



Rogéria Pereira de Souza

FOTOCONTROLE DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE
Impatiens wallerana HOOK. f.

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

Orientador: Maria de Fátima D. A. Pereira

Campinas

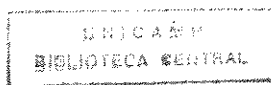
1990

So89f

13166/BC

Este exemplar corresponde à redação final da
Tese defendida pela candidata Rogéria Pereira de
Souza e aprovada pela Comissão Julgadora.

22/11/90



Prof.ª Maria D. A. Pereira

"Se não houver frutos,
valeu pela beleza das flores,
Se não houver flores,
valeu pela sombra das folhas,
Se não houver folhas,
valeu pela intenção da semente..."

(Henfil)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria de Fátima D. A. Pereira pela orientação dada a este trabalho, pela confiança e apoio;

À Dra. Marisa V. Carlucci, da seção de Floricultura e Plantas Ornamentais do IAC, pelo fornecimento de parte das sementes utilizadas neste trabalho;

Ao Prof. Dr. Ivany F. M. Válio pelo fornecimento de algumas das substâncias químicas utilizadas neste trabalho, pela revisão e pelas sugestões dadas por ocasião da pré-banca;

À Profa. Dra. Ana Maria Monteiro e à Dra. Ana Maria M. A. Lagôa, membros da pré-banca, pela revisão cuidadosa e sugestões;

À GTE do Brasil (Divisão Sylvania), através do Eng^o. Amilcar Fonte, pelo envio das curvas de distribuição espectral de energia das lâmpadas utilizadas neste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro;

À minha família, pelas oportunidades concedidas;

Aos amigos e colegas do Departamento de Fisiologia Vegetal, pela convivência, incentivo e auxílios prestados;

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal;

A todos os amigos que me acompanharam durante a realização deste trabalho pelo carinho e presença constantes.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
1. Material Vegetal.....	23
2. Curva de Embebição.....	24
3. Método Geral de Germinação.....	25
4. Tratamentos com Luz.....	25
4.1. Tratamento com Luz Contínua de Diferentes Qualida - des.....	26
4.2. Tratamentos com Luz Vermelha.....	27
4.2.1. Sensibilidade a uma exposição ao vermelho.....	27
4.2.2. Irradiação inicial com vermelho.....	27
4.2.3. Irradiação intermitente com vermelho.....	27
4.3. Tratamentos com Vermelho-Extremo.....	29
5. Tratamentos com Temperaturas.....	30
5.1. Temperaturas Constantes e Alternadas.....	30
5.2. Interação entre Temperatura e Exposições à Luz Ver- melha.....	31
6. Giberelinas	31
6.1. Tratamento com Ácido Giberélico.....	31
6.2. Interação entre GA ₃ e Exposições à Luz.....	32

6.3. Inibidores de Biossíntese de Giberelinas em Tratamento Indutivo de luz.....	32
7. Estratificação.....	32
7.1. Estratificação na Presença de Giberelinas.....	33
7.2. Estratificação na Presença de Inibidores de Biossíntese de Giberelinas.....	33
7.3. Interação entre Tratamento de Estratificação e Exsiccões à Luz.....	34
8. Análise de Giberelinas Endógenas.....	35
8.1. Extração e Fracionamento.....	35
8.2. Purificação e Preparo da Amostra.....	37
8.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	38
8.4. Bioteste do Alongamento do Hipocótilo de Alface.....	38
9. Cálculo do Tempo Médio de Germinação.....	39
10. Análise Estatística.....	40
III. RESULTADOS.....	41
1. Determinação de Tamanho e Peso das Sementes.....	41
2. Curva de Embebição.....	41
3. Padrão de Germinação.....	41
4. Relação da Coloração do Tegumento com a Necessidade de Luz para a Germinação.....	45
5. Tratamentos com Luz.....	46
5.1. Tratamento com Luz Contínua de Diferentes Qualidades.....	46

5.2. Tratamentos com Luz Vermelha.....	46
5.2.1. Sensibilidade a uma exposição ao vermelho.....	46
5.2.2. Irradiação inicial com vermelho.....	49
5.2.3. Irradiação intermitente com vermelho.....	49
5.3. Tratamentos com Vermelho-Extremo.....	59
6. Tratamentos com Temperaturas.....	70
6.1. Temperaturas Constantes e Alternadas.....	70
6.2. Interação entre Temperatura e Exposições à Luz Ver- melha.....	74
7. Efeito do Armazenamento sobre o Fotoblastismo.....	77
8. Giberelinas.....	81
8.1. Tratamento com Ácido Giberélico.....	81
8.2. Interação entre GA ₃ e Exposições à Luz.....	84
8.3. Inibidores de Biossíntese de Giberelinas em Trata - tamento Indutivo de Luz.....	84
9. Estratificação.....	88
9.1. Duração da Estratificação.....	88
9.2. Estratificação na Presença de Giberelinas.....	88
9.3. Estratificação na Presença de Inibidores de Bios- síntese de Giberelinas.....	88
9.4. Interação entre Tratamento de Estratificação e Ex- posições à Luz.....	91
9.5. Estratificação e Níveis de Giberelinas Endógenas.....	96
IV. DISCUSSÃO.....	101

V. RESUMO.....	123
VI. LITERATURA CITADA.....	126
VII. APÊNDICE.....	150

I - INTRODUÇÃO

Um dos problemas mais importantes e interessantes na fisiologia das sementes é a incapacidade que as sementes viáveis de muitas espécies têm para retomar imediatamente o ciclo de desenvolvimento, quando colocadas em condições favoráveis à germinação. Estas são representadas pelo fornecimento apropriado de água, temperatura adequada e composição normal da atmosfera (MAYER & POLJAFOFF-MAYBER, 1982).

