNGARO, M. R. G.; KIIH, T. A. M. . Divergência genética em genótipos de girassol. **Ciência e agrotecnologia** , v. 31, n. 6, p. 1637-1644, 2007.

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

ARORA, D.; BHATLAS, S. C. Nitric oxide triggers a concentration-dependent differential modulation of superoxide dismutase (Fe-SOD and Cu/Zn-SOD) activity in sunflower seedling roots and cotyledons as an early and long distance signaling response to NaCl stress. **Plant Signaling & Behavior**, Londres, v.10, n. 10, p. 1-28, 2015.

BALESTRAZZI, A.; CONFALONIERIB, M.; MACOVEIA, A.; CARBONERA, D. Seed imbibition in *Medicago truncatula* Gaertn.: expression profiles of DNA repair genes in relation to PEG-mediated stress. **Journal of plant physiology**, v. 168, n. 7, p. 706-713, 2011.

BAHIA, H. F.; SILVA, S. A.; FERNANDEZ, L. G.; LEDO, C. A. S.; MOREIREIRA, R. F. C. Divergência genética entre cinco cultivares de mamoneira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 3, p. 357-362, 2008.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. Second Edition. Plenum Press, New York, 1994.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p.1-30.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Heidelberg, v.43, p. 83-116, 1992.

FENG, C.; LANJU, M.; XIAOLONG, A.; SHUN, G.; LIN, T.; FANG, C. Lipid peroxidation and antioxidant responses during seed germination of *Jatropha curcas*. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 13, n. 1, p. 25-30, 2011.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, ed. 4, p. 588, 2000.

CASTRO, L. A.. **Superóxido dismutases do fungo entomopatogênico e acaricida *Metarhizium anisopliae***. 2002.

DE CASTRO, R. D.; HILHORST, H. W. M. Embebição e Reativação do Metabolismo. In: Germinação: do básico ao aplicado (A. Gui Ferreira; Borghetti, F., orgs.) **Artmed**, Porto Alegre, p149-162. 2004.

CYRNE, L.; US MARTINS, L.; FERNANDES, L.; MARINHO, H. S. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, p. 385-393, 2003. Disponível em: Acesso em: 26 maio. 2009.

EMBRAPA, Mamona Disponível em;
<<http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/index.html>> Acesso em:
29/06/2016.

NETO, A. F.; FRANCISCO DE ASSIS, C. A.; DE GOUVEIA, J. P.; MÁRCIA, B. M.; NÓBREGA, R. M.; PEDROZA, J. P. Divergência genética em acessos de mamona (*Ricinus communis* L.) baseada nas características das sementes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.4, n.002, 2004.

FUFA, H.; BAENZIGER, P. S.; BEECHER, B. S.; DWEIKAT, I.; GRAYBOSCH, R. A.; ESKRIDGE, K. M. Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. **Euphytica**, v. 145, n. 1-2, p. 133-146, 2005. APA

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.

GILL, S. S.; ANJUM, N. A.; GILL, R.; YADAV, S.; HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M.; TUTEJA, N. Superoxide dismutase - mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 14, p. 10375-10394, 2015.

JIANG, M.; ZHANG, J. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 379, p. 2401-2410, 2002.

JISHA, K. C.; VIJAYAKUMARI, K.; PUTHUR, J. T. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. **Acta Physiol Plant**, v.35, p.1381-1396, 2013.

JOOSEN, R. V.; KODDE, J.; WILLEMS, L. A.; LIGTERINK, W.; VAN DER PLAS, L. H.; HILHORST, H. W. Germinator: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of *Arabidopsis* seed germination. **The Plant Journal**, v.62, p.148-159, 2010.

KIBINZA, S.; BAZIN, J.; BAILLY, C.; FARRANT, J. M.; CORBINEAU, F.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant Science**, v. 181, n. 3, p. 309-315, 2011.

KIM, Y. H.; KWAK, S. S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p.129-150.

KIRAN, C. R.; RAO, D. B.; SIRISHA, N.; RAO, T. R. Impact of Germination on Biochemical and Antioxidant Enzymes of *Ceiba pentandra* (Kapok) Seeds. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 9, p. 1187, 2012.

KRANNER, I.; MINIBAYEVA, F. V.; BECKETT, R. P.; SEAL, C. E. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed Science. **New Phytologist**, Cambridge, v.188, n. 3, p.655-673, 2010.

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

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

MELONI, D. A.; OLIVA, M. A.; RUIZ, H. A.; MARTINEZ, C. A. Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. **Journal of Plant Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 599-612, 2001.

MILANI, M. Descritores de mamona utilizados pela Embrapa Algodão. **Embrapa Algodão. Documentos**, 2008.

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

MITTLER, R. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in plant science**, v. 9, n. 10, p. 490-498, 2004.

MORAES, P. F.; DE LAAT, D. M.; SANTOS, M. E. A. H. P.; COLOMBO, C. A.; KIIHL, T. Expressão gênica diferencial em genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.) submetidos a déficit hídrico induzido por PEG. **Bragantia**, v. 74, n. 1, p. 25-32, 2015.

MOREIRA, J. A. N.; SANTOS, J. W.; OLIVEIRA, S. R. M. **Abordagens e metodologias para avaliação de germoplasma**. Campina Grande, PB, Embrapa-CNPA, 1994. 115p.

OLIVEIRA, A. B.; QUEIROZ, J. A.; MENEZES, C. H. S. G., CARTAXO, W. V.; SUASSUNA, N. D. Efeito do tempo de embebição em água e remoção da carúncula na germinação de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA – Energia e Sustentabilidade, 1., 2004, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. p.123-128.

PINHO, S. Z.; CARVALHO, L. R.; DELACHIAVE, M. E. A. Limit between stages I and II of a seed imbibition curve. **Scientia Agricola**, v.61, n°1, p.17-20, 2004.

PRODANOVIĆ, O.; PRODANOVIĆ, R.; BOGDANOVIĆ, J.; MITROVIĆ, A.; MILOSAVIĆ, N.; RADOTIĆ, K. Antioxidative enzymes during germination of two lines of serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně]. **Archives of Biological Sciences**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 209-216, 2007.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed germination and vigor, **Annual Reviews of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 507-533, 2012.

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

SHAO, H. B.; LIANG, Z. S.; SHAO, M. A.; WANG, B. C. Changes of anti-oxidative enzymes and membrane peroxidation for soil water deficits among 10 wheat genotypes at seedling stage. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 42, n. 2, p. 107-113, 2005.

SILVA, E. N.; RIBEIRO, R. V.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIEIRA, S. A.; PONTE, L. F. A.; SILVEIRA, J. A. S. Coordinate changes in photosynthesis, sugar accumulation and antioxidative enzymes improve the performance of *Jatropha curcas* plants under drought stress. **Biomass and Bioenergy**, São Paulo, v. 45, p. 270-279, 2012.

SOUZA, F. V. **Expressão de genes em resposta a estresse por restrição hídrica em sementes de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae)**. 2012, 76f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

TOMMASI, F.; PACIOLLA, C.; DE PINTO, M. C.; DE GARA, L. Comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 647-1654, 2001.

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

VIEIRA, R. M.; LIMA, E. F. Importância sócio-econômica e melhoramento genético da mamoneira no Brasil. **Recursos Genéticos e Melhoramento Plantas para o**

Nordeste **Brasileiro.** Disponível em:
<http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/catalogo/livrorg/>. Acessado em: 25/07/2016.

WANG, F. Z.; WANG, Q. B.; KWON, S. Y.; KWAK, S. S.; SU, W. A. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 4, p. 465-472, 2005.

WOJTYLA, Ł.; GARNCZARSKA, M.; ZALEWSKI, T.; BEDNARSKI, W.; RATAJCZAK, L.; JURGA, S. A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. **Journal of plant physiology**, v. 163, n. 12, p. 1207-1220, 2006.

ZUCHI, J.; PANOZZO, L. E.; HEBERLE, E.; ARAUJO, E. F. Curva de embebição e condutividade elétrica em sementes de mamona classificadas por tamanho. **Revista Brasileira de Sementes**, Nota científica, v.34, n°3, p.504-509, 2012.

CAPÍTULO 1

**Caracterização fenotípica de sementes
de mamona (*Ricinus communis* L.)**

1. INTRODUÇÃO

A mamoneira é uma planta com muita diversidade morfológica, fisiológica e genética. Por ser uma espécie polimórfica, apresenta grande variação em seu hábito de crescimento, cor das folhas, caules, ramos, frutos, tamanho de sementes, teor de óleo, altura das plantas, sendo possível distinguir um material genético do outro (WEISS, 1983; LUZ, 2013).

Na tentativa de explicar a grande variedade de formas considera a mamoneira uma espécie politípica, foi considerado existir diversas subespécies para a mamona, as quais podem diferir quanto à morfologia e aos aspectos genéticos e ecológicos.(MOSHKIN, 1986; VENANCIO, 2013)

Hoje a mamoneira é encontrada em muitos países e pode ser cultivada em grande diversidade de solos, ambientes e climas. No Brasil, que apresenta um clima tropical, a mamona está presente de forma espontânea em diversas regiões, como se fosse uma planta nativa (COSTA e HOESCHL, 2006; SANTOS et al., 2007; PUTTINI, 2014).

A cultura se apresenta como uma alternativa de relevante importância econômica e social para o Brasil, particularmente para a região Nordeste, que segundo levantamento feito pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, dispõe de mais de 45 milhões de hectares de terras com aptidão para a exploração econômica desta cultura (MELHORANÇA e STAUT, 2005; PUTINNI, 2014).

A cultura da mamoneira no Nordeste brasileiro, maior região produtora do país, ainda apresenta problemas decorrentes da falta de adoção de sementes melhoradas. Conseqüentemente, há degeneração dos genótipos cultivados, com predominância de variedades locais pouco produtivas, deiscentes, de porte alto, tardias, com baixo teor de óleo e suscetíveis às principais doenças e pragas que ocorrem na região (FREIRE et al., 2007). As demais regiões produtoras do país também apresentam problemas, contudo, em menor grau do que ocorre na região Nordeste. Em São Paulo, a produção de grãos está muito aquém da necessidade industrial instalada. Para atender essa necessidade crescente de matéria-prima e

dificuldade de produção em escala industrial é imprescindível o desenvolvimento de novos genótipos. Esses genótipos devem ter porte adequado para facilitar a colheita e maturação precoce e uniforme, de modo a permitir a utilização de alta tecnologia que possibilite a produção em maior escala (OLIVEIRA et al., 2008).

Os métodos mais utilizados para testar a qualidade fisiológica das sementes são o teste de germinação, teste de viabilidade por tetrazólio e o teste de condutividade elétrica. Para sementes de mamona o teste de germinação é o mais comumente utilizado (SOUSA, 2007).

A caracterização morfofisiológica pode indicar genótipos com maior vigor de sementes que podem ser usados em programas de melhoramento genético. Desta forma, o objetivo desse trabalho é realizar a caracterização morfofisiológica em genótipos de mamona obtidos pela Empresa Bahiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA) e Empresa de pesquisa agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), visando selecionar dois genótipos contrastantes quanto a tolerância à restrição hídrica.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material biológico

2.1.1. Genótipos

Foram analisados 19 genótipos, sendo 9 genótipos (EBDA17, EBDA31, EBDA35, EBDA39, EBDA 40, EBDA47, EBDAMPA11, EBDAMPB01, EBDAMPA34), representativos de linhagens genéticas pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) e Programa de Melhoramento Genético de mamona da EBDA, mantido na Estação Experimental de Iraquara, situada no município de Iraquara, a 469 km de Salvador, na região da Chapada Diamantina, latitude 12°15'0" e longitude 41°37'0", e altitude média de 700 metros, tendo a Caatinga como bioma predominante. Os outros 10 genótipos representam cultivares comerciais ('MPB01', 'MPA11', 'MPA34', BRS ENERGIA, 'BRS PARAGUAÇU', 'BRS NORDESTINA', 'IAC2028', 'IAC80', IAC226, 'GUARANI'), tendo as sementes sido produzidas e doadas pela EPAMIG, localizada no campo Experimental de Montes Claro (CEMC). O CEMC está localizado em Montes Claros em Minas Gerais, altitude de 602m,

paralelo de 16° 66', latitude sul de meridiano de 43° 73', longitude oeste de Greenwich.

2.1.2 Armazenamento

Os genótipos foram armazenados à temperatura ambiente (25°C) no Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia de Bioprodutos (LBBB), localizado na Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, cidade de Salvador, onde os experimentos foram executados.

2.2 Teor de água

A avaliação do teor de água foi realizada seguindo as recomendações da Regra para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Foram utilizados recipientes de alumínio com tampas previamente pesados em balança (Shinadzu, modelo AUW220D). Foi pesado aproximadamente 4,5 a 5,0 gramas de sementes em cada recipiente de alumínio, as sementes foram partidas e colocados na estufa (Eletrolab, modelo EL 202) à 105°C por 24h. Após as 24h, os recipientes de alumínio com as sementes foram colocados em dessecador (NS24/29) onde permaneceu por 30 min para esfriar os recipientes. Após este período realizou-se a pesagem final e o cálculo do peso do teor de água foi obtido através da fórmula a seguir:

$$\% \text{ de Umidade (U)} = \frac{100 (P-p)}{P-t}$$

Onde:

P = peso inicial, peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente úmida;

p = peso final, peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente seca;

t = tara, peso do recipiente com sua tampa.

2.3. Morfometria das sementes e peso de 100 sementes

Para as análises morfométricas foram selecionadas aleatoriamente 100 sementes de cada uma dos cultivares de *R. communis* (quatro replicatas de 25 sementes), onde foi medida a altura (do ápice à base), a largura e a espessura (região mediana) de cada uma com o auxílio de paquímetro digital (Lee Tools- Electric Digital Caliper 6”), obtendo-se o volume (mm^3) através da multiplicação das três medidas. As dimensões da comprimento, largura e espessura foram expressos em milímetro (mm). A massa de 100 sementes foi realizada Utilizando um béquer, previamente tarado, fazendo 4 pesagens de 100 sementes e obtido a média entre as repetições. A morfometria e peso de 100 sementes foram realizadas de acordo com as recomendações das Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA com 5% de probabilidade, e as médias foram comparadas com o teste de skot knot, utilizando o software sisvar. Foi realizada a análise de componentes principais (ACP) incluindo todos os parâmetros e o teste de associação de wards, utilizando o software PAST com objetivo de obter a melhor forma de distinção entre os parâmetros morfométricos e peso de 100 sementes dos 19 genótipos.

2.4 Teste de viabilidade de sementes por tetrazólio

Para avaliar a viabilidade das sementes foi seguido o protocolo descrito por Gaspar-Oliveira et al. (2009). Para a realização do teste de tetrazólio, as sementes foram embebidas previamente em água por 24h (em copo descartável com água destilada até cobrir as sementes e mantidas a temperatura ambiente de 25°C). Após este período, foram retirados o tegumento das sementes e estas sofreram um corte sagital, cortando ao meio o embrião e o endosperma onde a banda com a melhor visualização foi utilizada para análise. Após o corte as sementes foram colocadas em copos plásticos, submersas em solução de tetrazólio 0,2% e incubadas em BOD (ELETROLAB – modelo EL202/3) a 35°C no escuro por duas horas. A reação foi finalizada com o descarte da solução de tetrazólio e a substituição por água destilada. As sementes foram lavadas três vezes com água destilada e colocadas

para secar em papel toalha, sendo em seguida avaliadas como sementes viáveis e sementes não viáveis de acordo com a reação envolvida onde sementes viáveis apresentam uma coloração avermelhada em seus tecidos e tecidos mortos apresentam uma coloração branca. Sementes com 50% do endosperma e 50% do embrião corado de vermelho foram consideradas viáveis. Para este teste foram analisadas 40 sementes de cada genótipo divididas em 4 repetições de 10 sementes.

Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA com 5% de probabilidade, e as médias foram comparadas com o teste de tukey, utilizando o software sisvar.

2.5. Teste de germinação

Os ensaios fisiológicos foram realizados entre agosto de 2014 a junho de 2015. Foram coletadas amostras das sementes armazenadas de cada uma das cultivares e estas amostras foram submetidas ao teste de germinação em rolo de papel germitest, seguindo as recomendações das RAS (BRASIL, 2009).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, foram utilizadas quatro replicatas de 25 sementes de sementes, foi realizada a desinfestação das sementes utilizando solução de hipoclorito 0,5% e Tween20 (1 gota para cada 100mL) de acordo resultados obtidos por Sousa (2013) como melhor tratamento para desinfestação em sementes de mamona . Para isso, as sementes foram submersas na solução de hipoclorito por 20 min sob agitação constante. Foram realizadas quatro lavagens com água destilada para a retirada do hipoclorito e as sementes foram colocadas para secar em cima de papel toalha. As sementes antes de serem colocadas para germinar, sofreram remoção da carúncula com o objetivo de garantir uma maior uniformidade de embebição na germinação. Os ensaios foram realizados em rolo de papel germitest (28 x 38 cm) como substrato, umedecidos com água destilada, na quantidade equivalente a três vezes o peso do substrato seco. Os rolos eram formados por três folhas de papel germitest, sendo que as 25 sementes foram arrumadas sobre dois folhas de papel e cobertas por uma terceira, e foram colocadas em sacos plásticos transparentes e em seguida transferidos para a

câmara de germinação tipo BOD (Panasonic – humidity), sem fotoperíodo, a uma temperatura de 25°C.

A avaliação do teste de germinação foi diária e realizada por sete dias, sendo analisados os seguintes parâmetros: germinação máxima (Gmax), U_{84-16} (uniformidade entre 16 e 84% da germinação), tempo médio de germinação (TMG), área embaixo da curva (AAC), porcentagem de plântulas normais (PPN), tamanho de plântula (TP) e massa seca (MS). As plântulas normais, tamanho de plântulas, e massa seca foram analisadas aos sete dias. Os dados obtidos foram analisados no software Germinator (JOOSEN, 2010). A biometria das plântulas normais foi realizada no sétimo dia de germinação utilizando paquímetro digital (LEE Tools – modelo electric digital caliper 6”), sendo os resultados expressos em centímetros (cm). Para determinação da massa seca (MS) das plântulas normais foi excluindo os cotilédones destas, foram então acondicionadas em sacos de papel e levados para a estufa (Eletrolab – modelo EL402/150) a 80°C por 24h. Logo em seguida as plântulas foram mantidas em dessecador durante 30 min para resfriamento, seguindo-se a pesagem em balança analítica (Shinadzu, modelo AUW220D).

Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA com 5% de probabilidade, e as médias foram comparadas com o teste de tukey, utilizando o software sisvar. As médias dos resultados de cada parâmetro (gMAX, U_{84-16} , TMG e AAC) foram comparadas com o componente de maior variação (AXIS1) obtida na análise de componentes principais (ACP) dos parâmetros morfométricos e peso de 100 sementes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Morfometria das sementes .

