

AVALIAÇÃO DO USO DE ÁCIDO SALICÍLICO EM SEMENTES DE CALÊNDULA
(*Calendula officinalis* L.) SOB DIFERENTES ESTRESSES

PATRÍCIA REINERS CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO USO DE ÁCIDO SALICÍLICO EM SEMENTES DE CALÊNDULA
(*Calendula officinalis* L.) SOB DIFERENTES ESTRESSES**

PATRÍCIA REINERS CARVALHO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Agronomia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador:
Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto

581.7
C837a

Carvalho, Patrícia Reiners
Avaliação do uso de ácido salicílico em
sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.)
sob diferentes estresses. / Patrícia Reiners
Carvalho. -- Presidente Prudente : [s.n.], 2006.
35 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) -
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE,
Presidente Prudente, SP, 2006.

Bibliografia

1. Germinação, Sementes. 2. Estresse
hídrico. 3. Resistência sistêmica adquirida;
Germinação, IVG.

PATRÍCIA REINERS CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO USO DE ÁCIDO SALICÍLICO EM SEMENTES DE CALÊNDULA
(*CALENDULA OFFICINALIS* L.) SOB DIFERENTES ESTRESSES**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Presidente Prudente, 30 de janeiro de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste

Prof. Dr. Dr. Massanori Takaki
Universidade Estadual Paulista – Unesp – Campus de Rio Claro

Prof. Dr. Dr. Gustavo Maia Souza
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Ulysses e Josilda, verdadeiros heróis e exemplos de dedicação e amor.

Aos meus irmãos Carlos e Ulysses que me deram verdadeiros tesouros, meus amados sobrinhos.

Aos meus queridos amigos e amigas, fontes intermináveis de energia positiva.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo, professor, Dr. Nelson Barbosa Machado Neto, pela orientação, pela confiança depositada em mim, dedicação e profissionalismo e pela maneira como me fez ver, que no mundo não existem coisas difíceis, mais sim coisas que conhecemos e as que não conhecemos.

Agradecimentos especiais aos professores Dra Ceci C. Custódio e Dr. Gustavo Maia, pela presença amigável e disposição em contribuir com o aprimoramento do meu trabalho.

Aos meus amigos Paulo Costa e Oscar Andrade, pelos dias de estudos, pelo companheirismo e lealdade.

As companheiras laboratoristas Edna, Márcia e Cristiane, pela constante presença positiva.

A todos os professores que integram o quadro do mestrado em agronomia da UNOESTE, batalhadores pois sei das dificuldades e do empenho de cada um, graças ao sonho e o poder de realização de vocês, hoje este mestrado é uma realidade.

A UNOESTE, pela oportunidade de participar de seu programa de mestrado e utilização de suas instalações

“[...] O homem instruído tem sempre riqueza em si mesmo [...]”

Leonardo da Vinci

CARVALHO, Patricia Reiners. **Avaliação do uso de ácido salicílico em sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.) sob diferentes estresses**. Presidente Prudente: UNOESTE, 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

Orientador: Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto.

RESUMO

A calêndula (*Calendula officinalis* L.) é uma importante planta medicinal e ornamental, e também é usada na culinária, na fabricação de cosméticos e de fitofármacos. As plantas sofrem agressões por agentes bióticos e abióticos e apesar de não apresentarem defesas através de movimentos ágeis, podem ocorrer adaptações e profundas alterações no metabolismo da célula vegetal, entre elas a síntese de proteínas de defesas ativada através de mecanismos complexos. A aplicação exógena ou o estímulo à síntese endógena de ácidos orgânicos como o ácido salicílico pode agir como indutor de proteínas de tolerância aos diferentes estresses, bem como para elevar a atividade de enzimas de desintoxicação celular, especialmente às envolvidas na degradação de radicais ativos oxigenados. O objetivo deste trabalho foi o de se estudar o efeito do ácido salicílico (AS) sobre a germinação e o vigor de sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.) em condições ideais e sob estresse térmico e hídrico. As sementes foram colocadas para germinar em papel embebido em soluções com concentrações crescentes de ácido salicílico (zero, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,1 e 0,2mM); medindo-se as variáveis: porcentagem de germinação (G%); índice de velocidade de germinação (IVG) e germinação à primeira contagem (PC). Ficou constatado através do teste de Tukey que apenas a (%G) foi significativa, sendo que as melhores dosagens detectadas para o percentual de sementes germinadas ficou entre 0,025 e 0,05 mM de ácido salicílico. Três outros experimentos foram feitos, um com água acidulada aos pH respectivos às concentrações de ácido salicílico (6,0; 4,8; 4,2; 3,6 e 3,2), um com diferentes potenciais hídricos induzidos por manitol (0; -0,3; -0,6; -0,9 e -1,2 MPa), e outro com temperaturas (20, 25, 30 e 35°C). Não houve efeito dos tratamentos ácidos sobre a germinação e o IVG de calêndula. A concentração de 0,025mM de AS apresentou-se como superior tanto para %G como para IVG de sementes de Calêndula sob efeito de estresse hídrico. O uso, ou não, de AS não foi eficiente para aliviar o estresse térmico.

Palavras-chave: Resistência Sistêmica Adquirida; Estresse Hídrico; Germinação, IVG.

CARVALHO, Patricia Reiners. **Study the use salicylic acid of marigold seeds (*Calendula officinalis* L.) or stressing conditions.** Presidente Prudente: [s.n], 2006. (Msc. Dissertation).

Adviser: Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto.

ABSTRACT

Marigold (*Calendula officinalis* L.) is an important medicinal and decorative plant also used in the kitchens and in the manufacturing of cosmetic and phytotherapeutic products. Plants are susceptible to biotical and non biotical aggression and independently of not showing agile movements as defence; they could present deep modifications in the cell metabolism as defence protein synthesis activated by single molecules or complex mechanisms. The exogenous application or the synthesis stimulus of organic acids as salicylic, may act as an inductor of tolerance protein to different biotical or non biotical stress increasing the detoxification enzyme activity, specially those ones involved in the degradation of reactive oxygen species. The aim of this work was the study of salicylic acid (SA) over the germination and vigour of marigold seeds (*Calendula officinalis* L.) in ideal or stressing conditions. Seeds were put to germinate in paper wetted with SA (zero, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 and 0.2mM). Germination (G%), first germination counting(PC) and germination velocity index (IVG) were measured. Just germination was significant, and the best doses were 0.025 and 0.05 mM of SA. Three other experiments were done one with acid water, adjusted to the pH of the related SA solutions (6.0; 4.8, 4.2 3.6 and 3.2), one with different water potentials, induced by mannitol (0; -0.3; -0.6; -0.9 and -1.2 MPa) and one with different temperatures(20, 25, 30 e 35°C). pH had no effect over germination and IVG of Marigold seeds, so the effect observed earlier was due to SA. The treatment with 0.025mM of SA increased the G% and IVG of marigold seeds exposed to water deficit. Temperature with or without SA treatment were superior at 20°C than the recommended temperature of 25°C.

Index terms: systemic acquired resistance; water deficit; germination, IVG

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Massa seca de parte aérea e de raiz de calêndula (<i>Callendula officinalis</i>) submetidas a diferentes doses de ácido salicílico.UNOESTE, Presidente Prudente, 2004.....	28
FIGURA 2	Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de calêndula (<i>Callendula officinalis</i>) submetidas a diferentes doses de ácido salicílico.UNOESTE, Presidente Prudente, 2004.....	29
FIGURA 3	Percentagem de Germinação e Primeira contagem de germinação (Pcont) de sementes de calêndula (<i>Callendula officinalis</i>) submetidas a diferentes doses de ácido salicílico.UNOESTE, Presidente Prudente, 2004.....	29
FIGURA 4	Número de folhas (NF) e comprimento de parte aérea e de raízes de plântulas de calêndula (<i>Calendula officinalis</i>) submetidas a diferentes doses de ácido salicílico.UNOESTE, Presidente Prudente, 2004.....	30
FIGURA 5	Percentagem de Germinação e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de plântulas de calêndula (<i>Calendula officinalis</i>) submetidas a diferentes pHs. UNOESTE, Presidente Prudente, 2005.....	30
FIGURA 6	Percentagem de Germinação de plântulas de calêndula (<i>Calendula officinalis</i>) submetidas a diferentes concentrações de ácido salicílico sob estresse hídrico.UNOESTE, Presidente Prudente, 2005.....	31
FIGURA 7	Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de plântulas de calêndula (<i>Calendula officinalis</i>) submetidas à diferentes concentrações de ácido salicílico sob estresse hídrico.UNOESTE, Presidente Prudente, 2005.....	31
FIGURA 8	Percentagem de Germinação de plântulas de calêndula (<i>Calendula officinalis</i>) submetidas a diferentes concentrações de ácido salicílico e temperaturas.UNOESTE, Presidente Prudente, 2005.....	32
FIGURA 9	Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de plântulas de calêndula (<i>Calendula officinalis</i>) submetidas a diferentes concentrações de ácido salicílico e temperaturas. UNOESTE, Presidente Prudente, 2005.....	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
2.1 Caracterização inicial.....	16
2.2 Experimento 1.....	17
2.3 Experimento 2.....	18
2.4 Experimento 3.....	18
2.5 Experimento 4.....	18
4 REULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5 CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
ANEXOS.....	33

USO DE ÁCIDO SALICÍLICO EM CALÊNDULA

**AVALIAÇÃO DO USO DE ÁCIDO SALICÍLICO EM SEMENTES DE
CALÊNDULA (*Calendula officinalis* L.) SOB DIFERENTES ESTRESSES ¹**

PATRICIA REINERS CARVALHO²; NELSON BARBOSA MACHADO NETO³ E CECI
CASTILHO CUSTÓDIO³

4141—

¹ Parte da dissertação de Mestrado do curso de Produção Vegetal da UNOESTE.