Tal fato é amplamente conhecido como dormência, sendo bastante comum em sementes de zonas temperadas e frequentemente encontrado também em espécies tropicais e subtropicais (VILLIERS, 1972).

A ocorrência da dormência em sementes é importante como um mecanismo de proteção contra as mudanças, periódicas ou ocasionais, do ambiente natural, as quais podem tornar difícil a sobrevivência das espécies durante certos períodos. A dormência parece ser também uma consequência evolutiva natural da maior parte das formas de dispersão, desde que os ambientes nos quais a dispersão ocorre podem ser temporariamente inadequados ao crescimento ativo (KOLLER, 1972).

CROCKER (1916 apud VILLIERS, 1972) propôs uma classificação bastante simples e frequentemente utilizada dos tipos de dormência encontrados, baseada em suas causas. De acordo com esta, a dormência pode ser resultante de 1) imaturidade do embrião, 2) impermeabilidade da testa à água, 3) resistência mecânica da testa ao crescimento do embrião, 4) baixa permeabilidade da testa a gases, 5) dormência resul-

tante de um bloqueio metabólico inerente ao embrião - o que torna as sementes dependentes de exposição à luz ou ao frio, 6) uma combinação dos tipos descritos acima e 7) dormência secundária. Este último tipo refere-se à dormência induzida por exposição das sementes maduras e embebidas a condições desfavoráveis à germinação, em contraste com os outros tipos de dormência, classificadas como primárias, desde que se referem ao estado em que as sementes são liberadas da planta de origem.

À exceção das sementes que, apesar de não serem capazes de germinar imediatamente após a dispersão, germinam após um período de pós-maturação a seco, a dormência pode se manter indefinidamente, a menos que sinais ambientais ou fatores que quebrem a dormência sejam percebidos (METIVIER, 1979). Em condições naturais, os fatores que podem agir para converter uma semente do estado dormente para o estado não dormente são, de modo geral, alterações na testa e outras estruturas envolventes do embrião, o próprio envelhecimento das sementes com o tempo, luz e temperatura (BEWLEY & BLACK, 1982).

Com relação ao fator luz, tem sido extensivamente descrita a influência deste em um grande número de espécies. São reconhecidos dois grupos principais de sementes com relação à sensibilidade à luz branca: as sementes fotoblásticas positivas, que necessitam de iluminação para que a germinação seja promovida, tais como Porophyllum lanceolatum (FELIPPE *et al.*, 1971), Cecropia glaziovii (VÁLIO & JOLY, 1979), Stevia rebaudiana (RANDI & FELIPPE, 1981), Aster pilosus (BASKIN & BASKIN, 1985), Portulaca oleracea (LIMA & FELIPPE, 1986), Vitis vinifera (PEREIRA & MAEDA, 1986) e Talinum patens (LIMA & FELIPPE,

1988) e as sementes fotoblásticas negativas, cuja germinação é inibida pela luz. Exemplos destas incluem Cucumis anguria (NORONHA *et al.*, 1978), Ricinus communis (LAGÔA & PEREIRA, 1987) e Citrullus lanatus (BOTHÁ & SMALL, 1988). Existe ainda um terceiro grupo de sementes, as indiferentes à luz, em que a germinação pode ocorrer tanto sob luz branca ou escuro. Sementes de Dypterix alata (MELHEM, 1975), Ipomoea acuminata (FELIPPE & POLO, 1983), Andropogon gayanus (FELIPPE *et al.*, 1983), Bromus commutatus (FROUD-WILLIAMS & CHANCELLOR, 1986), Capsicum annum (GONZÁLEZ *et al.*, 1989), além das sementes da maioria das espécies cultivadas (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982), pertencem a este grupo.