A tabela 1 apresenta a morfometria das sementes, através da comprimento, largura, espessura e volume. O volume foi obtido multiplicando as três dimensões da semente. Os resultados da morfologia das sementes dos genótipos serão apresentados nas tabelas e gráficos em ordem crescente do volume encontrado para cada genótipo. Muitos trabalhos em diversas espécies vegetais tem associado

parâmetros morfométricos ao melhor desempenho fisiológico, nesse trabalho foi feita a classificação das sementes dos genótipos em grupos, que serão analisados segundo a germinação e vigor de sementes.

Tabela 1. Morfometria de sementes de diferentes genótipos de *Ricinus communis* L.

| Genótipo | Morfometria (mm) | | | Volume (mm ³) |
|--------------------|------------------|---------|-----------|---------------------------|
| | Comprimento | Largura | Espessura | |
| 'BRS ENERGIA' | 12,26a | 8,13a | 6,04b | 602,0a |
| EBDAMPB01 | 12,85b | 8,50b | 6,22c | 679,5b |
| 'IACC226' | 14,18c | 8,45b | 5,75a | 689,5b |
| 'IAC2028' | 13,55c | 8,49b | 6,05b | 695,9b |
| 'GUARANI' | 14,02c | 8,52b | 6,13b | 732,1c |
| 'MPB01' | 13,47c | 8,78c | 6,32c | 748,0c |
| 'IAC80' | 13,02b | 9,66d | 6,68d | 840,4d |
| EBDA17 | 15,18d | 11,21e | 6,72d | 1146,8e |
| 'BRS NORDESTINA' | 15,54d | 11,30e | 6,57d | 1155,6e |
| 'MPA34' | 15,39d | 11,34e | 6,68d | 1166,1e |
| EBDAMPA11 | 15,66d | 11,46e | 6,98e | 1252,8f |
| EBDAMPA34 | 15,86d | 11,78f | 6,80d | 1270,2f |
| 'MPA11' | 15,59d | 11,81f | 7,05e | 1298,8g |
| 'BRS PARAGUAÇU' | 16,44d | 12,63i | 7,09e | 1386,5h |
| EBDA40 | 16,49e | 12,02g | 7,21f | 1428,7h |
| EBDA31 | 16,80e | 12,49h | 7,45g | 1562,1i |
| EBDA35 | 16,97e | 12,44h | 7,52g | 1588,6i |
| EBDA39 | 16,70e | 12,73i | 7,54g | 1603,0i |
| EBDA47 | 17,84f | 13,45j | 7,87h | 1889,8j |
| Média | 15,1 | 10,8 | 6,7 | 1144,0 |
| CV(%) | 3,1 | 1,4 | 1,4 | 4,4 |
| Erro Padrão | 0,23 | 0,78 | 0,05 | 25,4 |

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scoot Knot, ao nível de 5% de probabilidade.

O teste Skot Knot foi capaz de distinguir 6 grupos através do comprimento, 9 grupos a partir da largura, 8 grupos através da espessura e 9 grupos a partir do volume. Esse resultado demonstra a grande variabilidade morfométrica entre genótipos de mamona. O comprimento variou entre 12,26 mm (BRS ENERGIA) a 17,84 mm (EBDA47), a espessura variou entre 8,13 mm (BRS ENERGIA) a 13,45 mm (EBDA47), a espessura variou entre 5,75 mm (IAC226) a 7,87mm (EBDA47) e o volume 602 mm³ (BRS ENERGIA) a 1889,8 mm³ (EBDA47).

MILANI et al. (2009) trabalhando com 32 acessos de mamona encontrou a formação de 5 grupos para comprimento, 10 grupos para a largura e 11 grupos para espessura, utilizando o teste de skot knot ($P < 0,01$). A grande variação morfométrica das sementes também foi descrita por Luz (2013) estudando 12 cultivares de mamona.

O teor de água e o peso de 100 sementes são mostrados na tabela 2. O teor de água foi utilizado para verificar a umidade das sementes dos genótipos e verificar se existem diferenças que possam influenciar os resultados fisiológicos. O peso de 100 sementes mostrou a variação do peso entre as sementes dos diferentes genótipos. O peso de 100 sementes foi agrupado aos parâmetros morfométricos e utilizado na análise de componentes principais (ACP) para agrupar sementes de genótipos de mamonas.

Tabela 2: Teor de água, peso de 100 de sementes de genótipos de *Ricinus communis* L.

| Genótipo | Teor de Água (%) | Peso de 100 (mg) |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 'BRS ENERGIA' | 4,5 ± 0,09 | 29,3a1 |
| EBD'MPB01' | 4,4 ± 0,79 | 31,9a2 |
| 'IACC226' | 4,6 ± 0,26 | 33,0a2 |
| 'IAC2028' | 4,5 ± 0,16 | 30,3a1 |
| 'GUARANI' | 4,4 ± 0,16 | 33,8a2 |
| 'MPB01' | 5,1 ± 0,16 | 33,8a2 |
| 'IAC80' | 4,8 ± 0,08 | 32,3a1 |
| EBDA17 | 4,3 ± 1,15 | 49,9a3 |
| 'BRS NORDESTINA' | 4,4 ± 0,26 | 51,3a3 |
| 'MPA34' | 4,9 ± 0,31 | 52,5a4 |
| EBDAMPA11 | 4,0 ± 0,05 | 58,6a5 |
| EBDAMPA34 | 4,2 ± 0,08 | 59,3a5 |
| 'MPA11' | 4,9 ± 0,18 | 52,8a4 |
| 'BRS PARAGUAÇU' | 4,7 ± 0,07 | 60,3a5 |
| EBDA40 | 4,1 ± 0,08 | 67,0a6 |
| EBDA31 | 4,3 ± 0,17 | 69,1a7 |
| EBDA35 | 4,1 ± 0,45 | 70,3a7 |
| EBDA39 | 5,3 ± 2,81 | 71,3a8 |
| EBDA47 | 4,0 ± 0,13 | 84,7a9 |

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scot Knot, ao nível de 5% de probabilidade.

O valor de teor de água encontrado para as sementes dos diferentes genótipos foi entre 4 e 5,3 % da massa total. Outros autores encontraram valores semelhantes de teor de água, Teles (2013) observou teor de umidade 5,9% para o genótipo EBDAMPA11. Junior (2009) de 5,6% do genótipo BRS-NORDESTINA e Luz (2013) encontrou o teor de umidade de 6,7% para sementes de 12 genótipos da EBDA estudados. Almeida, et al. (2002), afirmaram que o percentual de umidade nas sementes de mamona deve estar entre 4 e 6% da massa total das sementes, os valores encontrados nesse trabalho de teor de água estão na faixa descrita pelos autores Almeida et al. (2002).

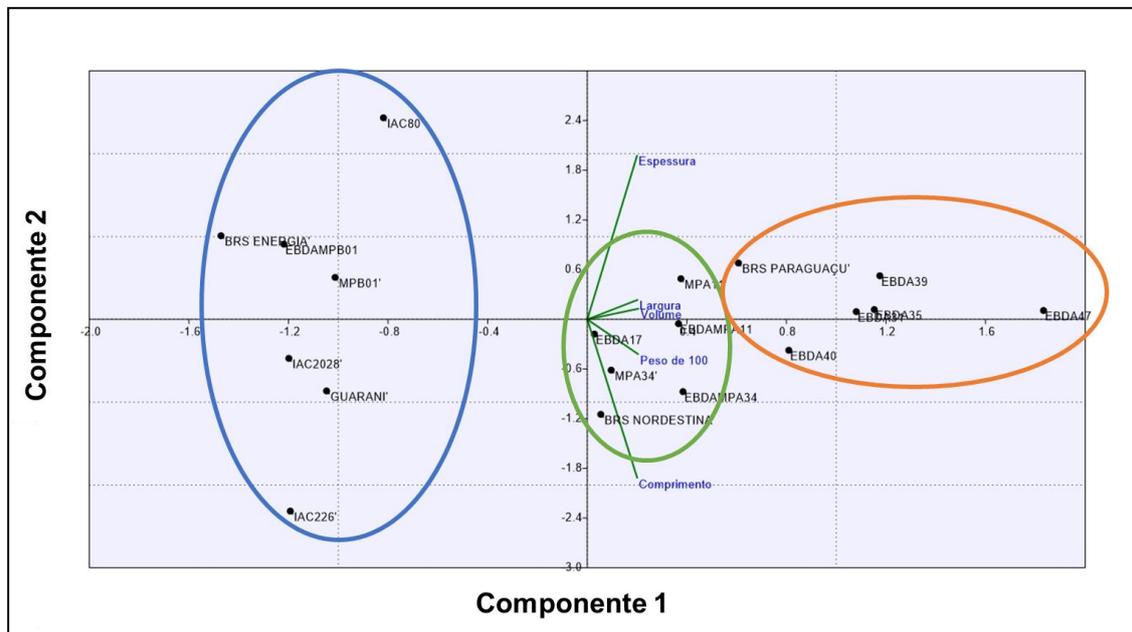
O peso de 100 sementes variou entre 29,3mg (menor peso) para o genótipo 'BRS ENERGIA' a 84,7mg (maior valor) encontrado para o genótipo EBDA47, formando 9 grupos entre os genótipos analisados pelo teste de skot knot a 5% de probabilidade. Milani (2009) também encontrou 9 grupos analisando o peso para 32 acessos de mamona, enquanto Luz, (2013) encontrou 3 grupos analisando 12 cultivares de mamona.

Existe uma divergência entre autores quanto a correlação da morfometria com a obtenção de plântulas mais vigorosas. Brum et al. (2011), afirmaram que a separação de sementes de mamona por largura, comprimento ou massa pode permitir a obtenção de plântulas mais vigorosas. Enquanto Dantas et al. (2008), descreveram que não houve correlação entre massa, tamanho e velocidade de germinação das sementes de mamonas analisadas. Já Drumond et al. (2010), avaliando diferentes genótipos de mamona na Chapada do Araripe, concluíram que o menor peso das sementes, não está relacionado com a diminuição da produção, este mesmo resultado foi também encontrado por Jesus Filho (2014).

Foi utilizado método de 'análise de componentes principais' (ACP) com o objetivo de obter informações sobre a existência de possíveis padrões relacionando com as variáveis morfométricas e peso de 100 sementes entre os 19 genótipos (Figura 1), esse resultado foi comparado com a análise de associação pelo método de wards, objetivando a categorização de sementes em grupos e posterior comparação dos grupos formados com parâmetros fisiológicos.

As variáveis morfométricas (comprimento, largura, espessura e volume) e peso de 100 sementes nos eixos 1 e 2 da ACP tendem a mesma direção evidenciando forte correlação entre os parâmetros morfométricos e peso de 100 sementes na diferenciação das amostras. A formação de três grupos formados pelas diferenças das sementes dos genótipos pode ser observada na Figura 1.

Figura 1: Representação dos dados morfométricos (comprimento, largura, espessura e volume) e peso de 100 das sementes dos 19 genótipos de mamona através das Componente 1 e Componente 2 na análise de componentes principais (ACP).



A Tabela 3 apresenta os 5 eixos e a porcentagem de variação obtidos na análise de componentes principais (ACP), onde o AXIS1, componente de maior variação será utilizado para comparação com parâmetros fisiológicos dos genótipos de mamona.

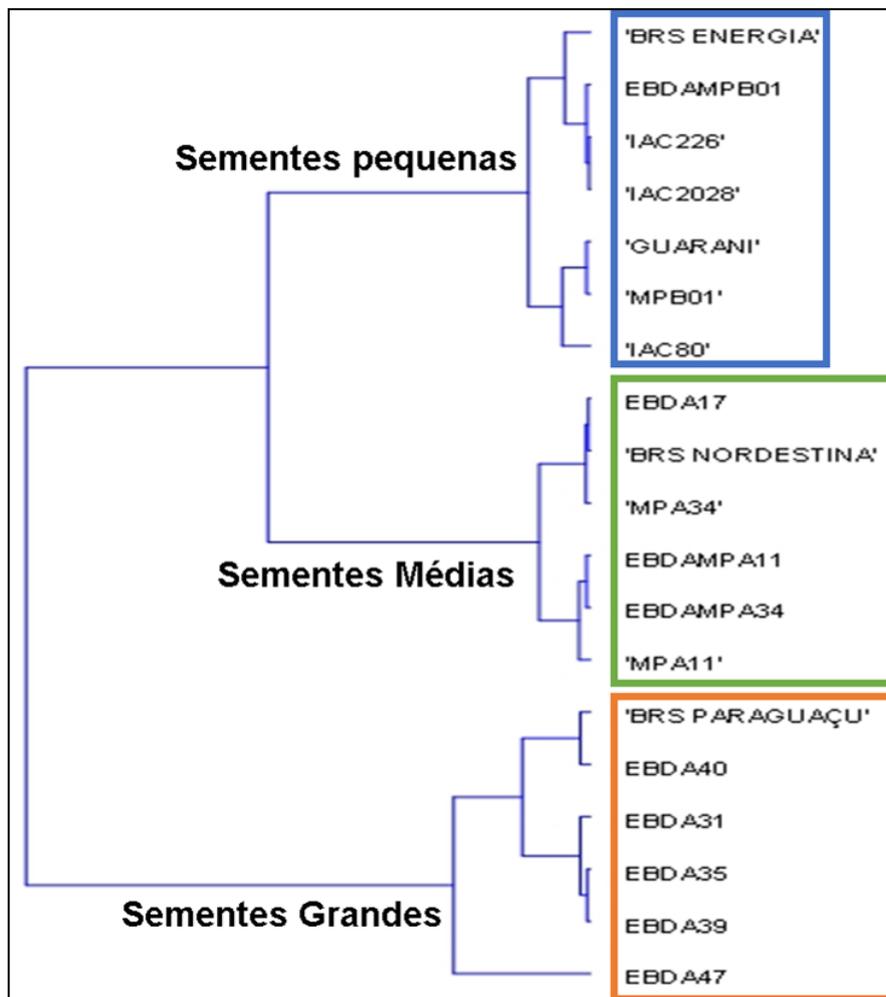
Tabela 3: Correlação entre os caracteres aplicados na ACP e os eixos gerados. Percentuais de variação apresentados no final da tabela.

| Genótipos | Axis 1 | Axis 2 | Axis 3 | Axis 4 | Axis 5 |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| BRS ENERGIA | -1.5 | 1.0 | 0.3 | -2.3 | -0.8 |
| EBDAMPB01 | -1.2 | 0.9 | 0.6 | -1.0 | 0.4 |
| IAC226 | -1.2 | -2.3 | 0.3 | 0.0 | -1.1 |
| 'IAC2028' | -1.2 | -0.5 | 0.5 | 0.7 | -1.0 |
| 'GUARANI' | -1.0 | -0.9 | 1.1 | 1.0 | 0.5 |
| 'MPB01' | -1.0 | 0.5 | 0.8 | 0.4 | 0.8 |
| 'IAC80' | -0.8 | 2.4 | -0.5 | 1.4 | 0.0 |
| EBDA17 | 0.0 | -0.2 | -1.1 | 0.5 | 0.1 |
| 'BRS NORDESTINA' | 0.1 | -1.1 | -1.3 | 0.3 | -0.3 |
| 'MPA34' | 0.1 | -0.6 | -1.1 | -0.1 | 0.4 |
| EBDAMPA11 | 0.4 | -0.1 | 0.0 | -0.5 | 2.1 |
| EBDAMPA34 | 0.4 | -0.9 | -1.0 | -1.0 | 0.8 |
| 'MPA11' | 0.4 | 0.5 | -0.9 | 1.9 | -0.9 |
| 'BRS PARAGUAÇU' | 0.6 | 0.7 | -2.1 | -1.0 | -0.8 |
| EBDA40 | 0.8 | -0.4 | 0.6 | -0.5 | 1.8 |
| EBDA31 | 1.1 | 0.1 | 0.6 | 0.5 | 0.0 |
| EBDA35 | 1.2 | 0.1 | 1.1 | 0.8 | 0.2 |
| EBDA39 | 1.2 | 0.5 | 0.5 | -0.1 | -0.1 |
| EBDA47 | 1.8 | 0.1 | 1.6 | -0.9 | -2.1 |
| Eigenvalue | 4.8 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 |
| % da variação | 96.1 | 2.5 | 1.0 | 0.3 | 0.0 |

Através da análise de componentes principais (ACP) foi gerado cinco AXIS ou componentes. Os AXIS 1 e 2 detem cerca de 98,6% de toda a porcentagem de variação dos resultados, sendo as mais indicadas para analisar os resultados. De Moraes (2012) afirma que é necessário reter componentes que expliquem acima de 80% de variação. Nesse trabalho, o AXIS 1 demonstrou reter a maior parte da variação, cerca de 96,1% da variação, e será utilizado para comparação com resultados fisiológicos.

Métodos de agrupamento são utilizados quando se quer classificar indivíduos, nesse caso, o método de agrupamento de wards foi utilizado para classificar genótipos de acordo os seus padrões morfométricos e de peso (Figura 2).

Figura 2: Dendograma de agrupamento gerado a partir do coeficiente de distância euclidiana, utilizando-se o método de associação de wards para dados morfométricos e peso de 100 de sementes de 19 genótipos de mamona.

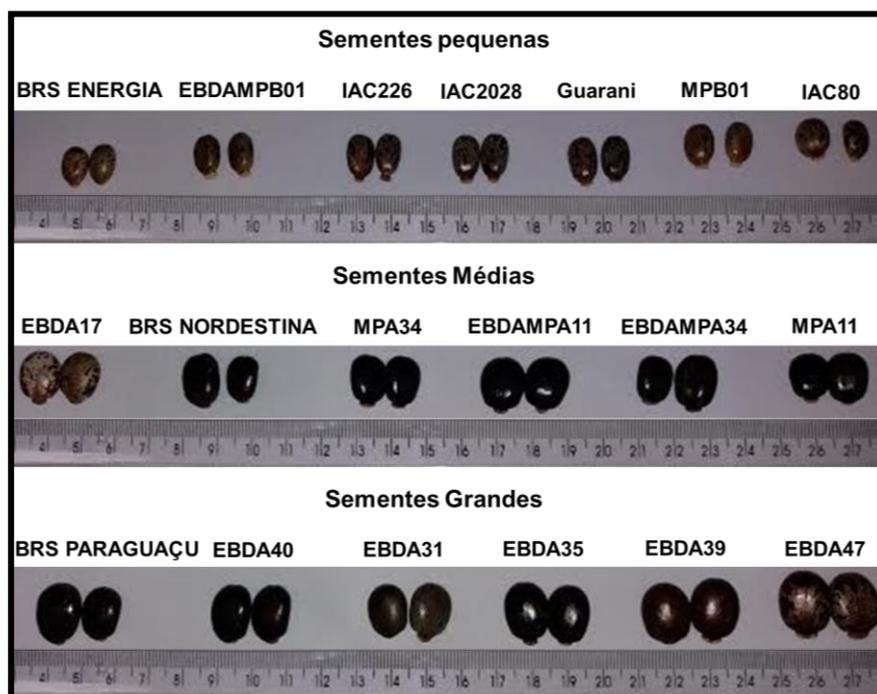


O método de associação de wards (Figura 2) foi capaz de agrupar as sementes em três grupos principais (sementes pequenas, sementes médias e sementes grandes). No grupo de sementes pequenas estão os genótipos BRS ENERGIA, EBDAMPB01, IAC226, 'GUARANI', 'MPB01' e 'IAC2028'. No grupo de sementes médias estão os

genótipos EBDA17, 'BRS NORDESTINA', 'MPA34', EBDAMPA11, EBDAMPA34 e 'MPA11'. No grupo de sementes grandes estão os genótipos 'BRS PARAGUAÇU', EBDA40, EBDA31, EBDA35, EBDA39 e EBDA47.