² Eng^a Agr^a, Esp., Prof^a Patrícia Reiners Carvalho aluna de Mestrado da UNOESTE. E-mail: patriciareiners@superig.com.br

³ Eng^o Agr^o, Dr., Profs. do Departamento de Biologia Vegetal e Fitossanidade e do mestrado em Produção Vegetal, UNOESTE, Rod. Raposo Tavares Km 572, 19067175, Presidente Prudente - SP,

RESUMO - A calêndula (*Calendula officinalis* L.) é uma importante planta medicinal e ornamental, e também é usada na culinária, na fabricação de cosméticos e de fitofármacos. As plantas sofrem agressões por agentes bióticos e abióticos e apesar de não apresentarem defesas através de movimentos ágeis, podem ocorrer adaptações e profundas alterações no metabolismo da célula vegetal, entre elas a síntese de proteínas de defesas ativada através de mecanismos complexos. A aplicação exógena ou o estímulo à síntese endógena de ácidos orgânicos como o ácido salicílico pode agir como indutor de proteínas de tolerância aos diferentes estresses, bem como para elevar a atividade de enzimas de desintoxicação celular, especialmente às envolvidas na degradação de radicais ativos oxigenados. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do ácido salicílico (AS) sobre a germinação e o vigor de sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.) em condições ideais e sob estresse térmico e hídrico. As sementes foram colocadas para germinar em papel embebido em soluções crescentes de ácido salicílico (zero, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,1 e 0,2mM); medindo-se as variáveis: porcentagem de germinação (G); índice de velocidade de germinação (IVG) e primeira contagem da germinação (PC). Ficou constatado através do teste de Tukey que apenas a (G) foi significativa, sendo que as melhores dosagens detectadas para o percentual de sementes germinadas ficou entre 0,025 e 0,05mM de ácido salicílico. Três outros experimentos foram feitos, um com água acidulada aos pH respectivos às concentrações de ácido salicílico (6,0; 4,8; 4,2; 3,6 e 3,2), um com diferentes potenciais hídricos induzidos por manitol (0; -0,3; -0,6; -0,9 e -1,2MPa), e outro com temperaturas (20, 25, 30 e 35°C). Não houve efeito dos tratamentos ácidos sobre a germinação e o IVG de calêndula. A concentração de 0,025mM de AS apresentou-se como superior tanto para G como para IVG de sementes de calêndula sob efeito de estresse hídrico. O uso, ou não, de AS não foi eficiente para aliviar o estresse térmico.

Termos para indexação: resistência sistêmica adquirida; estresse hídrico; germinação, IVG.

ABSTRACT - Marigold (*Calendula officinalis* L.) is an important medicinal and decorative plant also used in the kitchens and in the manufacturing of cosmetic and phytotherapeutic products. Plants are susceptible to biotical and non biotical aggression and independently of not showing agile movements as defence; they could present deep modifications in the cell metabolism as defence protein synthesis activated by single molecules or complex mechanisms. The exogenous application or the synthesis stimulus of organic acids as salicylic, may act as an inductor of tolerance protein to different biotical or non biotical stress increasing the detoxification enzyme activity, specially those ones involved in the degradation of reactive oxygen species. The aim of this work was the study of salicylic acid (SA) over the germination and vigour of marigold seeds (*Calendula officinalis* L.) in ideal or stressing conditions. Seeds were put to germinate in paper wetted with SA (zero; 0.0125; 0.025; 0.05; 0.1 and 0.2mM). Germination (G), first germination counting (PC) and germination velocity index (IVG) were measured. Just germination was significant, and the best doses were 0.025 and 0.05mM of SA. Three other experiments were done one with acid water, adjusted to the pH of the related SA solutions (6.0; 4.8; 4.2; 3.6 and 3.2), one with different water potentials, induced by mannitol (0; -0.3; -0.6; -0.9 and -1.2MPa) and one with different temperatures(20, 25, 30 e 35°C). pH had no effect over germination and IVG of Marigold seeds, so the effect observed earlier was due to SA. The treatment with 0.025mM of SA increased the G and IVG of marigold seeds exposed to water deficit. Temperature with or without SA treatment were superior at 20°C than the recommended temperature of 25°C.

Index terms: systemic acquired resistance; water deficit; germination, IVG.

INTRODUÇÃO

A calêndula (*Calendula officinalis* L.) pertencente à família Asteraceae, tem sua origem na orla mediterrânea e é importante pelo seu uso como planta medicinal e ornamental. Também é usada na culinária e na fabricação de cosméticos e fitoterápicos. A busca crescente pelo desenvolvimento sustentável e melhorias na qualidade de vida também envolvem o despertar de tecnologias para produção de espécies vegetais cada vez em maiores quantidades e menores agressões ao meio, com essa conscientização cada vez maior da população no tocante a conservação do meio ambiente, a utilização desenfreada de agroquímicos começa a ser repensada e as buscas por novas tecnologias voltadas à proteção das plantas contra os agentes bióticos e abióticos ganha um novo impulso. Nesse contexto de exploração sustentável e da proteção de plantas, além de novos produtos fitoterápicos e até homeopatia vegetal, podemos inserir a indução de resistência vegetal, que pode ser vista como de ocorrência natural, podendo ser induzida por fatores bióticos ou abióticos, os quais precisam ser decifrados para usá-los a favor de produtos eficientes e ambientalmente corretos na busca de maior produtividade com qualidade (Gazim, 2005).

As plantas, assim como todos os outros seres vivos, sofrem frequentemente agressões causadas por agentes bióticos e abióticos. Apesar dos vegetais não apresentarem defesas através de movimentos ágeis, hoje sabemos que podem ocorrer adaptações e profundas alterações no metabolismo da célula vegetal, entre elas a síntese de proteínas de defesas, expressa por genes específicos, ativados através de mecanismos complexos (Busam et al., 1997; Pinheiro et al., 1999). Tais proteínas exercem vários papéis na resistência e sobrevivência da planta, de forma direta (combatendo o agente agressor) ou indireta (mantendo a estrutura e as funções celulares). Esse elaborado sistema de defesa e adaptação das plantas pode atuar de três formas: i) Resistência constitutiva, inespecífica ou estática,

dependendo do pesquisador que a elas se refere, ocorre mesmo sem a ação de agentes agressores, recebida por herança genética, tornando as plantas imunes à determinados patógenos (Goto, 1990; Sticher et al., 1997); ii). Resistência localizada, ativada no ponto onde ocorre à agressão, e iii) Resistência Sistêmica Adquirida (SAR - Systemic Acquired Resistance) que protege a planta contra ataques subseqüentes.

SAR e Indução de Resistência Sistêmica (ISR – Induced Systemic Resistance), são fenômenos distintos (Sticher et al., 1997) mas fenotípicamente semelhantes em que plantas, após exposição a um agente indutor, têm seus mecanismos de defesa ativados não apenas no sítio de indução como também em outros locais dele distantes, de forma mais ou menos generalizada. Para autoridades mundialmente reconhecidas na área de indução de resistência em plantas (Métraux et al. 1991; Sticher et al., 1997) parece ser consensual que SAR e ISR são fenômenos distintos quanto à forma através da qual são induzidos e desencadeados e governados por mecanismos bioquímicos diferentes, mas bastante semelhantes no que concerne ao resultado fenotípico final que se expressa sob forma de indução de resistência, resistência essa com caráter de sistemicidade.

Embora com pequenas discordâncias (Métraux et al., 1991) têm assumido que SAR envolve o acúmulo de PRPs (Proteínas Relacionadas com Patogênese) como mecanismos induzidos de defesa da planta. Sua indução é salicilato-dependente (White, 1979; Métraux et al., 1991; Palva et al., 1994; López-López et al., 1995; Andarwulan e Shetty, 1999) podendo resultar em alterações na planta que sofreu indução e geralmente é induzida por patógenos ou ativadores químicos. No caso de ISR, não há acúmulo de PRPs, a planta que sofreu indução não exibe alterações, o agente indutor é usualmente um microrganismo não-patogênico e sua indução não é salicilato dependente, parecendo haver uma outra rota de sinalização mais associada a jasmonatos e etileno (Sticher et al., 1997).