A despeito desta classificação simples, a fisiologia do fotocontrole da germinação, quando analisada mais detalhadamente, se mostra bastante variada e complexa. Sementes indiferentes à luz podem se tornar sensíveis à inibição pela luz branca quando sujeitas a determinadas condições, como observado para sementes de Raphanus sativus (LADEIRA *et al.*, 1987) e Phaseolus vulgaris (LOPES & TAKAKI, 1987) submetidas a estresse osmótico. Sementes fotoblásticas positivas de diferentes espécies podem exigir diferentes condições de luz para a promoção da germinação. Na grande maioria dos casos estudados, as sementes respondem a exposições bastante curtas, da ordem de minutos ou segundos, à luz branca ou vermelha, como é o caso classicamente observado em Lactuca sativa cv. Grand Rapids (BEWLEY *et al.*, 1967) e também em Rumex obtusifolius (TAKAKI *et al.*, 1981a). Por outro lado, existem espécies, como Hyptis suaveolens (WULFF & MEDINA, 1971), Eupatorium adenophorum e E. riparium (RAI, 1987), que necessitam de períodos re-

lativamente longos de iluminação para a promoção da germinação e outras, como Kalanchoë blossfeldiana (ELDABH et al., 1974), Piper auritum (VÁSQUEZ-YANES & SMITH, 1982), Talinum triangulare (NWOKE, 1982) e Dactylis glomerata (PROBERT & SMITH, 1986), onde irradiações diárias repetidas são necessárias. Nos casos de Artemisia monosperma (KOLLER et al., 1964b), Jussiae suffruticosa (WULFF & MEDINA, 1969) e Oenothera biennis (ENSMINGER & IKUMA, 1987b), onde também se verificou a necessidade de exposição prolongada à luz, observou-se que esta pode ser substituída por tratamento de exposições intermitentes.

A necessidade para a promoção da germinação de irradiações repetidas, geralmente fornecidas em um regime diário, tem levado alguns autores a introduzirem o conceito de fotoperiodismo na germinação, embora este processo não seja análogo aos efeitos fotoperiódicos observados no controle da floração e outros processos fotomorfogênicos (FRANKLAND & TAYLORSON, 1983).

Estes diferentes tipos de respostas também têm sido observados em esporos de muitas espécies de pteridófitas, que apresentam germinação dependente de luz. Assim, tem-se como exemplos, Pteris vittata (FURUYA et al., 1982) e Lygodium japonicum (TOMIZAWA et al., 1983), cujos esporos respondem a um único pulso de luz e Dryopteris filix-mas, D. paleacea e Polystichum minutum, que necessitam de irradiação por um período de várias horas, a qual pode ser substituída por vários pulsos curtos distribuídos pelo período (HAUPT, 1985).

Na germinação, tem sido extensivamente mostrado, tanto para as sementes fotoblásticas positivas quanto para as negativas, que as regiões espectrais efetivas são o vermelho para promoção e o vermelho-

extremo para inibição. Embora esta seja a regra geral observada, exceções podem ocorrer, havendo os casos, por exemplo, de Bromus sterilis, onde o vermelho-extremo estimula e o vermelho inibe a germinação (HILTON, 1987), de Bidens pilosa, onde vermelho e vermelho-extremo têm igual efeito promotor (VÁLIO et al., 1972) e de Amaranthus retroflexus, onde o vermelho-extremo também pode promover a germinação, desde que com um período prolongado de embebição no escuro (TAYLORSON & HENDRICKS, 1971). Luz azul também é capaz de afetar a germinação de sementes, tendo sido descritos tanto efeitos promotores (KOLLER et al., 1964a; VÁLIO et al., 1972) quanto efeitos inibitórios (BLACK & WAREING, 1957; WAREING & BLACK, 1958; BOTHA & SMALL, 1988).

O controle da germinação pela luz é mediado através do fitocromo, o pigmento receptor envolvido nas respostas fotomorfogênicas das plantas, cujas moléculas consistem em uma proteína de 124kD ligada a um cromóforo, um tetrapirrol de cadeia aberta, e encontram-se associadas em dímeros (SMITH Jr., 1981).

É conhecido desde a década de 50, quando dos trabalhos iniciais desenvolvidos pelo grupo de Borthwick & Hendricks, que o fitocromo existe em duas formas interconvertíveis: Fv e Fve.

Fv - a forma fisiologicamente inativa - absorve preferencialmente a 660nm (vermelho), enquanto que Fve - a forma considerada fisiologicamente ativa - absorve preferencialmente a 730nm (vermelho-extremo). A absorção de luz por uma das formas causa a sua conversão para a outra, originando-se daí o fenômeno da fotorreversibilidade, no qual cada um destes comprimentos de onda é capaz de reverter seguidamente o efeito do outro.

Os comprimentos de onda de 660nm e 730nm são somente os pontos de absorção máxima de cada uma das formas do fitocromo. Na realidade, uma absorção considerável ocorre em outros comprimentos de onda, principalmente na faixa do vermelho, de modo que tanto Fv quanto Fve possuem bandas mais largas de absorção. As duas formas também apresentam uma pequena banda de absorção na faixa de 350-400nm. Deste modo, seus espectros de absorção se sobrepõem consideravelmente. Sob irradiação com comprimentos de onda que são absorvidos por ambas as formas do pigmento, um equilíbrio dinâmico é estabelecido, denominado equilíbrio ou estado fotoestacionário e cujo valor é representado pela razão $Fve/Ftotal$ (SMITH, 1975). O maior valor de estado fotoestacionário é o mantido por luz vermelha, sendo de cerca de 0,8. Vermelho-extremo mantém um baixo nível de Fve, em torno de 0,05. Outros comprimentos de onda levam a níveis apreciáveis de Fve no fotoequilíbrio, como no caso de luz azul, onde valores de 0,35 podem ser atingidos (KENDRICK, 1976).

