

ANA MARIA MAGALHÃES ANDRADE LAGÔA

FATORES QUE AFETAM A GERMINAÇÃO DE

R I C I N U S C O M M U N I S L.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Esta-
dual de Campinas para a obtenção
do título de Mestre em Ciências
Biológicas na área de Biologia
Vegetal.

Orientadora: Dra. Maria de Fátima Aleixo Pereira

CAMPINAS

1983

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria de Fátima Aleixo Pereira ,pela sua orientação, amizade e dedicação durante todo o transcorrer deste trabalho.

Aos Profs. Dr.Ivany F. M. Válio , Dr. Gil M. Felipe e Dr. Hilton S. Pinto , pelas sugestões dadas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

A todos os amigos, pelo apoio e incentivo dedicados.

ABREVIATURAS

Ácido giberélico.....	GA ₃
Ácido 2-cloroetil fosfônico.....	CEPA
Benzilaminopurina.....	6-BA
Fitocromo que absorve no comprimento de onda vermelho.....	Fv
Fitocromo que absorve no comprimento de onda vermelho extremo.....	Fve

Í N D I C E

	<u>Página</u>
I - INTRODUÇÃO	1
II- MATERIAL E MÉTODOS	11
1. Material biológico	11
2. Método geral de germinação	11
3. Embebição	12
4. Escarificação	12
5. Impermeabilização da região da carúncula	12
6. Luz	13
6.1. Período mínimo de luz	13
6.2. Luz monocromática	13
7. Temperatura	13
7.1. Temperaturas constantes	14
7.2. Choques de temperatura	14
8. Lixiviação	14
8.1. Lixiviação de carúnculas	14
8.1.1. Água de lixiviação de carúnculas na germinação de sementes	14
8.1.2. Água de lixiviação de carúnculas no desenvolvimento de plântulas de mostarda	15
8.2. Lixiviação de sementes	16
8.2.1. Água de lixiviação de sementes ..	16
8.2.2. Lixiviação intermitente	16
9. Análise de substâncias de crescimento	16

	<u>Página</u>
9.1. Extração e fracionamento de substâncias promotoras e inibidoras	16
9.2. Extração de substâncias fenólicas	17
9.3. Cromatografia de camada delgada	17
9.4. Biotestes	19
9.4.1. Alongamento do hipocôtilo de al - face	19
9.4.2. Aumento de peso fresco de cotilê- dones de rabanete	20
9.5. Determinação química de citocininas	21
10. Análise estatística	21
III - Resultados	23
1. Embebição	23
2. Fotoblastimo	23
2.1. Efeito da luz	23
2.2. Efeito do tegumento	23
2.3. Efeito da temperatura	27
2.4. Efeito de diferentes períodos de luz .	31
2.5. Efeito de luz monocromática	31
3. Temperatura	34
3.1. Efeito de temperaturas constantes	34
3.2. Efeito de choques de temperatura	37
4. Tegumento	37
4.1. Efeito da escarificação	37
4.2. Carúncula	39
4.2.1. Idade das sementes	39

	<u>Páginas</u>
4.2.2. Impermeabilização da região da carúncula	44
4.2.3. Água de lixiviação de carúnculas	44
4.2.4. Água de lixiviação de carúnculas no desenvolvimento de plântulas de mostarda	47
4.2.5. Substâncias endógenas	47
a) fração ácida	47
b) fração neutra	49
c) fração básica	49
d) substâncias fenólicas	53
5. Lixiviação	53
5.1. Germinação de sementes lixiviadas ...	53
5.2. Germinação em água de lixiviação de sementes	53
5.3. Substâncias endógenas em sementes lixiviadas	56
5.3.1. Fração ácida	56
5.3.2. Fração neutra	60
5.3.3. Fração básica	64
IV - DISCUSSÃO	66
V - RESUMO	75
VI - BIBLIOGRAFIA	76

I. INTRODUÇÃO

Para a formação de uma nova planta, é necessário que o embrião quiescente da semente, reassuma seu curso de desenvolvimento. Para isso, deve ocorrer uma série de reações metabólicas culminando na germinação da semente. Geralmente grandes quantidades de sementes são produzidas e dispersas a distâncias consideráveis sendo que, na maioria das vezes, só uma pequena proporção dessas sementes chega a produzir plantas adultas. Assim, tem sido dada muita atenção aos processos iniciais da germinação, que constituem uma das fases mais importantes no desenvolvimento da planta (Kozlowski e Gunn, 1972).

A semente é uma estrutura resistente em que o embrião está protegido, por seus envoltórios, de condições adversas do meio (Torrey, 1967).

O momento no qual a germinação termina e o crescimento começa é extremamente difícil de ser definido. A germinação é geralmente identificada pela protrusão de alguma parte do embrião através do tegumento das sementes, o que é resultado do crescimento do embrião. Em muitas sementes observa-se inicialmente a protrusão da radícula (Brown, 1972).

Para ocorrer a germinação, inicialmente é necessária a entrada de água na semente. Esta embebição, é determinada por três fatores: composição da semente, disponibilidade de água no meio e permeabilidade do tegumento da semente à água (Bewley e Black, 1978). A embebição é um processo físico, não estando portanto relacionada com a viabilidade das sementes. A medida da embebição é também uma indicação do poder de retenção de água da

semente e portanto determina a quantidade de água necessária para reidratar os tecidos durante a germinação. Durante esse processo, moléculas de solvente entram na semente causando solvatação das partículas coloidais e ocupam espaços intermicelares dos colóides. A absorção pelo colóide resulta na produção de pressões consideráveis chamadas pressão de embebição. Esta pressão pode atingir centenas de atmosferas e é de grande importância no processo de germinação, pois ela leva à quebra do tegumento das sementes e proporciona um meio para a germinação (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975). Sementes de várias espécies quando colocadas em água destilada em placas de Petri, sob condições ótimas para a germinação, mostram um padrão trifásico de entrada de água. A entrada inicial de água na fase 1, ocorre rapidamente (embebição) sendo consequência das forças matriciais das paredes da célula e do seu conteúdo. Esta fase ocorre tanto em sementes viáveis quanto inviáveis. Ocorre um pequeno aumento do metabolismo do embrião e o potencial matricial das células do embrião sendo muito baixo, facilita a entrada de água. Na fase 2, o potencial matricial aumenta tanto quanto o potencial osmótico, e então estabelece-se um equilíbrio. Nesta fase ocorre a maior parte dos processos metabólicos, preparando o embrião para a germinação. Na fase 3 ocorre a protrusão da radícula. O aumento da entrada de água é inicialmente associado com a diminuição do potencial hídrico da semente, provavelmente devido a mudanças ainda desconhecidas relacionadas com a germinação. Posteriormente, este aumento leva a uma diminuição do potencial osmótico, devido à hidrólise das reservas, após a germinação. (Bewley e Black, 1978).

O tegumento das sementes pode regular a germinação por

interferir em processos de absorção de água (embebição), no controle de absorção de oxigênio utilizado na respiração e processos oxidativos, na impermeabilidade a inibidores endógenos e na resistência ao crescimento do embrião (Koller et al., 1962). Segundo Coumans (1978), o poro existente no pericarpo de glomérulos de Beta vulgaris, é responsável pela passagem de água e gases do meio para o embrião, regulando assim a germinação desses glomérulos. Em sementes de Araucaria angustifolia, o tegumento impede a entrada de água, diminuindo assim a velocidade de germinação (Ferreira e Handro, 1979). A interferência do tegumento pode também ser devida à presença de inibidores. Este efeito ocorre, por exemplo, em sementes de uva onde foi comprovada a presença de inibidores no tegumento, que podem ser removidos pela lavagem das sementes em água corrente (Maeda, 1982). Em arilos de sementes de mamão, foi determinada a presença de inibidores de crescimento, que tinham natureza ácida e neutra e pareciam ter estrutura fenólica, inibindo a germinação destas sementes (Gherardi e Válio, 1976). Em algumas sementes, os inibidores presentes no tegumento podem inibir a germinação de outras espécies, como foi observado por Válio (1973) com sementes de Coumarouna odorata. O mesmo efeito foi verificado em sementes de Psoralla subacaulis (Baskin et al., 1967).

A remoção ou injúria do tegumento por escarificação química ou mecânica, além de aumentar a permeabilidade à água, induz a ocorrência de outras mudanças estruturais, tais como: o aumento da sensibilidade à luz e temperatura, permeabilidade a gases, remoção de promotores ou inibidores, influenciando significativamente no metabolismo da semente e conseqüentemente na sua dormência (Khan, 1977).

Vários experimentos de lixiviação são descritos na literatura. Em alguns casos, como em sementes de Carthamus oxycantha e Beta vulgaris a lixiviação promoveu a germinação (Kheradnan e Bassiri, 1980; Coumans, 1978). E em outros casos como em Cynodon dactylon, a lixiviação reduziu a germinação (Kay et al., 1977). Em tubérculos jovens de Cyperus rotundus a lixiviação retardou o crescimento de gemas, provavelmente pela saída de giberelinas endógenas (Aleixo e Válio, 1976). Em Datura stramonium a lixiviação das sementes reduziu a germinação podendo ser este efeito devido à remoção de algum promotor, já que a água de lixiviação destas sementes promoveu a germinação de Datura e de sementes de Cucumis anguria (Villar, 1982).

Os processos fisiológicos mediados por enzimas, só podem ocorrer dentro de certos limites de temperatura. Cada semente contém os substratos necessários para realizar os vários processos bioquímicos da germinação. Esses processos preparatórios envolvem alterações que tornam sua fase de latência dependente da temperatura (Koller, 1972). Assim, a temperatura tem um importante papel na iniciação da germinação de sementes maduras. Regimes de temperatura regulam a germinação por alterar a velocidade das reações bioquímicas e mudar os estádios físicos dos componentes celulares (Côme e Tissaoiu, 1972).

A germinação da maioria das espécies é inibida em temperaturas muito altas ou muito baixas. Isso ocorre mesmo em espécies de regiões tropicais, como é o caso de Rapanea guianensis (Joly e Felipe, 1979) e Magonia pubescens (Salgado-Laboriau, 1973), ambas espécies do cerrado brasileiro.

Em altas temperaturas o tecido embrionário é insuficientemente oxigenado para satisfazer a sua necessidade metabólica ,

pois as taxas respiratórias são muito altas. Essa deficiência de oxigênio é aumentada geralmente, quando substâncias fenólicas existentes no tegumento, absorvem o oxigênio do meio, impedindo a sua entrada para o embrião (Côme e Tissaoui, 1972). Alguns autores acreditam que o efeito de temperaturas altas se deve a alterações nos níveis endógenos de substâncias de crescimento. Assim, Felipe et al. (1970) e Takaki et al. (1982), mostraram que os níveis de giberelinas e citocininas são aumentados quando sementes de Rumex obtusifolius são expostas a altas temperaturas, tratamento este que promove a germinação.

Na faixa de temperatura em que uma semente germina, há geralmente uma temperatura ótima que é onde ocorre a maior porcentagem de germinação em menor tempo, acima ou abaixo da qual a germinação é retardada. As temperaturas mínimas e máximas para a germinação de uma dada espécie, são respectivamente as temperaturas menores e maiores em que ocorre a germinação (Salgado - Laboriau, 1973).

Muitas sementes têm a germinação promovida por temperaturas alternadas, como é o caso de Cucumis anguria (Felippe, 1980) e Vitis vinifera (Maeda, 1982). Ecologicamente este efeito pode ser importante, uma vez que alternâncias de temperatura acontecem na natureza, mas ainda não está explicado o modo pelo qual elas promovem a germinação. Segundo Koller (1972), o efeito da alternância poderia ser através da promoção de crescimento do embrião, produzindo a ruptura do tegumento, fato que poderia não ocorrer em regimes de temperatura constante. Outros autores atribuíram este efeito a um aumento da permeabilidade do tegumento a gases (Brown in Leopold e Kreedeman, 1977).

Algumas sementes, mesmo em temperatura ótima e em presen

ça de água e oxigênio, só germina na presença ou ausência de luz branca, sendo denominadas fotoblásticas positivas e negativas respectivamente (Evenari, 1965). Existem também espécies que são indiferentes à luz, germinando da mesma forma tanto na luz como no escuro (Smith, 1975).

Borthwick et al. (1952), trabalhando com alface, mostraram que em sementes mantidas no escuro, bastava um choque de um minuto de luz vermelha para que elas germinassem. Quando, após o choque de vermelho, era dado um choque de vermelho extremo, a germinação era totalmente inibida. Se após o choque de vermelho extremo fosse dado um lampejo de vermelho, as sementes germinavam. Assim, esses pesquisadores verificaram que o vermelho extremo revertia o efeito do vermelho e vice-versa, independentemente do número de aplicações, sendo que, apenas o último comprimento de onda iria determinar se a germinação ocorreria ou não. As respostas das sementes de alface seriam controladas por um pigmento que teria duas formas fotoconversíveis: com picos de absorção em 660 nm (Fv) e 730 nm (Fve) (Borthwick et al., 1952). Este pigmento é o fitocromo. Se sementes embebidas forem expostas à luz vermelha, a forma inativa (Fv) será convertida para a forma ativa (Fve) e a germinação acontece. Se a exposição à luz vermelha for seguida de exposição ao vermelho extremo, o Fve será convertido para a forma inativa Fv, e a semente germina (Smith, 1975). Após a formação de Fve, este pode sofrer um processo de reversão ao Fv no escuro ou ser destruído por ação de enzimas proteolíticas (Pike e Briggs, 1972).

Sementes que germinam em luz branca (fotoblásticas positivas) podem ser caracterizadas pelo elevado nível de Fve para indução da germinação. Nestas, a concentração de Fve pré-existente é sem-

pre inferior ao nível crítico. Assim, uma irradiação com luz branca após certo período de embebição, é necessária para se obter um teor elevado de Fve e, conseqüentemente, a indução da germinação. Segundo Hsiao e Vidaver (1971), é necessário um teor mínimo de 16 a 20% de água, para que o vermelho seja efetivo na indução da germinação.

As sementes que germinam no escuro (fotoblásticas negativas), segundo Kendrick (1976), podem ser caracterizadas pelo baixo nível de Fve para indução da germinação. Assim, pequena proporção do fitocromo destas sementes, se apresenta em uma forma intermediária, que se transforma em Fve no escuro, proporcionando a germinação.

Pode-se afirmar que um determinado fenômeno está sob ação do fitocromo, se for demonstrada a reversão vermelho-vermelho extremo. Muitos trabalhos foram feitos com várias espécies como tomate e pepino (Yaniv, et al., 1967), Cucumis anguria (Noronha et al., 1978), demonstrando o envolvimento do fitocromo na germinação destas espécies.

Sementes fotossensíveis, na ausência ou presença de luz, podem ter a germinação drasticamente modificada pela temperatura (Randi e Felipe, 1981). Isikawa e Fujü (1961), trabalhando com sementes de Rumex spp., verificaram que as sementes mantidas a 25°C, necessitam de irradiação com luz vermelha para que ocorra a germinação. Estes autores, verificaram que estas sementes germinam no escuro, se forem tratadas por um período curto de temperatura elevada. Cucumis anguria, semente fotoblástica negativa, pode germinar na luz quando tratada com temperaturas alternadas (Felipe, 1980).

Entre os fatores envolvidos na germinação, estão os hor-

mônios. Muitos estudos já foram feitos através de extratos de sementes, demonstrando o papel das substâncias de crescimento na germinação de muitas espécies.

A maioria das pesquisas com giberelinas no metabolismo das reservas durante a germinação, concentra-se em cevada, porém a função exata dessas substâncias na regulação da germinação de sementes, ainda está para ser esclarecida (Mayer e Shain, 1974). Em sementes de Rumex obtusifolius, o ácido giberélico substitui a luz na germinação (Felippe et al., 1970). Foi verificada também a interação entre os efeitos do ácido giberélico e da luz vermelha em sementes de alface (Ikuma e Thimann, 1960) e sementes de Kalanchoe, Salsola volkensü e Arabidopsis (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975). Em sementes de Nemophila insignis e Phacelia tanaacetifolia, no entanto, o ácido giberélico substitui o escuro na germinação (Krishnamoorthy, 1981).

Muitos trabalhos indicam a influência de um fator ligado ao embrião, no desenvolvimento de atividades enzimáticas nos cotilédones ou endosperma, o que leva a concluir que, na natureza, este controle é hormonal (Chin et al., 1972).

O desenvolvimento de atividades proteolíticas nos cotilédones é controlado por uma substância originada do tecido do embrião e transportada para os cotilédones (Wiley e Ashton, 1967). Em alguns casos a presença do eixo embrionário pode ser substituída pela aplicação exógena de citocininas (Penner e Ashton, 1967), daí podendo-se concluir que o eixo embrionário secreta uma citocinina que regula a formação de enzimas proteolíticas no cotilédone. A atividade de amilase em cotilédones de feijão, parece ser controlada por citocininas originárias do eixo embrionário (Gepstain e Ilan, 1970), e pode ser induzida com aplicação de

6-BA (Metivier e Paulilo, 1980). Citocininas fisiologicamente ativas estão ausentes em sementes secas de alface aparecendo somente durante a germinação. As citocininas promovem a germinação, no escuro, de muitas espécies de sementes fotoblásticas positivas (Miller, 1958). Em sementes de café foi observado que a cinetina aumenta a germinação por estimular o crescimento da radícula (Válio, 1976). A aplicação de um período de luz vermelha de um aumento da temperatura provoca um rápido aumento no conteúdo de citocininas endógenas em sementes de Rumex obtusifolius (Van Staden e Wareing, 1972; e Takaki et al., 1981).

O ácido abscísico existe em muitas sementes e tecidos envoltórios, quer estas sementes estejam dormentes ou não. É ainda um inibidor efetivo quando aplicado exogenamente (Wareing e Saunders, 1971). Em algumas espécies como em Fraxinus americana a dormência está relacionada com a quantidade de ácido abscísico no embrião (Sondheimer et al., 1968 e Milborrow, 1974). Alguns autores têm sugerido a interação entre ácido abscísico e ácido giberélico no controle da dormência (Taylorson e Hendricks, 1977).

O metabolismo do endosperma de sementes de Ricinus communis tem sido amplamente estudado. O interesse pelo endosperma nessa espécie se deve à grande quantidade de óleo que ele contém, sendo responsável por 35 a 57% do peso seco da semente (Bewley-Black, 1978). Esse produto tem um amplo uso industrial como lubrificante para motores graças a seu baixo ponto de congelamento; com boa aplicação na área medicinal e produtos químicos. (Pitangui, 1957; Canecchio Filho, 1961). Apesar da grande importância desta espécie, não foram encontradas na literatura, informações sobre os fatores que controlam a germinação de suas sementes.

O objetivo deste trabalho, foi verificar alguns fatores

que afetam a germinação de Ricinus communis, tais como luz, temperatura, influência do tegumento, e o envolvimento de substâncias de crescimento no processo da germinação.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Material biológico

Foram utilizadas sementes de Ricinus communis (mamona) cultivar guarani, fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas.

Estas sementes foram armazenadas em sacos de papel em temperatura ambiente, após tratamento com inseticida (Malathion) e fungicida (Benlate).

2. Método geral de germinação

Nos experimentos de germinação foram utilizadas 4 repetições de 25 sementes, colocadas em caixas gerbox pretas de 12x12 cm, com 2 folhas de papel de filtro umedecidas com 15 ml de água destilada. O papel de filtro e as caixas foram esterelizados com formol a 2%, 24 horas antes do seu uso.

As sementes foram mantidas em câmaras de crescimento a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$. Quando os experimentos foram realizados na luz, utilizaram-se caixas gerbox transparentes, expostas à luz branca provenientes de lâmpadas fluorescentes ($320\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$). A contagem de germinação das sementes mantidas no escuro, foi feita sob luz verde de segurança.

A protrusão da radícula foi usada como parâmetro para avaliação da germinação.

3. Embebição

Para o estudo da embebição de sementes de Ricinus communis (mamona), foram utilizadas 10 sementes por repetição e 4 repetições por tratamento.

As sementes foram imersas em água destilada, de onde foram retiradas e pesadas em intervalos de 1 hora durante as 6 primeiras horas. A embebição foi também verificada por períodos mais longos: 4, 12, 24, 36 e 48 horas. Os resultados são apresentados em porcentagem de aumento do peso fresco inicial.