Radicais livres são formados sob condições de estresse oxidativo bem como pelas reações normais da cadeia de transporte de elétrons, mas que são altamente reguladas (Chaoui et al., 1997; Mazhoudi et al., 1997; Greggains et al., 2000), todavia esta regulação pode ser perdida se o estresse for mais severo aumentando consideravelmente a produção de radicais livres que podem levar a uma cascata de eventos que, começando com a peroxidação de lipídeos, avançam para degradação de membranas e para morte celular (Greggains et al., 2000). De acordo com Foyer et al. (1997) o aumento nos oxidantes celulares pode levar a super expressão de genes de enzimas de desintoxicação como as superóxido dismutases (SOD) (Giannopolitis e Ries, 1977), catalase (CAT), peroxidase (PRX) e enzimas do ciclo ascorbato-glutationa (Sung e Jeng, 1994; Bailly et al, 1998) como parte de uma estratégia requerida para superar o estresse oxidativo (Foyer et al., 1997).

Uma destas moléculas é o H_2O_2 que possui diversas funções dentro da célula, desde a produção de radicais livres até lignificação e produção de compostos fenólicos, bem como atuando como gatilho para as respostas SAR (Hammerschmidt e Kuc, 1982; Siegel, 1993; Hammerschmidt e Kuc, 1995; Benhamou e Nicole, 1999; Jung et al., 2000; McCue et al., 2000) onde o ácido salicílico pode ser responsável por disparar a resposta SAR inibindo peroxidases específicas.

O termo elicitador biológico, usualmente se refere a macromoléculas, originadas tanto das plantas, como dos patógenos, as quais são capazes de estimular as respostas das plantas a patógenos. Uma ampla gama de compostos, incluindo oligossacarídeos, glicoproteínas e peptídeos, pode mediar a indução das reações de defesa nas plantas (Jung et al., 2000, Kúc, 2000; Benhamou e Nicole, 1999). De forma análoga, a resistência ao frio ou aos choques de calor podem ser aumentados por elevação na concentração de compostos fenólicos (Rivero et al., 2001) ou por alguns aminoácidos envolvidos na síntese de fenólicos (Machado Neto et al., 2004b)

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito que o ácido salicílico tem sobre a germinação e o vigor de sementes de calêndula em condições de estresse hídrico e térmico.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes da (UNOESTE) Universidade do Oeste Paulista, em Presidente Prudente (SP), no período de outubro de 2002 a agosto de 2005.

Foram utilizadas sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L). Após o recebimento das sementes compradas em São Paulo e importadas dos Estados Unidos, as sementes foram homogeneizadas e caracterizadas inicialmente através da determinação do grau de umidade, massa de 100 sementes, teste de germinação, classificação de vigor, comprimento de hipocótilo e de raiz, massa seca de parte aérea e de raiz.

CARACTERIZAÇÃO INICIAL

MASSA DE 100 SEMENTES: Foi determinada usando-se 8 repetições de 100 sementes por lote (Brasil, 1992).

TESTE DE GERMINAÇÃO: conduziu-se com quatro repetições de 25 sementes por tratamento, em duas folhas de papel para germinação (*germitest*), acondicionadas em gerbox acrílico umedecidas com 12 mL de água e borrifadas com água a cada dois dias, colocados em germinador tipo ‘Mangelsdorf’ a 25°C , e fotoperíodo de oito horas de luz e dezesseis horas de escuro (Brasil, 1992). As contagens de germinação foram feitas após o terceiro dia da semeadura até os 21 dias e a percentagem de germinação foi calculada levando-se em consideração as plântulas normais (Brasil, 1992).

Experimento 1

Foi preparada uma solução mãe de ácido salicílico (peso molecular de $138,12 \text{ g.mol}^{-1}$) de $0,2\text{mM}$ e através de diluições sucessivas em água destilada, foram atingidas as concentrações $0,1$; $0,05$; $0,025$ e $0,0125\text{mM}$, que foram utilizadas em todos os experimentos.

As sementes foram acondicionadas em embalagens de acrílico (gerbox), sobre duas folhas de papel para germinação (*germitest*) e umedecidas com 12mL das soluções de ácido salicílico nas doses de $0,0$; $0,0125$; $0,025$; $0,05$; $0,1$ e $0,2 \text{ mM}$ e colocadas no germinador tipo ‘Mangelsdorf’ à temperatura de 25°C , com fotoperíodo de oito horas de luz e dezesseis horas de escuro (Brasil, 1992). As contagens de germinação foram feitas após o terceiro dia da semeadura até os 21 dias e a percentagem de germinação foi calculada levando-se em consideração as plântulas normais (Brasil, 1992). Nos 21 primeiros dias após o início do surgimento das plântulas, foi avaliado o índice de velocidade de germinação. Considerou-se como germinada, uma plântula normal com, no mínimo, dois cm de altura. Para o cálculo foi utilizada a fórmula citada por Nakagawa (1999):

$$\text{IVG} = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$$
 onde; IVG = índice de velocidade de germinação, $G_{1..n}$ é o número de sementes germinadas no dia n , $N_{1..n}$ é o dia em que é efetuada a leitura da germinação.

Comprimento de hipocótilo e de raiz, massa seca de parte aérea e de raiz: A avaliação de comprimento de hipocótilo e raiz e de massa seca de parte aérea e raiz foram conduzidas através de quatro repetições de 25 sementes por lote semeadas em quatro repetições por tratamento, acondicionadas em gerbox com duas folhas de papel para germinação (*germitest*) e umedecidas com 12mL da solução com os tratamentos $0,0$; $0,0125$; $0,025$; $0,05$; $0,1$ e $0,2\text{mM}$ de AS e colocados para germinar em germinador tipo ‘Mangelsdorf’ à 25°C . Ao sétimo dia as plântulas normais foram avaliadas medindo-se o comprimento do hipocótilo e da raiz, a massa seca da parte aérea (sem os cotilédones) e a massa seca da raiz (Nakagawa, 1999).

Experimento 2

O pH das amostras de AS nas concentrações de zero, 0,0125, 0,025, 0,05 e 0,1mM foi aferido em pHmetro e com base nestes valores foram preparadas soluções de ácido clorídrico (HCL - $36,47\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) até os mesmos níveis de pH das amostras de AS (6,0; 4,8; 4,2; 3,6 e 3,2). As sementes de calêndula foram acondicionadas em gerbox, sobre duas folhas de papel para germinação (*germitest*) e umedecidas com 12mL das respectivas soluções de ácido clorídrico e colocadas para germinar a 25°C germinadores tipo ‘Mangelsdorf’ com fotoperíodo de oito horas de luz e dezesseis horas de escuro (Brasil, 1992). As contagens de germinação foram feitas após o terceiro dia da sementeira até os 21 dias e a percentagem de germinação foi calculada levando-se em consideração as plântulas normais (Brasil, 1992). Foram medidas as variáveis: percentagem de germinação (G); índice de velocidade de germinação (IVG) e primeira contagem da germinação (PC).

Experimento 3

As sementes foram acondicionadas em embalagens de acrílico (gerbox), sobre duas folhas de papel para germinação (*germitest*) e umedecidas com 12mL das soluções de ácido salicílico nas doses de 0,0; 0,025 e 0,05mM e colocadas para germinar em câmaras tipo ‘Mangelsdorf’ com fotoperíodo de oito horas de luz e dezesseis horas de escuro (Brasil, 1992) às temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C. As contagens de germinação foram feitas após o terceiro dia da sementeira até os 21 dias e a percentagem de germinação foi calculada levando-se em consideração as plântulas normais (Brasil, 1992). Foram medidas as variáveis: percentagem de germinação (G); índice de velocidade de germinação (IVG) e primeira contagem da germinação (PC).

Experimento 4

As sementes foram pré-condicionadas em soluções de ácido salicílico nas doses de 0,0; 0,025 e 0,05mM e colocadas para secar ao ar. Ao atingirem a umidade inicial, foram colocadas para germinar em quatro repetições por tratamento com 25 sementes cada, em

câmaras tipo ‘Mangelsdorf’ com fotoperíodo de oito horas de luz e dezesseis horas de escuro (Brasil, 1992), em diferentes potenciais de água (0; -0,3; -0,6; -0,9 e -1,2 MPa) induzidas por diferentes concentrações de manitol conforme Machado Neto et al. (2004a). As contagens de germinação foram feitas após o terceiro dia da semeadura até os 21 dias, separando-se as plântulas que obtinham pelo menos dois centímetros de raiz e a percentagem de germinação foi calculada levando-se em consideração as plântulas normais (Brasil,1992) e para a primeira contagem de germinação serão consideradas as plântulas normais obtidas aos 3 dias após a semeadura e que tenha obtido pelo menos dois centímetros de comprimento. Foram medidas as variáveis: percentagem de germinação (G); índice de velocidade de germinação (IVG) e primeira contagem da germinação (PC).