De forma visual pode-se notar a grande variação morfométrica entre as sementes dos 19 genótipos de mamona. A figura 3 mostra a imagem de duas sementes por genótipo agrupadas em suas respectivas classes (sementes pequenas, sementes médias e sementes grandes) definidas através da análise de componentes principais (ACP) e método de associação de wards.

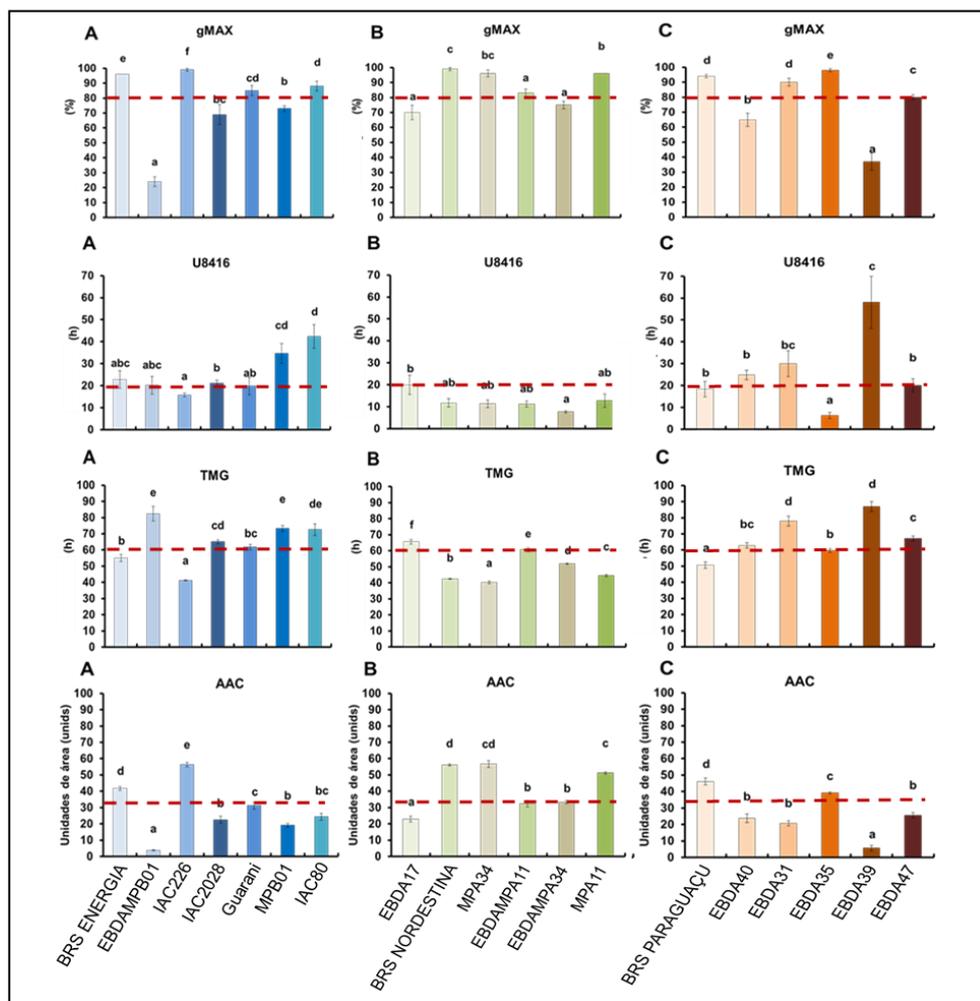
Figura 3: Classificação de sementes de *Ricinus communis* L. quanto ao tamanho.



3.2 Teste de germinação

Os parâmetros de Germinação máxima (gMAX), Uniformidade entre 84 e 16% (U_{84-16}), Tempo médio de germinação (TMG) e Área abaixo da curva (AAC) são mostrados na Figura 4, os genótipos estão agrupados segundo a classificação em três grupos: sementes pequenas (A), sementes médias (B) e sementes grandes (C).

Figura 4: Germinação máxima (gMAX), Uniformidade entre 84 e 16% (U_{84-16}), Tempo médio de germinação (TMG) e Área abaixo da curva (AAC) de sementes dos 19 genótipos de mamona. Em A) sementes pequenas, B) sementes médias e C) sementes grandes.

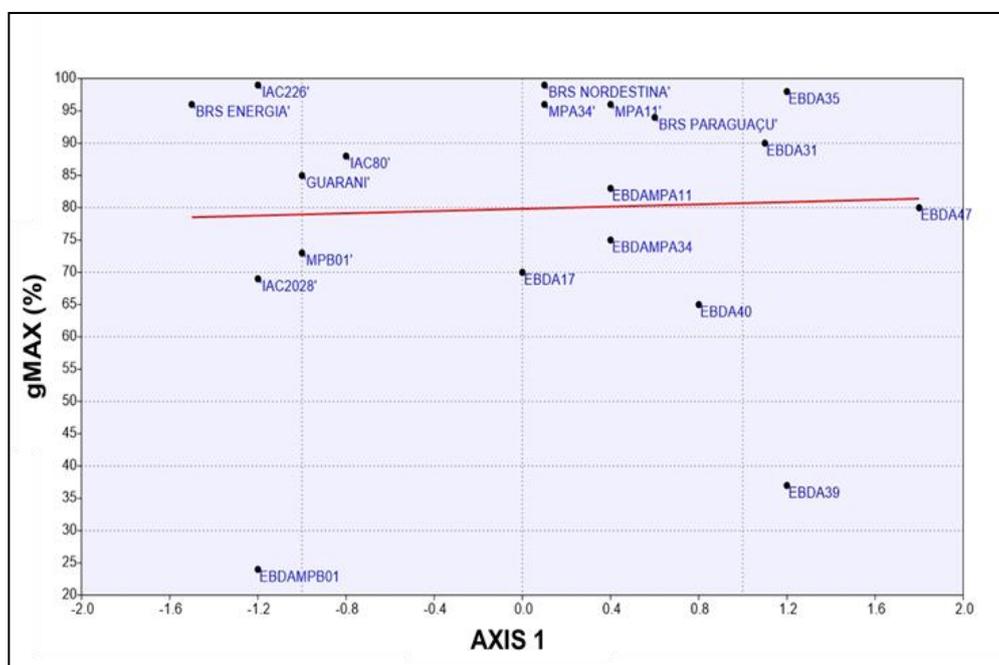


Médias seguidas das mesmas letras nas colunas, não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Linha tracejada vermelha horizontal indica a média entre os genótipos.

Dos 19 genótipos analisados 12 genótipos obtiveram germinação (gMAX) igual ou superior a 80%. No grupo de sementes pequenas (A) quatro genótipos (BRS ENERGIA, IAC226, 'GUARANI' e 'IAC80') com germinação igual ou superior a 80%. No grupo de sementes médias (B) quatro genótipos ('BRS NORDESTINA', "MPA34", EBDAMPA11, 'MPA11') com germinação igual ou superior a 80%. No grupo de sementes grandes (C) quatro genótipos ('BRS PARAGUAÇU', EBDA31,

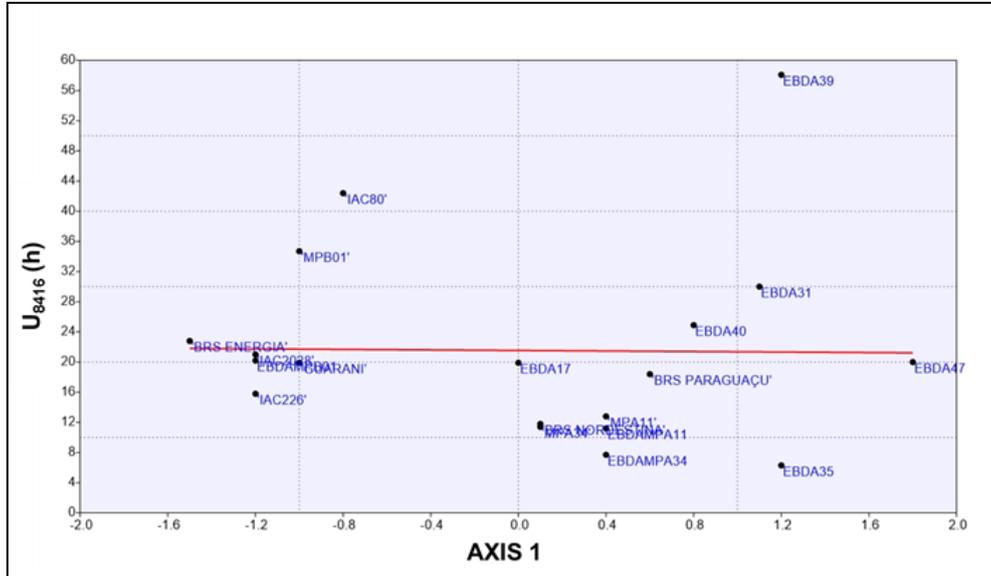
EBDA35 e EBDA47) com germinação igual ou superior a 80%. Os genótipos EBDAMPB01, 'IAC2028', 'MPB01' (sementes pequenas), EBDA17, EBDAMPA34, (sementes médias) e EBDA40, EBDA39 (sementes grandes) obtiveram germinação inferior a 80%. Dentre os genótipos com germinação inferior a 80% os genótipos EBDAMPB01 e EBDA39 apresentaram germinação inferior a 40% (Figura 5).

Figura 5: Análise multivariada do AXIS1 da análise de componentes principais (ACP) com a porcentagem de germinação (gMAX) das sementes dos 19 genótipos de mamona.



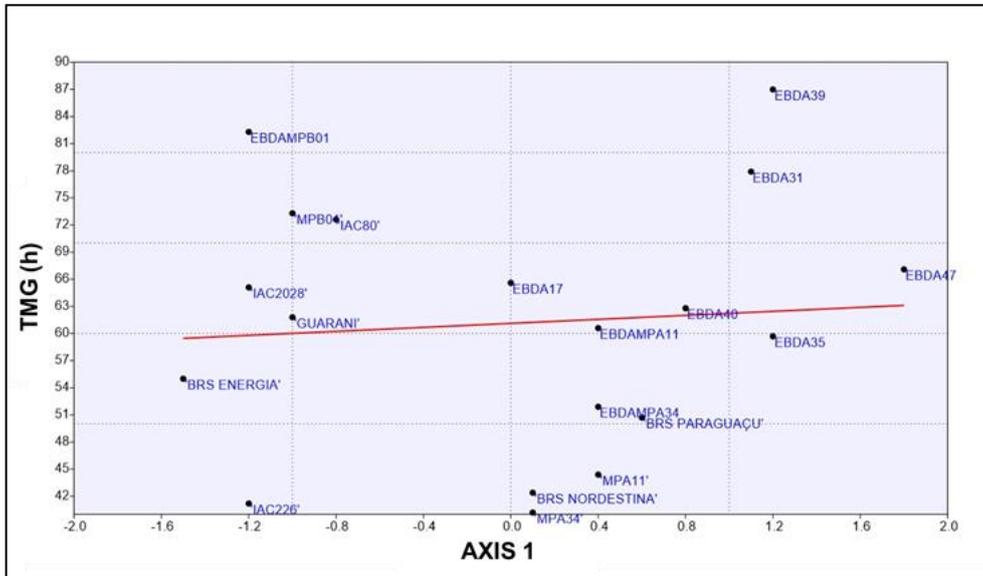
A uniformidade (U_{84-16}) obteve valor médio de 21h entre os genótipos (Linha vermelha tracejada). No grupo de sementes pequenas (A) quatro genótipos (EBDAMPB01, IAC226, 'IAC2028', 'GUARANI') obtiveram uniformidade com o tempo igual ou inferior ao valor médio de 21h, três genótipos obtiveram valor superior a 21h (BRS ENERGIA, 'MPB01' e 'IAC80'). No grupo de sementes médias (B) todos os genótipos (EBDA17, 'BRS NORDESTINA', "MPA34", EBDAMPA11, EBDAMPA34 e 'MPA11') obtiveram uniformidade igual ou inferior a 21h. No grupo de sementes grandes (C) três genótipos ('BRS PARAGUAÇU', EBDA35 e EBDA47) obtiveram uniformidade com o tempo igual ou inferior a 21h, os genótipos (EBDA40, EBDA31 e EBDA39) apresentaram uniformidade superior a 21h (Figura 6).

Figura 6: Análise multivariada do AXIS 1 da análise de componentes principais (ACP) com a uniformidade (U_{84-16}) das sementes dos 19 genótipos de mamona.



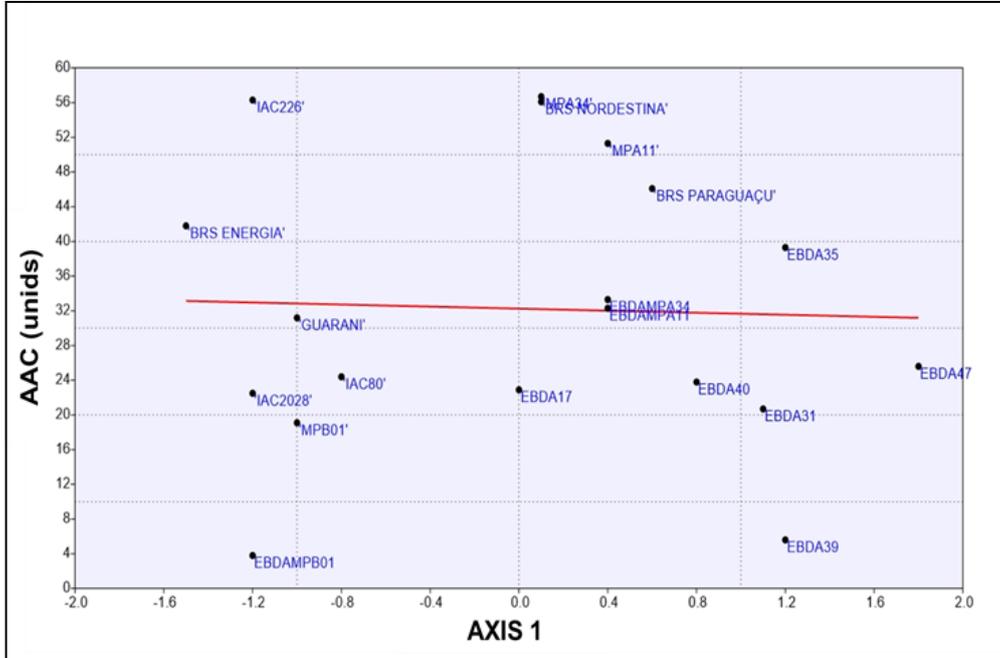
O tempo médio de germinação (TMG) apresentou valor médio de 61h entre os genótipos. No grupo de sementes pequenas(A) dois genótipos (BRS ENERGIA, IAC226) obtiveram TMG igual ou inferior ao valor médio de 61h, cinco genótipos obtiveram valor superior a 61h (EBDAMPB01, 'IAC208', 'MPB01', 'GUARANI' e 'IAC80'). No grupo de sementes médias (B) cinco genótipos ('BRS NORDESTINA', "MPA34", EBDAMPA11, EBDAMPA34 e 'MPA11') obtiveram TMG igual ou inferior a 61h, apenas o genótipo EBDA17 teve valor superior a 61h de TMG. No grupo de sementes grandes (C) apenas o genótipos (EBDA35) obteve TMG com o tempo igual ou inferior a 61h, cinco genótipos ('BRS PARAGUAÇU', EBDA40, EBDA31, EBDA39 e EBDA47) apresentaram TMG superior a 61h (Figura 7).

Figura 7: Análise multivariada do AXIS 1 da análise de componentes principais (ACP) com o tempo médio de germinação (TMG) das sementes dos 19 genótipos de mamona.



A área abaixo da curva (AAC) é um parâmetro que associa germinação, uniformidade e tempo de germinação, quanto maior esse parâmetro indica o melhor comportamento das sementes de um genótipo em todos os três parâmetros. O valor médio encontrado para os genótipos foi de 32 unidades de área. No grupo de sementes pequenas(A) três genótipos (BRS ENERGIA, IAC226 e 'GUARANI') obtiveram AAC igual ou superior ao valor médio de 32 unidades de área, quatro genótipos obtiveram valor inferior a 32 unidades de área (EBDAMPB01, 'IAC2028', 'MPB01' e 'IAC80'). No grupo de sementes médias (B) cinco genótipos ('BRS NORDESTINA', 'MPA34', EBDAMPA11, EBDAMPA34 e 'MPA11') obtiveram AAC igual ou superior a 32 unidades de área, apenas o genótipo EBDA17 obteve valor superior a média de AAC. No grupo de sementes grandes(C) dois genótipos ('BRS PARAGUAÇU' e EBDA35) obtiveram AAC igual ou inferior a 32 unidades de área, quatro genótipos (EBDA40, EBDA31, EBDA39 e EBDA47) obtiveram AAC superior a 32 unidades de área.