4. Escarificação

Para verificação do efeito do tegumento na germinação e embebição de sementes de mamona, foi feita a remoção, com o auxílio de bisturi ou esmeril, de partes do tegumento em diferentes regiões da semente:

- remoção da carúncula;
- remoção de parte da testa na região oposta à carúncula;
- remoção de parte do tegumento ao lado da região da carúncula, estando esta presente ou não;
- remoção de parte do tegumento em baixo da carúncula;
- remoção total do tegumento (sementes nuas).

Como controle destes experimentos foi verificada a germinação de um lote de sementes intactas.

5. Impermeabilização da região da carúncula

Após a remoção das carúnculas de sementes de mamona, co
briu-se esta região com uma camada de parafina em estado pastoso
($\pm 30^{\circ}\text{C}$).

Comparou-se a germinação destas sementes com a de semen-
tes sem carúnculas e sementes intactas.

6. Luz

6.1. Período mínimo de luz

Verificou-se a germinação de sementes expostas à luz bran-
ca por períodos de 8, 10, 16, 24 e 48 horas, em câmaras de germi-
nação mantidas a 25°C . Após estes períodos as sementes foram man-
tidas no escuro. Testou-se também a germinação de sementes manti-
das em luz e escuro contínuos.

6.2. Luz monocromática

Sementes embebidas por 24 horas em luz branca, foram
expostas por 24 horas à luz na faixa do vermelho ou do vermelho
extremo. Após este período as sementes foram mantidas no escu-
ro.

A luz vermelha foi obtida por meio de lâmpadas fluores-
centes vermelhas e o vermelho extremo por meio de lâmpadas incan-
descentes, usando-se como filtro folhas de papel celofane azuis
e vermelhas ($1.2 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{nm}$) (Kendrick e Frankland, 1981; Noronha
et al., 1978).

7. Temperatura

7.1. Temperaturas constantes

Foram testadas, tanto na luz como no escuro, as temperaturas de 10°C, 20°C, 25°C, 30°C e 40°C, em câmaras de germinação.

7.2. Choques de temperatura

Quando se testou o efeito de choques de temperaturas na germinação, as sementes foram mantidas 24 horas a 25°C no escuro. Após este período, foram feitos choques de 6 horas nas temperaturas de 10°C ou 40°C no escuro, voltando em seguida às condições anteriores.

Usou-se como controle, um lote de sementes mantidas a 25°C, no escuro.

8. Lixiviação

8.1. Lixiviação de carúnculas

A água de lixiviação de carúnculas foi obtida usando-se 200 carúnculas imersas em 100 ml de água destilada, por 4 horas a 25°C.

8.1.1. Água de lixiviação de carúnculas na germinação de sementes

Testou-se a germinação de sementes de Lactuca sativa (alface) cultivar "Grand Rapids", Lycopersicum esculentum (to-

mate), Rumex obtusifolius (língua de vaca), Cucumis anguria (maxixe) e Ricinus communis (mamona), na água de lixiviação de carúnculas.

Para sementes de mamona utilizou-se o método geral de germinação.

Sementes das outras espécies foram postas para germinar em placas de Petri de 9 cm de diâmetro em luz contínua a 25°C . Para sementes de alface e tomate usaram-se 25 sementes por placa e 4 repetições por tratamento. Para sementes de Rumex , foram usadas 100 sementes por placa e 2 repetições por tratamento. Para sementes de maxixe, usaram-se 50 sementes por placa e 4 repetições por tratamento. Foram colocados 5ml da água de lixiviação de carúnculas, e nos controles o correspondente em água destilada.

8.1.2. Água de lixiviação de carúnculas no desenvolvimento de plântulas de mostarda

Foram usadas 5 sementes de mostarda por repetição e 4 repetições por tratamento. Estas sementes foram postas para germinar em vidros com capacidade de 50ml, com tampa hermética, com 2 folhas de papel de filtro, umedecidas com 1,5 ml de água destilada ou água de lixiviação de carúnculas, ou etrel (forma comercial de CEPA) a 25 ppm. O experimento foi realizado tanto na luz como no escuro, em câmaras de crescimento a 25°C. Após 7 dias, mediu-se o hipocótilo de cada plântula, verificou-se o peso fresco dos cotilédones das plântulas crescidas na luz e observou-se a presença do gancho plumular.

8.2. Lixiviação de sementes

8.2.1. Água de lixiviação de sementes

Foram usadas 200 sementes de mamona, sem carúnculas, imersas em 100 ml de água destilada por 48 horas.

O efeito desta água de lixiviação foi verificado na germinação de sementes de mamona sem carúncula, usando-se 15 ml por placa. No controle usou-se água destilada. As placas foram mantidas no escuro.

8.2.2. Lixiviação intermitente

Foram retiradas as carúnculas das sementes de mamona, e estas foram lavadas intermitentemente, por diferentes períodos, por meio de um extrator soxhlet.

Verificou-se a germinação de sementes lixiviadas por 6, 24 e 48 horas e foi realizada extração de substâncias endógenas, de sementes lixiviadas por 24 e 48 horas.

9. Análise de substâncias de crescimento

9.1. Extração e fracionamento de substâncias inibidoras e promotoras

O método de extração utilizado, foi baseado no descrito por Usberti (1979). Foram utilizadas 5 gramas de carúnculas ou de sementes, trituradas em homogeneizador "Virtis-45" com 100 ml de metanol 80%.

Os macerados foram extraídos a 5°C, por 24 horas. Após este período foi feita filtragem e reextração por mais 24 horas a 5°C, em metanol 80%. Obteve-se assim o extrato metanólico bruto. A seguir procedeu-se à eliminação do metanol por meio de evaporador rotatório, sob pressão reduzida, a 35°C, obtendo-se o extrato aquoso bruto. Os passos seguintes estão apresentados no esquema I.

9.2. Extração de substâncias fenólicas

O método de extração utilizado para detecção de substâncias fenólicas seguiu o citado por Kefeli (1978). Foram usadas 10 g de carúnculas trituradas por meio de homogeneizador "Virtis-45" com 100 ml de metanol 80%. O método usado para a obtenção do extrato aquoso bruto, seguiu o citado no item 9.1. Este extrato foi lavado três vezes com igual volume de tolueno, evaporado até secar e após a eluição com etanol 70%, foi biotestado.

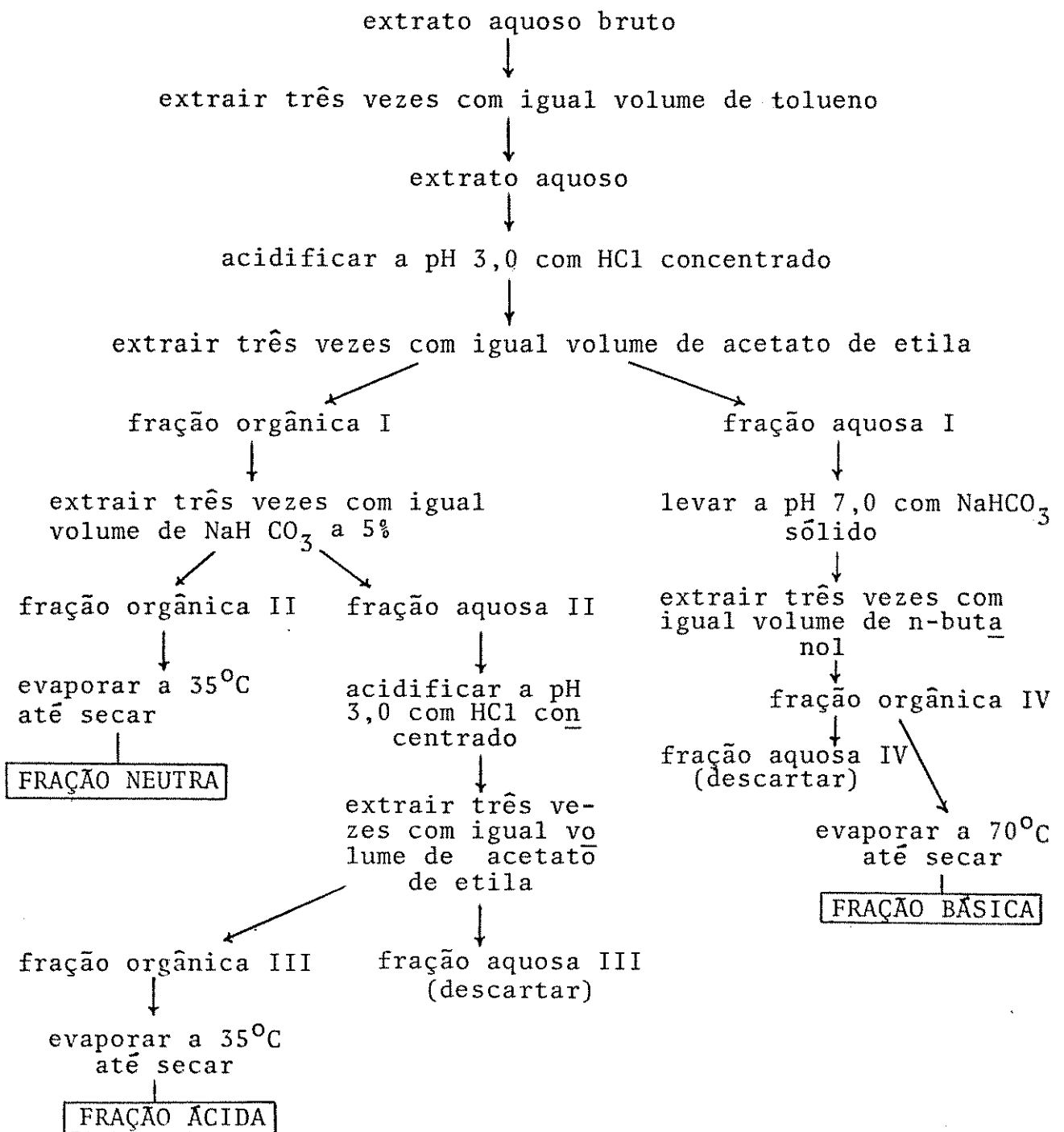
9.3. Cromatografia de camada delgada

As frações ácidas, básicas e neutras obtidas pelos métodos de fracionamento, foram cromatografadas sobre placas de vidro de dimensões de 20 x 20 cm com uma camada de 0,5 mm de suspensão de silicagel G e água na proporção de 1:2 (g de sílica/ml de água destilada). Os cromatogramas foram desenvolvidos em cubas de vidro, contendo o sistema de solventes, num percurso de 15 cm.

Os sistemas de solventes utilizados foram:

- isopropanol, amônia e água na proporção de 10:1:1 v/v/v (SISTEMA 1) (Kefford, 1955)
- benzeno, n-butanol e ácido acético na proporção de

ESQUEMA I - EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE SUBSTÂNCIAS INIBIDORAS E
PROMOTORAS



14:5:1 v/v/v (SISTEMA 2) (Aleixo e Vãlio,1976).

As placas foram deixadas secar por 24 horas quando usado o sistema 1 e 72 horas quando usado o sistema 2.

Em alguns casos os cromatogramas foram divididos na faixa da origem até o Rf 0.4, sendo esta denominada faixa I e o restante faixa II. A sílica de cada faixa foi removida e eluída em metanol 80% por 48 horas. Após este período o eluato foi centrifugado e com o sobrenadante foi feita cromatografia em camada delgada com o sistema de solventes 2.

9.4. Biotestes

Para a execução dos biotestes os cromatogramas foram divididos em 10 faixas transversais, entre o ponto de aplicação e a frente. Estas faixas foram divididas em 4 partes correspondendo a 4 repetições para cada faixa entre Rfs. De cada uma destas repetições, foi removida a sílica e colocada ao acaso em cubetas de formas de plástico para gelo. Em cada cubeta foram colocadas duas folhas de papel de filtro umedecidas com 1,5 ml de água destilada. Como controle utilizou-se quantidade de sílica correspondente à usada nos tratamentos ,provenientes de placas percorridas só pelo solvente.

9.4.1. Alongamento do hipocótilo de alface

Este bioteste foi realizado de acordo com Frankland e Wareing (1960). Foram utilizadas sementes de alface da cultivar "Grand Rapids", postas para germinar em placas de Petri a 25°C por 24 horas, sob luz contínua. Após este período, foram selecionadas as plântulas por homogeneidade de tamanho e estas foram

transferidas em grupos de 4 para cubetas de gelo. Como padrão foram usadas soluções de GA₃ na concentração de 10⁻⁷M. Quando o sistema de solventes 2 foi usado, umedeceram-se as cubetas com uma solução de tampão fosfato a pH 7.0.

As formas de gelo foram colocadas em bandejas com água tampadas hermeticamente com vidro transparente. Este sistema foi transferido para câmaras de crescimento a 25°C sob luz contínua por 4 dias. Após este período, foram medidos os hipocótilos das plântulas de alface, detectando-se assim substâncias inibidoras e promotoras do crescimento nas frações ácidas e neutras. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

Para detecção de substâncias fenólicas em carúncula, foi utilizado este bioteste.

Em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, com 2 folhas de papel de filtro, foram colocados 1,5 ml de extrato deixando-se secar por 2 dias em câmaras de crescimento a 25°C. Após este período, em cada placa, foram colocadas 10 plântulas de alface, obtidas como descrito acima, sendo umedecidas com 1,5 ml de água destilada.

Como controle utilizaram-se placas com o mesmo volume de água destilada. Os passos posteriores seguiram os descritos acima.

9.4.2. Aumento de peso fresco de cotilédones de rabanete

As frações básicas foram biotestadas segundo o método de Letham (1968).

As sementes de rabanete cv. redondo escarlate precoce (IAC 3271), foram colocadas para germinar em caixas Gerbox pretas a 25°C durante 30 horas. Após este período foi retirado o cotilédono interno de cada plântula. Os cotilédones mais uniformes foram transferidos para cubetas das formas de gelo, sendo 3 cotilédones por cubeta. Foram utilizadas soluções padrão de 6-BA nas concentrações de 10^{-5} M.

As formas de gelo foram colocadas em bandejas com água como descrito no bioteste do hipocótilo de alface. Após 3 dias foi determinado o peso fresco dos cotilédones.

Os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

9.5. Determinação química de citocininas

Para detecção química de citocininas das frações básicas, usou-se o reagente de Wood que é específico para substâncias purínicas, desenvolvendo cor azul na presença de tais grupos (Wood, 1955).

A técnica usada foi nebulizar o reagente em placas de 7 x 20 cm, onde uma parte da fração básica tinha sido aplicada e desenvolvida com o sistema de solventes 1. A faixa revelada correspondia a uma repetição para cada faixa entre R_fs. Somente as faixas com reação positiva (cor azul), foram biotestadas.

10. Análise estatística

As porcentagens de germinação foram transformadas em valor angular: $\text{ângulo} = \text{arco seno } \sqrt{p}$, onde p corresponde à proporção de sementes germinadas e esses valores utilizados para

a análise estatística subsequente.

O teste t foi aplicado para a comparação de dois valores médios, verificando-se a significância a 5% e a 1%, sendo este resultado representado por 1 ou 2 asteriscos respectivamente.

Quando se analisaram experimentos com mais de um tratamento, usou-se o teste F, e calculou-se a DMS (diferença mínima significativa) a 5% pelo teste de Tuckey (Snedecor, 1962), sendo representado por barras verticais.

Nos biotestes para detecção de substâncias endógenas, o delineamento estatístico usado foi o teste F, para analisar as diferenças entre cada faixa entre Rfs de cada cromatograma, e nos experimentos de lixiviação, também entre os diferentes tratamentos. As colunas hachuradas correspondem às porcentagens significativas a 5%.

III. RESULTADOS

1. Embebição

Na verificação da embebição de sementes de Ricinus communis, observa-se que entre intactas, sem carúncula e escarificadas na região oposta à carúncula, não houve diferenças significativas. A embebição, no entanto, foi favorecida pela remoção total do tegumento. Verifica-se também que a carúncula embebe rapidamente, sendo que depois de 2 horas ela atinge o seu máximo de embebição (fig. 1).

A figura 2 mostra resultados obtidos quando a embebição foi verificada por períodos mais longos; não houve diferença dos resultados anteriores. Neste caso, retiraram-se as carúnculas das sementes intactas, pois após 8 horas de embebição, estas se desintegram alterando os resultados.

2. Fotoblastismo

2.1. Efeito da luz

Foi verificado o efeito de luz na germinação de sementes intactas de mamona (fig. 3). Pode-se observar que o escuro favoreceu a germinação, quando comparada com as sementes colocadas para germinar na luz. Esta diferença foi significativa até o último dia de observação.

2.2. Efeito do tegumento

As sementes escarificadas na região oposta à carúncula,

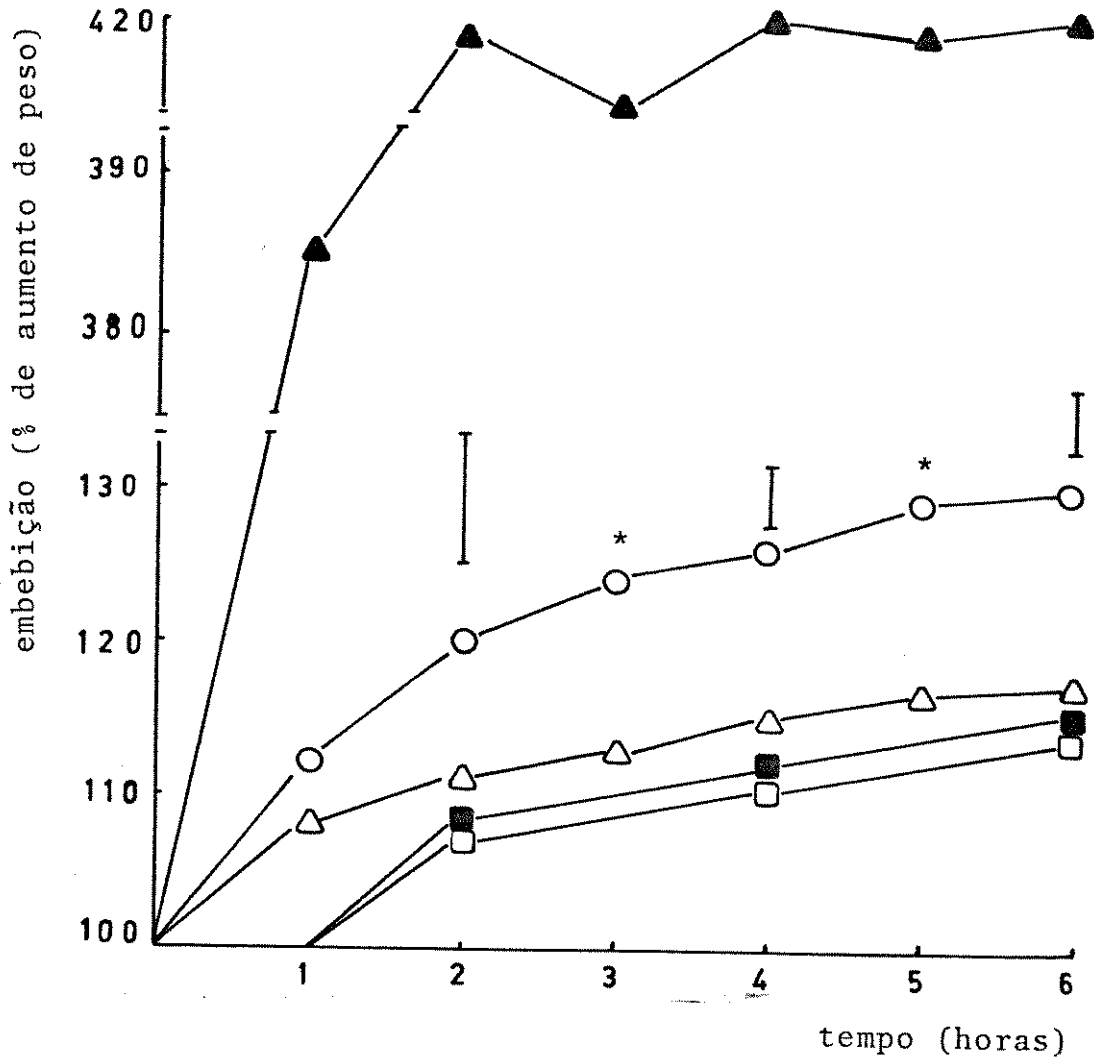


FIGURA 1 - Curva de embebição de sementes de R. communis.