Análise dos resultados

Os experimentos foram conduzidos como inteiramente casualizados e os resultados de percentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e primeira contagem de germinação foram transformados em arc seno $(X/100)^{0,5}$, o comprimento do hipocótilo e raiz, e a massa seca da parte aérea e de raiz não foram transformados. Os dados foram analisados estatisticamente com a ajuda do software SISVAR, usando o teste F para análise de variância, o teste Tukey a 5% para a comparação múltipla de médias. Os dados de concentração foram analisados como regressão polinomial. Os resultados de determinação da massa de 100 sementes e de grau de umidade não foram analisados estatisticamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos com diferentes dosagens de ácido salicílico, Figura 1, não obtiveram diferenças significativas no tocante à massa seca da parte aérea e da raiz das plântulas. Apesar dos melhores índices de velocidade de germinação estarem nas dosagens entre 0,025 e

0,05mM estatisticamente este fato não obteve valores significativos, ficando clara a diminuição da velocidade da germinação das sementes de calêndula a partir dessas dosagens de ácido salicílico, apresentando altos valores significativos entre os devidos tratamentos, observando que o AS pode induzir a resistência sistêmica adquirida de plantas, principalmente sob efeito de algum tipo de estresse. Na Figura ,1 as sementes de calêndula se encontravam em condições ideais de temperatura e calor, embora o efeito fitotóxico do AS em muitas culturas deva ser considerado na Figura 2, notando-se que o AS quando não utilizado simultaneamente a um efeito estressante, não apresentou melhoras significativas na velocidade de germinação, mas a partir de uma determinada dose houve redução da velocidade de germinação.

Apesar dos testes de percentagem de germinação e primeira contagem das sementes terem tendências parecidas, de acordo com a Figura 3 analisada, não ocorreu diferenças significativas estatisticamente na primeira contagem das sementes, talvez devido ao fato da plântula ainda não ter tido tempo hábil de resposta ao AS, no caso da hipótese deste estar funcionando como um indutor da SAR, observa-se ainda que a percentagem de germinação foi significativa, já que a mesma é feita com a somatória de 21 dias no germinador, estas provavelmente obtiveram tempo para que o AS pudesse agir nas plântulas e assim ativar seu sistema de defesa, sendo assim, as melhores dosagens detectadas para o percentual de sementes de calêndula germinadas ficou entre 0,025 e 0,05mM de ácido salicílico, em condições ideais de temperatura e umidade.

De acordo com a Figura 4 observamos que no parâmetro quantitativo de número de folhas, não obtivemos valores significativos entre os tratamentos com AS, e também não foram obtidos valores significativos para os parâmetros de comprimento da parte aérea e comprimento da raiz de plântulas de calêndula, como estes testes foram efetuados ao sétimo dia da germinação, talvez as proteínas de tolerância ainda não estivessem atuando, sendo o

SAR um mecanismo de defesa acionado por indutores, esse tipo de resistência necessita de um certo tempo para obter respostas.

Um meio com baixo pH pode estimular a síntese fenólica e aumentar a rigidez do tecido através de lignificação. A estimulação da síntese fenólica, através de baixo pH, suporta a hipótese de que o crescimento e alongação de células, induzida por acidez, pode ser regulada através da via das pentoses fosfato. Esta via pode estar ligada à estimulação do metabolismo de prolina, em resposta ao meio ácido ou aplicação de ácido salicílico, baseada em concomitante estimulação de glucose-6-fosfato-desidrogenase e aumento do conteúdo de prolina de acordo com McCue et al.(2000) e Andarwulan e Shetty (1999). Na Figura 5, foi confirmado que as diferenças de acidez não alteram as avaliações de percentual de germinação e IVG, sendo assim, pouco provável essa possibilidade. Fortalecendo a possibilidade do efeito do AS como indutor de SAR em sementes de calêndula.

Várias formas de combate ao estresse são citadas, entre elas a aplicação exógena ou estímulo à síntese endógena dos ácidos orgânicos, salicílico, ascórbico e cítrico, sendo que destes o primeiro pode agir como indutor de proteínas de tolerância ao estresse (SAR) segundo McCue et al. (2000). De acordo com as Figuras 6 e 7, os tratamentos com AS nas dosagens de 0,025mM obtiveram melhora significativa tanto no percentual de germinação como no IVG de sementes de calêndula sob efeito de estresse hídrico. Isto pode ser devido à resposta das sementes ao AS, que poderia ter induzido proteínas SAR fazendo com que as sementes tivessem uma resposta superior à germinação em água.

Como observado nas Figuras 8 e 9, tanto no percentual de germinação de sementes como o IVG de plântulas de calêndula reagiram positivamente sob efeito de estresse térmico a 35°C, quando submetidas às dosagens de 0,025 e 0,05mM de AS, comprovando assim o efeito do AS em condições de estresse térmico, e mesmo em condições ideais de temperatura

(25°C), observou-se melhora significativa com a dosagem de 0,025mM de AS (Takaki e Rosim, 2000).

CONCLUSÃO

O ácido salicílico na dosagem de 0,025mM interferiu positivamente na percentagem de germinação e no índice de velocidade de germinação de sementes da calêndula (*Calendula officinalis*) sob efeito de estresse hídrico e térmico.

REFERÊNCIAS

ANDARWULAN, N.; SHETTY, K. Improvement of pea (*Pisum sativum*) seed vigour response by fish protein hydrolysates in combination with acetyl salicylic acid. **Process Biochemistry**, Oxford, v.35, p.159-165, 1999.

BAILLY, C., BENAMAR, A., CORBINEAU, F., CÔME, D. Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. **Physiologia Plantarum**, Lund, v.104, p.626-652, 1998.

BENHAMOU, N.; NICOLE, M. Cell biology of plant immunization against microbial infection: the potential of induced resistance in controlling plant diseases. **Plant Physiology and Biochemistry**, Oxford, v.37, n.10, p.703-719, 1999

BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília:SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BUSAM, G.; KASSEMAYER, H.-H.; MATTERN, U. Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators of fungal challenge. **Plant Physiology**, Rockville, v.115, p.1029-1038, 1997.

CHAOUI, A.; MAZHOUDI, S.; GHORBAL, M.H.; EL FERZANI, E. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzymes activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, Madison, v.127, p.139-147, 1997.

FOYER, C.H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J.F.; SCOTT, I.M. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. **Physiologia Plantarum**, Lund, v.100, p.241-254, 1997.

GAZIM, Z.C. **Identificação e determinação dos constituintes químicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/MS), avaliação da atividade antimicrobiana e aspectos agrônômicos do óleo essencial de Calêndula (*Calendula officinalis* L. Asteraceae)**. 2005. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmaceuticas) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá 2005.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. 1. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.59, p.309-314, 1977.

GOTO, M. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathogens**. San Diego: Academic Press, 1990. 342p.

GREGGAINS, V.; FINCH-SAVAGE, W.E.; QUICK, W.P.; ATHERTON, N.M. Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. **New Phytologist**, Lancaster, v.148, p.267-276, 2000..

HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. **Induced Resistance to Disease in Plants**. Boston: Kluwer Academic Pub., 1995, 182 p.

HAMMERSCHMIDT, R., J. KUC. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiology of Plant Pathology**, Berlin, v.20, p.61-71., 1982.

JUNG, S.; KIM, J.S.; CHO, K.Y.; TAE, G.S.; KANG, B.G. Antioxidant responses of cucumber to photoinhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PPFs. **Plant Science**, Madison, v.153, p.145-154, 2000.

KÚC, J. Development and future direction of induced systemic resistance in plants. **Crop protection**, Oxford, v.19, p.859-861, 2000.

LÓPEZ-LÓPEZ, M.J.; LIÉBANA, E.; MARCILLA, P.; BELTRÁ, R. Resistance induced in potato tubers by treatment with acetylsalicylic acid to soft rot produced by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Journal of Phytopathology**, Gottingen, v.143, p.719-724, 1995.

MACHADO NETO, N. B.; SATURNINO, S. M., BOMFIM, D. C.; CUSTÓDIO, C.C. Water stress induced by mannitol and sodium chloride in soybean cultivars. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, n. 4, p. 521-529, 2004a.

MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C., GATTI, A. B., PRIOLLI, M.R. e CARDOSO, V. J. M. Proline: use as an indicator of temperature stress in bean seeds. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.4, p.330-337, 2004b.

MAZHOUDI, S.; CHAOUI, A.; GHORBAL, M.H.; EL FERZANI, E. Response of antioxidant enzymes excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Plant Science**, Madison, v.127, p.129-137, 1997.

McCUE, P.; ZHENG, Z.; PINKHAM, J.; SHETTY, K. A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. **Process Biochemistry**, Oxford, v.35, p.603-613, 2000.