A forma Fve é termodinamicamente instável e sofre uma reversão lenta no escuro a Fv. Após o seu estabelecimento, o Fve também sofre o processo de destruição, que envolve a degradação proteolítica da cromoproteína (KENDRICK & SPRUIT, 1977). Ambos os processos - reversão e destruição - são afetados pela temperatura e podem influenciar o valor do estado fotoestacionário.

Desta forma, o tamanho do "pool" de Fve em um sistema é determinado essencialmente por quatro processos: fototransformação de Fv a Fve, fototransformação de Fve a Fv, destruição de Fve a uma forma espectrofotometricamente não detectável e reversão de Fve a Fv no escuro.

ro (MARMÉ, 1977).

As fotoconversões de Fv e Fve não ocorrem diretamente de uma forma a outra, mas através de uma série de intermediários: Lumi-R, Meta-Ra e Meta-Rb, nesta sequência, no caminho de Fv a Fve e Lumi-F, Meta-Fa e Meta-Fb no caminho inverso. Apenas as reações de Fv a Lumi-R e de Fve a Lumi-F são fotorreações; as demais podem prosseguir no escuro. Alguns dos passos - as transformações de Meta-Ra para Meta-Rb e deste para Fve e também as de Meta-Fa para Meta-Fb e deste para Fv - podem ocorrer somente em tecidos altamente hidratados, enquanto as demais podem proceder sob baixos conteúdos de água (KENDRICK & SPRUIT, 1977).

Tem sido proposto que o fitocromo pode controlar os processos fotomorfogênicos através de duas reações: a de baixa energia e a de alta irradiância.

A reação de baixa energia se caracteriza 1) por apresentar picos de ação máxima a 660nm e 730nm, sendo a resposta iniciada através da ação do Fve, 2) pela ocorrência de fotorreversibilidade e 3) pela saturação da resposta com baixos níveis de energia (KENDRICK & SPRUIT, 1977). As respostas exibem reciprocidade e continuam a ser controladas no escuro através do Fve estabelecido durante o período de iluminação (JOSE & VINCE-PRUE, 1978).

Obviamente, há necessidade de atuação do Fve por um certo período de tempo. Embora a reversão da resposta induzida pelo vermelho ocorra pela exposição imediata ao vermelho-extremo, quando um período de escuro, maior do que uma duração crítica, é transcorrido antes da aplicação deste, a reversão do efeito não mais ocorre, apesar da forma Fve ainda estar presente e sendo convertida para Fv. A interpretação

deste fato é que o processo escapou ao controle pelo Fve (MOHR, 1972), não sendo a sua presença mais necessária para o prosseguimento da resposta. Este período de tempo durante o qual o Fve age e após o qual a sua fotorreversão não é mais inibitória é denominado tempo de escape e fornece uma medida fisiológica da ação do Fve (BEWLEY et al., 1967).

A reação de alta irradiância, por sua vez, não apresenta reciprocidade e a resposta à luz comumente necessita de irradiação por um longo período, não havendo evidências de que o controle continue no escuro (JOSE & VINCE-PRUE, 1978). O espectro de ação deste tipo de resposta tem um pico proeminente na região do vermelho-extremo (710 a 730nm) e picos menores na região do azul (440 a 500nm) e do ultra-violeta. Este tipo de reação é dependente do nível de irradiância e da duração da exposição e parece necessitar de contínua excitação de ambas as formas do fitocromo, sendo que a razão de ciclagem entre elas é um componente importante da resposta (MANCINELLI, 1978).

Evidências crescentes têm mostrado que os efeitos induzidos pela luz ultra-violeta e azul na reação de alta irradiância, embora estes comprimentos de onda também sejam absorvidos pelo fitocromo, devem envolver um outro sistema fotorreceptor (THOMAS & DICKINSON, 1979; GABA & BLACK, 1979), denominado criptocromo, provavelmente agindo em interação íntima com o fitocromo. É provável que flavinas ou carotenos sejam os possíveis receptores de luz azul, com um maior número de evidências em favor do primeiro grupo de substâncias (PRESTI, 1983).

Existem vários modelos propostos para explicar o modo de ação do fitocromo na reação de alta irradiância. Algumas das hipóteses mostram um grau de elaboração bastante elevado e podem fornecer uma interpre-

tação razoável de algumas características, mas nenhuma delas alcançou ainda o ponto de fornecer uma interpretação unificada do fenômeno (MANCINELLI, 1978; KENDRICK, 1983).