- | | |
|-------------------|---------------|
| ■ - intactas | ▲ - carúncula |
| □ - sem carúncula | ○ - nuas |
| △ - escarificadas | |

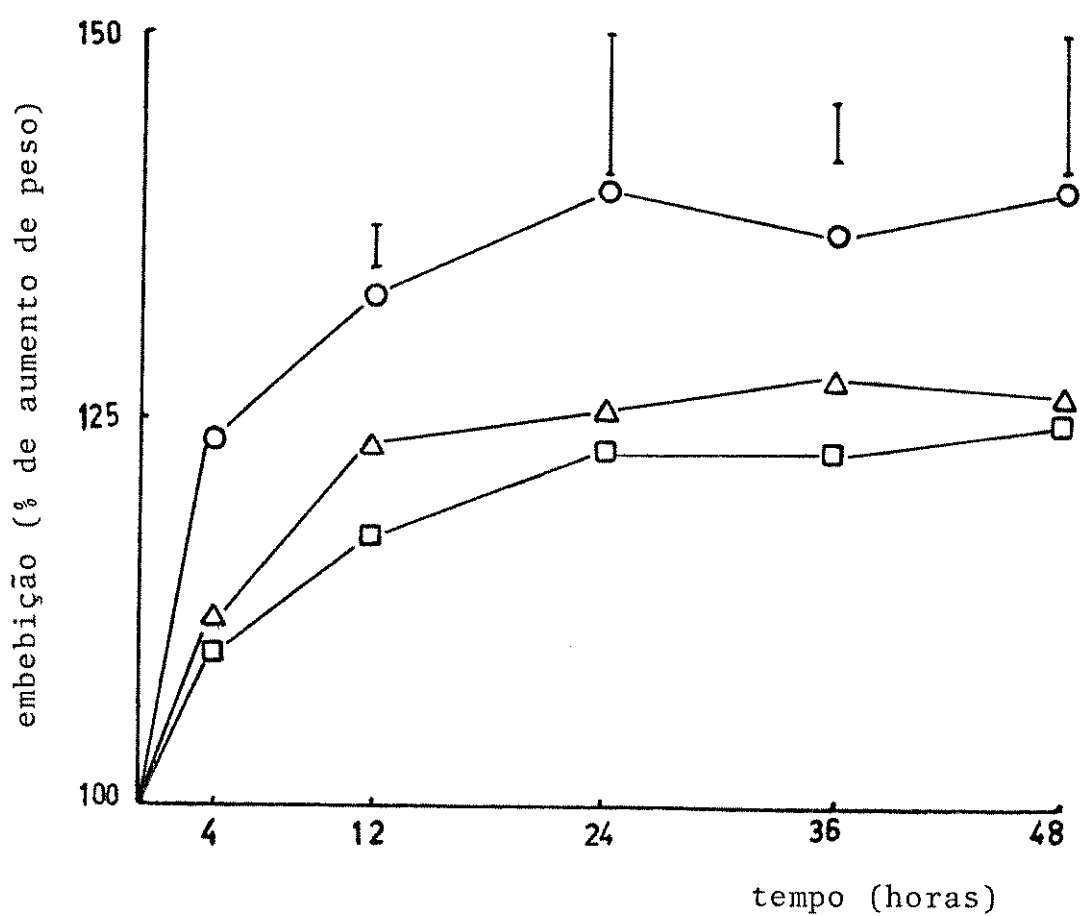


FIGURA 2 - Curva de embebição *R. communis*.

- - sementes intactas
- △ - sementes escarificadas
- - sementes nuas

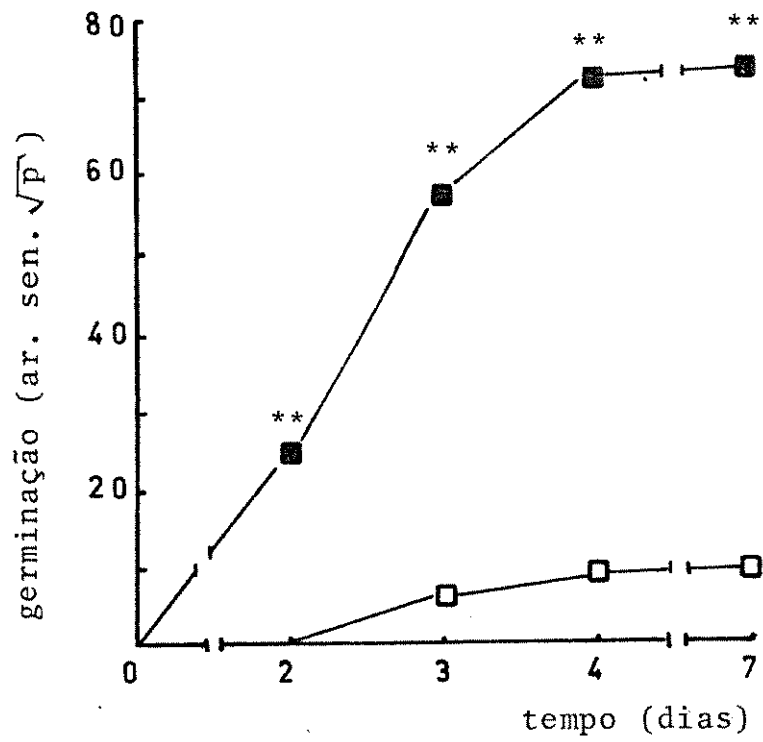


FIGURA 3 - Efeito de luz na germinação de sementes de R. communis.

□ - luz

■ - escuro

apresentaram uma maior germinação no escuro, quando comparada com as da luz, porém esta diferença desapareceu no 8º dia de observação (fig. 4). Quando se comparam estes resultados com os obtidos com sementes intactas, observa-se que não houve diferença entre a germinação de sementes escarificadas e intactas no escuro, porém as sementes escarificadas têm maiores porcentagens de germinação na luz em relação às intactas na mesma condição. Esta diferença foi significativa a partir do 4º dia de observação. Nas sementes onde o tegumento foi totalmente removido, a germinação, tanto na luz como no escuro, atingiu porcentagens mais altas do que nos outros tratamentos. As sementes nuas germinadas no escuro, apresentaram uma maior porcentagem de germinação no 2º dia de observação. A partir deste dia, não houve mais diferenças significativas, sendo que, nos últimos dias de experimento, a germinação atingiu por volta de 100% nos dois casos.

Na figura 5, verifica-se que a retirada da carúncula não afetou a germinação na luz. O escuro favoreceu a germinação, sendo que as sementes sem carúncula apresentaram uma promoção em relação às sementes intactas, significativa apenas no 3º dia de observação.

2.3. Efeito da temperatura

A partir dos resultados apresentados na figura 6, verifica-se que a temperatura afeta bastante o fotoblastismo nas sementes de R. communis. A temperatura de 10°C, inibiu a germinação tanto na luz como no escuro. Na temperatura de 20°C verifica-se uma mudança do padrão quanto ao fotoblastismo, ou seja, não se observou diferença significativa entre a germinação na luz e no

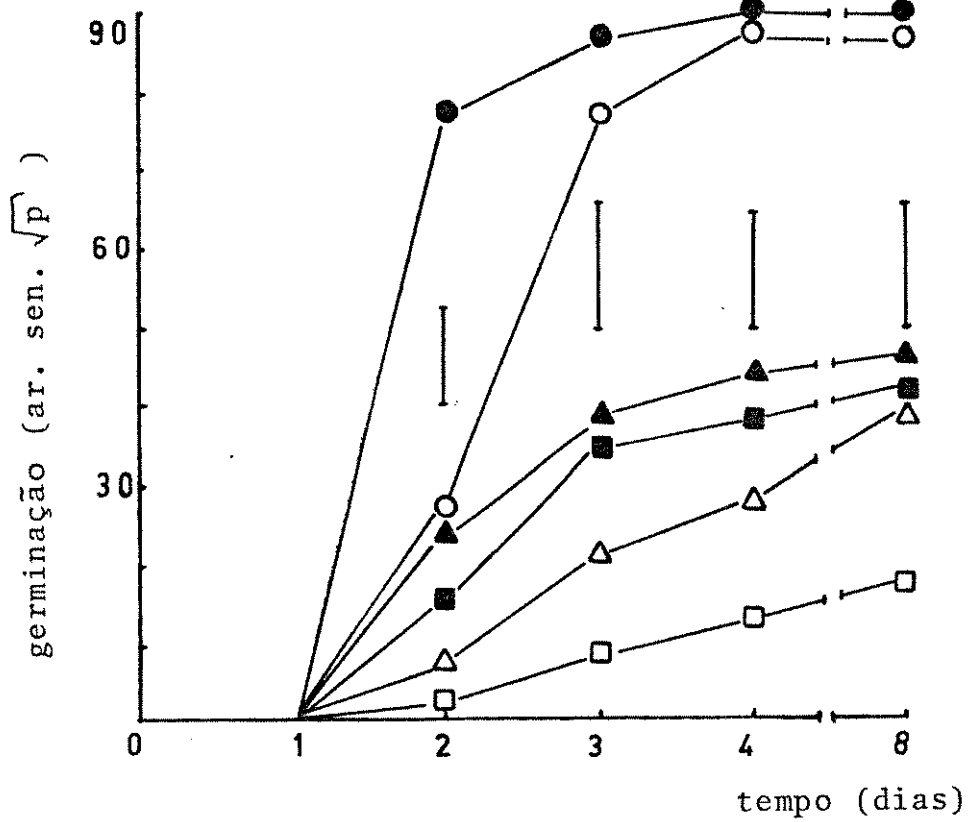


FIGURA 4 - Efeito da escarificação na germinação de R. communis.
Os símbolos vazios representam a germinação feita na luz e os cheios no escuro.

□ - intactas (controle)

△ - escarificadas

○ - nuas

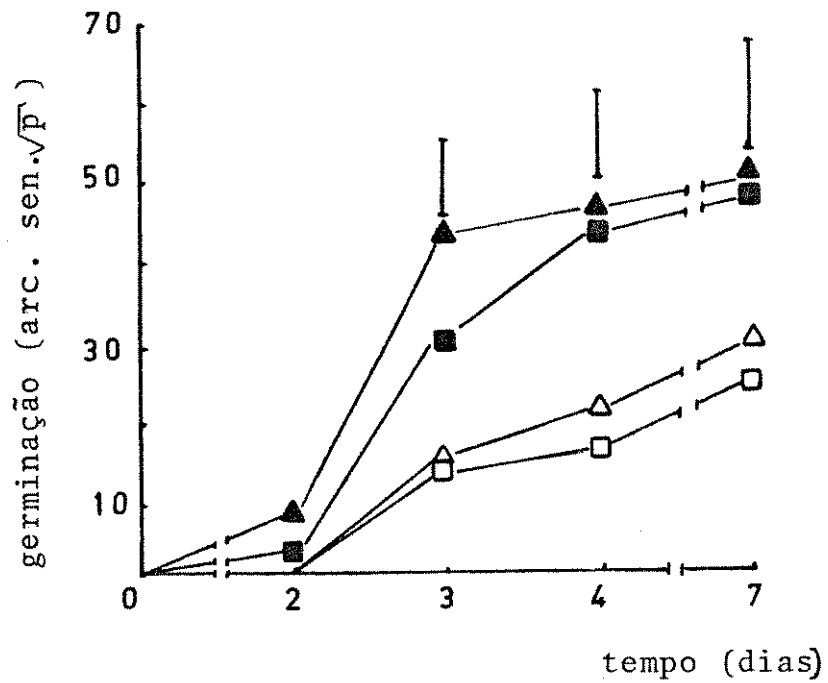


FIGURA 5 - Efeito da escarificação na germinação de R. communis.
 Os símbolos vazios representam a germinação na luz e os cheios no escuro.
 □ - sementes intactas
 △ - sementes sem carúncula

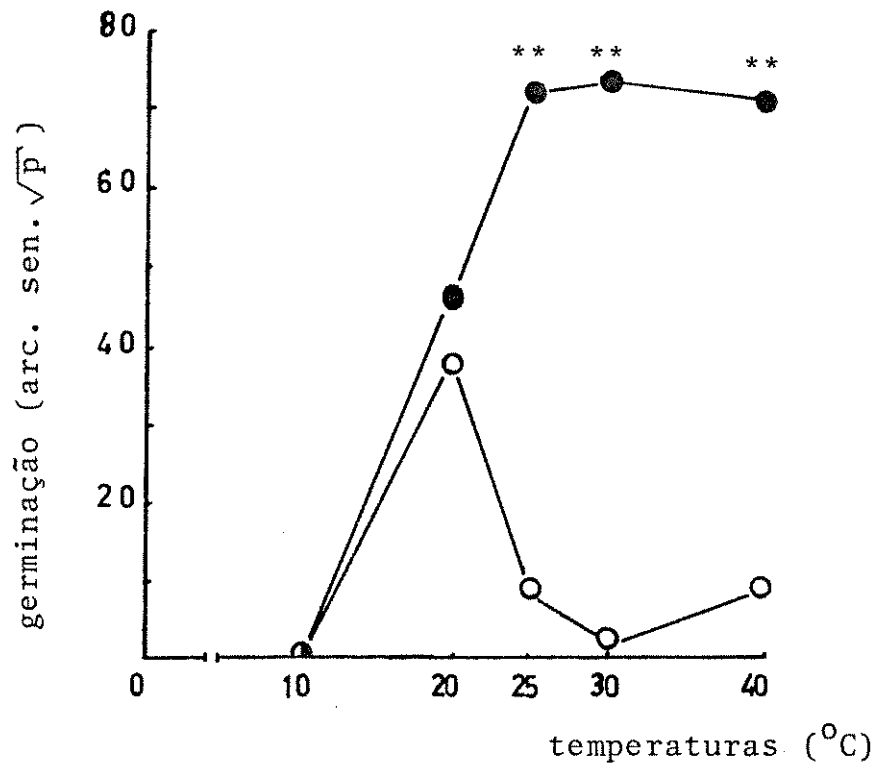


FIGURA 6 - Efeito de temperaturas constantes na germinação de R. communis, no 7º dias de observação.

○ - luz

● - escuro

escuro. Acima de 25°C , o escuro favoreceu a germinação .

2.4. Efeito de diferentes períodos de luz

Na tentativa de se demonstrar o período mínimo de luz a que as sementes podem ficar expostas sem ter sua germinação iniciada, testou-se a germinação em diferentes períodos de luz a 25°C . Na figura 7, verifica-se que a luz contínua é inibitória para a germinação em relação a todos os tratamentos, confirmando os resultados anteriores.

Nos tratamentos com diferentes períodos de exposição à luz, verifica-se que quanto maiores foram estes períodos, maior foi o atraso da germinação em comparação ao tratamento de escuro contínuo, sendo que no último dia de observação, não existe diferença entre eles.

2.5. Efeito de luz monocromática

Objetivou-se testar o efeito de luz nas faixas do vermelho e vermelho extremo, relacionando o fotoblastismo destas sementes com a atividade do fitocromo. Pelos dados apresentados na figura 8, verifica-se que a luz branca contínua inibiu a germinação em relação aos outros tratamentos. A exposição ao vermelho extremo por 24 horas, inibiu a germinação significativamente no 4º dia de observação, quando comparada com a germinação no escuro e com o tratamento com luz vermelha por 24 horas.

Não houve diferenças significativas entre os tratamentos de escuro contínuo e luz vermelha, no decorrer do experimento.

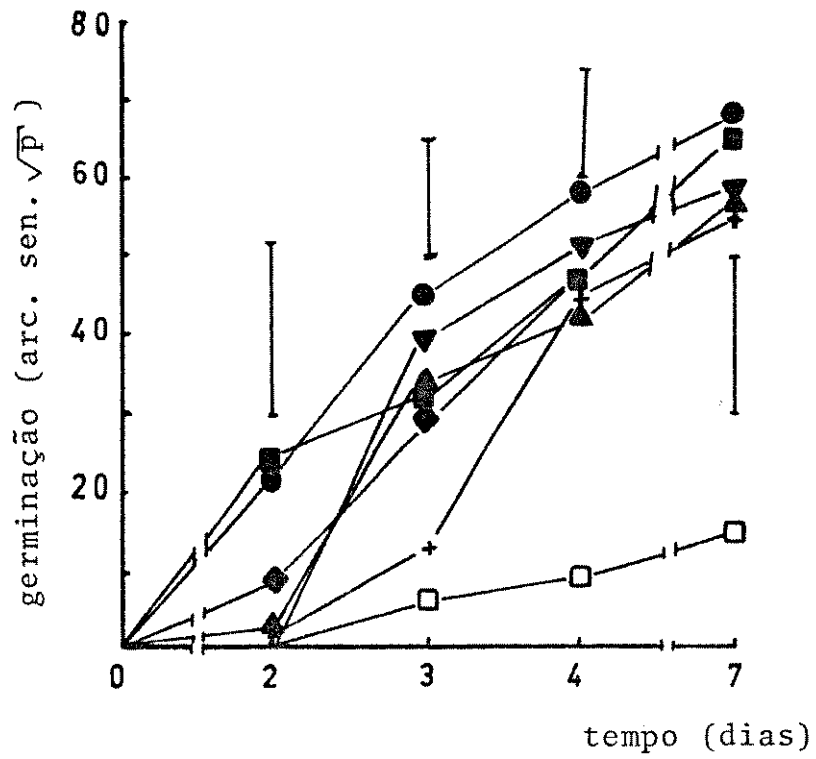


FIGURA 7 - Efeito de diferentes períodos de luz na germina o de R. communis.

- | | |
|---------------------|--------------|
| □ - luz contínua | ▼ - 16 horas |
| ■ - escuro contínuo | ◆ - 24 horas |
| ▲ - 8 horas | + - 48 horas |
| ● - 12 horas | |

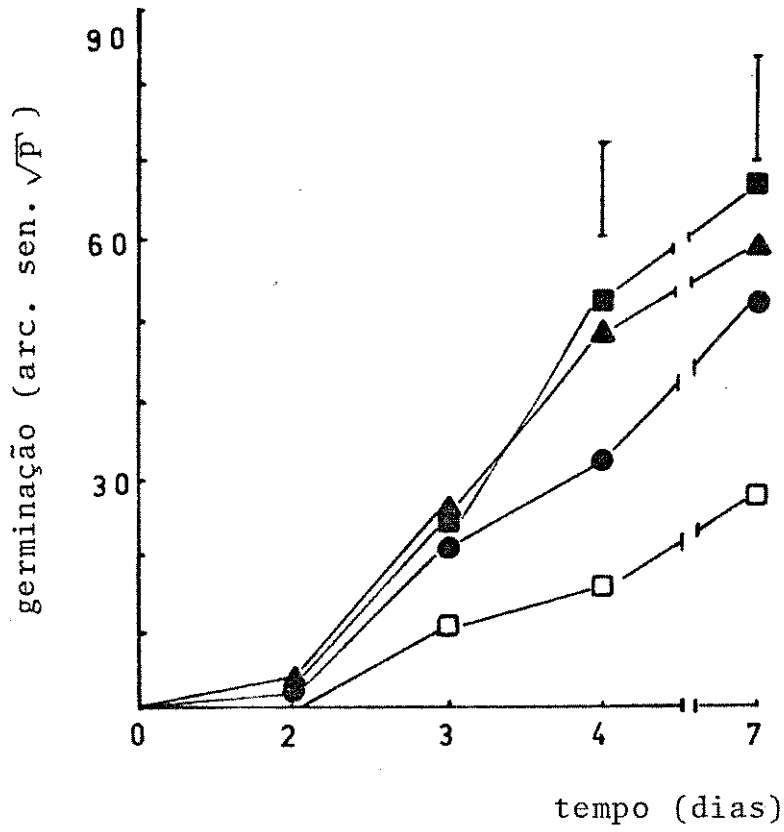


FIGURA 8 - Efeito de luz monocromática na germinação de R. communis.