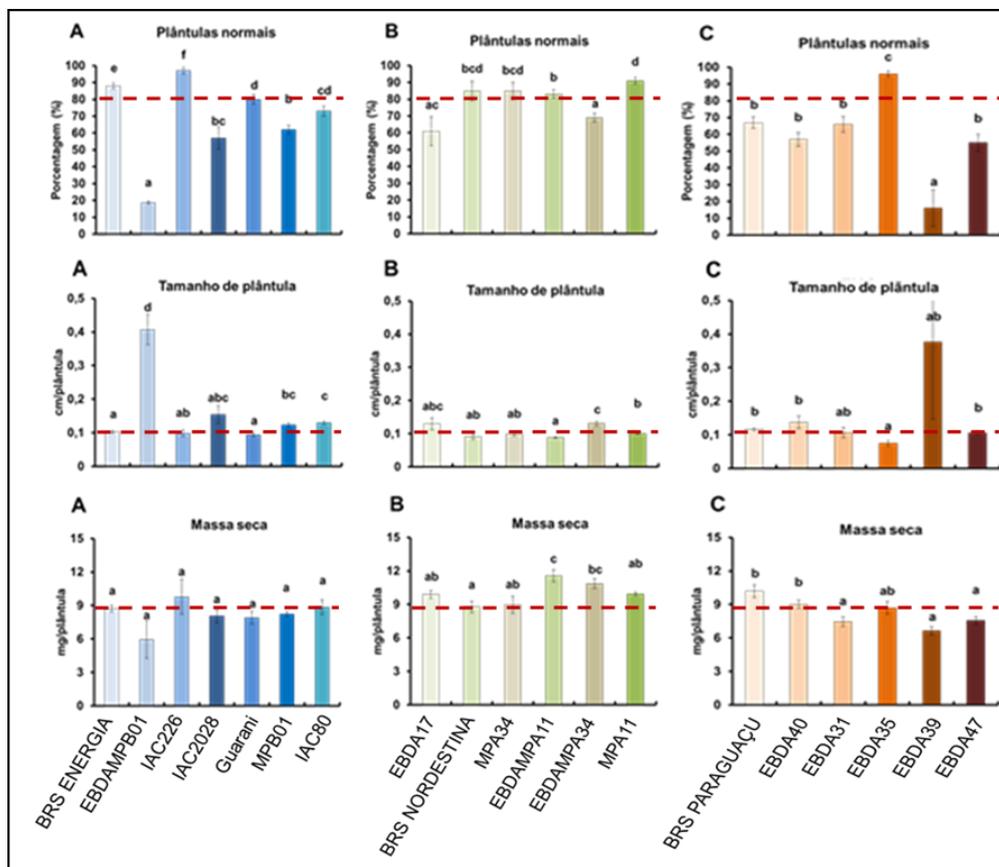
Figura 8: Análise multivariada do AXIS 1 da análise de componentes principais (ACP) com a área abaixo da curva (AAC) das sementes dos 19 genótipos de mamona.



Dos dezenove genótipos analisados nove genótipos obtiveram bons resultados nos parâmetros de germinação, dois genótipos (BRS ENERGIA, IAC226) de sete do grupo de sementes pequenas, cinco genótipos ('BRS NORDESTINA', 'MPA34', EBDAMPA11, EBDAMPA34 e 'MPA11') de seis no grupo de sementes médias e dois genótipos ('BRS PARAGUAÇU' e EBDA35) de seis no grupo de sementes grandes.

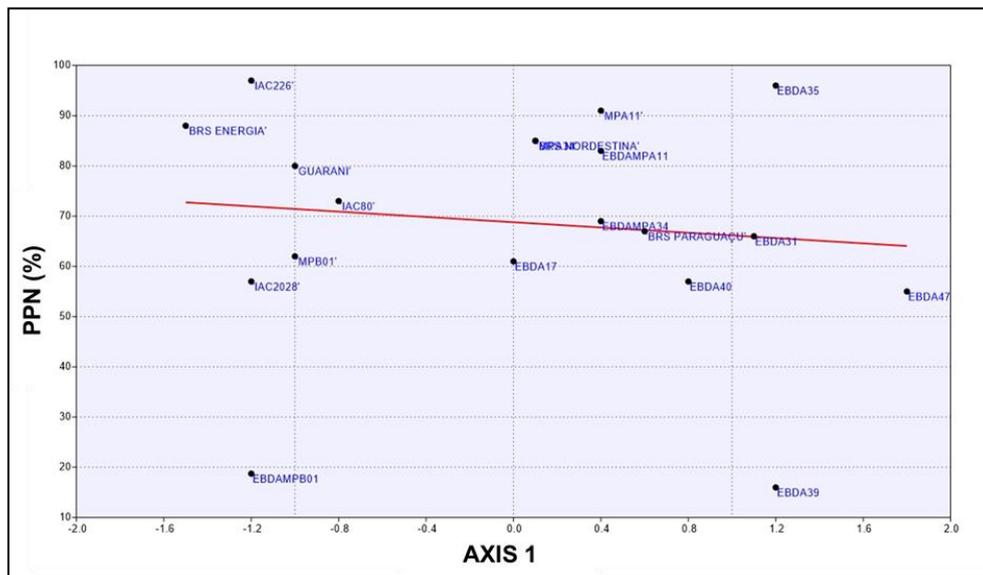
Os parâmetros porcentagem de plântulas normais (PPN), tamanho de plântulas (TP), massa seca (MS), foram utilizados para avaliar o vigor de plântulas dos 19 genótipos de mamona mostrados na (Figura 9).

Figura 9: Plântulas normais (PPN), tamanho de plântula (TP), massa seca de plântula (MS) de genótipos de mamona. Em A) sementes pequenas, B) sementes médias e C) sementes grandes.



Médias seguidas das mesmas letras nas colunas, não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Linha tracejada vermelha horizontal indica a média entre os genótipos.

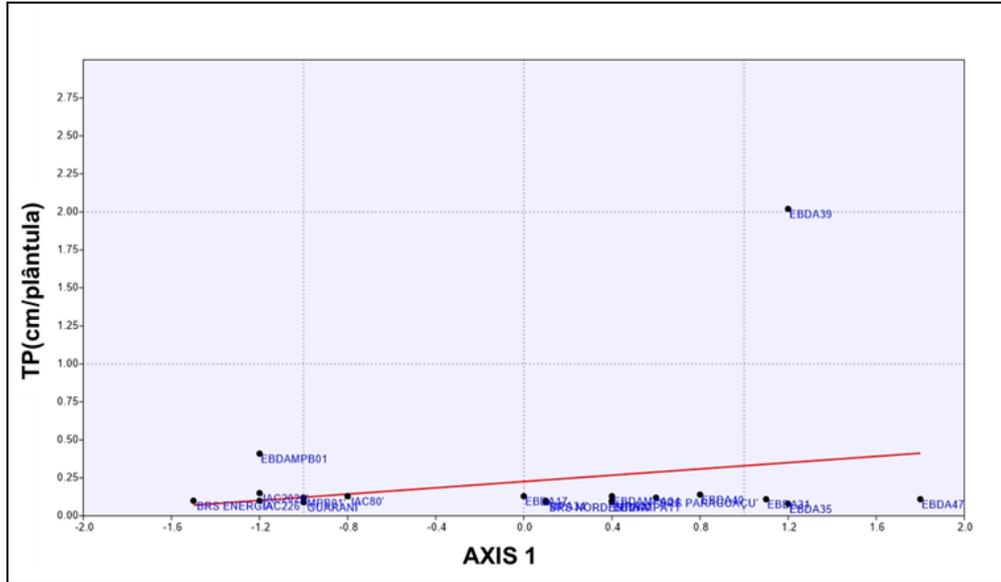
Figura 10: Análise multivariada do AXIS 1 da análise de componentes principais (ACP) com a porcentagem de plântulas normais (PPN) das sementes dos 19 genótipos de mamona.



Dos nove genótipos que apresentaram bons resultados de germinação oito genótipos obtiveram resultados igual ou superior a 80% de plântulas normais (PPN). No grupo de sementes pequenas três genótipos (BRS ENERGIA, 'IAC226' e 'GUARANI'), no grupo de sementes médias quatro genótipos ('BRS NORDESTINA', "MPA34", EBDAMPA11 e 'MPA11') e no grupo de sementes grandes apenas o genótipo EBDA35 (Figura 10).

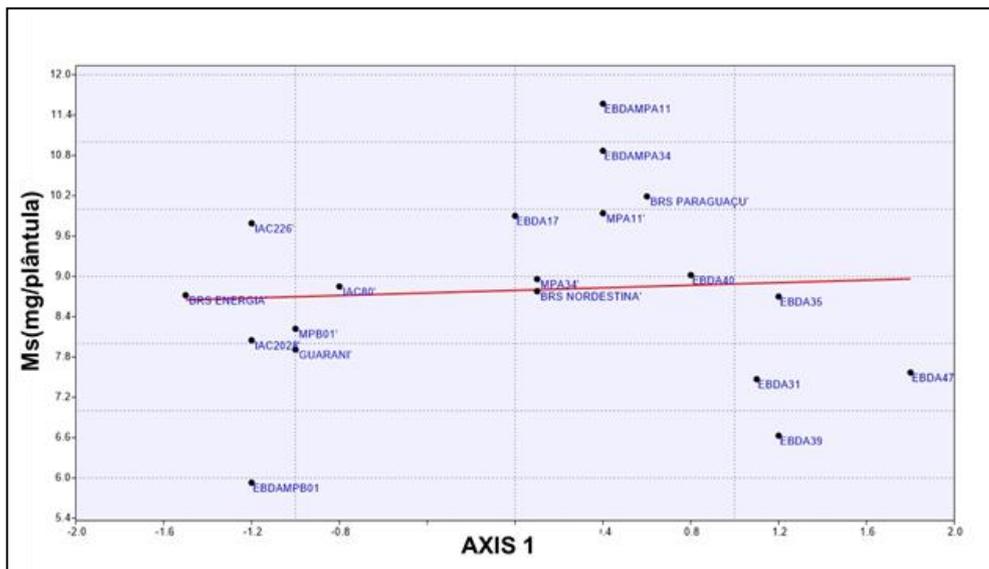
O tamanho de plântulas (TP) mostrou um valor médio de 0,14 mg/plântula, foi possível notar pouca variação entre o resultados dos genótipos dos três grupos, exceto, para os genótipos EBDAMPB01 e EBDA39, que obtiveram valores discrepantes em relação aos demais. Essa diferença foi devido ao baixo valor de plântulas normais e diferença entre os outros genótipos, refletindo no resultado apresentado. (Figura 11).

Figura 11: Análise multivariada do AXIS 1 da análise de componentes principais (ACP) com a tamanho de plântulas normais (TP) das sementes dos 19 genótipos de mamona.



A massa seca (MS) obteve um valor médio de 8,8mg entre os genótipos. No grupo de sementes pequenas não foi encontrado diferença estatística pelo teste de tukey (Figura 9) entre os genótipos, mas através da análise multivariada o genótipo 'IAC226' apresentou valor superior a 8,8mg. No grupo de sementes médias todos os genótipos obtiveram valor igual ou superior a 8,8mg. No grupo de sementes grandes apenas os genótipos ('BRS PARAGUAÇU', EBD A40) obtiveram valores igual ou superior a 8,8mg.

Figura 12: Análise multivariada do AXIS 1 da análise de componentes principais (ACP) com a massa seca de plântulas normais (MP) das sementes dos 19 genótipos de mamona.



Dos nove melhores genótipos a partir dos parâmetros de germinação, oito genótipos apresentaram bem nos parâmetros de vigor de plântulas, apenas o genótipo 'BRS PARAGUAÇU', não foi capaz de gerar porcentagem de plântulas normais PPN superior a 80%.

O genótipo IAC226, (semente pequena), e os genótipos NORDESTINA, 'MPA34' e 'MPA11' (semente média), apresentaram-se superiores tanto nos parâmetros de germinação quanto em parâmetros de vigor de plântulas, sendo as sementes desses genótipos definidas como as mais vigorosas.

Nesse trabalho com a classificação das sementes dos 19 genótipos em três grupos conclui-se que genótipos com sementes médias demonstraram melhores resultados em parâmetros de germinação e vigor de plântulas.

3.3 Teste de viabilidade de sementes por tetrazólio

O teste de viabilidade foi utilizado com intuito de confirmar a qualidade dos lotes dos 19 genótipos e mostrando que os resultados de germinação e vigor de plântulas não estão sendo influenciados por uma baixa qualidade das sementes.

Tabela 4: Viabilidade de sementes de *Ricinus communis* L. avaliada pelo teste de tetrazólio para diferentes genótipos.

| Genótipo | Viabilidade (%) |
|-------------------------|------------------------|
| 'BRS ENERGIA' | 100d |
| EBDAMPB 01 | 97cd |
| IAC226 | 97cd |
| 'IAC2028' | 95bcd |
| 'GUARANI'7 | 97cd |
| 'MPB01' | 100d |
| 'IAC80' | 92bc |
| EBDA17 | 72ab |
| 'BRS NORDESTINA' | 97cd |
| 'MPA34' | 100d |
| EBDAMPA11 | 100d |
| EBDAMPA34 | 100d |
| 'MPA11' | 97cd |
| 'BRS PARAGUAÇU' | 100d |
| EBDA40 | 100d |
| EBDA31 | 95cd |
| EBDA35 | 100d |
| EBDA39 | 72a |
| EBDA47 | 100d |

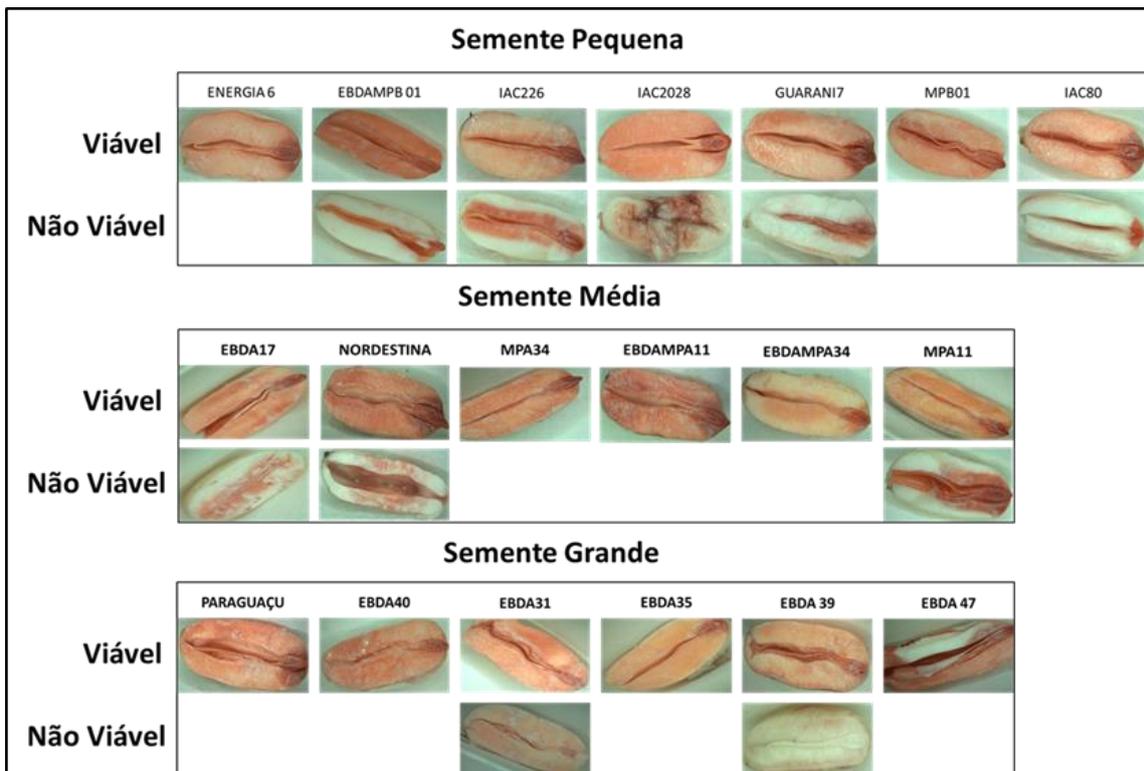
Médias seguidas das mesmas letras nas colunas, não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Segundo a International Rules for Seed Testing of International Seed Testing Association – ISTA (2004), o teste topográfico de tetrazólio é um teste bioquímico para a viabilidade, cujos objetivos são: executar uma estimativa rápida da viabilidade de amostras de sementes em geral e, em particular, naquelas que demonstram dormência e, no caso de determinadas amostras que ao final do teste de germinação revelam uma alta porcentagem de sementes dormentes, determinar a viabilidade individual das sementes dormentes ou a viabilidade de uma amostra de trabalho.

O teste de viabilidade por tetrazólio mostrou que 17 genótipos do total de 19 genótipos de mamona apresentaram viabilidade de suas sementes superior a 90% e somente os genótipos EBDA17 e EBDA39 apresentaram 72% de viabilidade e diferentes dos demais genótipos, o que demonstra que o baixo vigor desses genótipos está correlacionado com a sua viabilidade.

A Figura 6 mostra imagens das sementes dos diferentes genótipos de mamona avaliadas pelo teste de viabilidade por tetrazólio. As sementes viáveis apresentaram uma mudança de cor nos seus tecidos devido a reação bioquímica do tetrazólio (incolor) a formazan (coloração avermelhada), sendo distinguidas das sementes não viáveis que apresentaram a coloração esbranquiçada.

Figura 13: Viabilidade de sementes de *Ricinus communis* L avaliadas por meio do teste de tetrazólio.



4. CONCLUSÃO

As sementes dos diferentes genótipos apresentaram variação nos parâmetros morfométricos. Foi possível categorizar os genótipos de mamona em três classes segundo os aspectos morfométricos e peso de 100 sementes (sementes pequenas, médias e grandes) utilizando a análise de componentes principais (ACP) e método de associação de Wards. A análise multivariada entre aspectos morfométricos e parâmetros fisiológicos mostrou que o genótipo IAC226, (semente pequena), e os genótipos NORDESTINA, 'MPA34' e 'MPA11' (semente média), apresentaram-se superiores tanto nos parâmetros de germinação quanto em parâmetros de vigor de plântulas. Houve prevalência de genótipos com sementes médias com melhores resultados morfofisiológicos, demonstrando que a morfometria das sementes é um aspecto importante e que está associado ao melhor padrão fisiológico.

5. REFERÊNCIAS

DE AC ALMEIDA, F.; DE MORAIS, A. M.; CARVALHO, J. M.; DE GOUVEIA, J. P. Crioconservação de sementes de mamona das variedades 'BRS NORDESTINA' e PERNAMBUCANA. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.6, n.2, p. 295-302, 2002. Campina Grande, PB, DEAg/UFCG - <http://www.agriambi.com.br>

AZEVÊDO, D. M. P. de; Lima, E. F. O **Agronegócio da mamona no Brasil**. CampinaGrande: Embrapa Algodão, 2001. 350p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. p. 346.

BRUM, B.; LOPES, S. J.; STORCK, L.; DAL'COL LÚCIO, A.; DE OLIVEIRA, P. H.; MILANI, M. Correlações canônicas entre variáveis de semente, plântula, planta e produção de grãos em mamoneira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.3, p.404-411, mar, 2011.