MÉTRAUX, J. P.; AHL GOY, P.; STAUB, T.; SPELCH, J.; STEINEMANN, A.; RYALS, J.; WARD, E. Induced resistance in cucumber in response to 2,6-dichloroisonicotinic acid and pathogens. In: HENNECKE, H.; VERMA, D.P.S. (Eds). **Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions**. Dordrecht: Kluwer Academic Pub., 1991. p.432-439.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B **Vigor de sementes: conceitos e testes**. ABRATES. Londrina. 1999. pp.2-1 - 2-24.

PALVA, T.K.; HURTIG, M.; DAINDRENAN, P.; PALVA E.T. Salicylic acid induced resistance to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v.7, p.356-363, 1994.

PINHEIRO, M. M.; SANDRONI, M.; LUMMERZHEIM, M.; OLIVEIRA, D.E. A defesa das plantas contra as doenças. **Revista Ciência Hoje**, São Paulo, v.147, n.1, p. 25-31, 1999.

RIVERO, R.M.; RUIZ, J.M.; GARCIA, P.C.; LÓPEZ-LEFEBRE, E.S.; ROMERO, L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**, Madison, v.160, p.315-321, 2001.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases: an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, Oxford, v.12, p.303-312, 1993.

STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Gainesville, v.35, p.235-270, 1997.

SUNG, J.M.; JENG, T.L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. **Physiologia Plantarum**, Lund, v.91, p.51-55, 1994.

TAKAKI, M.; ROSIM, R.E. Aspirin increases tolerance to high temperature in seeds of *Raphanus sativus* L. cv Early Scarlet Globe. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.28, p.179-183, 2000.

WHITE, R.F. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. **Virology**, Oxford, v. 99, p.420-412, 1979.

FIGURAS

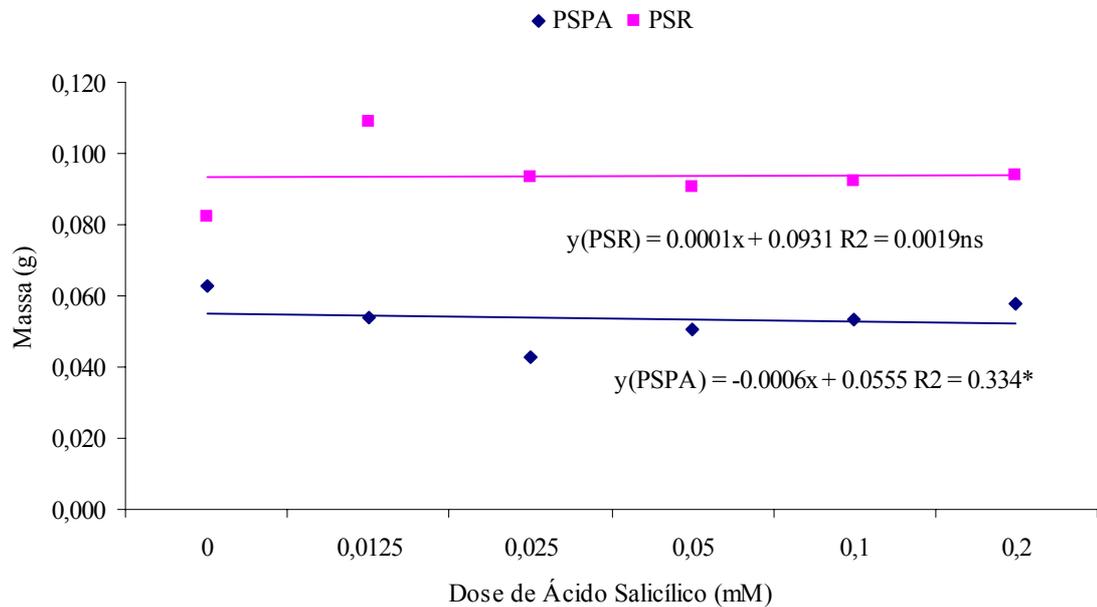


FIGURA 1. Massa seca de parte aérea e de raiz de calêndula (*Callendula officinalis*) submetidas a diferentes doses de ácido salicílico. UNOESTE, Presidente Prudente, 2004.

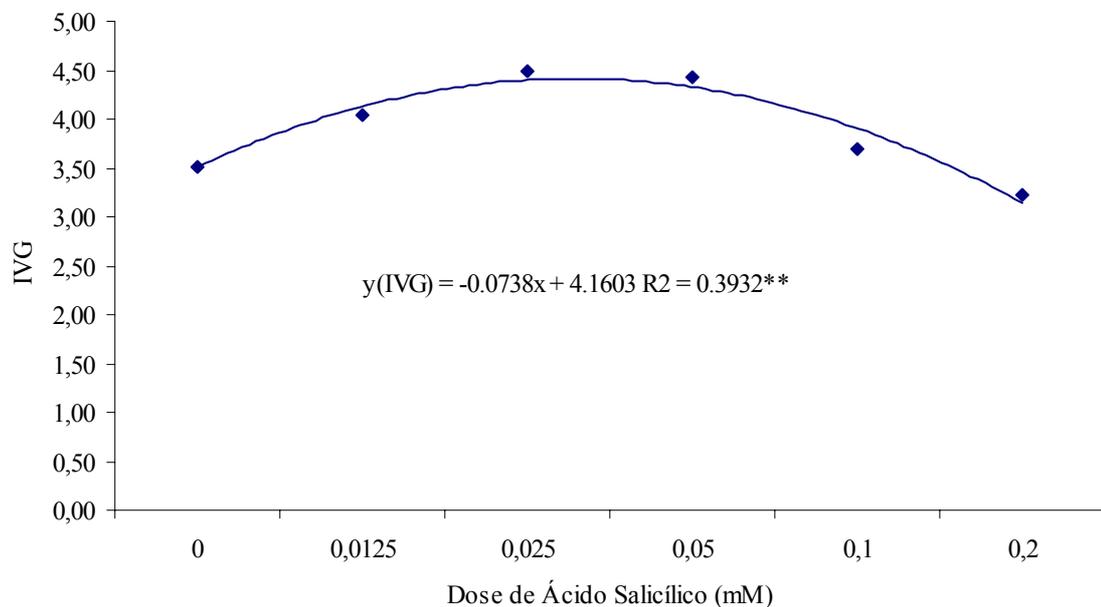


FIGURA 2. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de calêndula (*Callendula officinalis*) submetidas a diferentes doses de ácido salicílico. UNOESTE, Presidente Prudente, 2004.

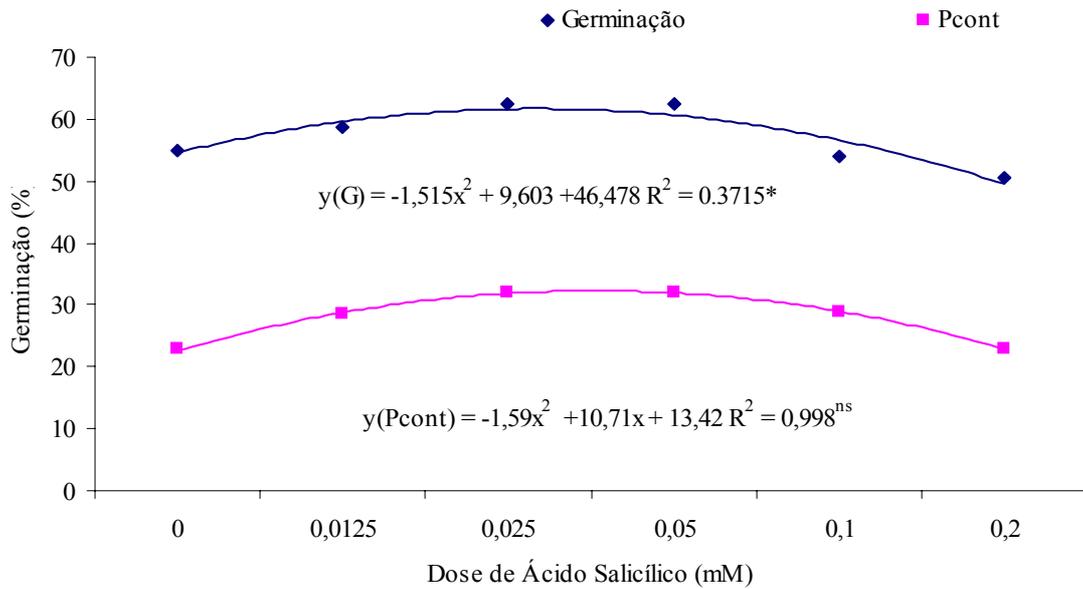


FIGURA 3. Percentagem de Germinação e Primeira contagem de germinação (Pcont) de sementes de calêndula (*Callendula officinalis*) submetidas a diferentes doses de ácido salicílico. UNOESTE, Presidente Prudente, 2004.