Nos últimos 40 anos, surgiram, como resultado de extensivos estudos, várias hipóteses quanto ao mecanismo molecular de ação do fitocromo (COLBERT, 1988). As hipóteses mais recentes propõem uma interação do fitocromo com membranas, as quais seriam os sítios de ação primária. MARMÉ (1977) sugere que o fitocromo poderia atuar por modular a atividade de enzimas capazes de controlar a translocação ativa de íons e moléculas através de membranas, por modular o metabolismo de moléculas ligadas a membranas e ainda por controlar a atividade de enzimas ligadas a membranas que catalisam o metabolismo de moléculas solúveis. KENDRICK (1983) propõe que o transporte iônico através de membranas seja o único mecanismo fundamental de ação do fitocromo, sugerindo que a diversidade de respostas encontradas seja devido à natureza de mensageiros secundários e de compartimentos celulares envolvidos, bem como à possibilidade de ocorrência de diversas modificações terciárias, como mudanças em níveis e distribuição de hormônios.

Na promoção da germinação de sementes e esporos pela luz, o fitocromo atua através da reação de baixa energia. Tem-se mostrado diretamente (FURUYA *et al.*, 1982; TOMIZAWA *et al.*, 1983; WULFF, 1985) ou indiretamente através da razão vermelho/vermelho-extremo da luz (FRANKLAND & LETENDRE, 1978; PONS, 1986), que a resposta de germinação é dependente do nível de equilíbrio fotoestacionário estabelecido na semente. Considerando-se uma população de sementes, é possível observar uma distribuição normal em torno de um valor médio de Fve necessá-

rio para a germinação (CONE & KENDRICK, 1986), o que ocorre em virtude de haver, na população, membros com diferentes limiares de equilíbrio fotoestacionário acima dos quais a resposta é promovida (MOHR, 1972).

As sementes fotoblásticas positivas, em geral, se caracterizam pelo elevado limiar de equilíbrio fotoestacionário para a indução da germinação, de modo que exposições curtas ao vermelho-extremo e azul, por estabelecerem valores baixos, causam a inibição da resposta. Quando estes comprimentos de onda apresentam efeitos promotores, postula-se que os baixos valores de estado fotoestacionário estabelecidos estão abaixo do limiar requerido pela espécie (BEWLEY & BLACK, 1982). Embora tenha sido demonstrado que um receptor azul/ultra-violeta em separado interage com o fitocromo para mediar algumas respostas, não há evidências para o seu envolvimento na indução da germinação através de irradiações curtas (CONE & KENDRICK, 1986).

Em sementes fotoblásticas negativas, a interpretação da resposta considera que, nestas, uma substancial proporção do fotorreceptor se encontra na forma ativa (Fve) - presente desde a maturação da semente e desidratado sob esta forma ou formado durante a embebição a partir de intermediários presentes na semente seca - e, deste modo, a germinação pode ocorrer quando as sementes são colocadas no escuro. Desde que esta proporção de Fve pode ser afetada pelas condições de iluminação, a germinação pode ser inibida por comprimentos de onda capazes de remover algum Fve - azul e vermelho-extremo fornecidos sob a forma de irradiações curtas (SMITH, 1975). Casos de necessidade de exposições intermitentes para inibição da germinação têm sido interpretados com base na necessidade de remoção de Fve em aparecimento durante a embe-

bicção a partir de intermediários (KENDRICK, 1976).

Sob irradiação prolongada com luz branca de alta intensidade, existe um outro tipo de fotoinibição da germinação, presente tanto em sementes fotoblásticas negativas - exemplos de Nemophila insignis (BLACK & WAREING, 1957), Bromus mollis e B. sterilis (ELLIS et al., 1986) - quanto em fotoblásticas positivas, cuja germinação pode ser promovida por curtos períodos de luz - exemplo de Sinapis arvensis (BARTLEY & FRANKLAND, 1982). Neste caso, mesmo após a indução da germinação pelo Fve e após o escape da reversão pelo vermelho-extremo curto, a resposta pode ser bloqueada por um período prolongado de luz de alta intensidade.

Estes efeitos inibitórios ocorrem via reação de alta irradiância, a qual tem, na germinação de sementes, efeito antagônico à reação de baixa energia (FRANKLAND, 1981). Esta inibição ocorre em um evento tardio do processo e é interpretada como um efeito da interconversão das formas do fitocromo, podendo ser quantificada em termos da sua razão de ciclagem, a qual é dependente da intensidade luminosa (FRANKLAND & TAYLORSON, 1983).

Tem sido demonstrado haver uma relação entre o nível de Fve presente na semente e a razão de ciclagem para a inibição da germinação, de modo que, sob altos níveis de Fve, é necessária uma maior intensidade luminosa para a inibição, ao passo que intensidades mais baixas são efetivas sob valores mais baixos de Fve (FRANKLAND, 1981; FRANKLAND & TAYLORSON, 1983). Deste modo, sob condições naturais, a ocorrência da promoção ou inibição da germinação depende das condições ambientais de luz e da importância relativa dos dois processos - indu-

ção pelo Fve e inibição pela reação de alta irradiância - para cada espécie em particular (FRANKLAND, 1981), existindo espécies que não apresentam qualquer inibição da germinação, mesmo sob iluminação prolongada com vermelho-extremo (GÓRSKI & GÓRSKA, 1979).