COSTA, F. C.; HOESCHL, H. C. Gestão do conhecimento na cadeia produtiva de biodiesel. **Anais do Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**. P. 30- 34. 2006.

DE MORAES, Mario Luiz Teixeira et al. Tópicos especiais da genética quantitativa aplicados ao melhoramento florestal.

DRUMOND, M. A.; TAVARES, J. A.; DE OLIVEIRA, A. R.; MILANI, M.; DOS ANJOS, J. B.; MORGADO, L. B.; SILVA, A. F. Desempenho agrônômico de genótipos de mamoneira na Chapa do Araripe, Pernambucano. CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4 & SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1, 2010, João Pessoa. Inclusão Social e Energia: **Anais**. Campina grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 1693-1699.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao avançado**. São Paulo: Artimed Editora, 2004. Cap. 18: Teste de qualidade, p. 283-297.

FREIRE, R. M. M. Ricinoquímica. In: Azevedo, D. M. P. de Lima, E. F (e.). **O Agronegócio da no Brasil**. Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001, cap. XIII, p.295-335.

GASPAR-OLIVEIRA, C.; MARTINS, C.; NAKAGAWA, J. **Método de preparo das sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) para o teste de tetrazólio**. Revista Brasileira de Sementes, Botucatu, v. 31, n. 1, p.160-167, 2009.

HEYDECKER, W.; COOLBEAR, P. Seed treatments for improved performancesurvey and attempted prognosis. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.5, n.2, p.353-425, 1977..

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **International Rules for Seed Testing**. Seed Science and Technology, Edition 2004. 2004.

JESUS FILHO, H. P. **Caracterização de genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.) para potencial utilização do farelo na alimentação animal**. 2014, 95 f. Dissertação, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

JOOSEN, R. V.; KODDE, J.; WILLEMS, L. A.; LIGTERINK, W.; VAN DER PLAS, L. H.; HILHORST, H. W. Germinator: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of *Arabidopsis* seed germination. **The Plant Journal**, v.62, p.148-159, 2010.

JUNIOR, J. M. B. **Maturação, qualidade fisiológica e testes de vigor em sementes de mamona**. 2009. 135 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 2009.

LUZ, Renata Pereira. **Caracterização morfofisiológica, molecular e agronômica de cultivares de mamona**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2012.

MAYER, A. M. **The Germination of Seeds**. New York: Macmillan, 1963.

MELHORANÇA, A. L.; STAUT, T. A. **Indicações técnicas para a cultura da mamona em Mato Grosso do Sul**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005. 62p.

MENDES, R. D. C.; DIAS, D. C. F. S.; PEREIRA, M. D.; BERGER, P. G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de mamona (*Ricinus communis* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 187-194, 2009.

MOSHKIN, V.A. **Castornew delph:oxoniam press**, 1986. 315p

OLIVEIRA, I. J.; ZANOTTO, M. D. Eficiências de seleção recorrente para redução da estatura de plantas em mamoneira (*Ricinus communis* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.32 n.4, p. 1107-1112, 2008.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p. n.4, p. 1107-1112, 2008.

PUTTINI, F. A. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AGRO-MORFOLÓGICA DE GENÓTIPOS DE MAMONA (*Ricinus communis* L.)**. 2014. Tese de Doutorado. INSTITUTO AGRONÔMICO.

SANTOS, M.C.S.; LIRA, M.A.; TABOSA J.N. et al. Comportamento de clones de *Pennisetum* sp. submetidos a déficit hídrico sob condição períodos de restrição hídrica controlada. **Archivos de Zootecnia**, no prelo, 2011.

SOUZA, G. M.; CARDOSO, V. J. M. Effects of different environmental stress on seed germination. **Seed Science Technology**, 28(3): 621–630, 2000.

SOUZA, L. D.; CARVALHO, M. D.; KATAOKA, V. Y.; OLIVEIRA, J. D. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 60-67, 2009.

TELES, C. A. S. **Aspectos fisiológicos e eventos do ciclo celular em sementes de *Ricinus communis* L. sob restrição hídrica**. 2013. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal da bahia, Salvador, Bahia, 2013.

VENANCIO, MARIA MANUELA HASHIMOTO. **CARACTERIZAÇÃO AGRO-MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ACESSOS DE MAMONA**. 2013. Tese de Doutorado. INSTITUTO AGRONÔMICO.

WEISS, E. A. **Oilseed crops**. London, Longman. P . 31-99,1983.

CAPÍTULO II

Efeito do osmocondicionamento na germinação e vigor de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.)

1. INTRODUÇÃO

Durante a embebição, as sementes passam pelas fases preparatórias essenciais à germinação (FANTI e PEREZ, 2003). Estas são um conjunto de processos fisiológicos influenciado por fatores externos e internos às sementes, podendo agir isoladamente ou interagindo uns aos outros (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Do ponto de vista fisiológico a germinação ocorre em quatro fases: embebição (re-hidratação das sementes), alongamento de células, divisão celular e diferenciação das células em tecidos. Do ponto de vista físico-bioquímico a germinação poderia ser dividida em embebição, aumento da respiração, formação de enzimas, digestão enzimática das reservas, mobilização e transporte de reservas, assimilação metabólica, crescimento e diferenciação dos tecidos (MARCOS FILHO, 2005).

Os efeitos provocados pela embebição permitem que as sementes atinjam um determinado grau de umidade que ative o sistema metabólico relacionado com o processo pré-germinativo, somado à elevação da respiração das células embrionárias (HEYDECKER et al., 1973). Hegarty (1978) acrescentou também que estes efeitos dependem fundamentalmente da temperatura e da duração do processo de hidratação, assim como da espécie, variedade ou lote de sementes tratadas.

O osmocondicionamento baseia-se no controle da hidratação das sementes a um nível que permita que ela inicie a atividade metabólica pré-germinativa, mas iniba a protrusão da radícula. As sementes são colocadas em contato com uma solução aquosa de um composto quimicamente inerte, mas osmoticamente ativo como manitol ou polietilenoglicol. A partir daí as sementes iniciam a embebição normalmente, paralisando o processo assim que entram em equilíbrio com o potencial osmótico da solução (MARCOS-FILHO, 2005).

O polietilenoglicol (PEG-6000, PEG-8000, dentre outros) tem sido utilizado com sucesso em trabalhos para simular os efeitos da restrição hídrica por não penetrar nas células, não ser degradado e não causar toxidez, devido ao seu alto peso molecular. Ele atua como um agente osmótico que simula um determinado potencial osmótico (Ψ_{os}) que pode ser estabelecido pela equação de Van't Hoff (BRAGA et al., 1999; HEYDECKER et al., 1975; SOUZA e CARDOSO, 2000).

A utilização de sementes de alta qualidade é um pré-requisito para o estabelecimento rápido e uniforme das plântulas no campo, com consequências no estande, na produtividade e na qualidade do produto colhido. A qualidade da semente é particularmente crítica quando são utilizadas novas cultivares ou híbridos, pois, devido ao alto custo, há necessidade de melhores técnicas para se obter melhor emergência. Visando a melhoria na qualidade das sementes, além de rápido e uniforme estabelecimento das plântulas, diferentes tipos de tratamentos têm sido estudados, dentre eles, o condicionamento osmótico (HEYDECKER et al., 1973; NASCIMENTO, 2002).

Sementes tratadas desta forma podem ser novamente desidratadas ao conteúdo de umidade inicial sem perda significativa dos efeitos benéficos promovidos pelo tratamento. Esse processo de secagem das sementes após o tratamento de condicionamento osmótico tem sido comumente designado na literatura como hidratação desidratação (BRACCINI et al., 1999).

Quando as condições do tratamento são favoráveis, o processo de mobilização de reservas, ativação e síntese de novo de algumas enzimas, síntese de DNA e RNA são iniciados durante o condicionamento osmótico. Quando o obstáculo à absorção de água é removido, ocorre o rápido crescimento do embrião (KHAN, 1992).

Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da restrição hídrica promovida por soluções de polietilenoglicol na germinação e vigor de sementes e plântulas de dois genótipos de mamona ('MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU').

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material biológico

As sementes dos genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' foram obtidas da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG).

2.2 Osmocondicionamento e reidratação de sementes

Os genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' foram escolhidos para os experimentos de restrição hídrica, pois, apresentaram-se bem no parâmetro (gMAX) com valores respectivos de 96% e 94%, porém, com diferenças no seu vigor notado pelo tempo médio de germinação (TMG) 40h e 50h, área abaixo da curva (AAC) 56,74 e 46,10 unidades de área e porcentagem de plântulas normais (PPN) 85% e 67% respectivamente. O genótipo 'MPA34' foi considerado com maior vigor do que genótipo 'BRS PARAGUAÇU' em parâmetros de germinação e vigor de plântulas sem tratamentos pré-germinativos.

Os genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' foram submetidas ao osmocondicionamento nos potenciais de restrição hídrica (-0.1, -0.2, -0.4, -0.6, -0.8 e -1.0 MPa) utilizando o polietilenoglicol (PEG 8000) mantendo as sementes em fase-II de embebição por 7 dias, e em seguida as sementes foram reidratadas em água (0.0 MPa). O teste foi conduzido em Germinador (PANASONIC - HUMIDITY) à temperatura de 25°C.

Para realização dos experimentos, foram utilizadas quatro replicatas de 25 sementes, totalizando 100 sementes, que foram separadas aleatoriamente, por contagem manual. Após a contagem e separação das sementes, foi realizada a desinfestação das mesmas, utilizando solução de hipoclorito 0,5% e Tween 20 (1 gota por 100mL) de acordo resultados obtidos por Sousa (2013) como melhor tratamento para desinfestação em sementes de mamona. Para isso, as sementes foram submersas na solução de hipoclorito por 20 min sob agitação constante. Foram realizadas quatro lavagens com água destilada para a retirada do hipoclorito e as sementes foram colocadas para secar sobre do papel toalha.

Para a restrição hídrica foram utilizadas caixas plásticas transparentes (14 x 22 cm) e os papéis germitests foram cortados na mesma proporção da caixa (14 x 22 cm) utilizando 3 vezes o peso do papel para adicionar de volume de polietilenoglicol (PEG 8000 – Sigma-Aldrich). O preparo do Polietilenoglicol foi de acordo Vilela et al. (2001).

Tabela 1: Concentração de polietilenoglicol (PEG 8000) utilizada para obter os diferentes níveis de potencial osmótico, com temperatura de 25°C.

| Potencial osmótico (MPa) | Concentração (g de PEG/L de H ₂ O) |
|--------------------------|---|
| -0.1 | 59,5 |
| -0.2 | 65,4 |
| -0.4 | 96,3 |
| -0.6 | 120,0 |
| -0.8 | 140,0 |
| -1.0 | 157,1 |

Fonte: Vilela et al. (2001).

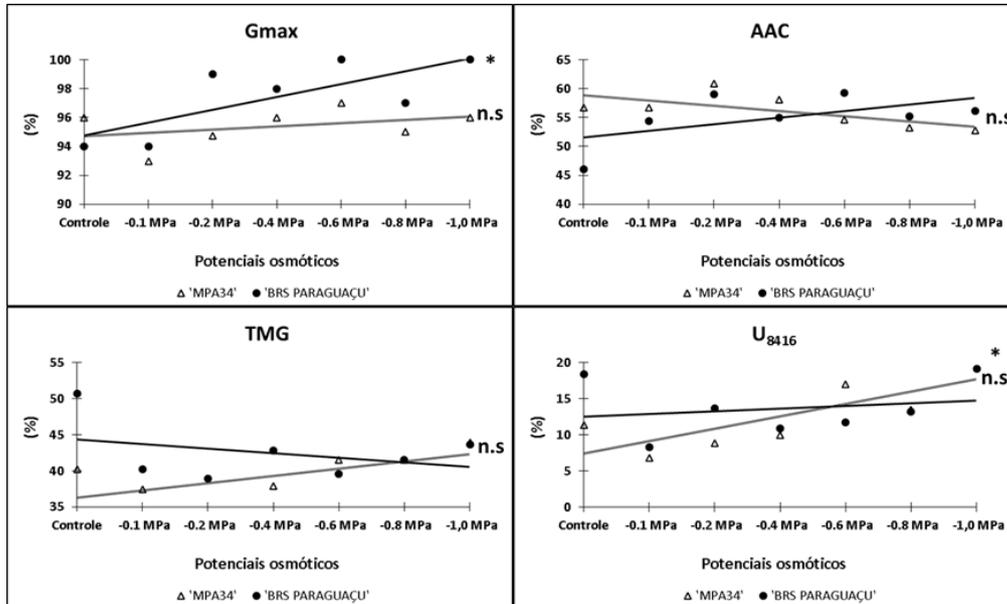
2.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística de regressão linear ao nível de probabilidade de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' apresentam qualidade fisiológica diferentes considerados divergentes segundo o vigor das suas sementes (Figura 1 e 2).

Figura 1: Efeito do osmocondicionamento em potenciais -0.1 a -1.0 MPa na germinação (gMAX), uniformidade (U_{84-16}), tempo médio de germinação (TMG) e área abaixo da curva (AAC) em sementes dos genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU'.



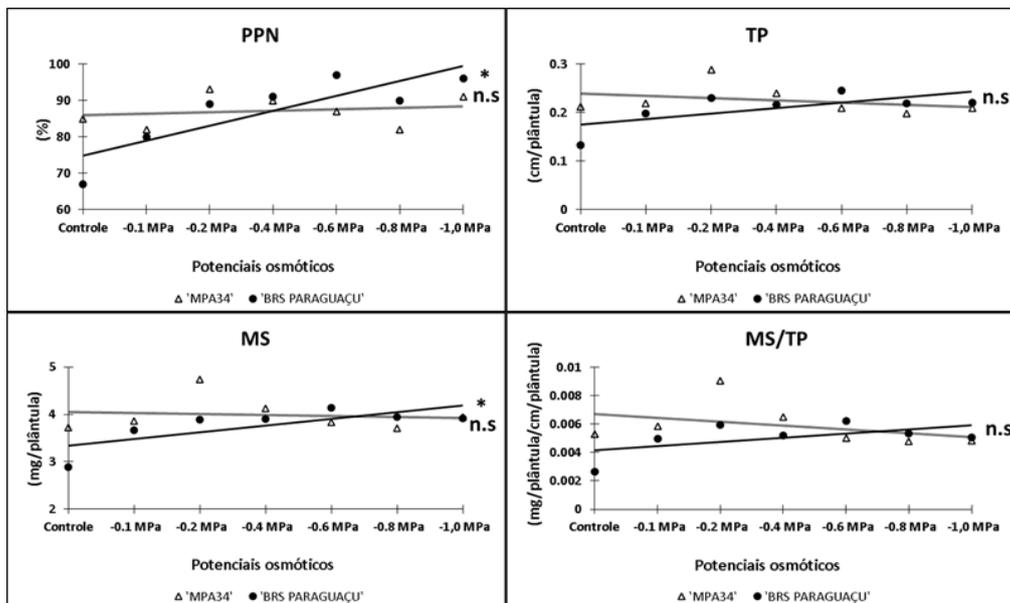
Os genótipos responderam de forma diferente ao osmocondicionamento pela análise de regressão linear nos parâmetros (gMAX, U_{84-16} , PPN e MS) e não apresentaram padrão de regressão linear nos parâmetros (AAC, TMG, TP e MS/TP).

O gMAX do genótipo 'BRS PARAGUAÇU' demonstrou ser influenciado pelo osmocondicionamento, os tratamentos demonstraram germinação superior em relação ao controle, e demonstrando um padrão significativo de aumento da germinação com a diminuição do potencial osmótico após o potencial osmótico -0.2 MPa, enquanto o genótipo 'MPA34' não demonstrou um padrão pela análise de regressão linear nesse parâmetro.

A regressão linear no parâmetro uniformidade (U_{84-16}) demonstrou que o genótipo 'MPA34' perde a sua uniformidade com a diminuição do potencial osmótico (maior restrição hídrica), enquanto o genótipo 'BRS PARAGUAÇU' não demonstra esse padrão, sendo mais desuniforme no controle, tendo melhores resultados de uniformidade nos potenciais osmóticos mais altos (menor restrição hídrica).

Os genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' apesar de terem apresentado porcentagens de germinação elevadas apresentaram-se diferentes na geração de plântulas normais (PPN) no tratamento controle, 85 e 67% respectivamente. O efeito do osmocondicionamento nos parâmetros de vigor de plântulas podem ser observados na Figura 2.

Figura 2: Efeito do osmocondicionamento em potenciais -0.1 a -1.0 MPa na porcentagem de plântulas normais (PPN), tamanho de plântulas (TP) e massa seca de plântulas (MS) em sementes dos genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU'.



Os parâmetros porcentagem de plântulas normais (PPN) e massa seca (MS) foram significativos para o genótipo 'BRS PARAGUAÇU', demonstrando melhor resultado com a diminuição do potencial osmótico (aumento da restrição hídrica), não sendo observado no genótipo 'MPA34'. Os parâmetros tamanho de plântulas (TP) e a razão massa seca pelo tamanho de plântula (MS/TP), não demonstraram um padrão de regressão linear.

A eficiência do osmocondicionamento segundo Eroseto et al. (2002) e Souza (2009) depende da qualidade inicial da semente, sendo que lotes com alta qualidade

fisiológica não respondem aos tratamentos de osmocondicionamento com os efeitos positivos característicos *priming*.

Em sementes de mamona foi registrado um possível efeito de *priming*, onde foi realizado um tratamento de osmocondicionamento em um sistema com aeração das sementes previamente aos testes de germinação. Os resultados do trabalho citado mostraram que quando as sementes de mamona são osmocondicionadas, no potencial -0.5 MPa, melhoram os valores de índice de velocidade de germinação (IVG) e as suas taxas de germinação. O potencial de -1.0 MPa foi danoso para as sementes (DA SILVA et al., 2009). Em outro estudo com mamona foi observado efeito de *priming* em relação à uniformidade, tempo e velocidade de germinação ao submeter sementes de mamona do genótipo EBDAMPA11 ao osmocondicionamento com PEG 8000 em diferentes potenciais osmóticos (TELES, 2013).

Em trabalhos com outras espécies Brito (2010) não obteve melhoria na qualidade e vigor das sementes e mudas ao submeter as sementes de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) ao osmocondicionamento com PEG 8000 no potencial -0.8 MPa. Ghiyasi et al. (2008) em sementes de trigo *Triticum aestivum* (Poaceae) demonstraram que houve melhoria na germinação das sementes e o estabelecimento das plântulas em comparação ao controle (sem tratamento). SUN et al (2010) obtiveram melhoria, na germinação e tolerância à seca das mudas de *Oryza sativa* L. (Poaceae).