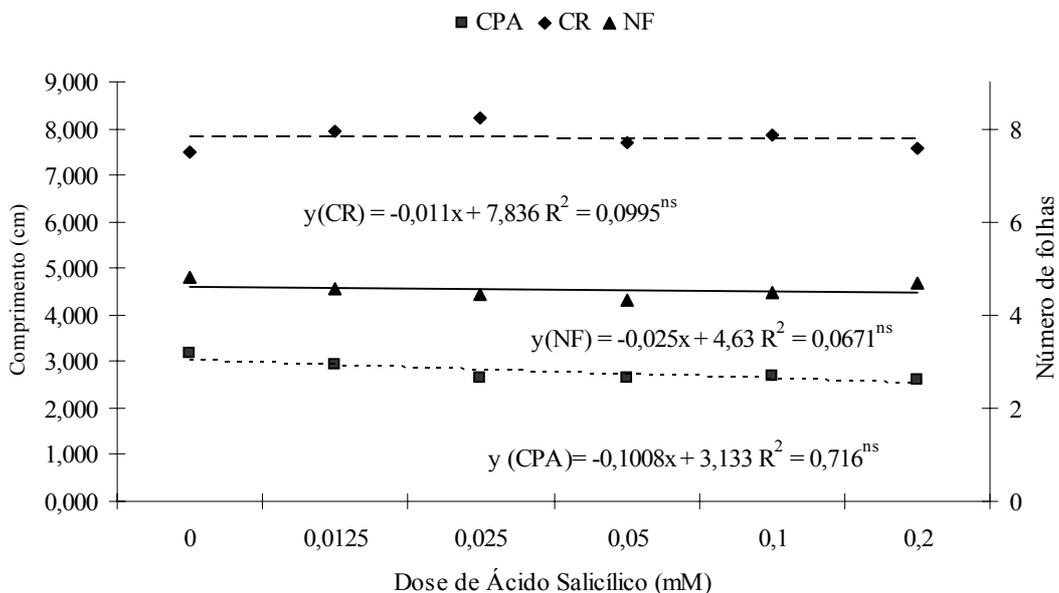
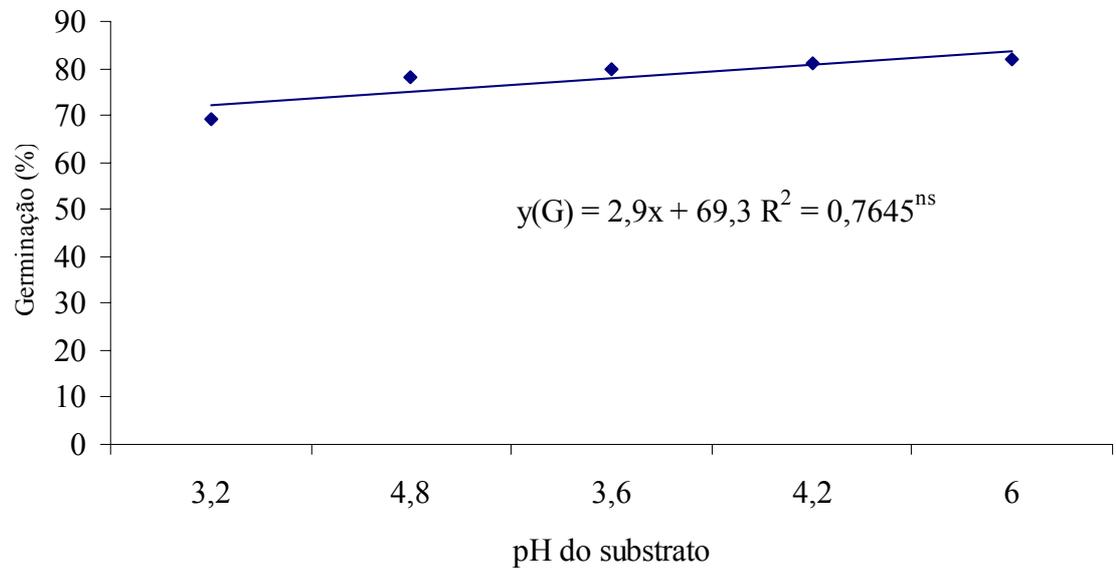
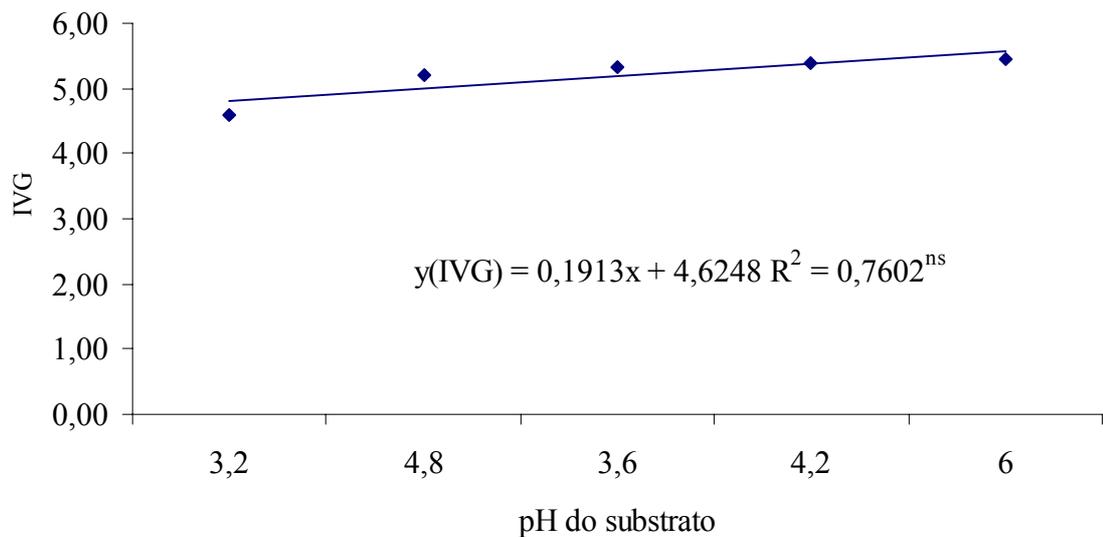


FIGURA 4. Número de folhas (NF) e comprimento de parte aérea e de raízes de plântulas de calêndula (*Calendula officinalis*) submetidas a diferentes doses de ácido salicílico. UNOESTE, Presidente Prudente, 2004.



A



B

FIGURA 5. Percentagem de Germinação e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de plântulas de calêndula (*Calendula officinalis*) submetidas a diferentes pHs. UNOESTE, Presidente Prudente, 2005.

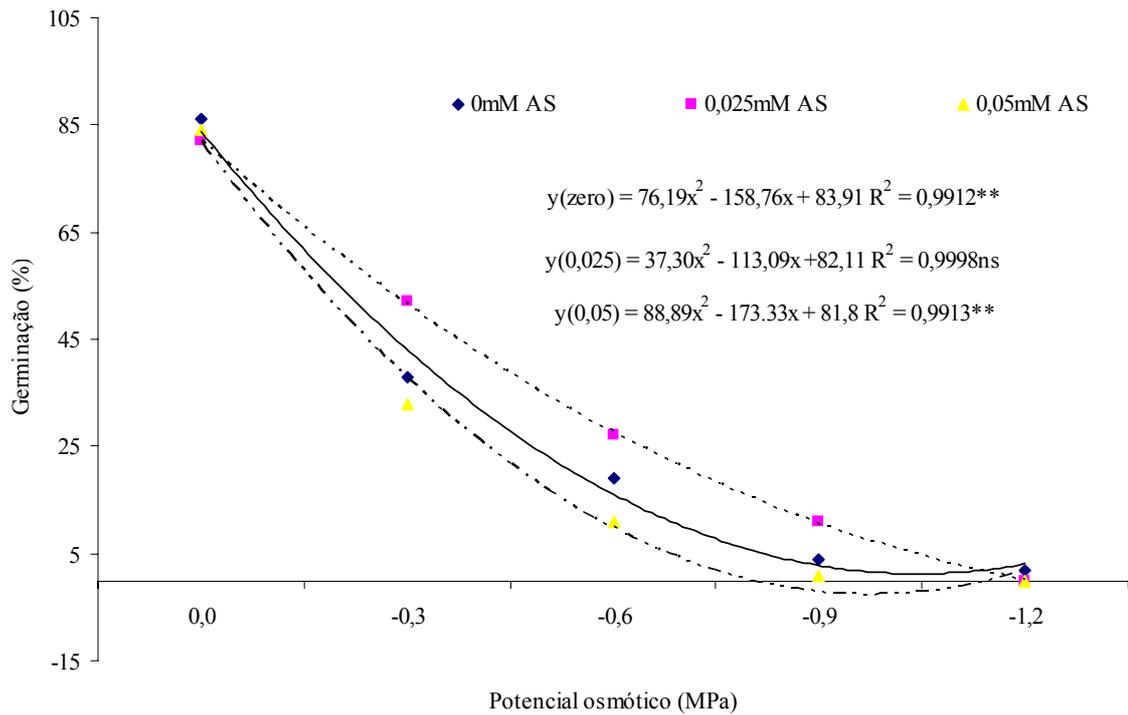


FIGURA 6. Percentagem de Germinação de plântulas de calêndula (*Calendula officinalis*) submetidas a diferentes concentrações de ácido salicílico sob estresse hídrico. UNOESTE, Presidente Prudente, 2005.