Normalmente, as sementes sensíveis à luz respondem a fluências de fótons na faixa de 1 a $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$, suficientes para causar a saturação da resposta no sistema de baixa energia. No entanto, recentemente, foi mostrado que muitas espécies apresentam um sistema que as capacita a responder a fluências muito baixas, da ordem de 10^{-4} a $10^{-1} \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$, que estabelecem razões de Fve/Ftotal de 10^{-6} a 10^{-3} (CONE & KENDRICK, 1986).

Este sistema foi denominado de "very low fluence responses" (VLFR) em semelhança ao sistema de baixa energia (LFR = "low fluence responses") e tem sido observado também em outros processos, além da germinação, tal como alongamento celular (MANDOLI & BRIGGS, 1981) e indução do acúmulo rápido de clorofila (SPRUIT *et al.*, 1979).

Curvas de fluência-resposta para indução da germinação com caráter bifásico, em consequência da presença dos dois níveis de resposta à luz (VLFR e LFR), têm sido apresentadas para sementes de Lactuca sativa (BLAAUW-JANSEN, 1983; VANDEWOUDE, 1985), Arabidopsis thaliana (CONE *et al.*, 1985), Rumex obtusifolius (KENDRICK & HEERINGA, 1986) e Kalanchoë blossfeldiana (RETHY *et al.*, 1987). A verificação da presença do sistema VLFR depende de pré-tratamentos que removam das sementes qualquer Fve endógeno (CONE & KENDRICK, 1986) e de pré-tratamentos que tornem as sementes mais sensíveis aos baixos níveis de Fve - como temperaturas altas em R. obtusifolius (KENDRICK & HEERINGA, 1986), altas

ou baixas temperaturas em A. thaliana (CONE et al., 1985) e L. sativa (BLAAUW-JANSEN, 1983; VANDERWOUDE, 1985), aplicação de GA₃ em Kalanchoë blossfeldiana (RETHY et al., 1987) e de etanol também em L. sativa (VANDERWOUDE, 1985).

Recentemente, KENDRICK & CONE (1985), alternativamente à hipótese de que as sementes que germinam no escuro o fazem devido à presença de alto nível de Fve, propuseram que isto ocorre devido à existência de indivíduos capazes de responder ao sistema VLFR. Além disto, tem sido mostrado que este sistema é o que media a germinação promovida por luz verde, relatada para algumas espécies, como Artemisia monosperma (KOLLER et al., 1964a) e Bidens pilosa (VÁLIO et al., 1972).

Dois modelos propostos têm procurado explicar as respostas no sistema VLFR. O modelo de BLAAUW-JANSEN (1983) assume que o baixo nível de Fve na VLFR seria capaz de induzir a resposta sem ativar o processo enzimático da destruição do Fve, o que ocorreria até uma concentração limiar deste. Acima deste nível, a destruição do Fve seria ativada, o que contrabalançaria o aumento do seu nível em decorrência do aumento na fluência. Com a saturação da atividade enzimática da destruição, o nível de Fve poderia ser novamente elevado, resultando na segunda fase da curva, indicativa do sistema de baixa energia. No entanto, segundo KENDRICK & HEERINGA (1986) e RETHY et al. (1987), este modelo não se ajusta aos dados obtidos respectivamente para R. obtusifolius e K. blossfeldiana.

O outro modelo, de VANDERWOUDE (1985), assumindo o fitocromo como um dímero, com 2 cromóforos e, portanto existindo em três formas intertransformáveis - FvFv, FvFve e FveFve - estabelece que a resposta

no sistema VLFR seria resultante do estabelecimento de baixas quantidades de FvFve e sua associação com um receptor X. A saturação de X por FvFve forneceria as respostas máximas do VLFR. As respostas do sistema de baixa energia seriam resultantes do estabelecimento do complexo FveFveX por fluências mais altas.

A sensibilidade das sementes à luz depende do nível de hidratação das sementes. Em virtude das fotoconversões completas do fitocromo não serem possíveis em sementes secas, há necessidade de um período de embebição que assegure a hidratação do fitocromo e suas subseqüentes transformações. HSAID & VIDAVER (1971) mostraram que, em sementes de Lactuca sativa cv. Grand Rapids, a germinação não foi afetada por exposição das sementes secas a qualquer comprimento de onda, havendo a necessidade de um conteúdo mínimo de água de 16% para assegurar as respostas à luz. No entanto, BARTLEY & FRANKLAND (1984), em estudos com as espécies Plantago major, Sinapis arvensis e Bromus sterilis, mostraram que sementes secas podem apresentar algum grau de sensibilidade à luz, particularmente ao vermelho-extremo. Os efeitos da luz em sementes secas têm sido interpretados com base nas reações, que ocorrem em tecidos desidratados, entre as formas do fitocromo e seus intermediários.

A hidratação do fitocromo não é o único fator que explica o aumento de sensibilidade à luz com a embebição. Tem sido mostrado para algumas espécies que o pico de sensibilidade à luz ocorre após o término da embebição, como ocorre em Portulaca oleracea (DUKE *et al.*, 1977). Aumentos na sensibilidade à luz com períodos crescentes de embebição têm sido atribuídos, além da hidratação do fitocromo, à síntese

se do pigmento (TAYLORSON & HENDRICKS, 1971) e a aumentos nos níveis de um componente com o qual o Fve interage (KOLLER et al., 1964b; DUKE et al., 1977).