Nesse trabalho, foi observado efeito de *priming* das sementes apenas para o genótipo 'BRS PARAGUAÇU', o qual era considerado inicialmente com sementes com menor vigor em comparação às sementes do genótipo 'MPA34' (tratamentos controle). O genótipo 'MPA34' demonstrou diminuir a sua uniformidade com o aumento da restrição hídrica, enquanto o genótipo 'BRS PARAGUAÇU' demonstrou melhorar os parâmetros de germinação e vigor de plântulas.

Os efeitos positivos do osmocondicionamento são atribuídos à indução de mecanismos bioquímicos de reparação celular, a ativação do sistema de defesa antioxidante e indução de enzimas que catalisam a decomposição dos compostos e mobilização de armazenamento (DI GIROLAMO e BARBANTI, 2012). Mecanismos

bioquímicos e moleculares precisam ser investigados para correlacionar os resultados fisiológicos.

4. CONCLUSÃO

Os genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' responderam de forma diferente ao osmocondicionamento quanto aos parâmetros de germinabilidade e vigor de plântulas. As sementes do genótipo ('BRS PARAGUAÇU') tiveram sua qualidade fisiológica melhorada após o osmocondicionamento, caracterizado como efeito de *priming*, conforme pôde ser observado quanto aos parâmetros gMAX, PPN e MS. Ao contrário, as sementes do genótipo 'MPA34' tiveram a qualidade piorada, tornando-se mais desuniformes (U_{84-16}) com a elevação do potencial osmótico (valores mais negativos). O melhor resultado evidenciado para o genótipo 'BRS PARAGUAÇU' quanto ao vigor de sementes resultante do osmocodicionamento (*priming*) indica melhor tolerância ao estresse hídrico por parte das sementes e plântulas desse genótipo.

5. REFERÊNCIAS

BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P.; BRAGA, J. F.; SÁ, M. E. Efeito da disponibilidade hídrica do substrato na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 2, p. 95-102, 1999.

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

BRITO, C. D. **Germinabilidade de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Sob restrição hídrica: aspectos fisiológicos, moleculares e citológicos**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2010.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

DA SILVA, Fábio F.; POLO, Marcelo; RODRIGUES, Amanda C. Efeitos do estresse hídrico induzido durante a germinação da mamona, *Ricinus communis* (Euphorbiaceae). **Bol. Mus. Biol. Mello Leitão**, v. 25, p. 31-41, 2009.

DE CARVALHO, L. F.; MEDEIROS-FILHO, S.; ROSSETTI, A. G.; TEÓFILO, E. E. M. Condicionamento osmotico em sementes de sorgo. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasilia, v.22, n.1, p.185-192, 2000.

DE LUCCA, A.; BRACCINI, M. S. R.; SEDIYAMA, C. S.; SCAPIM, C. A.; DO CARMO, L. B. M. Avaliacao da qualidade fisiologica de sementes de soja, apos o processo de hidratacao-desidratacao e envelhecimento acelerado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasilia, v.34, n.6, p.1053-1066, 1999.

DI GIROLAMO, Giuseppe; BARBANTI, Lorenzo. Treatment conditions and biochemical processes influencing seed priming effectiveness. **Italian Journal of Agronomy**, v. 7, n. 2, p. 25, 2012.

FANTI, S. C.; PEREZ, S. C. J. G. de A. Efeito do estresse hídrico e envelhecimento precoce na viabilidade de sementes osmocondicionadas de paineira (*Chorisia*

speciosa). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 4, p. 537-543, abr.2003.

GHIYASI, M.; SEYAHJANI, A. A.; TAJBAKSH, M.; AMIRNIA, R.; SALEHZADEH, H. Effect of osmopriming with polyethylene glycol (8000) on germination and seedling growth of Wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds under salt stress. **Research Journal of Biological Science**, v.3, n°10, p.1249-1251, 2008.

HEGARTY, T. W. The physiology of seed hydration and dehydration, and the relation between water stress and the control of germination: a review. **Plant Cell & Environment** . v. 1, p. 101-119, 1978.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R. L. Accelerated germination by osmotic seed treatment. **Nature**, London, v.246, n.5427, p.42-44, 1973.

JOOSEN, R. V.; KODDE, J.; WILLEMS, L. A.; LIGTERINK, W.; VAN DER PLAS, L. H.; HILHORST, H. W. Germinator: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of *Arabidopsis* seed germination. **The Plant Journal**, v.62, p.148-159, 2010.

KHAN, A. A. Preplant physiological seed conditioning. **Horticultural Review**, Edinburgh, v.13, p.131-181, 1992.

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

MEXAL, J.; FISHER, J. T.; OSTERYOUNG, J.; REID, C. P. Oxigen availability in polyethylene glycol solutions and its implication in plant-water relations. **Plant Physiology**, Lancaster, v.55, p.20-24, 1975.

NASCIMENTO, Warley Marcos. Sementes de melão osmoticamente condicionadas: vale a pena utilizá-las. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 133-135, 2002.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2. ed. Brasília: [s. n.], 1985. 298 p.

EROSETO, C. A. V.; LIMA, T. M.; NAKAGAWA, J. Qualidade fisiológica e potencial de armazenamento de sementes de tomate submetidas ao osmocondicionamento. **Horticultura brasileira**. V. 20, n. 4, p. 630-634, 2002.

SOUZA, C. L. M. **Germinabilidade de sementes de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) sob condições de estresses abióticos.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009, 52p.

SUN, Y. Y. et al. Effects of seed priming on **germination and seedling growth under water stress in Rice.** *Acta Agronomica Sinica*, v.36, n°11, p.1931-940, 2010.

TELES, C. A. S. **Aspectos fisiológicos e eventos do ciclo celular em sementes de *Ricinus communis* L. sob restrição hídrica.** 2013. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal da bahia, Salvador, Bahia, 2013.

CAPÍTULO 3

**Atividade de superóxido dismutase em sementes de
Ricinus communis L. sob déficit hídrico**

1. INTRODUÇÃO

A rápida e uniforme emergência em campo é um requisito fundamental para um bom estabelecimento da cultura, especialmente sob condições ambientais adversas (GUPTA et al., 2008) onde o processo germinativo e o desenvolvimento de plântulas são períodos cruciais (BRAY, 1995) envolvendo alta atividade metabólica e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) na célula (KIRAN et al., 2012), com um impacto direto no rendimento final e qualidade (GUPTA et al., 2008).

Está bem estabelecido que vários estresses ambientais muitas vezes levam ao aumento da geração de ERO. A enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) tem sido proposta por sua importância na tolerância ao estresse de plantas e por fornecer a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos dos níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MITTLER, 2002).

A (SOD, EC 1.15.1.1) é uma enzima ubíqua nos organismos aeróbicos, e constitui a primeira linha de defesa contra a toxicidade causada pelas ERO dentro de uma célula (ALSCHER et al., 2002; GILL, S. S. et al., 2015). É uma metaloenzima do sistema antioxidante enzimático intracelular eficaz, que catalisa a dismutação de radicais superóxido (radicais com tempo de vida curto) em peróxido de hidrogênio (ERO mais estáveis) (GILL e TUJETA, 2010).

O aumento da expressão (SOD, EC 1.15.1.1) pode proteger as plantas contra estresses físicos (salinidade, seca e alta intensidade de luz). Tem sido relatado que a super-expressão de SOD em algumas plantas transgênicas reforça a tolerância a estresses abióticos (LEE et al., 2007; TSENG et al., 2007). Deste modo, a SOD é considerado como uma enzima chave na regulação dos níveis de ROS intracelulares e na manutenção das condições fisiológicas normais sob o stress oxidativo (MITTLER, 2002; GILL et al., 2015).

Com isso, o objetivo desse trabalho foi determinar a atividade enzimática da superóxido dismutase durante as Fases-I e Fase-II de embebição definidas através de curva de embebição em diferentes potenciais osmóticos em radículas e cotilédones dos genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' procurando estabelecer uma possível relação da atividade da SOD com a germinação e o vigor de sementes e plântulas sob condições de restrição hídrica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material biológico

As sementes dos genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' foram obtidas da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG).

2.2 Curvas de embebição em diferentes potenciais osmóticos

A curva de embebição foi montada em um rolo com 10 sementes (controle), em caixa plástica transparente (14 x 22 cm) e os papéis germitests foram cortados na mesma medida da caixa. As sementes no potencial 0,0 MPa foram germinadas em rolo contendo apenas água. Inicialmente as sementes foram pesadas em balança analítica (SHIMADZU AUW220D), em seguida foram acondicionadas sobre o papel germitest em posições numeradas de 1 a 10, mantendo-se as mesmas em suas posições durante todo o teste. Cada caixa ou rolo continha três folhas de papel germitest, os quais foram umedecidos com polietilenoglicol (PEG 8000 – Sigma-Aldrich) até a saturação, visualizada por meio da formação de uma película do líquido sobre a primeira folha de papel. O teste foi conduzido incubando-se as sementes em câmara de germinação (Eletrolab EL402-150), as quais foram pesadas ao longo de 72h.

2.3 Coleta de material biológico para ensaios bioquímicos e moleculares

Foram utilizadas sementes dos genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' divididas em 4 tratamentos: a) Sementes embebidas em água por 12, 24 e 40h; b) Embebidas em PEG 8000 no potencial osmótico de -0.2 MPa por 12, 24 e 40h; c) Embebidas em PEG 8000 no potencial osmótico de -0.6 MPa por 12, 24 e 40h; e d) Embebidas em PEG 8000 no potencial osmótico de -1.0 MPa por 12, 24 e 40h e incubadas em germinadores a 25°C, sem iluminação. A atividade de SOD em semente seca foi atribuída como sendo o tempo 0h.

Foram isolados radícula e cotilédone das sementes com auxílio de lâminas do tipo “razor” e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, As amostras foram acondicionadas em eppendorf de 2mL e armazenados em ultrafreezer a -80°C. Em seguida estas foram liofilizadas por 16h em liofilizador tipo Enterprise 1 (Terroni) e maceradas nos seus respectivos tubos na presença de nitrogênio líquido.

2.4. Extração e quantificação de proteínas totais

Pesou-se em torno de 5mg do macerado de radícula e cotilédone respectivamente, que foi transferido para tubo eppendorf individual e homogeneizados em 125 μ L de tampão fosfato, pH 7,8 (SAMBROOK et al., 1989). Os tubos eppendorfs com as amostras foram colocados em recipientes com gelo na mesa agitadora (Labnet International, Inc. ORBITTM 300) durante 1h, sob agitação constante. Em seguida centrifugou-se o material a 1500 rpm, a 4°C durante 30 min. Após a centrifugação a fase aquosa (extrato proteico) foi retirada e colocada em novo tubo de reação (1,5 μ L tipo Eppendorf), identificados e armazenada em caixas à -80°C em ultra-freezer.

A quantificação das proteínas totais foi realizada segundo o método proposto por Bradford (1976), usando curva padrão de albumina sérica bovina - BSA (Molecular Probes) para a construção da curva analítica. Utilizou-se como reagente de cor, solução Bradford Protein Assay (Bio-Rad). Para determinação da concentração de proteínas totais utilizou-se a solução estoque BSA (1440 μ g/mL). Foi construída uma curva analítica, na qual o intervalo de concentração do BSA variou de 0,5 a 20 μ g.mL⁻¹. Para a análise das amostras foi utilizada uma alíquota de 1 μ L do extrato bruto diluído em 799 μ L de tampão fosfato pH 7,8. Para a leitura das amostras foi utilizado 160 μ L do extrato diluído e 40 μ L do reagente de Bradford Protein Assay (Bio-Rad). A leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan 60 – Thermo Scientific), no comprimento de onda de 595nm. O experimento foi realizado utilizando duas repetições técnicas e três biológicas. A concentração das proteínas nas amostras foi calculada usando-se a equação obtida no cálculo de regressão linear da curva analítica com BSA padrão.

2.5 Atividade de Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada espectrofotometricamente utilizando metodologia adaptada tendo como base o descrito por Gianopolitis e Ries (1977). Baseado na detecção espectrofotométrica do formazan a 560nm (produto de redução do azul de nitro-tetrazólio – NBT), mediado pelos radicais superóxidos, que são formados quando a riboflavina é submetida à luz, esta sofre fotólise, perdendo um elétron para o oxigênio do ambiente (O_2), resultando no íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Este íon atua reduzindo o NBT a formazan (produto de coloração roxa). Na presença de SOD, a reação é inibida e foi utilizada esta inibição para determinar atividade enzimática da SOD (ALFENAS, 2006).

Inicialmente determinou-se o tempo de reação para fotorredução do NBT e posteriormente foi realizada a inibição da formação do formazan a partir do NBT utilizando o extrato proteico em estudo, segundo a metodologia de GIANOPOLITIS e RIES (1977). Foram utilizados diferentes volumes de amostra para determinar qual o volume necessário para inibir em torno de 50% da reação de redução do NBT, quando mantidos durante 15 minutos a exposição à luz (9W).

A análise foi realizada a 25°C e o meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,8); metionina 14mM; ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,1µM; NBT 75µM e riboflavina 2µM. Para a determinação da atividade da SOD utilizou-se 20µL de amostra (extrato proteico diluído 10X) e acrescentou-se 180µL do meio de reação, totalizando 200µL. Para o preparo do controle utilizou-se apenas o meio de reação. A microplaca foi mantida por 15 minutos sob iluminação (9W) em caixa de papelão forrada com papel alumínio. O branco foi feito da mesma forma, no entanto ficou sob o abrigo da luz (caixa de papelão com a luminária apagada). As leituras das absorbâncias foram realizadas a 560 nm em espectrofotômetro (GE Healthcare - Ultrospec™ 7000). Todas as análises foram realizadas em duas repetições técnicas e três biológicas. A atividade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima (SOD) necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT e foi calculada pela reação descrita abaixo:

$SOD \text{ (Unidade/mL)} = [(V/v) - 1] \times F / [P]$ onde:

V - corresponde à taxa de reação na ausência da SOD (absorbância do tubo controle);

v - corresponde à taxa de reação na presença da enzima (absorbância do tubo amostra);

F - é o fator de diluição (100);

P - corresponde à concentração de proteínas totais do extrato bruto.

Uma unidade (U) da SOD corresponde ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) e o resultado é expresso em Unidade de SOD. μg^{-1} de Proteína.

2.3 Análise estatística

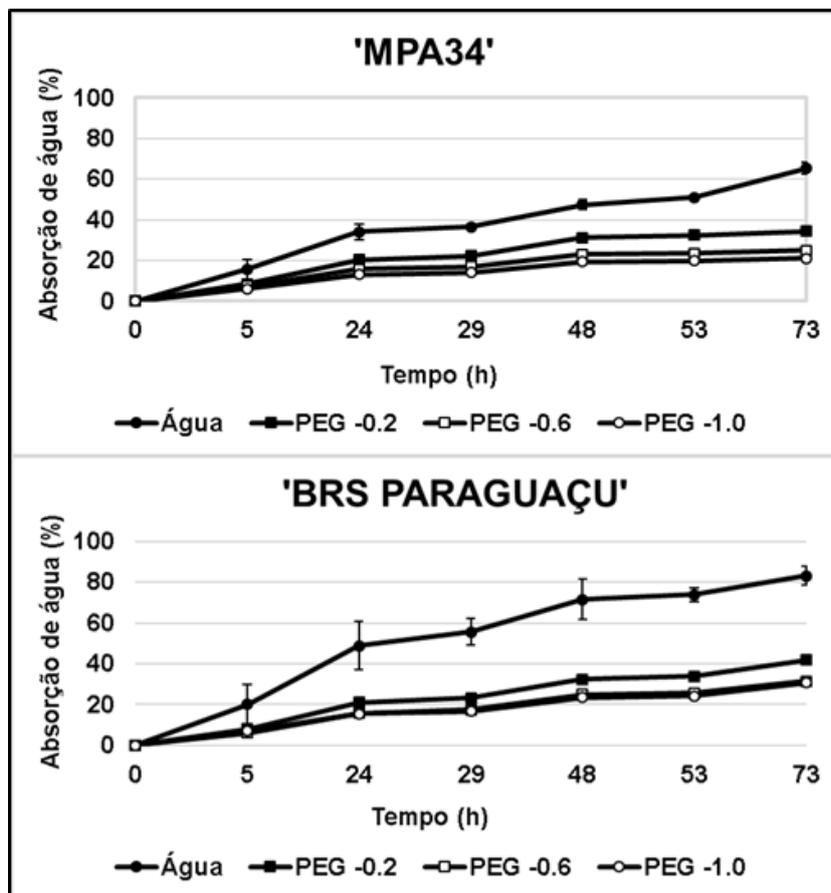
Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, usando o teste de Tukey ao nível de probabilidade de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Curvas de embebição em diferentes potenciais osmóticos

A curva de embebição foi utilizada para se obter o padrão de absorção de água dos dois genótipos de mamona ('MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' em diferentes potenciais osmóticos (0.0 MPa em água, -0.2, -0.6 e -1.0 MPa em PEG) (figura 1). O padrão de absorção de água foi utilizado para identificar o padrão trifásico de absorção de água, analisando-se a atividade de SOD em pontos compreendendo a Fase-I e Fase-II do processo de embebição e germinação das sementes dos dois genótipos.

Figura 1: Curva de embebição de sementes dos genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' sob os potenciais osmóticos (0.0 MPa em água, e -0.2, -0.6, e -1.0 MPa em PEG 8000).



Os genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' apresentaram padrão trifásico semelhante (embebição em água), onde as sementes do genótipo 'BRS PARAGUAÇU' necessitam absorver mais água para atingir a Fase-III (germinação) e apresentaram maior variação no padrão de absorção de água. A Fase-I ocorreu para ambos os genótipos até 24h de embebição, iniciando-se assim a Fase-II que ocorreu até a protusão radicular (48 e 53h). O genótipo 'BRS PARAGUAÇU' precisou absorver cerca de 70% água (53h) do seu peso inicial e o genótipo 'MPA34' precisou absorver aproximadamente 50% (48h) de água do seu peso inicial para alcançar a Fase-III.

A atividade respiratória é rapidamente iniciada uma vez que a semente começa a embeber, onde diversas rotas e ciclos, como o ciclo de Krebs, são ativados a partir de um conteúdo de água ao redor de 20%, seguindo um padrão similar ao da absorção de água. A quantidade de trifosfato de adenosina (ATP) em sementes secas é extremamente baixa, mas aumenta depressa durante a embebição, seguindo a atividade respiratória aeróbica que é a principal fonte de ATP antes da emergência da radícula (BEWLEY e BLACK, 1994).

Na Fase-I as primeiras atividades em sementes em embebição são associadas ao reparo dos danos acumulados durante a secagem e o período de armazenamento das sementes, como o reparo do DNA e membranas. A formação de polissomos a partir de ribossomos livres também acontece cedo durante a embebição, de modo a criar o maquinário para a tradução de RNAs mensageiros (mRNAs) em proteínas (BEWLEY e BLACK, 1994). Ambos os genótipos ('MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU') atingiram 20% de conteúdo de água em apenas 5h de embebição.