□ - luz

▲ - vermelho

■ - escuro

● - vermelho extremo

Foi analisada a velocidade de germinação destes resultados pelo cálculo do tempo médio de germinação (\bar{t}), adotando-se a expressão apresentada por Labouriau (1967):

$$\bar{t} = \frac{\sum_{i=0}^{i=g} P_i \cdot t_i}{G}$$

t_1 = tempo de germinação;

t_g = tempo máximo de germinação;

t_0 = tempo mínimo de germinação;

P_i = porcentagem de germinação no tempo t_i ;

G = capacidade de germinação (máxima porcentagem de germinação atingida)

Os resultados mostraram que as sementes de Ricinus communis são fotoblásticas negativas acima de 20°C, razão pela qual os experimentos seguintes foram realizados no escuro.

3. Temperatura

3.1. Efeito de temperaturas constantes

Na verificação do efeito de diferentes temperaturas na germinação de mamona, pode-se observar que a temperatura de 10°C foi totalmente inibitória (fig. 9).

Pela análise do \bar{t} verificou-se que as sementes que receberam o tratamento de vermelho extremo, apresentaram uma menor velocidade de germinação, quando comparadas com as que receberam tratamento de vermelho e escuro contínuo. As sementes que foram mantidas em luz branca, foram as que apresentaram a menor velocidade de germinação (tabela 1).

Tabela 1 - Efeito de luz monocromática na velocidade de germinação de sementes de R. communis

	tempo médio de germinação (dias)
escuro	1.75
vermelho	1.75
vermelho extremo	2.25
luz branca	3.2

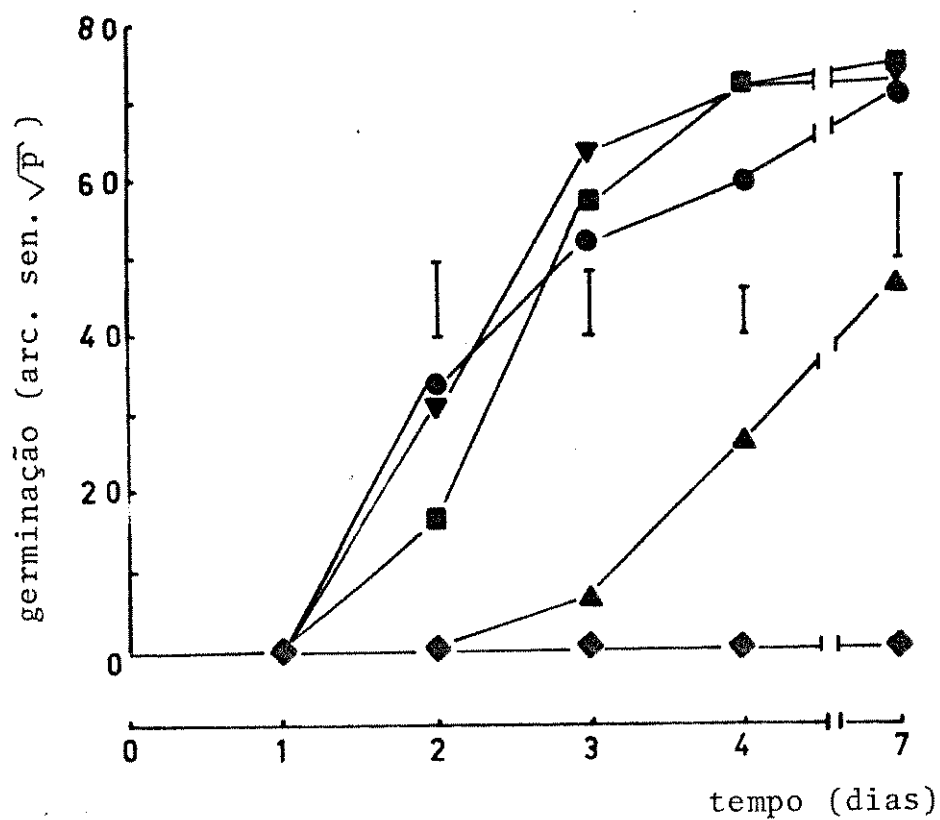


FIGURA 9 - Efeito de temperaturas constantes na germinação de R. communis no escuro.

- ◆ - 10°C
- ▲ - 20°C
- - 25°C
- ▼ - 30°C
- - 40°C

Na temperatura de 20°C a germinação se inicia só a partir do 3º dia de observação, chegando ao 7º dia aproximadamente, a 50%. A 25°C observa-se que no 2º dia a germinação foi menor que a observada a 30°C e 40°C. Entre as temperaturas de 30°C e 40°C, houve uma maior porcentagem na temperatura de 30°C apenas no 3º dia de observação.

3.3. Efeito de choques de temperatura

Na análise do efeito de choques de 6 horas de temperaturas altas e baixas realizados 24 horas após o início da embebição, verificou-se que a germinação não foi afetada significativamente, em relação a germinação a 25°C constante (fig. 10).

4. Tegumento

4.1. Efeito da escarificação

Como foi mostrado que a remoção do tegumento promove a germinação de sementes de mamona (item 2.2.), tentou-se verificar que tipos de impedimentos o tegumento poderia estar exercendo, sabendo-se que a protrusão da radícula ocorre na região da carúncula.

Verificou-se qual o efeito, na germinação, da remoção de partes do tegumento em diferentes regiões em relação ao embrião.

Sementes onde foi retirada parte do tegumento na região

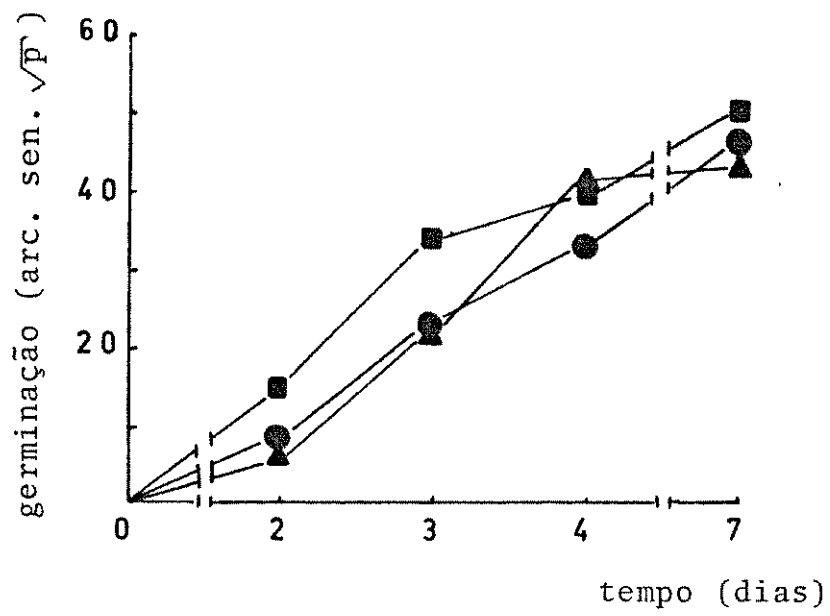


FIGURA 10 - Efeito de choques de temperatura na germinação de R. communis.

■ - 25°C constante

▲ - 10°C

● - 40°C

oposta à carúncula, não apresentaram diferença significativa na germinação, quando comparadas com o controle (fig. 11-A). Quando a escarificação foi realizada em baixo da carúncula, observa-se uma promoção da germinação em relação ao controle. Esta diferença só não foi significativa no último dia de observação (fig. 11-B).

Os resultados apresentados na figura 12-A, mostram que a escarificação ao lado da região da carúncula, quando esta foi mantida, não alterou significativamente a germinação em relação às sementes intactas. Quando este mesmo tipo de escarificação foi testado, retirando-se a carúncula, obteve-se uma promoção significativa em relação à germinação de sementes intactas, durante todo o experimento (fig. 12-B).

4.2. Carúncula

4.2.1. Idade das sementes

Em vários experimentos observaram-se, muitas vezes resultados contraditórios quanto ao efeito da presença da carúncula. A idade das sementes pareceu ser um dos possíveis responsáveis por este efeito.

Na figura 13-A, observa-se que a retirada da carúncula em sementes recém-colhidas, tem um efeito promotor da germinação, estatisticamente significativo no 4º dia de observação. Em sementes com 4 meses de idade (fig. 13-B), verifica-se este efeito no 2º e 3º dias. Nas sementes com 8 meses de idade, este efeito aparece no 2º dia de observação (fig. 14-A). Na figura 14-B, quando foi verificado o efeito da retirada da carúncula em se-

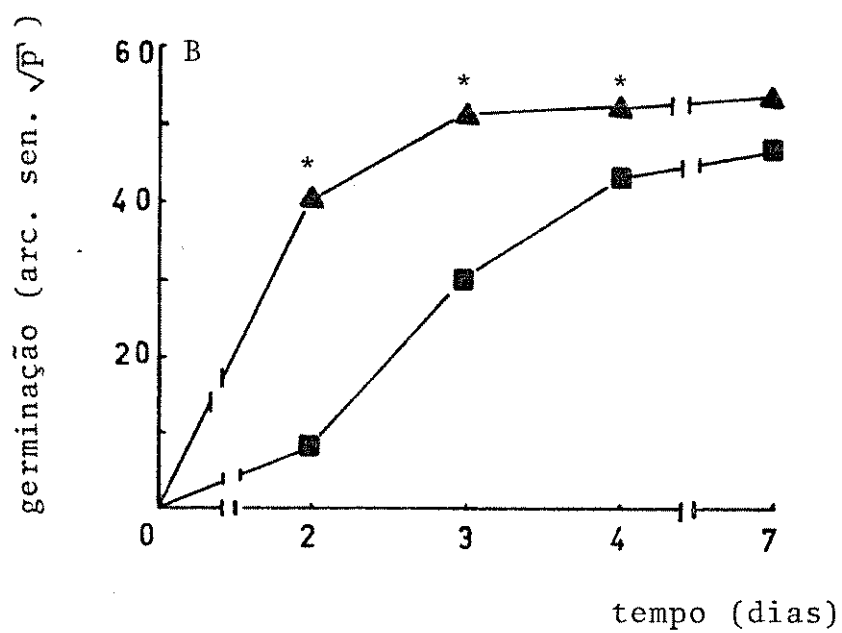
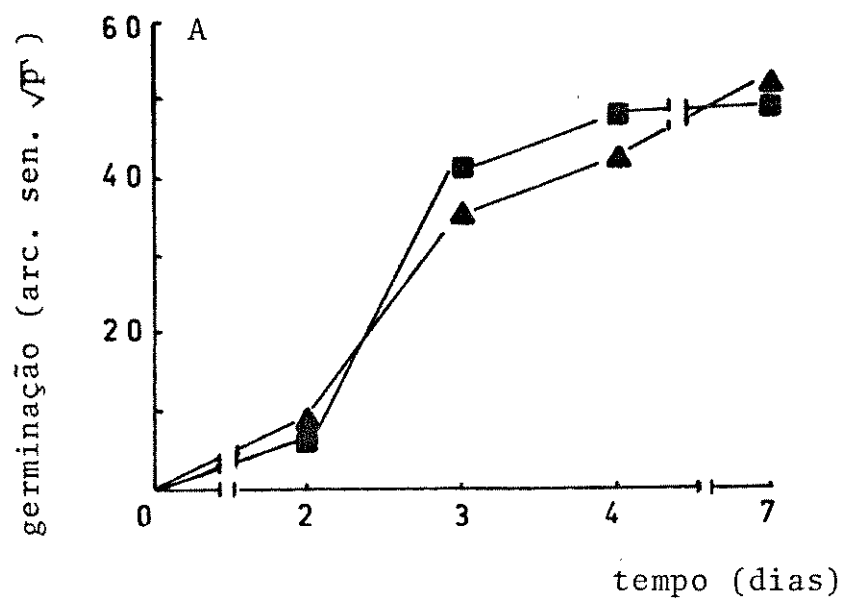


FIGURA 11 - Efeito da escarificação na germinação de sementes de *R. communis*.

A - escarificação no lado oposto à carúncula.

B - escarificação em baixo da carúncula

■ - intactas (controle) ▲ - escarificadas

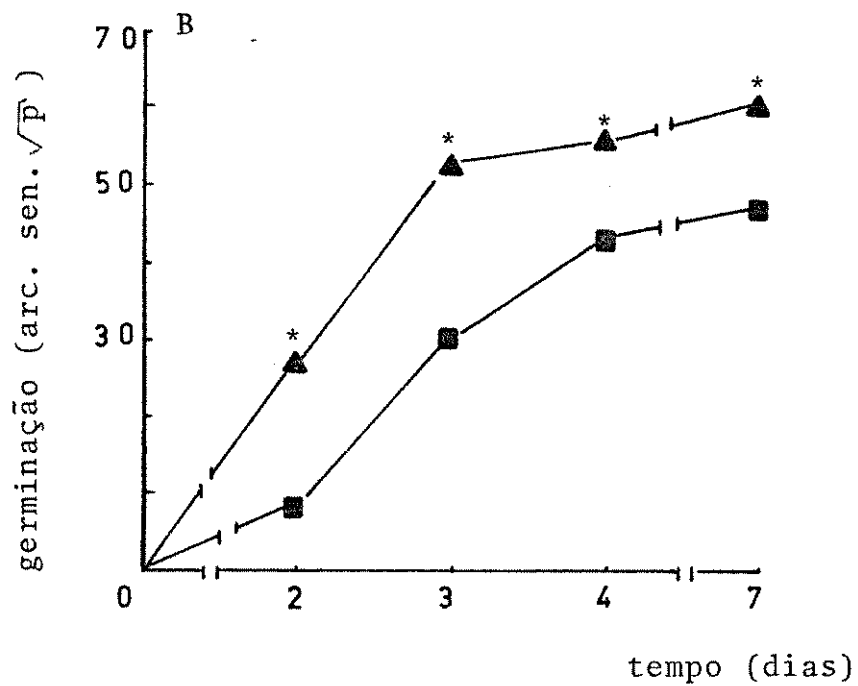
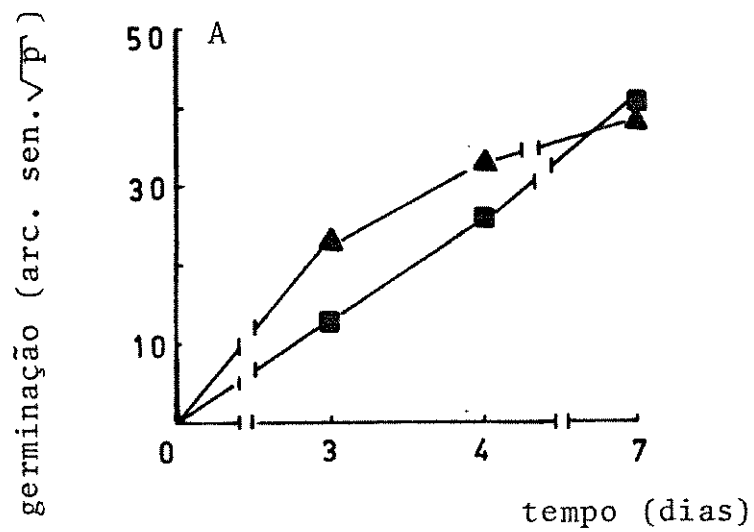


FIGURA 12 - Efeito da escarificação na germinação de sementes de R. communis.

A - escarificação ao lado da carúncula mantendo-a

B - escarificação ao lado da carúncula retirando-a

■ - intactas (controle)

▲ - escarificadas

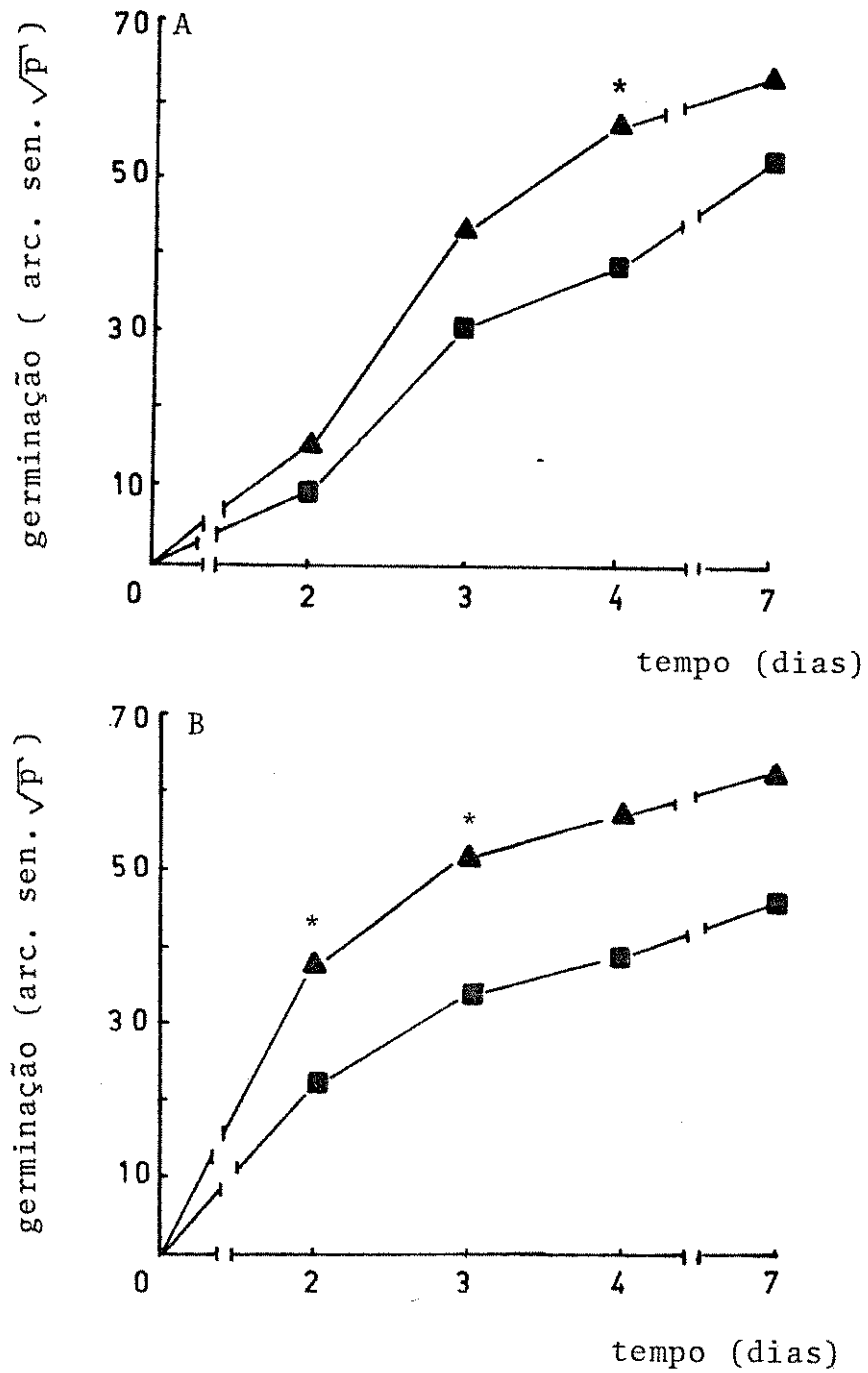


FIGURA 13 - Efeito da carúncula na germinação de sementes de *R. communis* recém colhidas (A), e com 4 meses após a colheita (B).