A capacidade de resposta a um pulso de luz vermelha, após atingir o seu máximo, pode ser progressivamente perdida, sendo este declínio da resposta tomado como um tipo de dormência secundária, denominado escotodormência. Isto ocorre em um número bastante grande de espécies, tendo sido relatado para Rumex crispus (TAYLORSON & HENDRICKS, 1973), Portulaca oleracea (DUKE et al., 1977), Kalanchoë blossfeldiana (RETHY et al., 1983), Oldenlandia corymbosa (CORBINEAU & CÔME, 1985), Paulownia tomentosa (GRUBIŠIĆ et al., 1985) e Lactuca sativa (THANOS & GEORGHIOU, 1988), embora existam espécies onde este declínio não é observado e a resposta se mantém constante, como Artemisia monosperma (KOLLER et al., 1964b) e Amaranthus retroflexus (TAYLORSON & HENDRICKS, 1971). O decréscimo de sensibilidade à luz com períodos prolongados de escuro tem sido atribuído ao acúmulo de inibidores ou à limitação da respiração, como sugerido para K. blossfeldiana (RETHY et al., 1983) ou devido ao decréscimo do nível do componente X com o qual o fotorreceptor interage (DUKE et al., 1977; CORBINEAU & CÔME, 1985; THANOS & GEORGHIOU, 1988). Os resultados obtidos por TAYLORSON & HENDRICKS (1973) podem sugerir que X seja um componente de membranas. De fato, tem sido demonstrado que a atividade do fitocromo no processo de germinação deve estar associada com mudanças em regiões organizadas de membranas (HENDRICKS & TAYLORSON, 1978).

A resposta de germinação das sementes à luz está sujeita a interação com outros fatores ambientais. As sementes fotossensíveis podem

ter sua resposta drasticamente modificada pela temperatura. Em Lactuca sativa, por exemplo, a germinação no escuro é máxima em temperaturas até 20°C, enquanto que acima desta, a porcentagem de germinação diminui com o aumento na temperatura até atingir 0% a aproximadamente 35°C. Além disso, a necessidade de luz aumenta com o aumento da temperatura, de modo que, até 29°C, uma irradiação única com vermelho é suficiente para promover a germinação, ao passo que acima desta há necessidade de irradiações repetidas (SAINI et al., 1989).

Em Ricinus communis, a 20°C não se observa diferença significativa entre a germinação na luz e no escuro, enquanto que acima de 25°C, o escuro favorece a germinação (LAGÔA & PEREIRA, 1987). Outros exemplos deste tipo de interação podem ser observados em sementes de Stylosanthes macrocephala, que são fotoblásticas negativas a 10°C e 15°C, mas indiferentes na faixa de 20°C a 35°C (FELIPPE & SILVA, 1984), em sementes de alguns cultivares de Agrostis tenuis, cuja germinação se apresenta igual sob luz ou escuro na faixa de temperatura ótimas, mas é promovida pela luz nas temperaturas marginais (TOOLE & KOCH, 1977) e em sementes de Pinus brutia, indiferentes à luz a 20°C, mas fotoblásticas positivas a 15°C (THANOS & SKORDILLIS, 1987).

A indução da escotodormência em sementes de várias espécies também se mostra dependente de temperatura. Em Lactuca sativa foi observado que a escotodormência é somente induzida em temperaturas acima de 17°C (THANOS & GEORGHIOU, 1988). Estes e vários outros autores (TAYLORSON & HENDRICKS, 1973; ROBERTS & TOTTERDELL, 1981; RETHY et al., 1983) mostraram que a razão de indução e o grau de dormência são aumentados com o aumento de temperatura.

Tratamentos específicos com temperaturas também podem funcionar como fator de quebra de dormência em substituição à luz. Em Rumex obtusifolius, um tratamento com 35°C por um período curto de tempo pode induzir a germinação completa no escuro (TAKAKI *et al.*, 1981a). O mesmo acontece para sementes de Chloris orthothon submetidas a um período de 40°C (CRUZ & TAKAKI, 1983). TAKAKI *et al.* (1981a) propuseram que os tratamentos de temperaturas altas estariam tornando as sementes sensíveis a baixos níveis de Fve, ou, alternativamente, estariam agindo por originar o aparecimento de Fve a partir de intermediários. No entanto, foi mostrado posteriormente não haver mudanças detectáveis nos níveis endógenos de Fve como resultado do tratamento de temperatura elevada (TAKAKI *et al.*, 1985). DI NOLA & TAYLORSON (1989) indicaram que a breve exposição das sementes de Echinochloa crus-galli a altas temperaturas pode ter um efeito na composição de proteínas ligadas a membranas.