A Fase-II é tida por ocorrer a síntese e duplicação de DNA, onde também ocorre o início da degradação das reservas e o alongamento celular. A síntese de DNA, RNA e proteínas ocorre em um conteúdo de água de aproximadamente 50% (BEWLEY e BLACK, 1994). A Fase-II foi considerada para ambos os genótipos como tendo início em 24h, onde o genótipo 'MPA34' absorveu aproximadamente 40% em conteúdo de água e o genótipo 'BRS PARAGUAÇU' absorveu cerca de 50% de água.

A embebição em potenciais osmóticos (-0.2, -0.6 e -1.0 MPa) demonstrou manter as sementes de ambos os genótipos na Fase-II, não permitindo que ocorresse a conclusão do processo germinativo por meio da protrusão radicular. Em 24h de embebição foi alcançado cerca de 20% de absorção de água em todos os potenciais osmóticos testados, sendo este o conteúdo aproximado para se iniciar a atividade respiratória. A embebição nos potenciais osmóticos no mesmo momento do início da protrusão radicular na embebição em água ('MPA34' em 48h e 'BRS PARAGUAÇU' em 53h) ocorreu entre 20 e 40% de absorção de água, demonstrando que esse conteúdo de água não é o suficiente para que as sementes atinjam a germinação.

As fases de germinação em mamona foram descritas por Telles (2013) trabalhando com o genótipo EBDA 'MPA11'. A autora observou a embebição através do peso das sementes e chegou a conclusão que a Fase-II para esse genótipo ocorre entre 24h e 36h onde percebeu uma diminuição na absorção de água em 24h indicando o início da Fase-II e em 38h percebeu um aumento do peso das sementes indicando o início do crescimento do embrião.

A Fase-I e Fase-II da germinação em sementes de mamona de diferentes tamanhos embebidas em papel umedecido foi descrita por Zuchi (2012). O autor notou que a rápida absorção de água (Fase-I) ocorreu em média até 28h de embebição, onde inicia-se a Fase-II que ocorre a ativação dos processos metabólicos requeridos para o crescimento do embrião, esse padrão foi dito pelo autor ocorrer independente do tamanho da semente.

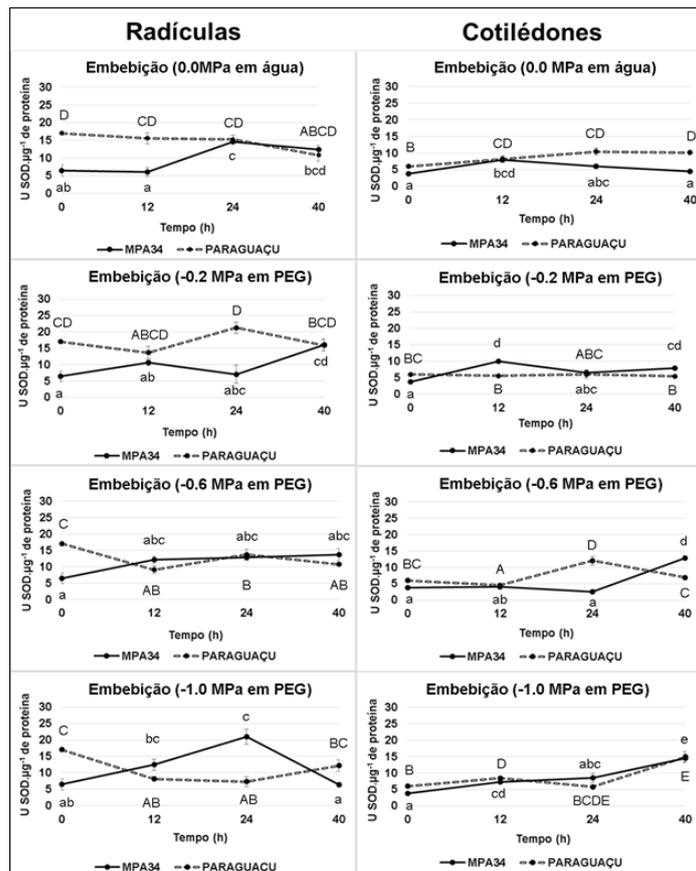
A variabilidade fenotípica nos parâmetros biométricos de sementes de diferentes variedades e cultivares de mamona assim como a qualidade do lote podem causar variabilidade nos padrões de embebição das sementes (RODRIGUES et al., 2010; LUZ, 2012).

Os resultados obtidos corroboram com os encontrados por Teles (2013) e Zuchi (2012), onde a Fase-II iniciou por volta de 24h e finalizou por volta de 40h. A diferença na porcentagem de absorção de água entre os dois genótipos indica que a variabilidade fenotípica entre suas sementes.

3.2 Atividade de Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade de SOD foi avaliada em tecidos de radículas e de cotilédones de sementes de ambos genótipos embebidas nos potenciais osmóticos de 0.0 MPa em água, e -0.2 , -0.6 e -1.0 MPa em soluções de PEG 8000) nos tempos de embebição de 0h (semente seca) e de 12h (Fase-I), 24h (início da Fase-II) e 40h (final da Fase-II) (Figura2).

Figura 2: Atividade de SOD (U SOD.μg de proteínas) em radículas e cotilédones de sementes dos genótipo 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU', embebidas por (12, 24 e 40h), nos potenciais (0.0 MPa em água, e -0.2, -0.6, -1.0 MPa em PEG 8000).



Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas e minúsculas foram utilizadas para os genótipos 'BRS PARAGUAÇU' e 'MPA34' respectivamente.

A atividade de SOD em semente seca foi maior para o genótipo 'BRS PARAGUAÇU'. De modo geral, os dois genótipos apresentaram padrões de atividade de SOD diferentes em ambos os compartimentos analisados (radícula e cotilédone)(Figura 2).

A atividade de SOD em radícula no genótipo 'MPA34' apresentou um aumento em água (0.0 MPa) a partir de 24h de embebição, sendo que na embebição sob restrição hídrica no potencial de -0.2 MPa esse aumento foi notado no tempo de embebição de 40h. No potencial osmótico de -0.6 MPa a atividade de SOD não sofreu alteração, e no potencial osmótico -1.0 MPa a atividade de SOD aumentou em 24h de embebição seguida de diminuição em 40h. Já o genótipo 'BRS PARAGUAÇU' não obteve variação da atividade de SOD na embebição nos potenciais de 0.0 e -0.2 MPa no decorrer dos tempos de embebição. No potencial osmótico de -0.6 MPa obteve diminuição da atividade de SOD nos três tempos de embebição em relação a semente seca. No potencial osmótico de -1.0 MPa a atividade de SOD diminuiu em 12 e 24h em relação a semente seca (0h) e aumentou em 40h de embebição.

A atividade de SOD em cotilédones no genótipo 'MPA34' apresentou um aumento em 12h de embebição em relação a semente seca e os tempos de 24 e 40h que não diferiram entre si na embebição em água. No potencial osmótico de -0.2 MPa a atividade de SOD aumentou em 12 e 40h de embebição em relação a semente seca se 24h de embebição. No potencial osmótico de -0.6 MPa a atividade de SOD aumentou apenas em 40h de embebição. No potencial osmótico de -1.0 MPa a atividade de SOD aumentou em 12h em relação a semente seca (tempo 0h), mantendo-se em 24h de embebição e sofrendo novo aumento em 40h de embebição. A atividade de SOD em cotilédones no genótipo 'BRS PARAGUAÇU' aumentou em 24 e 40h de embebição em água em relação a semente seca. No potencial osmótico de -0.2 MPa atividade de SOD não sofreu alteração. No potencial -0.6 MPa a atividade de SOD diminuiu em 12h em relação a semente seca (tempo 0h), aumentou em 24h sendo superior a atividade em semente seca (tempo 0h) e 12h e diminuiu em 40h. No potencial osmótico de -1.0 MPa não ocorreu um aumento da atividade de SOD em 12h em relação a semente seca (tempo 0h), diminuiu em 24h e aumentou em 40h de embebição.

A atividade de SOD relatada em sementes de *Lupinus Luteus* L. (Fabaceae) demonstrou aumento nos eixos embrionários até a emergência da radícula, enquanto que nos cotilédones a atividade permaneceu constante (GARNCZARSKA e WOJTYLA, 2008). Segundo esses autores, o aumento da atividade de SOD pode

ter sido estimulado pelo aumento da formação do íon superóxido ao longo da embebição.

Avaliando a atividade de SOD em cotilédones de sementes de *Amburana cearensis* (Fabaceae) submetidas a embebição em água (0,0 MPa) e em PEG à -1.2 e -1.4 MPa, foi notado menor atividade quando sob restrição hídrica à -1.0 e -1.4 MPa. Além disso, verificou-se diferenças entre os dois tratamentos de indução ao estresse hídrico. A atividade enzimática diminuiu em 72 e 96h quando do uso de PEG à -1.4 MPa enquanto que, o potencial de -1.2 MPa, a atividade enzimática aumentou em 96h (PEREIRA, 2014).

Foi notado em raízes e cotilédones de *Stephanomeria virgata* (Asteraceae) que apesar das alterações observadas na atividade das isoenzimas de SOD, o aumento de atividade de uma isoforma parece ser compensado pela diminuição da atividade de outra isoforma, resultando em atividade total da SOD similar para os tratamentos controle e NO (ZERLIN, 2015). Em *Bruguiera parviflora* (Rhizophoraceae), foi notado que os aumentos significativos na atividade das isoenzimas da SOD, associados com outros mecanismos de defesa, induziram a proteção oxidativa e se correlacionaram com a subsequente tolerância dessa espécie à salinidade (PARIDA et al, 2005).

A maior atividade de superóxido dismutase é descrita por estar associada a melhor tolerância das plantas ao estresse abiótico, nesse trabalho foi observado que o genótipo 'BRS PARAGUAÇU' mostrou ter a atividade de SOD mais alta em semente seca que o genótipo 'MPA34', mantendo essa atividade estável durante os tempos de embebição e potenciais osmóticos aplicados em radículas. O que sugere uma melhor capacidade de manter a atividade da enzima superóxido dismutase intensa e constante. O que pode estar relacionado aos efeito de *priming* observado para o genótipo 'BRS PARAGUAÇU' demonstrando responder de forma positiva a ao osmocondicionamento. A atividade de SOD variou dentre os dois genótipos de *Ricinus communis* L., o que pode ser explicado pela grande variabilidade fenotípica e genética observada.

4. CONCLUSÃO

A embebição das sementes dos genótipos 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' obedeceram ao padrão trifásico, porém demonstrando diferenças entre os genótipos, sendo que as sementes de 'BRS PARAGUAÇU' requerem maior absorção de água para atingir a germinação. Sendo que as sementes 'BRS PARAGUAÇU' demonstraram maior atividade de SOD em semente seca e melhor capacidade em manter a atividade superior durante a embebição em água, assim como sob condições de restrição hídrica mais acentuadas. De modo que a atividade de SOD pode estar relacionada à melhor germinabilidade adquirida após o osmocondicionamento resultante do efeito de *priming* no genótipo 'BRS PARAGUAÇU'.

5. REFERÊNCIAS

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. UFV, 2006

ARORA, D.; BHATLAS, S. C. Nitric oxide triggers a concentration-dependent differential modulation of superoxide dismutase (Fe-SOD and Cu/Zn-SOD) activity in sunflower seedling roots and cotyledons as an early and long distance signaling response to NaCl stress. **Plant Signaling & Behavior**, Londres, v.10, n. 10, p. 1-28, 2015.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Physiology and Biochemistry of seed in relation to Germination. Berlin: **Springer Verlag**, v.1, 306p. 1978.

BEWLEY, J. D. BLACK, M. 1994. **Seeds**; physiology of development and germination.

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

BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P.; BRAGA, J. F.; SÁ, M. E. Efeito da disponibilidade hídrica do substrato na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 2, p. 95-102, 1999.

BRAY, C. M. Biochemical processes during the osmopriming of seeds. **Seed development and germination**. New York: **Marcel Dekker**, p. 767-789, 1995.

GARNCZARSKA, M.; WOJTYLA, Ł. Differential response of antioxidative enzymes in embryonic axes and cotyledons of germinating lupine seeds. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 4, p. 427-432, 2008.

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

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

GUPTA, Arnab et al. Seed priming: the aftermath. **Int. J. Agric. Environ. Biotechnol**, v. 1, p. 199-209, 2008.

HADAS, A. Water uptake and germination of leguminous seeds under changing external water potencial in osmotic solution. **Journal Express Botany**, 27: 480-9, 1976.

HEYDECKER, W.; COOLBEAR, P. Seed treatments for improved performancesurvey and attempted prognosis. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.5, n.2, p.353-425, 1977.

KIRAN, C. R.; RAO, D. B.; SIRISHA, N.; RAO, T. R. Impact of Germination on Biochemical and Antioxidant Enzymes of *Ceiba pentandra* (Kapok) Seeds. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 9, p. 1187, 2012.

LEE, Keun Pyo et al. EXECUTER1-and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 24, p. 10270-10275, 2007.

LUZ, R. P. **Caracterização morfofisiológica, molecular e agrônômica de cultivares de mamona**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2012.

MELONI, D. A., OLIVA, M. A., RUIZ, H. A., MARTINEZ, C. A. Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. **Journal of Plant Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 599-612, 2001.

PARIDA, A K; DAS, A B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 60, n. 3, p. 324-349, 2005.

PEREIRA, E. P. L. **Marcadores bioquímicos da atividade antioxidante em sementes de *amburana cearensis* (Fr. Alemão) AC Smith submetidas a estresse hídrico**. 2014.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p

RODRIGUES, H. C. D. A.; CARVALHO, S. P. D.; CARVALHO, A. A. D.; SANTOS, C. E. M. D.; CARVALHO FILHO, J. L. S. D. Correlações genotípicas, fenotípicas e ambientais entre caracteres de mamoneira. **Ciência e Agrotecnologia** . v.34, nº6, p.1390-1395, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SOUZA, G. M.; CARDOSO, V. J. M. 2000. Effects of different environmental stress on seed germination. **Seed Science Technology**, 28(3): 621–630.

TANAKA, Y.; HIBINO, T.; HAYASHI, Y.; TANAKA, A.; KISHITANI, S.; TAKABE, T.; YOKOTA, S. Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondrial Mn-SOD in chloroplasts. *Plant Science*, v. 148, n. 2, p. 131-138, 1999.

TELES, C. A. S. **Aspectos fisiológicos e eventos do ciclo celular em sementes de *Ricinus communis* L. sob restrição hídrica**. 2013. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal da bahia, Salvador, Bahia, 2013.

TSENG, Menq Jiau; LIU, Cheng-Wei; YIU, Jinn-Chin. Enhanced tolerance to sulfur dioxide and salt stress of transgenic Chinese cabbage plants expressing both superoxide dismutase and catalase in chloroplasts. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 10, p. 822-833, 2007.

VAN BREUSEGEM, F.; SLOOTEN, L.; STASSART, J. M.; BOTTERMAN, J.; MOENS, T.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Effects of overproduction of tobacco MnSOD in maize chloroplasts on foliar tolerance to cold and oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 330, p. 71-78, 1999.

ZERLIN, J K. **Mecanismos de proteção de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. contra espécies reativas de nitrogênio e oxigênio**. 2015. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica.

ZUCHI, J.; PANOZZO, L. E.; HEBERLE, E.; ARAUJO, E. F. Curva de embebição e condutividade elétrica em sementes de mamona classificadas por tamanho. **Revista Brasileira de Sementes**, Nota científica, v.34, n°3, p.504-509, 2012.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A variabilidade morfológica das sementes de mamona é bem descrita na literatura, onde o comprimento, largura e espessura são considerados como bons marcadores morfológicos (MILANI, 2008), sendo que as características tamanho e peso das sementes são considerados características relevantes na distinção de melhor potencial fisiológico dentre genótipos (BRUM et al., 2011).

Na busca por melhor compreensão da relação da morfologia entre peso e tamanho das sementes e o melhor potencial fisiológico, foi necessário estabelecer o agrupamento das sementes utilizando os parâmetros morfológicos (comprimento, largura, espessura e volume) e peso de 100 sementes, os quais foram então comparados aos parâmetros fisiológicos (gMAX, U₈₄₁₆, TMG, AAC, PPN, TP, MS). Inicialmente, foi utilizado o teste teste skot knot, o qual possibilitou a distinção de seis grupos em função do comprimento das sementes, nove grupos em função da largura, oito grupos em função da espessura, e nove grupos a partir da relação volume e peso. Para melhor visualização dos grupos pela morfometria e peso das sementes dos genótipos, foi preciso utilizar o método de associação de Wards, o qual demonstrou a formação de três grupos principais de sementes classificados em: sementes pequenas, sementes médias e sementes grandes.

Para comparar os parâmetros morfológicos e peso com os parâmetros fisiológicos foi necessário utilizar a análise de componentes principais (ACP) para unificar os parâmetros. Foi observado nessa análise uma forte relação entre os parâmetros morfométricos e peso analisados, sendo possível reduzir os parâmetros analisados a um valor (componente 1), o qual deteve 96,1% de toda a variação dos resultados.

Uma vez classificadas as sementes dos 19 genótipos em três grupos principais, foi possível verificar que os genótipos com sementes médias apresentaram melhores resultados em termos dos parâmetros de germinabilidade e vigor de plântulas. Concluindo assim, que o tamanho e peso das sementes contribuem para o melhor potencial fisiológico.

Foram então escolhidos dois genótipos contrastantes em termos de vigor, sendo 'MPA34' (maior vigor) pertencente ao grupo de sementes médias e 'BRS

PARAGUAÇU' (menor vigor) pertencente ao grupo de sementes grandes. Ambos apresentaram alta porcentagem de germinação, porém foram distintos quanto ao vigor de sementes e plântulas demonstrado pela diferenças quanto à uniformidade (U_{8416}), tempo médio de germinação (TMG), área abaixo da curva (AAC), e porcentagem de plântulas normais (PPN).

Os genótipos 'MPA34' (maior vigor) e 'BRS PARAGUAÇU' (menor vigor) foram submetidos ao osmocondicionamento diferentes níveis de restrição hídrica (0,0 em água, e de -0.1 a -1,0 MPa) por sete dias e posterior reidratação, quando então foram avaliados os parâmetros fisiológicos (gMAX, U_{8416} , TMG, AAC, PPN, TP, MS). Sequencialmente foi realizada curvas de embebição em potenciais osmóticos e foi estudado a atividade de superóxido dismutase durante a embebição em potenciais osmóticos. Os resultados foram submetidos a análise de regressão linear e foram considerados resultados significativos resultados de P menor que 5%.