■ - intactas

▲ - sem carúncula

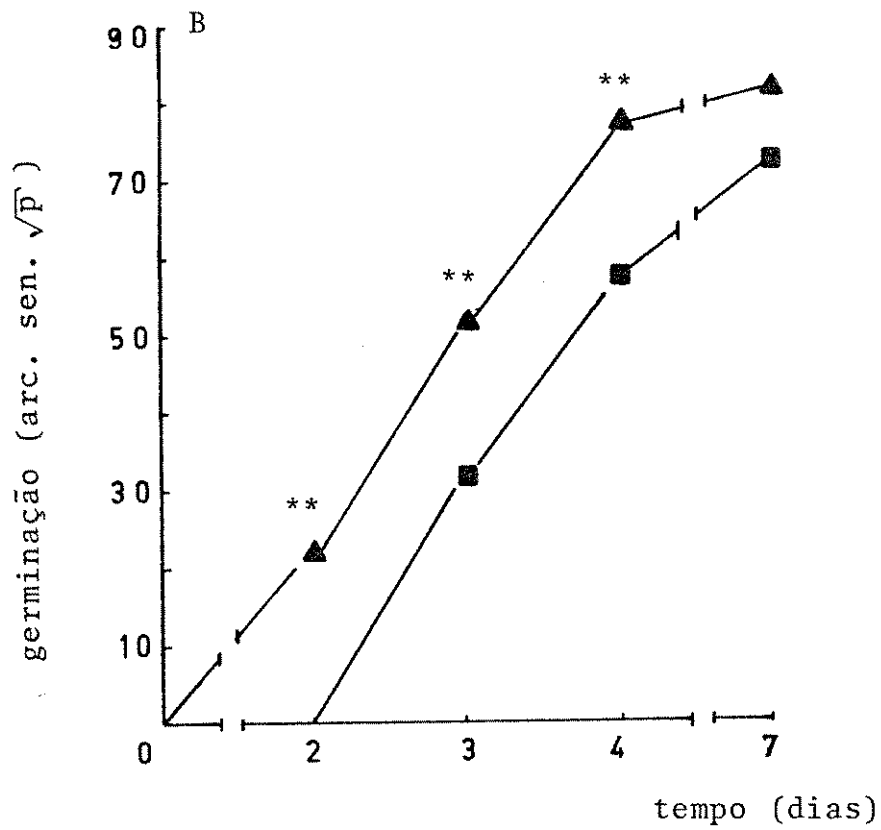
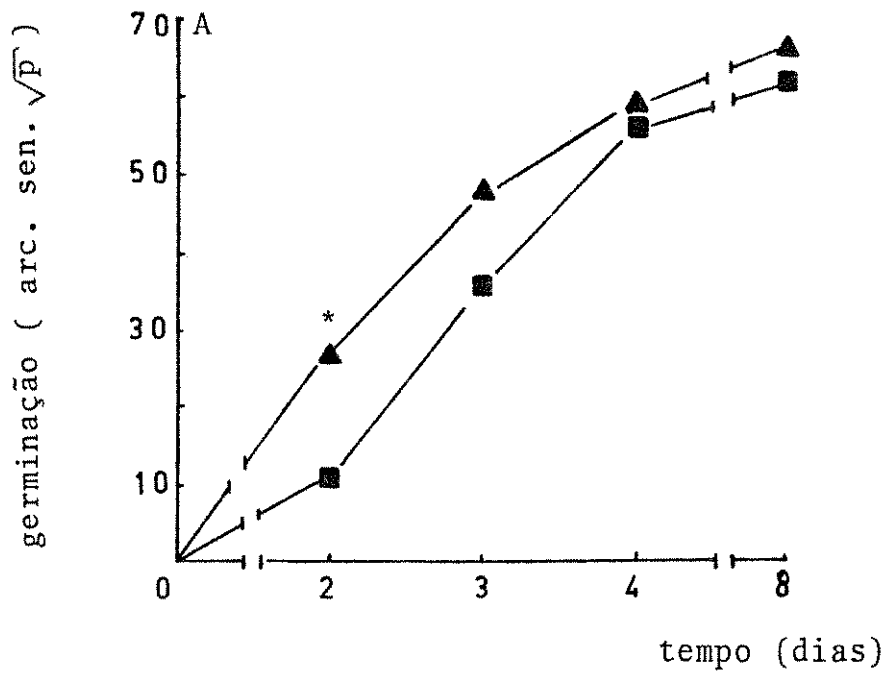


FIGURA 14 - Efeito da carúncula na germinação de sementes de R. communis com 8 meses (A) e 1 ano (B) após a colheita

■ - intactas ▲ - sem carúncula

mentes com 1 ano após a colheita, verificou-se uma promoção da germinação durante o 2º, 3º e 4º dias de observação. No 7º dia esta diferença não é mais significativa.

Analisando estes resultados, observa-se que o efeito promotor da remoção da carúncula, foi mais intenso em sementes com 1 ano após a colheita.

4.2.2. Impermeabilização da região da carúncula

Na tentativa de se verificar se a carúncula exerce uma barreira às trocas gasosas, uma vez que foi mostrado que ela não impede a entrada de água (item 1), testou-se a germinação de sementes impermeabilizadas com parafina nesta região. Na figura 15, verifica-se que as sementes com parafina, tiveram a sua germinação inibida significativamente, quando comparada com a germinação de sementes com ou sem carúncula.

4.2.3. Água de lixiviação de carúnculas na germinação de diferentes espécies

Para verificação da presença de substâncias inibidoras na carúncula, testou-se a germinação de algumas espécies de sementes em presença da água de lixiviação de carúnculas.

Pela tabela 2 observa-se que a água de lixiviação de carúnculas, teve um efeito inibitório significativo na germinação de sementes de mamona. Verifica-se também, que não houve nenhum efeito significativo na germinação das outras sementes testadas.

Em todas as sementes tratadas com água de carúnculas,

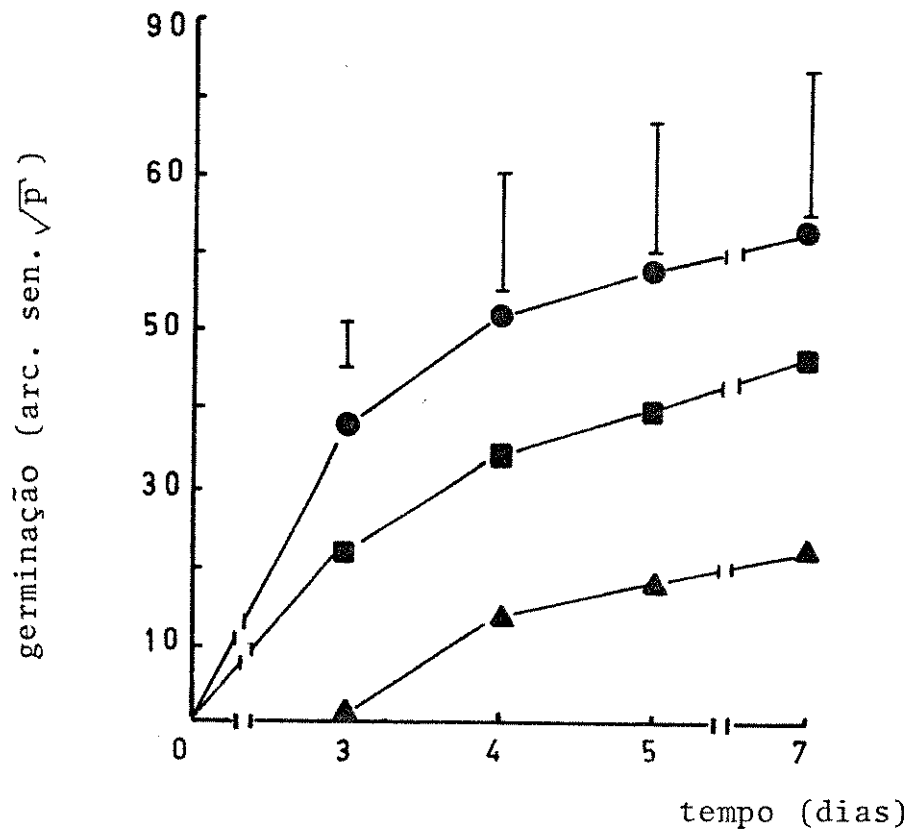


FIGURA 15 - Efeito da impermeabilização da região da carúncula na germinação de R. communis.

- - intactas
- - sem carúncula
- ▲ - com parafina

Tabela 2 - Efeito da água de lixiviação de carúnculas, na germinação de sementes de várias espécies.

	DIAS DA OBSERVAÇÃO	arco seno \sqrt{p}	
		CONTROLE	TRATADO
mamona	3º	49.0	22.8*
alface	2º	88.0	88.0
tomate	7º	84.2	80.0
<u>Rumex</u>	7º	84.2	82.0
<u>Cucumis</u>	7º	84.2	84.2

observou-se uma intensa presença de pelos nas radículas.

4.2.4. Água de lixiviação de carúnculas no desenvolvimento de plântulas de mostarda

A grande quantidade de pelos radiculares desenvolvidos nas sementes germinadas em presença de água de lixiviação de carúnculas (item 4.2.3), sugeriu a presença de etileno nesta água. Para testar esta hipótese, verificou-se o efeito da água de lixiviação de carúnculas na manutenção do gancho plumular de plântulas de mostarda crescidas na luz, um efeito de etileno, em comparação a plântulas crescidas em água e etrel. Na tabela 3, verifica-se que o etrel mantém o gancho plumular das plântulas crescidas na luz, quando comparadas com as do escuro. Porém, a água de carúnculas não teve o mesmo efeito, mostrando resultado semelhante ao obtido com água destilada.

Observou-se que estas plântulas, crescidas tanto na luz como no escuro, apresentaram um crescimento de hipocótilo maior do que o dos seus controles (tab. 4). As plântulas tratadas com água de lixiviação de carúnculas, crescidas na luz, apresentaram um aumento visível de tamanho de cotilédones. Estes resultados foram expressos em peso fresco (tab. 4).

4.2.5. Substâncias endógenas

Para verificação do tipo de substâncias endógenas presentes em extratos de carúnculas, procedeu-se à extração e biotestes das diferentes frações.

a) Fração ácida

TABELA 3 - Efeito da água de lixiviação de carúnculas no gancho plumular de plântulas de mostarda.

	plântulas com gancho plumular (%)	
	luz	escuro
água	0	100
extrato	0	100
etrel (25ppm)	100	100

TABELA 4 - Efeito da água de lixiviação de carúnculas no desenvolvimento de plântulas de mostarda.

	peso fresco de cotilédones (mg)	comprimento de hipocótilo (cm)	
		luz	escuro
água (controle)	4.7	11.1	16.9
extrato	11.24 **	18.6 **	42.8 **

Nas frações ácidas de carúnculas recém-colhidas, não se observa nenhuma promoção ou inibição significativa a 5%, mostrando que com a quantidade de material usada, não se conseguiu detectar nenhuma atividade no crescimento do hipocótilo de alface (fig. 16-A). Porém, nas frações ácidas de carúnculas de sementes de 1 ano após a colheita, verifica-se um pico de atividade giberelínica, estatisticamente significativo, na faixa entre os Rfs 0.7 e 0.8 (fig. 16-B), com atividade quantitativamente menor do que a encontrada para uma solução de GA₃ a 10⁻⁷ M.

b) Fração neutra

O bioteste da fração neutra de extratos de carúnculas de sementes recém-colhidas (fig. 17-A), não apresentou nenhuma atividade inibidora ou promotora significativa a 5%.

Em fração neutra de carúnculas de 1 ano, observa-se uma inibição do crescimento do hipocótilo, estatisticamente significativa, na faixa compreendida entre Rfs 0.5 e 0.7 (fig. 17-B).

c) Fração básica

Na análise da porcentagem de aumento do peso fresco de cotilédones de rabanete em presença de fração básica de extrato de carúnculas de sementes recém-colhidas, verifica-se a presença de substâncias com atividade citocinínica entre os Rf 0.8 e 1.0 (fig. 18-A).

Comparando-se estes resultados com os obtidos para extratos de carúnculas de sementes de 1 ano após a colheita, pode-se verificar que houve uma mudança qualitativa de substâncias citocinínicas em extratos de carúnculas mais velhas (fig. 18-B). Observa-se também que neste extrato, detectou-se uma maior quantidade

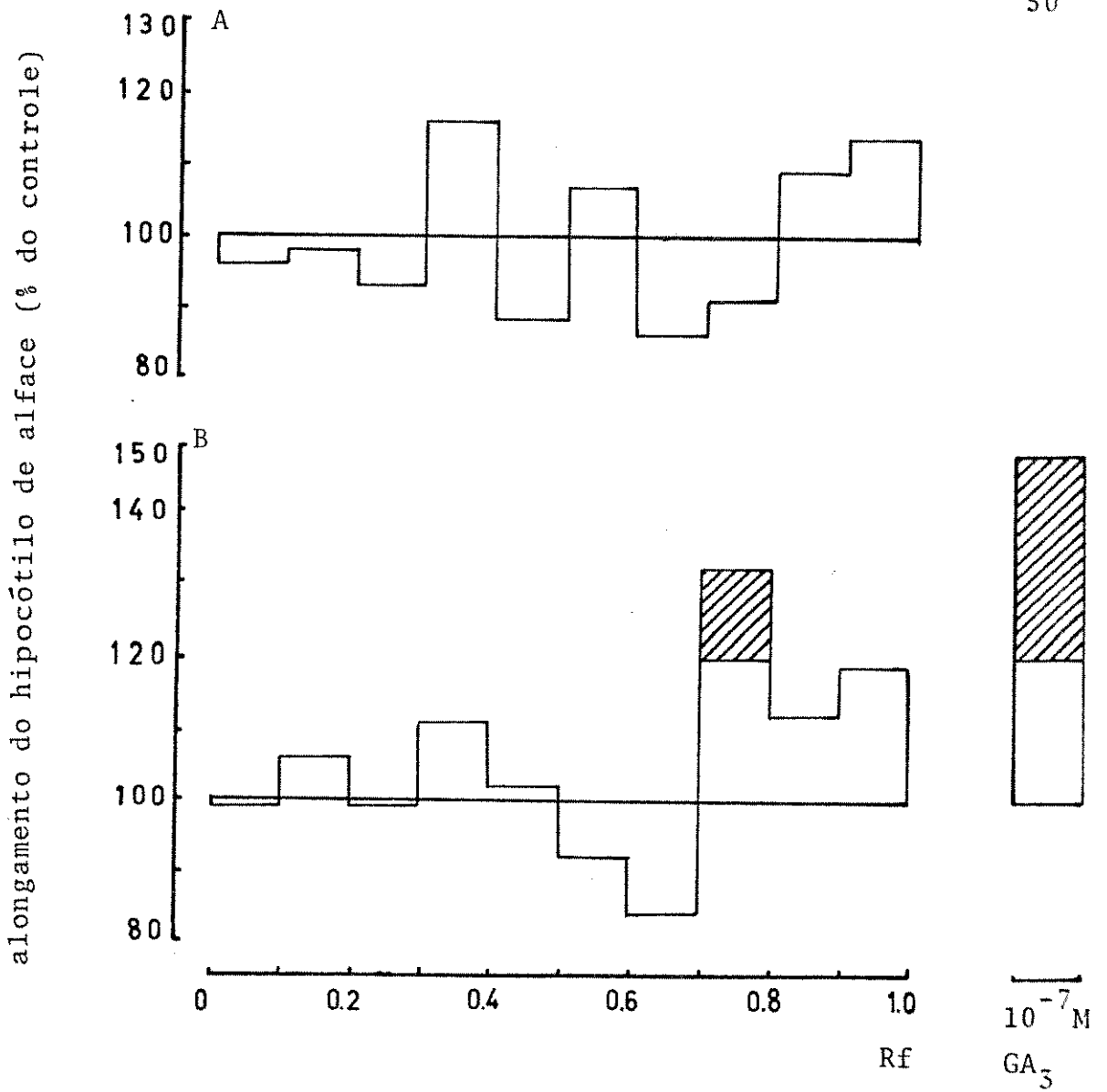


FIGURA 16 - Efeito de frações ácidas de carúnculas de sementes de R. communis com diferentes idades, no alongamento de hipocótilos de alface.

A - recém-colhidas

B - 1 ano após a colheita

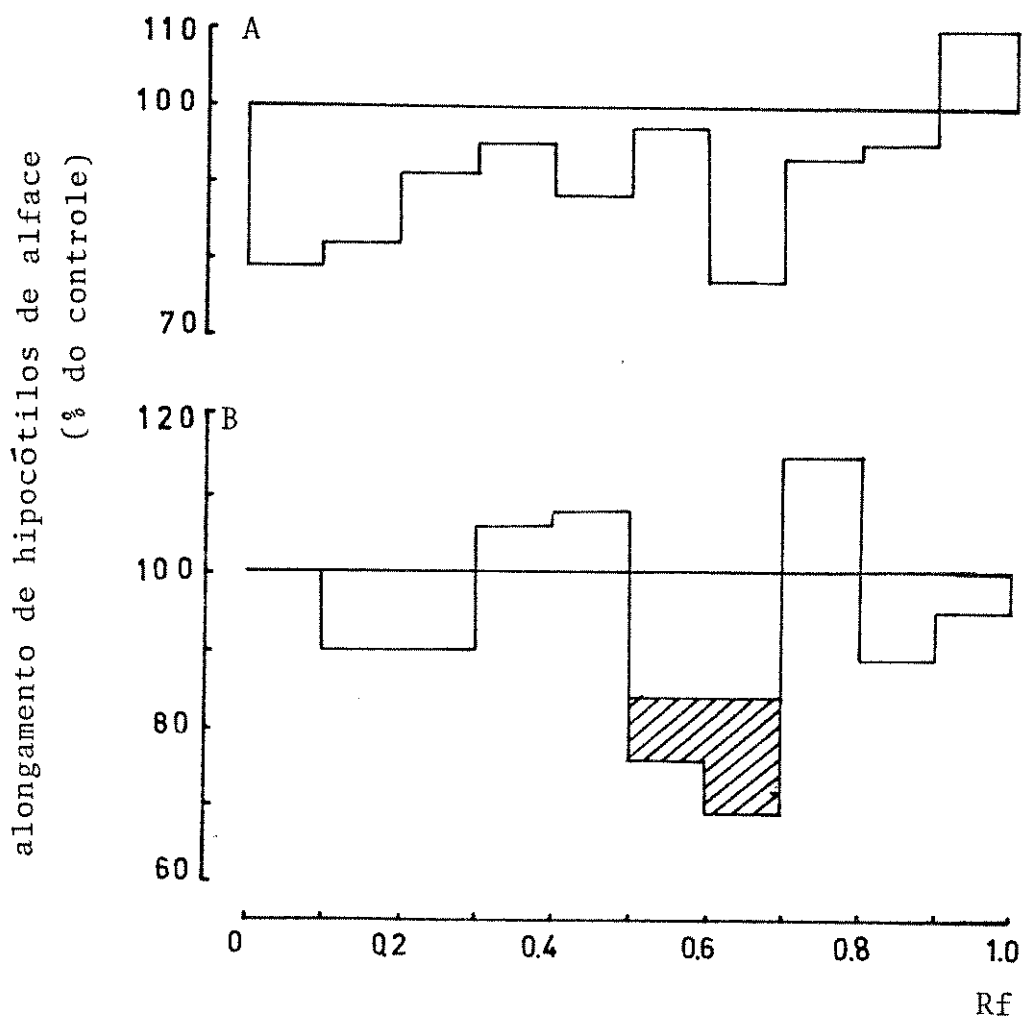


FIGURA 17 - Efeito de frações neutras de carúnculas de sementes de R. communis com diferentes idades, no alongamento de hipocótilos de alface.