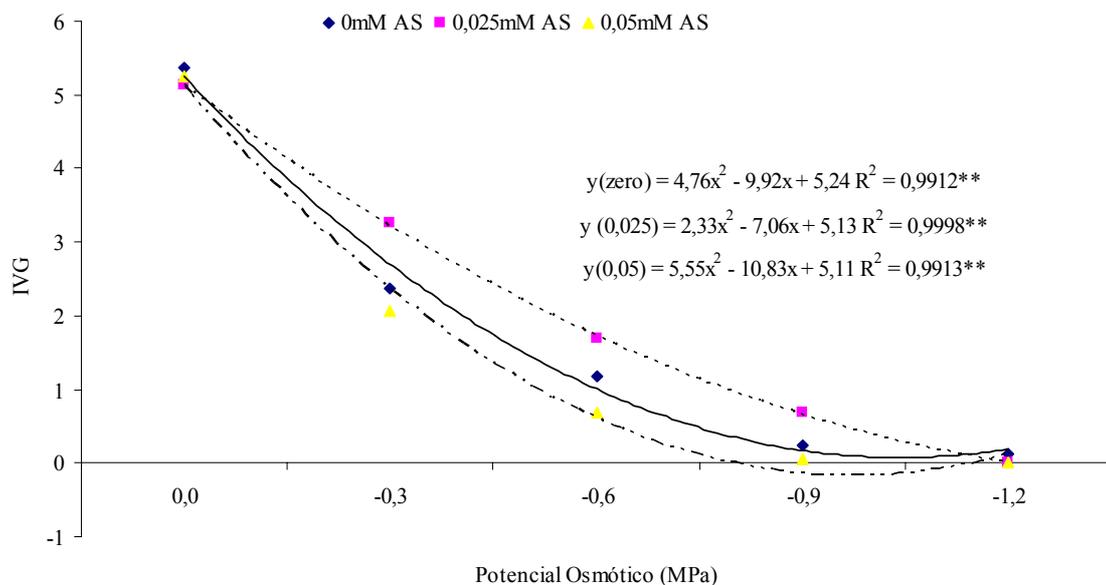


FIGURA 7. Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de plântulas de calêndula (*Calendula officinalis*) submetidas à diferentes concentrações de ácido salicílico sob estresse hídrico. UNOESTE, Presidente Prudente, 2005.

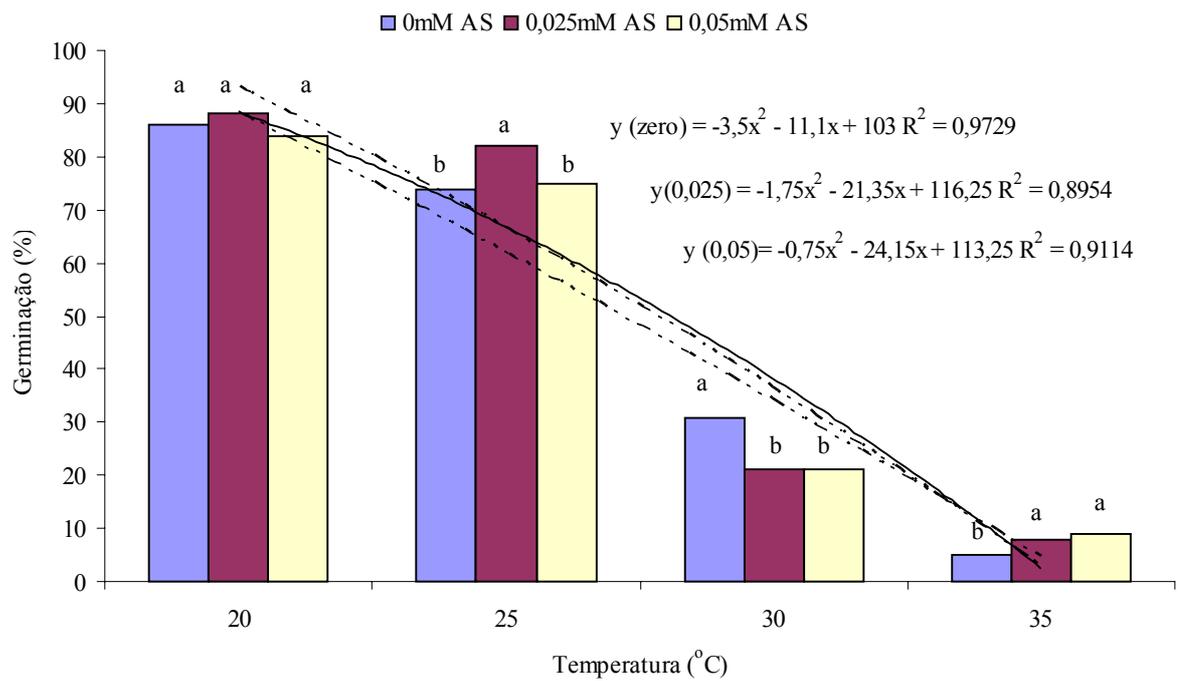


FIGURA 8. Percentagem de Germinação de plântulas de calêndula (*Calendula officinalis*) submetidas a diferentes concentrações de ácido salicílico e temperaturas. UNOESTE, Presidente Prudente, 2005.

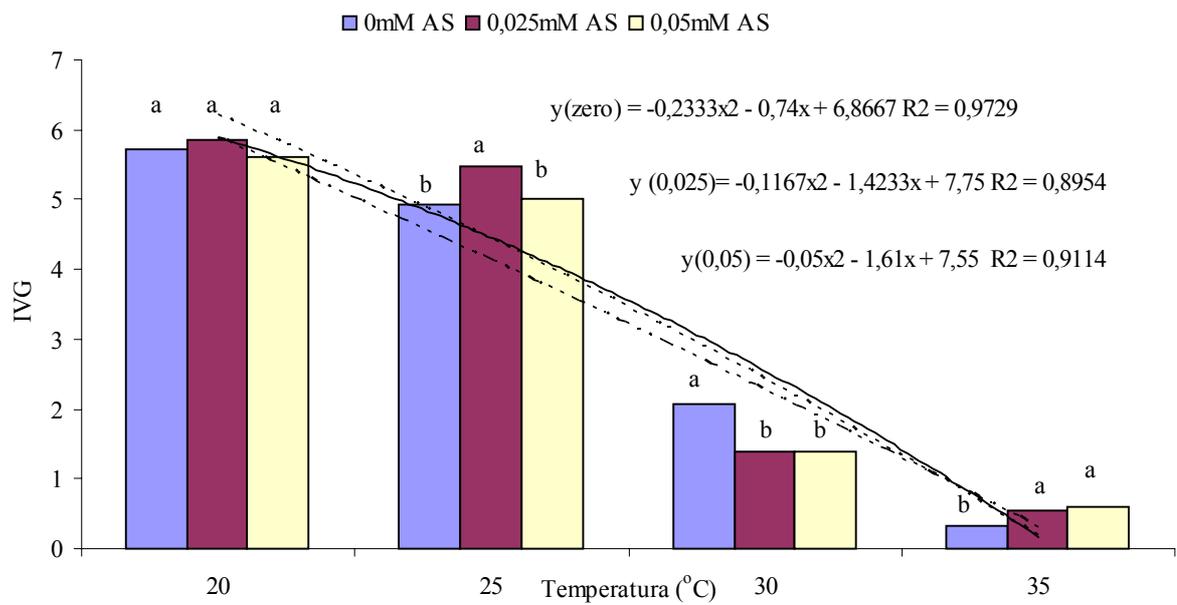


FIGURA 9. Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de plântulas de calêndula (*Calendula officinalis*) submetidas a diferentes concentrações de ácido salicílico e temperaturas. UNOESTE, Presidente Prudente, 2005.

5. ANEXO

NORMAS UTILIZADAS PARA REDAÇÃO DOS ARTIGOS



Publicação Semestral ISSN 0101-3122

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Serão aceitos para publicação trabalhos científicos originais e notas científicas, ainda não publicados, nem encaminhados a outra revista para o mesmo fim, em idioma português, espanhol ou inglês.

Pelo menos a metade dos autores deverá ser sócio da ABRATES e estar, rigorosamente, em dia com a taxa da anuidade.

Os dados, opiniões e conceitos emitidos nos artigos, bem como a exatidão das referências bibliográficas, são de inteira responsabilidade do(s) autor(es). A eventual citação de produtos e marcas comerciais não significa recomendação de seu uso pela ABRATES. Contudo, o EDITOR, com assistência da Comissão Editorial e dos Assessores Científicos, reservar-se-á o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias.