O genótipo 'MPA34' (maior vigor) apresentou a tendência a perder a uniformidade (U_{8416}) com a diminuição do potencial osmótico, nos parâmetros (gMAX, TMG, AAC, PPN, TP e MS) não apresentou padrão de regressão linear significativo. O genótipo 'BRS PARAGUAÇU' (menor vigor) após o osmocondicionamento apresentou melhores resultados da germinação (gMAX), uniformidade (U_{8416}), porcentagem de plântulas normais (PPN) e massa seca (MS), demonstrando uma resposta positiva com a diminuição do potencial osmótico (-1,0 MPa).

A atividade de enzimas antioxidantes geralmente está associada a melhor capacidade das plantas em tolerar a estresses abióticos. A superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima na linha de defesa contra estresse oxidativo, sendo responsável por dismutar o radical superóxido a peróxido de hidrogênio, considerada como mentora da tolerância de plantas a estresse abiótico (GILL, S. S et al., 2015). Buscando-se relacionar a resposta bioquímica da atividade de SOD aos parâmetros fisiológicos resultantes do processo de embebição e germinação, realizou-se a determinação da curva de embebição de sementes dos genótipos contrastantes 'MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU' sob diferentes potenciais osmóticos (0.0, -0.2, -0.6, -1.0 MPa). Os genótipos apresentaram perfis de embebição trifásico, germinando ao atingirem a Fase-III em água (0,0 MPa), após 48 e 53h de embebição, respectivamente. Enquanto que as sementes não germinaram após sete dias sob

osmocondicionamento (-0.2, -0.6, -1.0 MPa), mantendo-se na Fase-II em todos os potenciais osmóticos de restrição hídrica testados.

Para estudo da atividade de superóxido dismutase foram escolhidos três pontos durante a embebição das sementes em potenciais osmóticos 0,0 -0.2, -0.6, -1.0 MPa), escolhidos através da embebição das sementes em água (potencial 0,0 MPa), a atividade de superóxido dismutase foi realizada em dois compartimentos (radículas e cotilédones) em semente seca (0h), 12h (Fase-I), em 24h (início da Fase-II) e 40h (final da Fase-II) para os dois genótipos. As fases de germinação em mamona foram descritas por Telles (2013) e Zuchi (2012). Chegaram a conclusão que a Fase-II inicia-se em torno de 24h e 28h respectivamente, o que corrobora com os resultados encontrados para embebição em água (0,0 MPa).

A superexpressão de isoformas de SOD foi capaz de aumentar a tolerância a estresse de seca em arroz (WANG et al., 2005), em trigo foi demonstrado que genótipos possuem respostas distintas ao estresse hídrico estudando enzimas antioxidantes (SOD, POD e CAT)(SHAO et al., 2005). Foi observado no presente estudo que o genótipo 'BRS PARAGUAÇU' apresentou atividade de SOD mais elevada em semente seca que no genótipo 'MPA34', sendo capaz de manter a atividade em níveis elevados e relativamente estáveis durante todos os períodos de embebição e sob todos os potenciais osmóticos testados. É importante ressaltar que a porcentagem de água absorvida na embebição em água (potencial nulo) é superior a porcentagem de absorção de água nos potenciais de restrição hídrica nos tempos (12, 24 e 40h), o que reforça a capacidade do genótipo 'BRS PARAGUAÇU' em manter a atividade de superóxido dismutase intensa e constante nas radículas embrionárias mesmo nos potenciais de restrição hídrica onde a menor absorção de água limita a ativação de eventos metabólicos.

A melhor capacidade de manter a atividade da SOD parece relacionar com os melhores resultados fisiológicos em termos dos parâmetros de germinabilidade e vigor de plântulas do genótipo 'BRS PARAGUAÇU', demonstrando que a SOD pode constituir uma enzima importante para melhor tolerância a restrição hídrica em mamona.

O estresse por déficit hídrico em plantas é descrito por levar o aumento de radicais livres e como consequência o estresse oxidativo. A restrição hídrica afeta a porcentagem de absorção de água das sementes, onde os perfis de metabólitos podem ser afetados em múltiplos níveis, através de diversos mecanismos. Um efeito direto sobre os perfis de metabólitos é através da produção e compostos oxidados através das reações química de metabólitos com ERO. Mesmo nos casos em que as enzimas ou metabólitos envolvidos em uma determinada via não são afetados diretamente pelo aumento de ERO, a atividade da via pode ser modificada através de reguladores resposivos por ERO, tais como fatores de transcrição dependentes de redox. (MØLLER et al, 2007; FARMER E MUELLER, 2013).

Um segundo efeito é através de reações da ERO com enzimas de formas que ou inibem a catálise (por exemplo, a enzima respiratória, aconitase) ou que após a tradução modifica a atividade ou a estabilidade da proteína através de processos tais como carbonilação ou oxidação de tiol (HOLTGREFE et al., 2008; ZAFFAGNINI et al., 2012). outra rota é através de ajustes metabólicos que não necessariamente envolvem direta oxidação de enzimas, mas que resultam do aumento do envolvimento de ERO-dependente nas vias de geração de agente redutor para apoiar o aumento do metabolismo de ROS (NOCTOR, 2006; VALDERRAMA et al., 2006). Essas são algumas das várias maneiras através das quais as ERO podem afetar o metabolismo. DIZENGREMEL et al., 2009). Todos estes tipos de mecanismos, agindo isoladamente ou em interação, podem conduzir a efeitos secundários como níveis alterados de metabólitos, modificar a atividade das enzimas através da transcrição ou mecanismos pós-traducional que ativam sinalização, defesa, ou vias de aclimação. (G. NOCTOR et al., 2015).

A germinação e estabelecimento de plântulas são considerados etapas críticas no crescimento da planta, onde a restrição hídrica implica na diminuição da produção, por modificar vias metabólicas e transcrição de genes e como consequência, levando a perda do vigor. Genótipos de mamona possuem capacidades distintas para tolerar o estresse hídrico, demonstrado pelos resultados dos genótipos ('MPA34' e 'BRS PARAGUAÇU') onde o defesa antioxidante enzimática demonstrada pela enzima superóxido dismutase demonstra estar relacionada a melhor tolerância a estresse hídrico e exercendo grande importância contra o estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

BRUM, B.; LOPES, S. J.; STORCK, L.; DAL'COL LÚCIO, A.; DE OLIVEIRA, P. H.; MILANI, M. Correlações canônicas entre variáveis de semente, plântula, planta e produção de grãos em mamoneira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.3, p.404-411, mar, 2011.

DIZENGREMEL, P., LE THIEC, D., HASENFRATZ-SAUDER, M. P., VAULTIER, M. N., BAGARD, M., & JOLIVET, Y. Metabolic-dependent changes in plant cell redox power after ozone exposure. **Plant Biology**, v. 11, n. s1, p. 35-42, 2009.

FARMER, Edward E.; MUELLER, Martin J. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 429-450, 2013.

GILL, S. S.; ANJUM, N. A.; GILL, R.; YADAV, S.; HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M.; TUTEJA, N. Superoxide dismutase - mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 14, p. 10375-10394, 2015.

HOLTGREFE, S., GOHLKE, J., STARMANN, J., DRUCE, S., KLOCKE, S., ALTMANN, B., ... & SCHEIBE, R. Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. **Physiologia Plantarum**, v. 133, n. 2, p. 211-228, 2008.

MILANI, M. Descritores de mamona utilizados pela Embrapa Algodão. **Embrapa Algodão. Documentos**, 2008.

MØLLER, Ian M.; JENSEN, Poul Erik; HANSSON, Andreas. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 58, p. 459-481, 2007.

NOCTOR, Graham. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. **Plant, Cell & Environment**, v. 29, n. 3, p. 409-425, 2006.

NOCTOR, G; LELARGE-TROUVERIE, C; MHAMDI, A. The metabolomics of oxidative stress. **Phytochemistry**, v. 112, p. 33-53, 2015.

SHAO, H. B., LIANG, Z. S., SHAO, M. A., & WANG, B. C. Changes of anti-oxidative enzymes and membrane peroxidation for soil water deficits among 10 wheat

genotypes at seedling stage. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 42, n. 2, p. 107-113, 2005.

TELES, C. A. S. **Aspectos fisiológicos e eventos do ciclo celular em sementes de *Ricinus communis* L. sob restrição hídrica**. 2013. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal da bahia, Salvador, Bahia, 2013.

VALDERRAMA, R., CORPAS, F. J., CARRERAS, A., GÓMEZ-RODRÍGUEZ, M. V., CHAKI, M., PEDRAJAS, J. R., ... & BARROSO, J. B. The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 29, n. 7, p. 1449-1459, 2006.

WANG, F. Z., WANG, Q. B., KWON, S. Y., KWAK, S. S., & SU, W. A. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 4, p. 465-472, 2005.

ZAFFAGNINI, M., BEDHOMME, M., LEMAIRE, S. D., & TROST, P. The emerging roles of protein glutathionylation in chloroplasts. **Plant science**, v. 185, p. 86-96, 2012.

ZUCHI, J.; PANOZZO, L. E.; HEBERLE, E.; ARAUJO, E. F. Curva de embebição e condutividade elétrica em sementes de mamona classificadas por tamanho. **Revista Brasileira de Sementes**, Nota científica, v.34, n°3, p.504-509, 2012.

ANEXOS

CAPÍTULO II: Efeito do osmocondicionamento na germinação e vigor de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.)

ANEXO I: Análise de variância: Regressão linear aplicada aos parâmetros de germinação e vigor de plântulas (gMAX, U8416, TMG, AAC, PPN, TP e MS) de sementes dos genótipos "MPA34" e "BRS PARAGUAÇU" osmocondicionadas em potenciais osmóticos de 0,0 MPa a -1,0 MPa em polietilenoglicol (PEG) e posterior reidratação em água.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA GERMINAÇÃO - GENÓTIPO "BRS PARAGUAÇU"

Variável analisada: Germinação (Gmax)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|-----------------|------------|------------------------|-----------|-------|--------|
| POTENCIAIS | 6 | 158.857143 | 26.476190 | 5.346 | 0.0017 |
| erro | 21 | 104.000000 | 4.952381 | | |
| Total corrigido | 27 | 262.857143 | | | |
| CV (%) = | 2.28 | | | | |
| Média geral: | 97.4285714 | Número de observações: | | 28 | |

Variável analisada: Uniformidade (U8416)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|-----------------|------------|------------------------|-----------|-------|--------|
| POTENCIAIS | 6 | 371.246636 | 61.874439 | 3.304 | 0.0189 |
| erro | 21 | 393.276975 | 18.727475 | | |
| Total corrigido | 27 | 764.523611 | | | |
| CV (%) = | 31.80 | | | | |
| Média geral: | 13.6082143 | Número de observações: | | 28 | |

Variável analisada: Tempo médio de germinação (TMG)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|-----------------|------------|------------------------|-----------|-------|--------|
| POTENCIAIS | 6 | 384.574793 | 64.095799 | 4.533 | 0.0043 |
| erro | 21 | 296.904250 | 14.138298 | | |
| Total corrigido | 27 | 681.479043 | | | |
| CV (%) = | 8.85 | | | | |
| Média geral: | 42.4764286 | Número de observações: | | 28 | |

Variável analisada: Área abaixo da curva (AAC)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|-----------------|------------|------------------------|-----------|-------|--------|
| POTENCIAIS | 6 | 462.779871 | 77.129979 | 8.327 | 0.0001 |
| erro | 21 | 194.515225 | 9.262630 | | |
| Total corrigido | 27 | 657.295096 | | | |
| CV (%) = | 5.53 | | | | |
| Média geral: | 55.0146429 | Número de observações: | | 28 | |

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PLÂNTULAS - GENÓTIPO ``BRS PARAGUAÇU``

Variável analisada: Porcentagem de plântulas Normais (PPN)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|-----------------|------------|------------------------|------------|-------|--------|
| POTENCIAIS | 6 | 2635.428571 | 439.238095 | 8.478 | 0.0001 |
| erro | 21 | 1088.000000 | 51.809524 | | |
| Total corrigido | 27 | 3723.428571 | | | |
| CV (%) = | 8.26 | | | | |
| Média geral: | 87.1428571 | Número de observações: | | 28 | |

Variável analisada: Tamanho de Plântulas normais (TP)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|-----------------|-----------|------------------------|----------|--------|--------|
| POTENCIAIS | 6 | 0.031294 | 0.005216 | 10.638 | 0.0000 |
| erro | 21 | 0.010296 | 0.000490 | | |
| Total corrigido | 27 | 0.041591 | | | |
| CV (%) = | 10.61 | | | | |
| Média geral: | 0.2086071 | Número de observações: | | 28 | |

Variável analisada: Massa seca de plântulas (MS)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|-----------------|-----------|------------------------|----------|-------|--------|
| POTENCIAIS | 6 | 4.049171 | 0.674862 | 8.090 | 0.0001 |
| erro | 21 | 1.751800 | 0.083419 | | |
| Total corrigido | 27 | 5.800971 | | | |
| CV (%) = | 7.68 | | | | |
| Média geral: | 3.7628571 | Número de observações: | | 28 | |

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA GERMINAÇÃO - GENÓTIPO ``MPA34``

Variável analisada: Germinação (Gmax)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|-----------------|------------|------------------------|-----------|-------|--------|
| POTENCIAIS | 6 | 39.928571 | 6.654762 | 0.566 | 0.7523 |
| erro | 21 | 246.750000 | 11.750000 | | |
| Total corrigido | 27 | 286.678571 | | | |
| CV (%) = | 3.59 | | | | |
| Média geral: | 95.3928571 | Número de observações: | | 28 | |

Variável analisada: Uniformidade (U8416)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------------|------------|------------------------|-----------|-----------|-----------------|
| POTENCIAIS | 6 | 538.467700 | 89.744617 | 4.027 | 0.0077 |
| erro | 21 | 467.992900 | 22.285376 | | |
| Total corrigido | 27 | 1006.460600 | | | |
| CV (%) = | 37.68 | | | | |
| Média geral: | 12.5300000 | Número de observações: | | 28 | |

Variável analisada: Tempo médio de germinação (TMG)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------------|------------|------------------------|-----------|-----------|-----------------|
| POTENCIAIS | 6 | 331.803336 | 55.300556 | 5.138 | 0.0022 |
| erro | 21 | 226.043350 | 10.763969 | | |
| Total corrigido | 27 | 557.846686 | | | |
| CV (%) = | 8.35 | | | | |
| Média geral: | 39.3142857 | Número de observações: | | 28 | |

Variável analisada: Área abaixo da curva (AAC)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------------|------------|------------------------|-----------|-----------|-----------------|
| POTENCIAIS | 6 | 194.967771 | 32.494629 | 3.702 | 0.0114 |
| erro | 21 | 184.313325 | 8.776825 | | |
| Total corrigido | 27 | 379.281096 | | | |
| CV (%) = | 5.28 | | | | |
| Média geral: | 56.1546429 | Número de observações: | | 28 | |

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PLÂNTULAS - GENÓTIPO 'MPA34'

Variável analisada: Porcentagem plântulas normais (PPN)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------------|------------|------------------------|-----------|-----------|-----------------|
| POTENCIAIS | 6 | 459.428571 | 76.571429 | 1.005 | 0.4482 |
| erro | 21 | 1600.000000 | 76.190476 | | |
| Total corrigido | 27 | 2059.428571 | | | |
| CV (%) = | 10.02 | | | | |
| Média geral: | 87.1428571 | Número de observações: | | 28 | |

Variável analisada: Tamanho de plântulas normais (TP)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------------|-----------|------------------------|-----------|-----------|-----------------|
| POTENCIAIS | 6 | 0.022717 | 0.003786 | 5.604 | 0.0013 |
| erro | 21 | 0.014188 | 0.000676 | | |
| Total corrigido | 27 | 0.036905 | | | |
| CV (%) = | 11.56 | | | | |
| Média geral: | 0.2248571 | Número de observações: | | 28 | |

Variável analisada: Massa seca de plântulas (MS)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|-----------------|-----------|------------------------|----------|-------|--------|
| POTENCIAIS | 6 | 3.084343 | 0.514057 | 3.703 | 0.0114 |
| erro | 21 | 2.915325 | 0.138825 | | |
| Total corrigido | 27 | 5.999668 | | | |
| CV (%) = | 9.34 | | | | |
| Média geral: | 3.9889286 | Número de observações: | | 28 | |

CAPÍTULO 3: Atividade de superóxido dismutase em sementes de (*Ricinus communis* L.) sob déficit hídrico

Anexo 2: Análise de variância da atividade de superóxido dismutase em função dos fatores (Genótipo, tempo, potencial osmótico e compartimento).

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA ATIVIDADE DE SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|----------------------|-----------|------------------------|------------|---------|--------|
| GENOTIPOS | 1 | 28.408705 | 28.408705 | 6.972 | 0.0097 |
| TEMPO | 3 | 145.979545 | 48.659848 | 11.942 | 0.0000 |
| POTENCIAL | 4 | 65.220126 | 16.305032 | 4.001 | 0.0049 |
| COMPARTIME | 1 | 799.475625 | 799.475625 | 196.199 | 0.0000 |
| GENOTIPOS*TEMPO | 3 | 66.318738 | 22.106246 | 5.425 | 0.0017 |
| GENOTIPOS*POTENCIAL | 4 | 170.957967 | 42.739492 | 10.489 | 0.0000 |
| GENOTIPOS*COMPARTIME | 1 | 9.961316 | 9.961316 | 2.445 | 0.1214 |
| TEMPO*POTENCIAL | 5 | 79.984387 | 15.996877 | 3.926 | 0.0029 |
| TEMPO*COMPARTIME | 3 | 32.321688 | 10.773896 | 2.644 | 0.0538 |
| POTENCIAL*COMPARTIME | 4 | 124.456885 | 31.114221 | 7.636 | 0.0000 |
| GENOTIPOS*TEMPO*POTE | 5 | 263.153626 | 52.630725 | 12.916 | 0.0000 |
| GENOTIPOS*TEMPO*COMP | 3 | 53.863109 | 17.954370 | 4.406 | 0.0061 |
| GENOTIPOS*POTENCIAL* | 4 | 204.063195 | 51.015799 | 12.520 | 0.0000 |
| TEMPO*POTENCIAL*COMP | 5 | 146.531440 | 29.306288 | 7.192 | 0.0000 |
| GENOTIPOS*TEMPO*POTE | 5 | 302.599595 | 60.519919 | 14.852 | 0.0000 |
| erro | 92 | 374.883383 | 4.074819 | | |
| Total corrigido | 143 | 2868.179331 | | | |
| CV (%) = | 20.51 | | | | |
| Média geral: | 9.8431944 | Número de observações: | | 144 | |