A- recém-colhidas

B-1 ano após a colheita

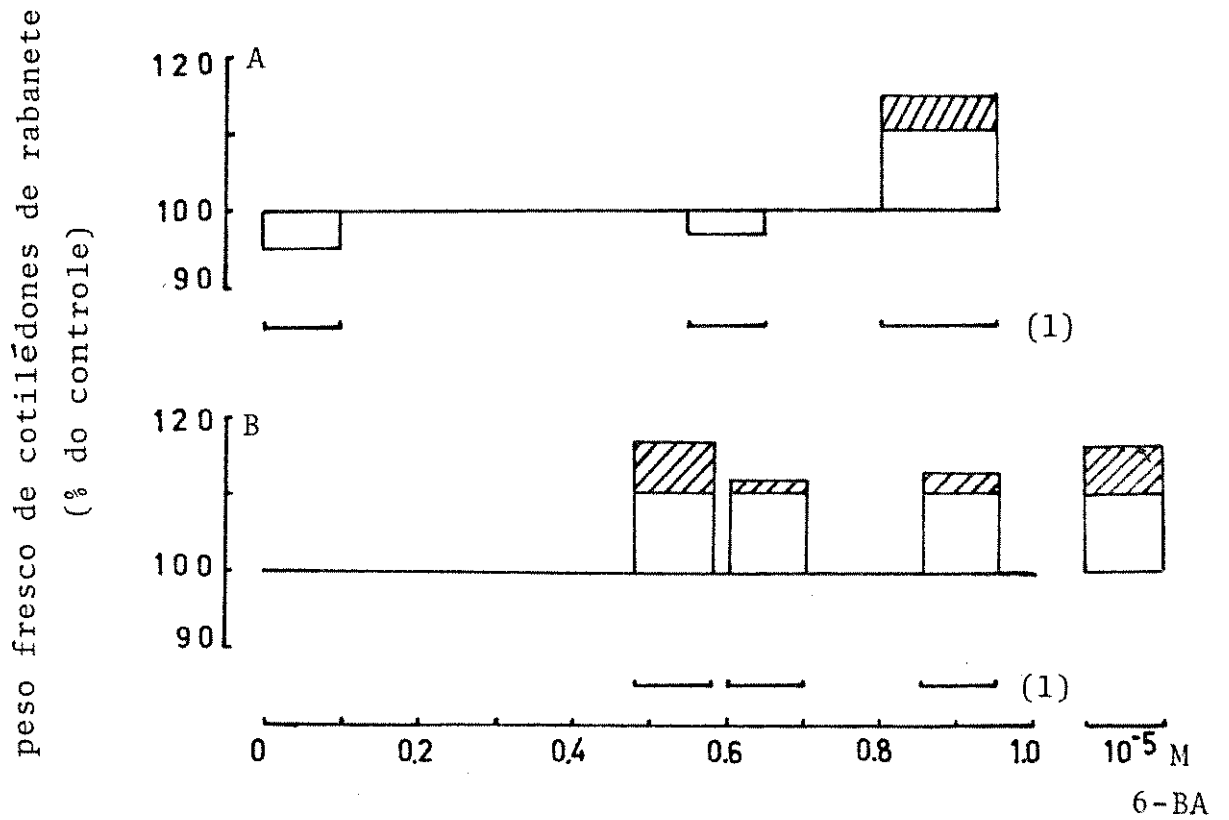


FIGURA 18 - Efeito das frações básicas de carúnculas de sementes de R. communis com diferentes idades, no crescimento de cotilédones de rabanete.

A - recém-colhidas

B - 1 ano após a colheita

(1) faixas com reação positiva ao reagente de Wood.

total de substâncias com atividades citocinínicas, quando comparada com o extrato de carúnculas de sementes recém-colhidas. A concentração de 6-BA testada promoveu o crescimento dos cotilédones de rabanete 20% em relação ao controle.

d) Substâncias fenólicas

Na tentativa de verificar se o efeito da carúncula na germinação de sementes de mamona, era devido à presença de substâncias fenólicas, realizou-se um bioteste na tentativa de se detectar atividade deste grupo de substâncias.

Na tabela 5, onde estão apresentados os resultados do bioteste de crescimento do hipocótilo de alface, verificou-se uma inibição significativa nas plântulas crescidas no extrato de carúnculas, quando comparadas com o controle.

5. Lixiviação

5.1. Germinação de sementes lixiviadas

Verificou-se o efeito de diferentes períodos de lixiviação na germinação de sementes de mamona. Na figura 19, verifica-se que a lixiviação das sementes por 6 horas (fig. 19-A), 24 horas (fig. 19-B) e por 48 horas (fig. 19-C), provocou uma forte inibição na germinação das sementes, que praticamente não foi aumentada com o aumento do período de lixiviação.

5.2. Germinação em água de lixiviação de sementes

Os resultados anteriores mostraram que a lixiviação inibe a germinação de sementes de mamona. Então testou-se o efeito

Tabela 5 - Efeito do extrato fenólico de carúnculas de sementes de R. communis, no crescimento de hipocótilos de alface.

ALONGAMENTO DE HIPOCÓTILOS DE ALFACE (mm)	
controle	13.12
extrato	10.72*

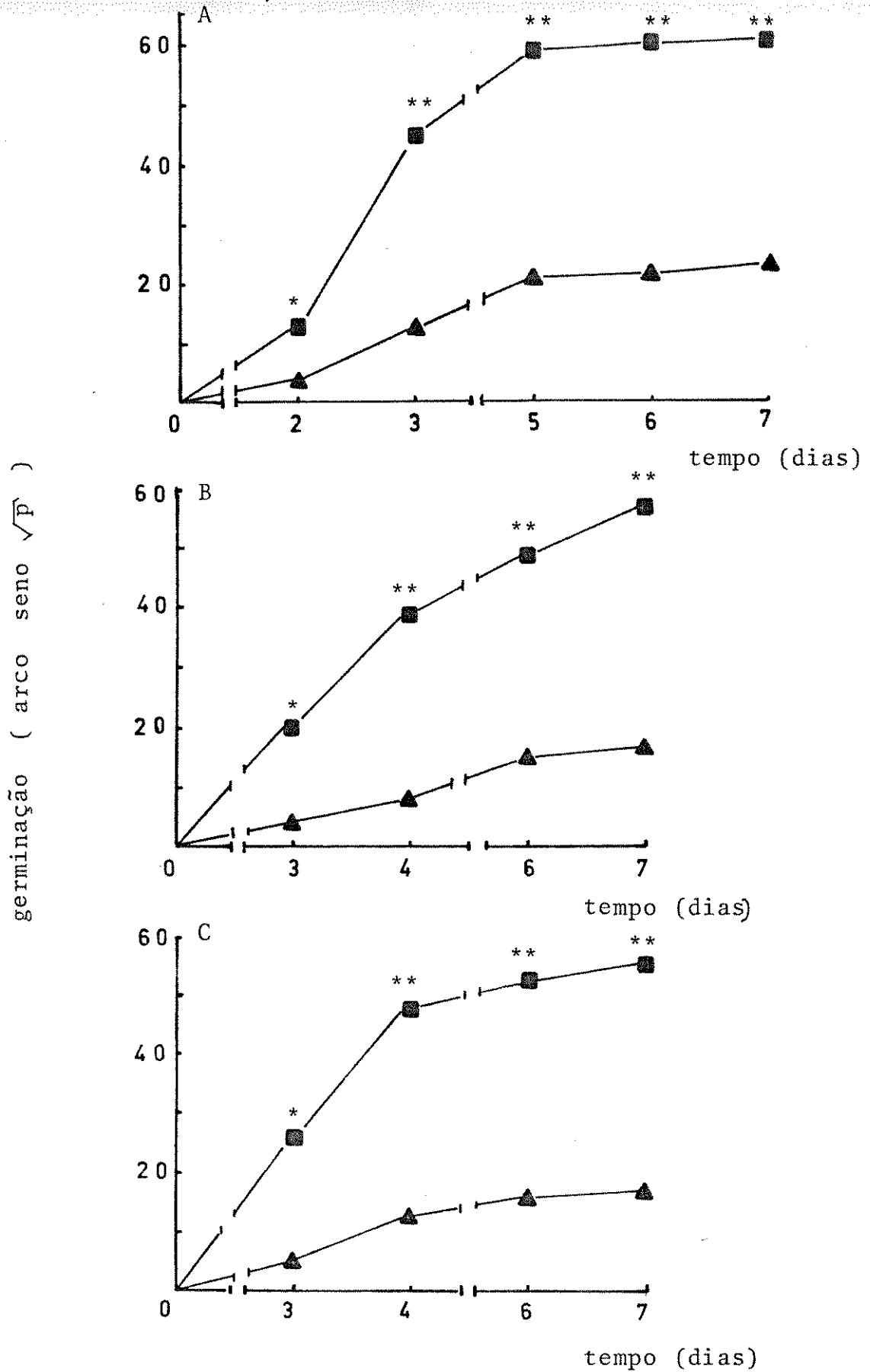


FIGURA 21 - Efeito de diferentes períodos de lixiviação na germinação de R. communis.

A - 6 horas

B - 24 horas

C - 48 horas

■ - controle

▲ - sementes lavadas

da água de lixiviação na germinação de sementes não lavadas na tentativa de detecção de algum promotor da germinação.

Na figura 20 pode-se observar esta promoção que é estatisticamente significativa no 7º dia de observação, quando comparada com o controle.

5.3. Substâncias endógenas em sementes lixiviadas

Para verificação do tipo de substâncias que poderiam estar sendo lixiviadas, compararam-se as diferentes frações de sementes secas e lavadas.

5.3.1. Fração ácida

Na figura 21-A, B e C estão representados os resultados obtidos nos biotestes de frações ácidas de sementes secas, lavadas por 24 horas e 48 horas, respectivamente.

Não foi observada, em nenhum dos 3 tratamentos, atividade giberelínica significativa em relação ao controle. Nestes resultados evidenciam-se inibidores com diferente mobilidade neste sistema de solventes, que podem ser agrupados em 2 faixas. A faixa I da origem até o Rf 0.4 e a faixa II deste ponto até a frente do cromatograma. Na computação da porcentagem total de inibição de cada faixa, obtida somando-se a atividade de todos os picos significativos (tab. 6), verifica-se que na faixa I, a inibição que não existia em sementes secas, aparece em níveis significativos nas sementes lavadas e aumenta com o tempo de lixiviação.

O inverso acontece na faixa II, onde a forte inibição ob

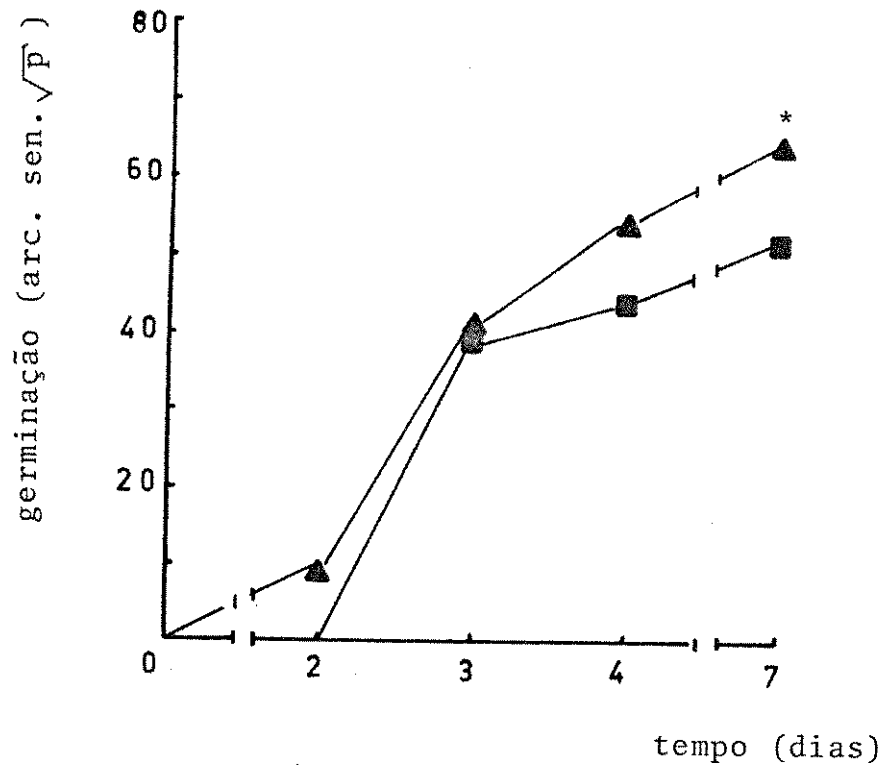


FIGURA 20 - Efeito da água de lixiviação de sementes de mamona, na germinação de sementes de R. communis.

■ - controle

▲ - tratado

FIGURA 21 - Efeito das frações ácidas de sementes de R. communis lavadas e não lavadas, no alongamento de hipocótilos de alface, (A) sementes não lavadas, (B) 24 horas e (C) 48 horas.

alongamento do hipocótilo de alface (% do controle)

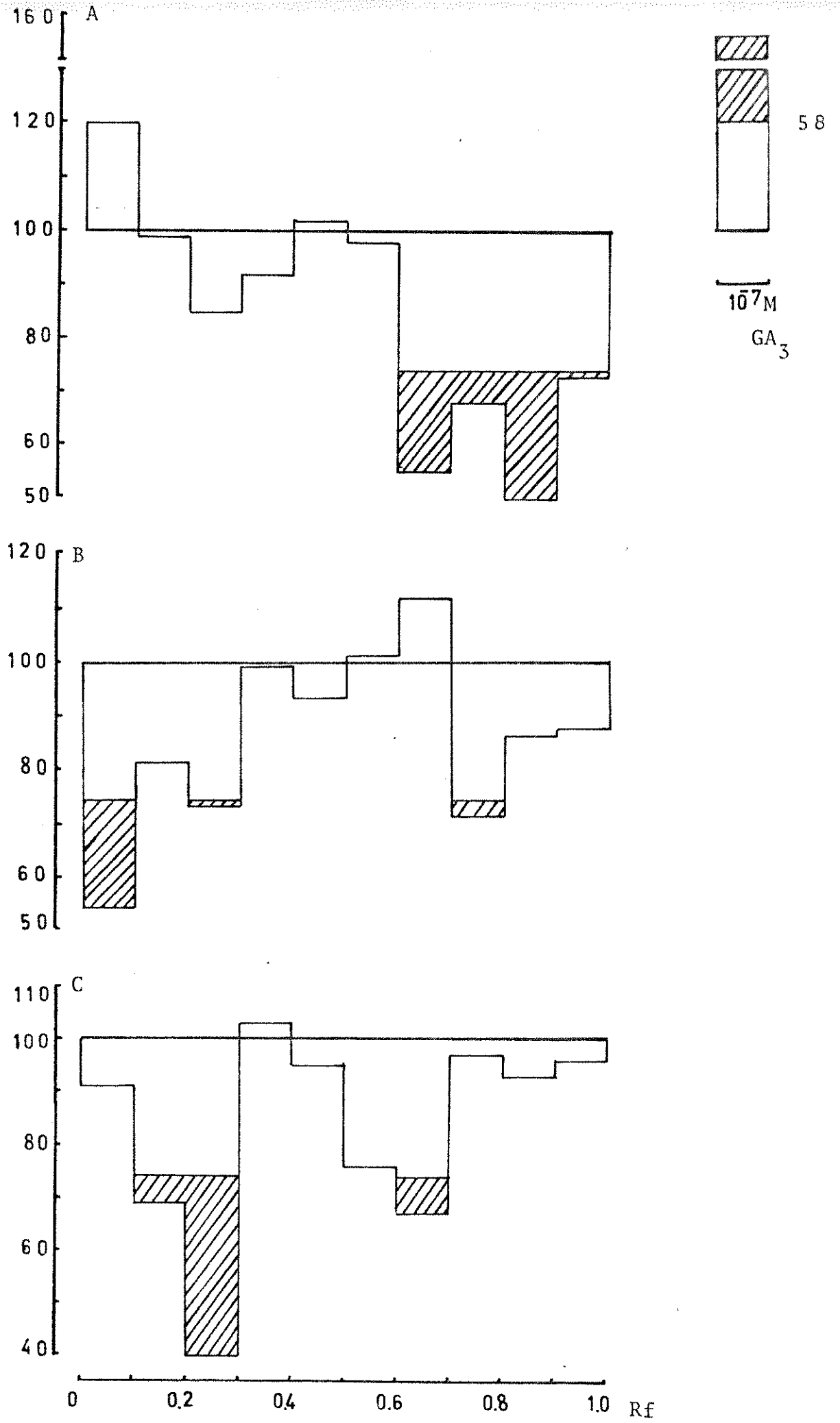


FIGURA 23

TABELA 6 - Porcentagem de inibição do crescimento de hipocóti-
los de alface em frações ácidas de sementes lavadas
por 24 e 48 horas e sementes não lavadas (0 horas).

	0 horas	24 horas	48 horas
faixa I	0	47	91
faixa II	128	29	33

servada nas sementes secas, diminui nas sementes com 24 e 48 horas de lavagem.

Na figura 22 estão representados os resultados dos biotestes com a faixa I, que foi recromatografada com outro sistema de solventes, tanto em sementes não lavadas (fig. 22-A) como em sementes lavadas por 48 horas (fig. 22-B). O nível de substâncias giberelínicas encontrado nas sementes secas na faixa de Rf 0.6-0.7, aparece bem menor nas sementes lixiviadas por 48 horas. Nesta última, verifica-se na faixa do Rf 0.5-0.6, a presença de um inibidor em nível significativo a 5% (fig. 22-B). Nos biotestes realizados com a faixa II também após recromatografia em outro sistema de solvente com sementes não lavadas e lavadas por 24 e 48 horas (fig. 23-A, B e C), verifica-se uma atividade giberelínica na faixa de Rf 0.2-0.3 do extrato de sementes, que diminui nos extratos de sementes lavadas por 24 e 48 horas. Nas sementes secas, verifica-se uma pequena promoção significativa na faixa de Rf 0.9-1.0. Nos três tratamentos verifica-se uma inibição do alongamento do hipocótilo de alface na faixa do Rf 0.4-0.5.

5.3.2. Fração neutra

Comparando-se os resultados dos extratos de sementes secas com os de lavadas por 24 e 48 horas (fig. 24-A, B e C), pode-se observar a presença de inibidores nos três tratamentos. A inibição observada entre Rfs 0.9 e 1.0 de sementes secas (fig. 24-A), não foi observada nos outros tratamentos. Quando comparados os resultados das sementes secas e lavadas por 48 horas, verifica-se a presença de inibidores nos dois tratamentos nas faixas de Rf

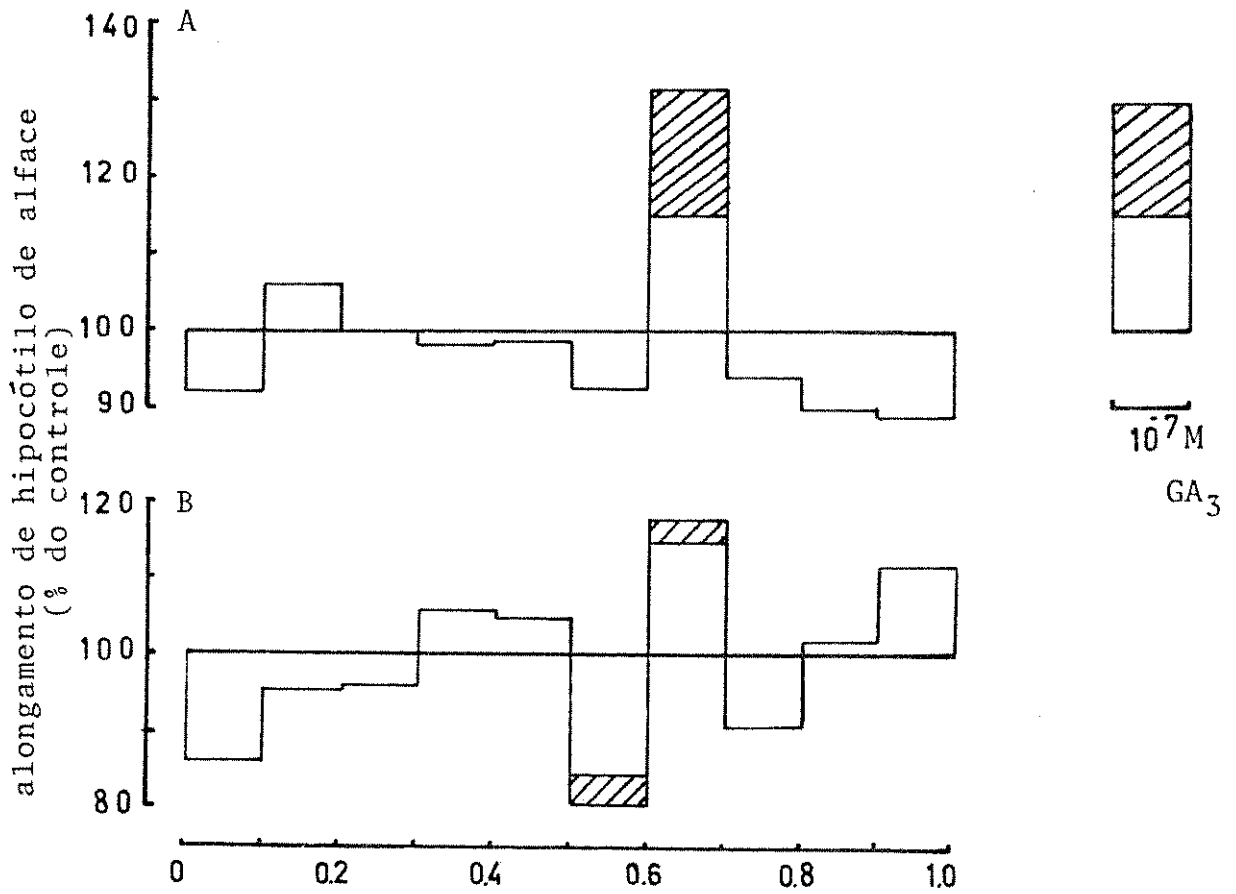


FIGURA 22 - Efeito de frações ácidas de sementes de R. communis (faixa I), no crescimento de hipocótilos de alface.
 A - sementes não lavadas
 B - sementes lavadas por 48 horas