Originais. Na elaboração dos originais, deverão ser atendidas as seguintes normas:

Informações Gerais

Os trabalhos deverão ser apresentados digitados em **linhas numeradas em espaço duplo** e com margens de 2cm, utilizando fonte Times New Roman 14 para o título e 12 para o texto, que deverão ser escritos corridamente, sem intercalação de tabelas e figuras que, feitas separadamente, serão anexadas ao final do trabalho; para REFERÊNCIAS, RESUMO e ABSTRACT serão iniciadas páginas novas, mesmo que haja espaço na anterior; as páginas ordenadas em texto, tabelas e figuras serão numeradas seguidamente; **as páginas com texto não deverão exceder 30 linhas. O texto não deve exceder um total de 20 páginas, incluindo as ilustrações (figuras e tabelas), o que equivale aproximadamente a oito páginas, na configuração final do trabalho. No caso do trabalho exceder oito páginas, será cobrada do(s) autor(es) uma taxa de R\$ 100,00 (cem reais) por página adicional.**

A digitação do trabalho deverá ser feita utilizando-se o editor de texto **Word** (DOC ou RTF) e os gráficos em programas compatíveis com o **WINDOWS**, como o **EXCEL**, e formato de imagens: Figuras (GIF) e Fotos (JPEG).

A redação dos trabalhos deverá apresentar concisão, objetividade e clareza, com a linguagem no passado impessoal; no texto, os sinais de chamadas para as notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito, após a palavra ou a frase que motivou a nota; a numeração será uma só e em números contínuos; as notas serão colocadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada; todas as tabelas e todas as figuras deverão ser mencionadas no texto; no RESUMO e no ABSTRACT não serão permitidos parágrafos, bem como a apresentação de dados em colunas ou em quadros e a inclusão de citações bibliográficas;

O(s) nome(s) do(s) autor(es) deverá(ão) ser mencionado(s) por extenso logo abaixo do título. No rodapé da primeira página, através de chamadas apropriadas, deverá ser feita menção ao patrocinador, caso tenha havido subvenção à execução do trabalho, citar se for o caso, Dissertação de Mestrado ou Tese de Doutorado do primeiro autor, trabalho apresentado em Reuniões Científicas e à filiação científica do(s) autor (es), mencionando Titulação, Departamento ou Seção, Instituição, Caixa Postal, CEP, Município e o e-mail de cada autor;

Siglas e abreviaturas dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso.

Submissão dos Artigos

A submissão de artigos a RBS, deve ser feita exclusivamente *on line*, para isso clique no item [submissão](#) no menu inicial. O usuário preenche as informações no website e anexa os arquivos do artigo, enviando as informações para um banco de dados. EM seguida da submissão o sistema responde com um e-mail automático para o autor responsável pelo artigo, confirmando o recebimento das informações no sistema e informando o número de protocolo. Os autores podem consultar no website a situação atualizada da tramitação de seu artigo, clicando no link [Situação do artigo](#)

Organização dos Trabalhos Científicos

Os trabalhos deverão ser organizados em TÍTULO RESUMIDO (colocado centralizado no início da primeira página), TÍTULO, RESUMO, TÍTULO EM INGLÊS, ABSTRACT, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, AGRADECIMENTOS E REFERÊNCIAS. Serão necessários no RESUMO "Termos para indexação" e no ABSTRACT "Index terms", no máximo cinco, que não estejam citados no título.

Citações no Texto

As citações de autores, no texto, serão feitas pelo sobrenome com apenas a primeira letra em maiúsculo, seguida do ano de publicação. No caso de dois autores, serão incluídos os sobrenomes de ambos, intercalado por "e"; havendo mais de dois autores, será citado apenas o sobrenome do primeiro, seguindo de "et al.". Em caso de citação, será obedecida a seguinte ordem: - o autor não consultado deve aparecer em primeiro lugar seguido da expressão "citado por" e o sobrenome do autor da obra consultada, seguido da data de publicação. No caso de duas ou mais obras do(s) mesmo(s) autor(es), publicadas no mesmo ano, elas deverão ser identificadas por letras minúsculas (a,b,c, etc.), colocadas imediatamente após o ano de publicação. Comunicações pessoais, trabalhos em andamento e inéditos deverão ser citados no rodapé, não devendo aparecer nas Referências.

Unidades de medida

Exemplos: 10°C, 10%, 10mL, $\mu\text{S.cm}^{-1}\text{.g}^{-1}$

Referências

As referências deverão ser apresentadas em ordem alfabética pelo sobrenome do autor ou do primeiro autor, sem numeração; mencionar todos os autores do trabalho separados por ";". Seguir as normas da ABNT NBR6023. Alguns exemplos são apresentados a seguir:

Artigos de Periódicos:

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Teste de deterioração controlada para avaliação do vigor de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.25, n.2, p.28-35, 2003.

MELLO, S.C.; SPÍNOLA, M.C.M.; MINAMI, K. Métodos para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de brócolis. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 1151-1155, 1999. Suplemento.

Artigos de Anais ou Resumos:

ANDREOLLI, D.M.C.; GROTH, D.; RAZERA, L.F. Qualidade fisiológica de sementes de café (*Coffea canephora* L.) cv. Guarani após secagem natural e artificial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 20., 1991, Londrina. **Anais...** Londrina: SBEA/IAPAR/UEL, 1991. v.2, p.1453-1466.

Livros:

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **Sistema de análise estatística para microcomputadores - SANEST**. Pelotas: UFPel, Instituto de Física e Matemática, 1986. 150p.

Capítulo de Livro:

ROBERTS, E.H.; KING, M.W.; ELLIS, R.H. Recalcitrant seeds: their recognition and storage. In: HOLDEN, J.H.W.; WILLIAMS, J.F. (Ed.). **Crop genetic resources: conservation and evaluation**. London: Allen and Unwin, 1984. p.38-52.

VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; França Neto, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 4.1-4.26.

Dissertações e Teses:

SOFIATTI, V. **Efeito de regulador de crescimento e controle químico de doenças de final de ciclo na produção e qualidade de grãos e sementes de arroz**. 2004. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

Artigos com autor anônimo:

NOVAS Técnicas - Revestimento de sementes facilita o plantio. **Globo Rural**, São Paulo, v.9, n.107, p.7-9, 1994.

Artigo de revista não científica:

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

Leis, Decretos, Portarias:

País ou Estado. Lei, Decreto, ou Portaria nº ..., de (dia) de (mês) de (ano). **Diário Oficial da União**, local de publicação, data mês e ano. Seção ..., p. ...

BRASIL. Medida provisória nº 1.569-9, de 11 de dezembro de 1997. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez. 1997. Seção I, p. 29514.

Relatório Técnico:

FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A.; COSTA, N.P. Estudo da deterioração da semente de soja no solo. In: RESULTADOS DE PESQUISA DE SOJA 1984/85. Londrina: EMBRAPA/CNPSo, 1985. p.440-445.

Documentos Eletrônicos:

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **SNPC - Lista de Cultivares protegidas**. Disponível em : <<http://agricultura.gov.br/snpc/lst/200.htm>>. Acesso em: 8 set. 2003.

Tabelas.

As tabelas numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, recebendo a denominação de TABELA, devem ser encabeçadas por um título conciso e claro, com letras minúsculas, não devendo ser usadas linhas verticais para separar colunas. Quando for o caso, as tabelas deverão ter indicação de fonte.

Figuras

As figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) deverão ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos e deverão, obrigatoriamente, ser executadas em programas compatíveis com o **WORD FOR WINDOWS**, inseridas no texto preferencialmente como objeto; os desenhos e as fotografias deverão ser escaneados, com alta qualidade e **enviados/apresentados no tamanho que devem ser publicados na revista**. As legendas deverão ser digitadas logo abaixo da figura e iniciar com a denominação de FIGURA, seguida do respectivo número e texto, em minúsculos; havendo possibilidade de dúvida, deverá ser indicada a parte superior da figura. **As figuras poderão ser impressas em cores, quando requeridas, cabendo ao(s) autor(es) o pagamento do acréscimo do custo.**

O EDITOR após avaliação preliminar do trabalho poderá aceitá-lo ou não para publicação. Sendo aceito previamente o trabalho, o EDITOR designará um EDITOR ASSOCIADO, por área de especialidade, que procederá a editoração com o auxílio de pelo menos dois ASSESSORES CIENTÍFICOS DA RBS, tendo as mesmas prerrogativas de aceitar ou não o trabalho para publicação. O EDITOR ASSOCIADO manterá contato com o(s) autor(es) até a obtenção da versão final por parte deste(s). Depois de revisado e aprovado o(s) autor(es), encaminhará(ão) eletronicamente ao EDITOR ASSOCIADO que fará a avaliação final do trabalho, sua aprovação e encaminhará ao EDITOR para avaliação, composição e publicação.

Os artigos serão publicados conforme a ordem de aprovação.

As orientações explicitadas nessas instruções deverão ser seguidas plenamente pelo(s) autor(es).