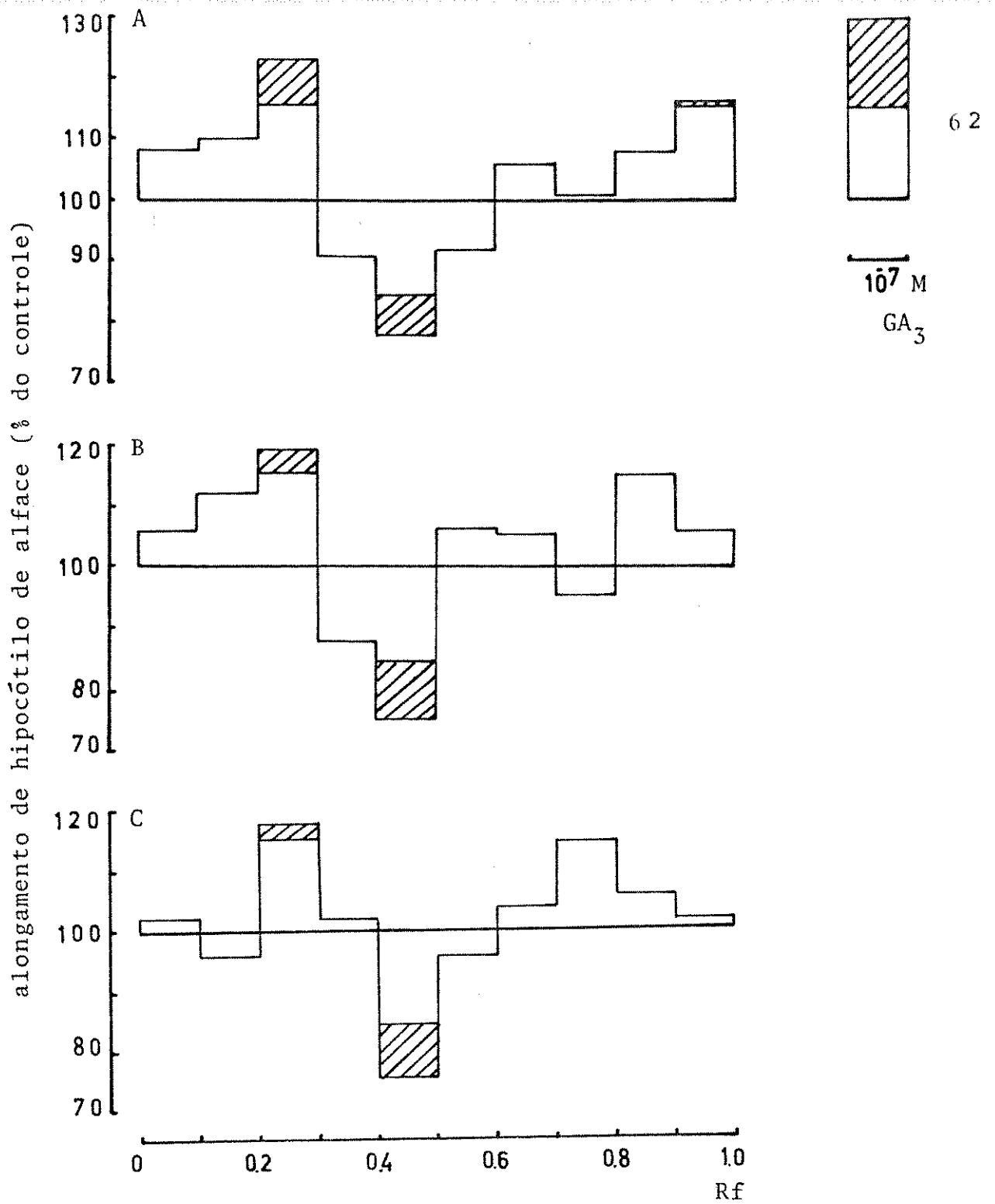


FIGURA 23 - Efeito de frações ácidas de sementes lavadas e não lavadas de R. communis (faixa II), no crescimento de hipocótilos de alfaca.

A - não lavadas

B - 24 horas

C - 48 horas

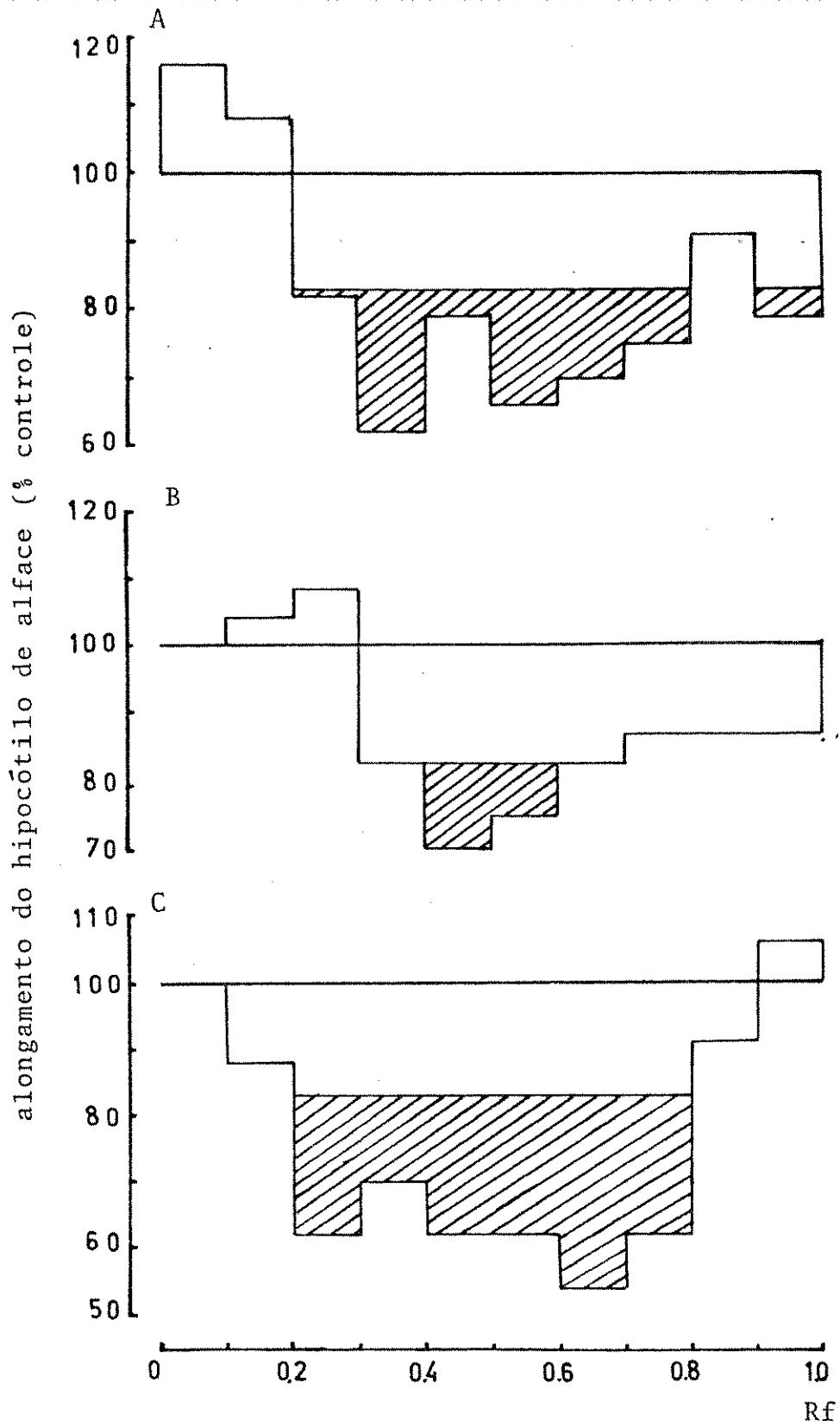


FIGURA 24 -Efeito das frações neutras de sementes de R. communis lavadas e não lavadas, no crescimento de hipocótilos de alface.

A - não lavadas

B - 24 horas

C - 48 horas

0.2-0.8, porém esses inibidores encontram-se em maiores níveis em extratos de sementes lavadas por 48 horas (fig. 24-A e C). Nas sementes de 24 horas de lavagem observou-se a presença destes inibidores, porém em níveis inferiores aos encontrados nos outros tratamentos (fig. 24-B).

5.3.3. Fração básica

Na figura 25 estão representados os resultados do aumento de peso fresco de cotilédones de rabanete, na presença de extratos de sementes lavadas e não lavadas.

Não se verificou a presença de atividade citocinínica em níveis estatisticamente significativos, no extrato de sementes não lavadas (fig. 25-A). Nas sementes lavadas por 24 horas, verifica-se a presença de substâncias citocinínicas na faixa do Rf 0.8 a 1.0 (fig. 25-B). Nas sementes lavadas por 48 horas esta promoção aparece na faixa do Rf 0.5 ao 0.7 (fig. 25-C). Os resultados mostram que a lavagem causa modificações tanto quantitativas como qualitativas nas substâncias com atividade citocinínicas.

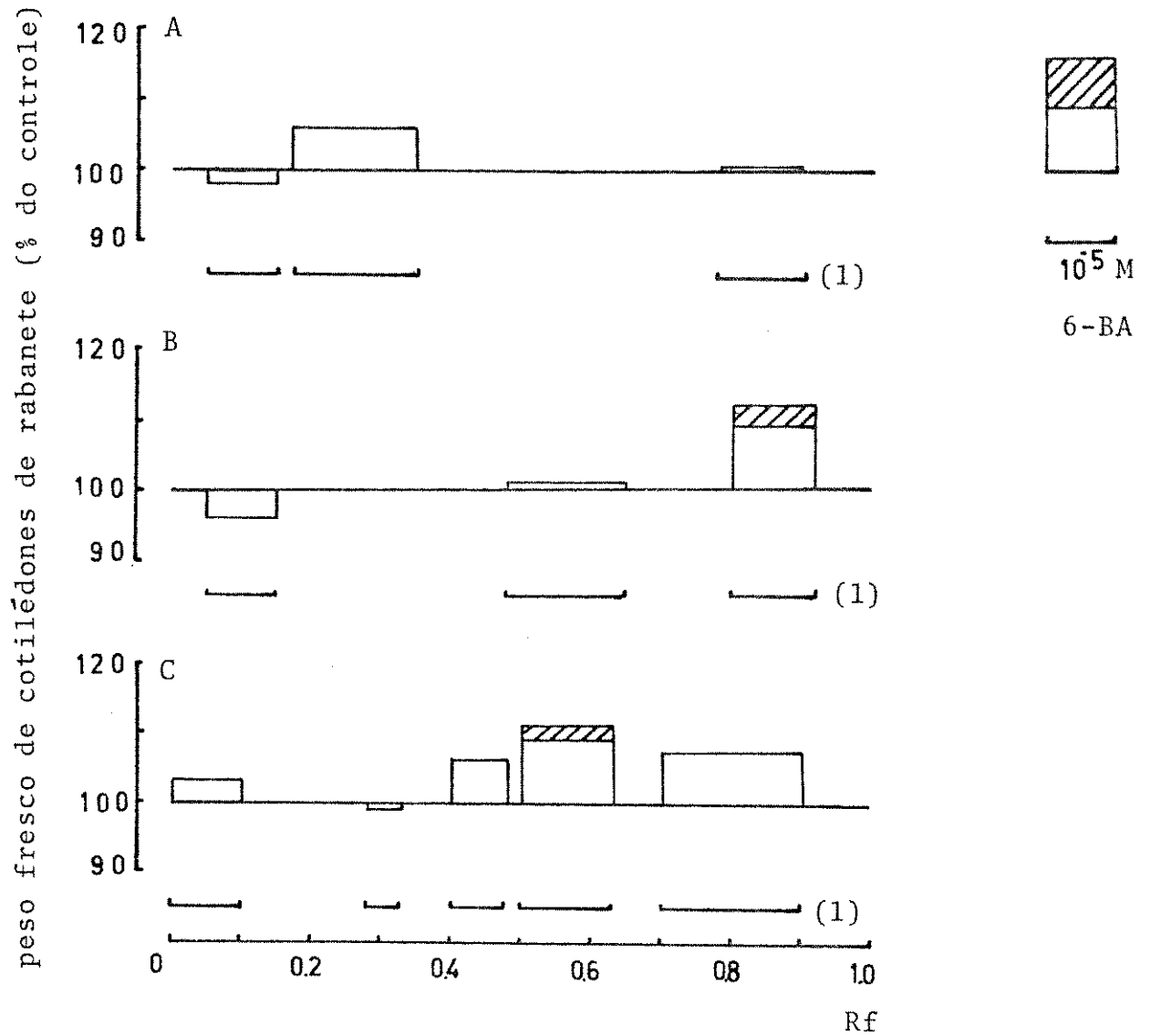


FIGURA 25 - Efeito das frações básicas de sementes não lavadas e lavadas, no crescimento de cotilédones de rabanete.

A - não lavadas

B - 24 horas

C - 48 horas

(1) faixas com reação positiva ao reagente de Wood.

IV. DISCUSSÃO

A germinação envolve a reativação, pela embebição de água, de sistemas que estão quiescentes desde o período da maturação da semente. A hidratação dos tecidos de reserva e a ativação dos sistemas enzimáticos, dependem sobremaneira da velocidade de embebição (Jones e Armstrong, 1971).

As sementes de Ricinus communis com remoção total do tegumento, têm maior velocidade de embebição do que as sementes intactas. Este fato poderia justificar a maior germinação observada em sementes nuas. No entanto, o tegumento não deve ser totalmente impermeável à água, uma vez que o aumento da porcentagem de peso das sementes nuas na embebição é apenas ligeiramente maior do que o das sementes intactas, e sementes escarificadas e intactas embebem igualmente.

As sementes sensíveis à luz, somente respondem a esse estímulo quando embebidas e as respostas, além de serem influenciadas pela temperatura, o são também pelo tegumento (Wareing e Phillips, 1973). As sementes de R. communis (mamona), a 25°C, germinam melhor em ausência de luz sendo portanto fotoblásticas negativas, efeito este também verificado por Polo (1982). Este fotoblastismo é dependente da temperatura, pois a 20°C as sementes germinam igualmente na luz e no escuro. Este efeito foi também observado em Rumex spp, sendo que estas sementes, que são fotoblásticas positivas, podem germinar no escuro se forem tratadas com temperaturas altas (Isikawa e Fujii, 1961).

O tegumento parece também ter efeito no fotoblastismo de sementes de mamona. Escarificação na região oposta à carúncula,

não afetou a germinação de sementes mantidas no escuro, no entanto teve um efeito promotor em sementes mantidas em luz contínua. Este efeito do tegumento no fotoblastismo das sementes de mamona, se torna mais evidente quando se verifica a germinação de sementes nuas na luz. Estas sementes atingem porcentagens finais de germinação bem maiores do que as de sementes intactas germinadas nessas condições.

A presença ou não da carúncula, outro tipo de tegumento de mamona, não modificou o comportamento fotoblástico das sementes.

O fato das porcentagens finais de germinação das sementes que receberam choques de luz vermelha e vermelho extremo não serem diferentes, não descarta totalmente a possibilidade do envolvimento do fitocromo neste processo, uma vez que a velocidade de germinação das sementes tratadas com vermelho extremo, foi menor do que as tratadas com vermelho e escuro contínuo. Em alguns casos, como em Amaranthus caudatus e algumas variedades de alface, que germinam no escuro, para que a germinação seja inibida, é necessária uma prolongada iluminação de vermelho extremo. Esta dormência pode ser interrompida por uma única irradiação de curta duração de vermelho. Esta situação sugere que o Fve está aparecendo na semente no escuro, no decorrer de um longo período de tempo. Quando se transferem as sementes do vermelho extremo para o escuro, o Fve pode surgir a partir dos produtos intermediários (Kendrick e Frankland, 1981). Segundo Kendrick (1976), as sementes fotoblásticas negativas podem ser caracterizadas pela resposta a baixo nível de Fve para a indução da germinação. Assim, pequena proporção do fitocromo destas sementes, se apresenta em forma intermediária, que se transforma em Fve no escuro, proporcio-

nando a germinação nesta condição. Estes fatos podem justificar o pequeno efeito inibitório causado pelo vermelho extremo na germinação de sementes de mamona e a sua recuperação quando as sementes voltaram para o escuro. Talvez o período de luz (24 horas) na faixa do vermelho extremo, tenha sido curto para inibir totalmente a germinação. Quando as sementes voltaram para o escuro, o Fve pode ter sido formado a partir dos intermediários e a germinação promovida.

Quando as sementes foram postas para germinar em diferentes períodos de luz branca, observou-se que os tratamentos mais curtos do que 48 horas não foram suficientes para retardar o início da germinação, sendo que no final do experimento, não houve diferenças de porcentagem de germinação entre as sementes tratadas e as que ficaram no escuro contínuo. Embora 48 horas de luz tenha atrasado o início da germinação, esta foi inibida somente quando as sementes foram mantidas em luz contínua.

Na faixa de temperaturas em que uma semente germina, há geralmente uma temperatura ótima que é onde ocorre a maior porcentagem de germinação em menos tempo, acima ou abaixo da qual a germinação é retardada (Salgado-Laboriau, 1973). Em sementes de mamona a faixa de temperatura ótima para a germinação parece estar entre 25°C e 40°C.

As temperaturas dos choques testadas, não alteraram a germinação em relação a 25°C.

O tegumento das sementes pode regular a germinação por interferir em processos de absorção de água (embebição), no controle de entrada de oxigênio utilizado na respiração e processos oxidativos, na impermeabilidade a inibidores endógenos e na resistência ao crescimento do embrião (Koller et al., 1962). Em semen

tes de Rapanea guianensis por exemplo, a dormência é imposta por uma resistência mecânica causada pelo endocarpo, ao crescimento do embrião (Joly e Felipe, 1979). Sementes nuas de mamona germinam no escuro, melhor do que as sementes escarificadas, sugerindo que o tegumento destas sementes impede de alguma forma a germinação. No entanto, a escarificação no lado oposto à carúncula não teve efeito na germinação. Estes fatos sugerem que o tegumento pode exercer uma barreira ao crescimento do embrião já que a protrusão da radícula ocorre na região da carúncula. Fica descartada a possibilidade do tegumento impedir a entrada de água para o embrião, pois como já foi visto, não existe diferença na embebição entre sementes com este tipo de escarificação e sementes intactas, e a embebição de sementes nuas é apenas ligeiramente maior do que a das intactas. Quando a escarificação foi realizada ao lado da região da carúncula, só se obteve efeito promotor, quando esta foi retirada, sugerindo que o efeito obtido foi o da ausência da carúncula e não o da retirada do tegumento ao lado desta região. A escarificação em baixo da carúncula provocou um aumento da velocidade de germinação das sementes de mamona. Estes resultados reforçam a hipótese de que um dos efeitos do tegumento das sementes de R. communis é exercer uma barreira ao crescimento da radícula atrasando a germinação, já que o único tipo de escarificação efetivo na promoção da germinação, foi quando se retirou parte do tegumento na região onde ocorre a protrusão da radícula. Este mesmo efeito foi observado por Engelhardt e Vicente (1968) com sementes de Ricinus communis. Estas autoras verificaram que retirando-se a carúncula e parte da testa em baixo dela, a germinação das sementes era promovida. Verificaram também, que a escarificação no lado oposto à carúncula retardava a germi-

nação, fato este não confirmado neste trabalho.

Em vários experimentos observaram-se resultados contraditórios quanto ao efeito da presença da carúncula. Foi levantada a hipótese de que o efeito da carúncula na germinação poderia ser alterado com a idade das sementes. O efeito da retirada da carúncula, promovendo a germinação, é bem mais evidente em sementes de 1 ano de idade do que em sementes mais novas. Porém, em todas as idades testadas houve efeito pelo menos em um dos dias de observação. Logo, a carúncula das sementes de mamona retarda a germinação, mesmo que este efeito seja efêmero. Sugeriu-se então, que a carúncula poderia ter alguma substância inibidora de germinação.

Segundo Válio (1973), em algumas sementes os inibidores presentes no tegumento, podem inibir a germinação de outras espécies, como foi verificado em sementes de Coumarouna adorata inibindo a germinação de alface. A água de lixiviação de carúnculas inibiu a germinação de mamona, fato este que apóia a hipótese da presença de substâncias inibitórias neste tipo de tegumento. No entanto, esta água não inibiu a germinação de sementes de maxixe, tomate, Rumex e alface.

A grande quantidade de pelos encontrada nas radículas de sementes das diferentes espécies germinadas em água de lixiviação de carúnculas, sugeriu a presença de etileno nesta água, pois este é um dos efeitos deste hormônio em radículas. Sabe-se também, que o etileno é o responsável pela manutenção do gancho plumular em plântulas mantidas na luz (Abeles, 1973). As plântulas de mostarda crescidas em presença de água de lixiviação de carúnculas não mantiveram, na luz, o gancho plumular verificado em plântulas mantidas no escuro ou em presença de etrel (substância liberadora de etileno). Além disso, ocorreu um aumento do tamanho do

hipocótilo nas plântulas que receberam a água de lixiviação de carúnculas, crescidas tanto no escuro como na luz, efeito este oposto ao esperado se o etileno estivesse presente, observou-se também um aumento de tamanho dos cotilédones. Sabe-se por dados de literatura, que as giberelinas são responsáveis pelo crescimento do hipocótilo de plântulas intactas, e que as citocininas são responsáveis pelo crescimento de cotilédones. Sugeriu-se então, a presença destas substâncias na água de lixiviação de carúnculas.

Em sementes com um ano de idade verificou-se a presença de uma substância com atividade giberelínica em extrato de carúnculas. Estas substâncias não foram detectadas em carúnculas de sementes recém-colhidas. Estes fatos apóiam a hipótese do crescimento de hipocótilos de mostarda ser devido à presença de substâncias giberelínicas, uma vez que a água de lixiviação onde as plântulas cresceram, era de carúnculas mais velhas.

Na fração neutra de carúnculas de sementes de um ano de idade, detectou-se a presença de inibidores, podendo serem eles responsáveis pelo atraso de germinação verificado nas sementes com carúncula nesta idade. Nas sementes recém-colhidas, estes inibidores não foram detectados, talvez eles existam em menores concentrações, daí o menor efeito da retirada da carúncula na germinação de sementes mais novas.

Na fração básica de carúnculas foi detectada a presença de substâncias citocinínicas tanto em sementes recém-colhidas como em sementes com um ano de idade, sendo que nestas últimas em maiores quantidades. A presença destas substâncias pode justificar o efeito do aumento de peso verificado nos cotilédones de mostarda.

Nos trabalhos de Coumans (1978), em estudos da germinação de glomérulos de beterraba, a obstrução de uma parte específi

ca do tegumento (o poro basal) com vaselina, inibia a germinação. O autor sugeriu que esta região poderia ser importante na passagem de água e gases para o embrião. A aplicação de parafina na região da carúncula inibiu a germinação em sementes de mamona. Este efeito inibidor talvez possa ser comparado ao obtido em glomérulos de beterraba. Logo, o efeito obtido pode ser devido a um bloqueio da passagem de gases, sendo então provável que esta região seja mais importante do que o resto do tegumento, para este transporte. A maior facilidade da passagem da água nesta região fica descartada pois, em curvas de embebição, não se observaram diferenças entre a embebição de sementes com ou sem carúncula.

Côme (1968) sugere que os inibidores fenólicos presentes em tegumentos de sementes, podem absorver parte do oxigênio do meio, diminuindo a disponibilidade deste gás para o embrião. Sugere que este efeito, pode causar uma inibição da germinação. A presença destes inibidores na carúncula, parece provável, pois, nas frações neutras de carúnculas, foram detectados inibidores, cujo o nível aumenta com a idade das sementes. Em extrações mais específicas para fenóis, com extratos de carúnculas, detectou-se a presença de substâncias fenólicas.

Este fato, aliado ao efeito inibitório da impermeabilização da região da carúncula, na germinação destas sementes, sugere que as substâncias fenólicas encontradas em carúnculas, poderiam estar diminuindo o suprimento de oxigênio para o embrião, retardando assim a germinação.

Em sementes de Datura stramonium a lixiviação das sementes inibe a germinação (Villar, 1982). Em sementes de mamona, todos os períodos de lavagem, mesmo o período de duração mais curta (6 horas), provocaram uma inibição de germinação. Esta inibição

pode ser explicada através da hipótese de que substâncias promotoras da germinação, foram removidas pela lavagem das sementes. Outra hipótese para explicar a inibição observada, é que o período em que a semente ficou submersa poderia levar a uma diminuição do suprimento de oxigênio disponível para o embrião, diminuindo assim a germinação, como foi observado em Phaseolus vulgaris (Orphanus e Heydecker, 1968). Porém esta hipótese é pouco provável, no caso da mamona, uma vez que a lavagem foi intermitente.

A germinação de sementes de R. communis foi levemente promovida quando germinadas em água de lixiviação de sementes, apoiando assim a hipótese da lavagem estar lixiviando algum promotor de germinação. O fato desta promoção ter sido pequena, pode se dever à baixa concentração de substâncias promotoras.

Em frações ácidas de sementes secas e lavadas, o aumento no nível de substâncias inibidoras na faixa I, pode ser devido à lixiviação de promotores que, na semente seca, estariam em equilíbrio com inibidores, mascarando o seu efeito. É possível também que, com a embebição, esses inibidores se tornem ativos, justificando a sua ação nas sementes lavadas. Na faixa II deve ter ocorrido, no decorrer da lavagem das sementes, lixiviação de inibidores. Desta forma, pode-se dizer que os inibidores presentes nesta faixa não estão envolvidos no efeito inibitório da lavagem na germinação, uma vez que o nível de substâncias inibidoras na fração ácida destas sementes é menor do que a detectada em sementes secas.

Na recromatografia da faixa I, verifica-se que em sementes não lavadas existia um pico de atividade giberelínica que em sementes lavadas por 48 horas é bem menor. Nestas últimas ocorreu

uma inibição que não existia em sementes não lavadas. Estes fatos apóiam a hipótese de que a lavagem estaria removendo algum promotor, neste caso com atividade giberelínica.

Quando se biotestaram extratos recromatografados da faixa II, verificou-se uma diminuição pequena das substâncias com atividade giberelínica nas sementes lavadas. Porém, ocorreram inibidores nas sementes lavadas e não lavadas. Acredita-se então que as substâncias que ocorreram nesta faixa não sejam responsáveis pela inibição da germinação de sementes lavadas.

Modificações causadas pela lixiviação, nos níveis de substâncias inibidoras nas frações neutras e substâncias citocinínicas nas frações básicas, sugerem que estas substâncias não estão diretamente envolvidas na germinação destas sementes.

V. RESUMO

Pouco é conhecido a respeito da germinação de sementes de Ricinus communis, apesar da importância econômica destas sementes. O objetivo deste trabalho, foi estudar alguns fatores que afetam a germinação desta espécie.

As sementes de R. communis (mamona) cv. guarani são fotoblásticas negativas, sendo que esta sensibilidade à luz é dependente da temperatura, pois a 20°C as sementes germinam igualmente na luz e no escuro. O tegumento destas sementes também afeta o fotoblastismo, uma vez que sementes nuas atingem altas porcentagens de germinação na luz.

O tegumento das sementes de mamona afeta a germinação impedindo, em parte a protrusão da radícula. A carúncula, outro tipo de tegumento das sementes, retarda a germinação, sendo este efeito mais evidente em sementes mais velhas. Supõe-se que o efeito da carúncula de deva à presença de substâncias fenólicas, que utilizariam parte do oxigênio do meio, diminuindo a disponibilidade deste gás para o embrião.

A lixiviação das sementes de mamona inibe a germinação. Acredita-se que este efeito de deva a modificações nos níveis de substâncias com atividade giberelínica e de substâncias inibidoras, causadas pela lixiviação. Em extratos de frações ácidas de sementes não lavadas ocorrem substâncias com atividade giberelínica cujo nível é bem menor em sementes lavadas. Nestas últimas encontra-se um pico de inibição não encontrado em sementes não lavadas.

VI. BIBLIOGRAFIA

- ABELES, F.B., 1973. Ethylene in Plant Biology. Academic Press, London.
- ALEIXO, M.F.D. e VÁLIO, I.F.M., 1976. Effect of light, temperature and endogenous growth regulators on the growth of buds of Cyperus rotundus L. tubers. Z. Pflanzenphysiol. 80:336-347.
- BASKIN, J.M.; LUDLOW, C.J.; HARRIS, T.M. e WOFF, F.T. 1967. Psoralen, an inhibitor in the seeds of Psoralla subacaulis. Phytoch. 6 (7):1029-13.
- BEWLEY, J.D. e BLACK, M., 1978. The structure of seed and their food reserves. In Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination. Springer-Verlag Vol. I, Berlin pp 33-35.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M., 1978. Imbibition, germination and growth. In Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination. Springer-Verlag Vol. I, Berlin pp 115-116.
- BORTHWICK, H.A.; HENDRICKS, S.B.; PARKER, M.W.; TOOLE, E.H. e TOOLE, V.K., 1952. A reversible photoreaction controlling seed germination. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 38:662-666.
- BROWN, R., 1972. Germination. In Plant Physiology: a Treatise. Ed. F.C.Steward, Academic Press vol. VI.

- CANECCHIO FILHO, V., 1961. Histórico e aplicação de óleo de mamona. São Paulo Agrícola. 3:9-10.
- CHIN, T.Y.; POULSON; R. e BEEVERS, L., 1972. The influence of axis removal on protein metabolism in cotyledons of Pisum sativum L. Plant. Physiol. 49:482-489.
- CÔME, D., 1968. Relations entre l'oxygene et les phenomenes de dormance embryonnaire et d'inhibition tegumentaire. Bull. Soc. Fr. Physiol. Veg. 13:31-45.
- CÔME, D. e TISSAOIU, T., 1972. Interrelated effects of imbibition temperature and oxygen on seed germination. In Seed Biology. Ed. T.T. Kolzlowisk vol. II Academic Press, London.
- COUMANS, M., 1978. Rôle du pore basal dans la germination du glomerule de Betterave sucrière. Biol. Plant. 20:114-118.
- ENGELHADRDT, M. e VICENTE, M., 1963. Como obter a germinação de sementes recém-colhidas de mamona (Ricinus communis). rev. O Biológico. 29:191.
- EVENARI, M., 1965. Light and dormancy. In: Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 15. Ed. W. Ruhland. Springer-Verlag, Berlin pp. 804-847.
- FELIPPE, G.M., 1980. Germination of light sensitive seeds of Cucumis anguria and Rumex obtusifolius: effects of temperature. New Phytol. 84:439-448.

- FELIPPE, G.M.; GHERARDI, E.; PENTEADO, L.B.K.; ANNES, V.C.S.; SENE, C.M., 1970. Detecção de giberelinas durante a germinação de Rumex obtusifolius L. Arq. do Inst. Biol. 37:177-187.
- FERREIRA, A.G. e HANDRO, W., 1979. Aspects of seed germination in Araucaria angustifolia. Revta. Brasil. Bot. 2:7-13.
- FRANKLAND, B. e WAREING, P.F., 1960. Effects of gibberellic acid on hypocotyl growth of lettuce seedling. Nature. 185:336-256.
- GEPSTAIN, S. e ILAN, I., 1970. A promotive action of kinetin on amylase activity in cotyledons of Phaseolus vulgaris. Pl. Cell Physiol. 11:819-822.
- GHERARDI, E. e VÁLIO, I.F.M., 1976. Ocurrence of promoting and inhibitory substances in the seed arils of Carica papaya L. J. Hort. Sci. 51:1-14.
- HSIAO, A.I. e VIDAVER, W., 1971. Seed water content in relation to phytocrome mediated germination of lettuce seeds (Lactuca sativa var. Grand rapids). Can. J. Bot. 49:111-115.
- IKUMA, H. e THIMANN, K.V., 1960. Action of gibberellic acid on lettuce seed germination. Plant Physiol. 36:557-566.
- ISIKAWA, S. e FUJÜ, T., 1961. Photocontrol and temperature dependence of germination of Rumex species. Pl. Cell Physiol. 2:51-62.

- JOLY, C.A. e FELIPPE, G.M., 1979. Dormência das sementes de Rapanea guianensis. Aubl. Revta. Brasil. Bot. 2:1-6.
- JONES, R.L. e ARMSTRONG, J.E., 1971. Evidence for osmotic regulation of hydrolitic enzyme production in germinating barley seeds. Pl. Physiol. 48:139-142.
- KAY, B.L.; EVANS, R.A.; YOUNG, J.A., 1977. Soaking procedures and hydroseder damage to common bermudograss-seeds. Agron. J. 59: 555-557.
- KEFELI, V.I., 1978. Principles of analysis of phytohormones and natural growth inhibitors. In Natural Plant Growth Inhibitors and Phytohormones. The Hague, Boston pp 9-47.
- KEFFORD, N.P., 1955. The growth substances separated from plant extracts by chromatography. I. J. Exp. Bot. 6:129-151.
- KENDRICK, R.E., 1976. Photocontrol of seed germination. Sci. Prog. 63:347-367.
- KENDRICK, R.E. e FRANKLAND, B., 1981. Fitocromo e Crescimento Vegetal. Trad. G.M. Felipe EPU-EDSP, S.P.
- KENDRICK, R.E. e SPRUIT, C.J.P., 1974. Inverse dark reversion of phytochrome: an explanation. Planta. 120:265-272.
- KHAN, A.A., 1977. The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination. Publ. Co. Oxford, North-Holland pp. 29-45.

- KHERADNAN, M. e BASSIRI, A., 1980. Seed germination and seedling growth inhibition caused by safflower seed extracts. Agron. J. 72:31-35.
- KOOLER, D., 1972. Enviromental control of seed germination. In Seed Biology. Ed. T.T.Kolzlowisk. Vol. III. Academic Press, London.
- KOLLER, D.; MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A.; KLEIN, S., 1962. Seed germination. Ann. Rev. Plant. Physiol. 13.
- KOZLOWSKI, T.T. e GUNN, C.R., 1972. Importance and Characteristics of Seeds. In Seed Biology, Vol. I. Academic Press, London pp. 1-18.
- KRISHNAMOORTHY, H.N., 1981. Plant Growth Substances. Mac. Graw-Hill Publ. Co. Ltda., New Delhi pp 49-87.
- LABOURIAU, L.G., 1967. Sobre a fisiologia da germinação das sementes de Vicia graminea Sm. Tese de Livre-docência em Fisiologia Vegetal. Universidade Rural do Brasil.
- LEOPOLD, A.C.; KREEDEMAN, P.E., 1977. Plant Growth and Development. Mac Graw-Hill Booc Co., New York.
- LETHAN, D.S., 1968. A new cytokinin bioassay and the naturally occurring cytokinin complex. In Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances. Ed. F. Wightman e G. Setterfield. The Runge Press Ltd., Ottawa pp 19-23.

- MAEDA, J.A., 1982. Germinação e dormência de sementes de Vitis vinifera. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.
- MAYER, A.M. and POLJABOFF-MAYBER, A. 1975. The Germination of Seeds. Ed. P.F. Wareing e A.Y. Galston. Pergamon Press, Oxford.
- MAYER, A.M. e SÄHIN, Y., 1974. Control of seed germination. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:167-193.
- METIVIER, J. e PAULILO, M.T., 1980. The utilization of cotyledonary reserves in Phaseolus vulgaris L. cv. Carioca II The effects of 6-Benziladenina and gilberellic acid upon embryonated and detached. J. Exp. Bot. 31:1271-1282.
- MILBORROW, B.V., 1974. The chemistry and physiology of abscisic acid. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:259-307.
- MILLER, C.O., 1958. The relationship of kinetin and red light promotion of lettuce seed germination. Plant Physiol. 33:115-117.
- NORONHA, A.; VICENTE, M. e FELIPPE, G.M., 1978. Photocontrol of germination of Cucumis anguria L. Biol. Plant. 20:281-286.
- ORPHANUS, P.I. e HEYDECKER, W., 1968. On the nature of the soaking injury of Phaseolus vulgaris seeds. J. Exp. Bot. 61(9):770 - 784.

- PENNER, D. e ASHTON, F.M. 1967. Hormonal control of proteinases activity in squash cotyledons. Plant Physiol. 42:791-796.
- PIKE, C.S. e BRIGGS, W.R. 1972. Partial purification and characterization of a phytochrome degrading neutral protease from etiolated oat shoots. Plant Physiol. 49:521-530.
- PITANGUI, J.F., 1957. Cultura de mamona. Boletim Geral de Agricultura do Departamento de Produção Vegetal. M.G. 6:3-4.
- POLO, M., 1982. Ervas invasoras de uma cultura de milho no município de Campinas, estado de São Paulo. Tese de Mestrado Universidade Estadual de Campinas.
- RANDI, A.M.; FELIPPE, G.M., 1981. Efeito de temperatura, luz e reguladores de crescimento na germinação de Stevia rebaudiana Bert., Ciênc. e Cult. 33:404-411.
- SALGADO-LABORIAU, M.L., 1973. A semente de Magonia pubescens St. Hil: morfologia a germinação. Anais Acad. Bras. Ciênc. 45: 501-537.
- SMITH, H., 1975. Phytochrome and Photomorphogenesis. Mac Graw-Hill, London.
- SNEDECOR, G.W., 1962. Statistical Methods. The Iowa State University Press, USA.

- SONDHEIMER, E.; IZAU, D.S. e GALSTON, E.C., 1968. Abscisic acid levels and seed dormancy. Plant Physiol. 43:1443-1447.
- TAKAKI, M.; DIETRICH, S.M.C., FELIPPE, G.M. e CARDOSO, V.M., 1982. Cytocinin and ethylene during germination of Rumex obtusifolius. Revta. brasil. Bot. 5:29-32.
- TAKAKI, M.; KENDRICK, R.E. e DIETRICH, S.M.C., 1981. Interaction of light and temperature on the germination of Rumex obtusifolius L. Planta 152:209-214.
- TAYLORSON, R.B. e HENDRICK, S.B., 1977. Dormancy in seeds. Ann. Rev. Plant. Physiol. 28:331-354.
- TORREY, J.G., 1967. Development in Flowering Plants. The Mac Millan Co., New York pp 68-77.
- USBERTI, R., 1979. Estudo da germinação de sementes de limão cravo (Citrus reticulata var. austera Hib.-swingle): condições de umidade e armazenamento e relações hormonais. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.
- VÁLIO, I.F.M., 1973. Effects of endogenous coumarin on the germination of seeds of Coumarouna odorata Aublet. J. Exp. Bot. 24(79):442-449.
- VÁLIO, I.F.M., 1976. Germination of coffee seeds (Coffea arabica L. cv. Mundo Novo). J. Exp. Bot. 27:983-991.

- VAN STADEN, J. e WAREING, P.F., 1972. The effects of light on endogenous cytokinins levels in seeds of Rumex obtusifolius. Planta. 104:126-133.
- VILLAR, M.L.D., 1982. Germinação de Datura stramonium L. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.
- WAREING, P.F. e PHILLIPS, I.D.J., 1973. Dormancy. In: The Control of Growth and Differentiation in Plants. Pergamon Press, Oxford pp 223-254.
- WAREING, P.F., SAUNDERS, P.F., 1971. Hormones and dormancy. Ann. Rev. Plant Physiol. 22:261-285.
- WILEY, L. e ASHTON, F.M., 1967. Influence of the embrionic axis on protein hydrolisis in cotyledon of Cucurbita maxima. Physiol. Pl. 20:688-696.
- WOOD, T., 1955. A reagent for the deteccion of chloride and certains purines and pyrimidines on paper chromatograms. Nature. 176:175.
- YANIV, Z.; MANCINELLI, A. e SMITH, P., 1967. Phytochrome and seed germination III. Action of prolonged far red irradiation on the germination of tomato e cucumber seeds. Plant Physiol. 42: 1479-1482.