Tratamentos de temperaturas alternadas também podem aumentar a germinação no escuro de sementes fotoblásticas positivas, como ocorre em Hyptis suaveolens (WULFF & MEDINA, 1971) e Paulownia tomentosa (BARNHILL *et al.*, 1982). Em Rumex crispus e R. obtusifolius, tratamentos com alternância de temperaturas, desde que com curtos períodos na temperatura mais alta e grande amplitude, são efetivos em promover a germinação no escuro (TOTTERDELL & ROBERTS, 1980). Em sementes fotoblásticas negativas, temperaturas alternadas podem causar a germinação sob luz, como verificado em Cucumis anguria (FELIPPE, 1980).

Tratamentos de baixas temperaturas, conhecidos por estratificação, também podem estimular a germinação no escuro de sementes foto-

blásticas positivas. Isto foi observado, por exemplo, nas sementes de Paulownia tomentosa (BARNHILL et al., 1982), onde estratificação a 3°C por 3 a 8 semanas se mostrou efetiva. Em R. obtusifolius e R. crispus, as sementes podem ser estimuladas a germinar no escuro por estratificação nas temperaturas de 0°C a 15°C. Neste caso, quanto menor a temperatura, maior o período necessário de tratamento (ROBERTS & TOTTERDELL, 1981).

SENDEN et al. (1986) mostraram, para uma série de espécies, que o tratamento de estratificação tornou as sementes capazes de responder a razões vermelho/vermelho-extremo de luz mais baixas. VANDERWOUDE & TOOLE (1980) e BEVINGTON & HOYLE (1981) também evidenciaram que temperaturas baixas aumentaram a sensibilidade de sementes de Lactuca sativa e Betula papyrifera, respectivamente, a baixos níveis de Fve e sugeriram que fenômenos de mudanças de fase de membranas devam estar envolvidos nestas respostas. Estes autores mostraram ainda que o aumento da germinação no escuro pelo tratamento de estratificação depende da presença de Fve nas sementes, o mesmo tendo sido demonstrado por ESASHI et al. (1986) em sementes de Xanthium pennsylvanicum.

Em sementes submetidas a tratamentos de estratificação para quebra da dormência, geralmente são observados aumentos nos níveis endógenos de giberelinas, fato este relatado tanto para sementes não fotoblásticas, como Prunus persica (GIANFAGNA & RACHMIEL, 1986) quanto para sementes fotoblásticas positivas, como Vitis vinifera (PEREIRA & MAEDA, 1986), cuja necessidade de luz pode também ser substituída pela aplicação exógena de giberelinas.

A substituição da exigência de luz por giberelinas é fato bastante conhecido, ocorrendo, por exemplo, em sementes de Porophyllum lanceolatum (FELIPPE & LUCAS, 1971), Apium graveolens (THOMAS, 1989) e Paulownia tomentosa (GRUBIŠIĆ *et al.*, 1988). Nestes casos, os autores sugerem o envolvimento do fitocromo na biossíntese deste fitormônio.

No entanto, outros autores sugerem que luz e giberelinas tenham uma ação em separado no desencadeamento da germinação, agindo em diferentes cadeias de eventos que levam à emergência da radícula (LEWAK & KHAN, 1977) ou na regulação de sítios sequenciais da via de germinação (VIDAVER & HSAIO, 1974). RETHY *et al.* (1987) demonstraram em Kalanchoë blossfeldiana que GA₃ altera a sensibilidade das sementes ao Fve, tornando-as mais capazes de responder a níveis baixos desta forma do fitocromo. HILHORST *et al.* (1986) e HILHORST & KARSEN (1988) propuseram que existe um efeito duplo da luz agindo via fitocromo na germinação de sementes de Sisymbrium officinale e Arabidopsis thaliana: o primeiro estimulando a biossíntese de giberelinas e o segundo aumentando a sensibilidade às giberelinas, através da estimulação da formação ou da atividade de sítios receptores para estes reguladores.

O envolvimento de outros fitormônios no controle da germinação pela luz é bem menos evidente. Aplicação de citocininas exógenas, de modo geral, induz pouca ou nenhuma germinação (BEWLEY & BLACK, 1982), apresentando uma maior ação somente quando combinadas com outros agentes promotores, como luz, giberelinas ou etileno (TAYLORSON & HENDRICKS, 1977). Por exemplo, citocininas exógenas não foram capazes de promover a germinação no escuro de sementes de Chenopodium album (KARSEN, 1976) e Stevia rebaudiana (RANDI & FELIPPE, 1981), enquanto

levaram a uma pequena estimulação em Bidens pilosa (VÁLIO et al., 1972). Por outro lado, TAKAKI et al. (1982) demonstraram aumento na atividade citocinínica em sementes de Rumex obtusifolius após irradiação com vermelho ou tratamento de temperatura elevada.

Etileno parece também ter pouca ação isoladamente, havendo, em geral, uma interação com luz (TAYLORSON & HENDRICKS, 1977). Em Stevia rebaudiana (RANDI & FELIPPE, 1981) e Rumex obtusifolius (TAKAKI et al., 1981a), a aplicação de etrel não causou aumento da germinação no escuro; em Chenopodium album (KARSSSEN, 1976) e Lactuca sativa (SPEER et al., 1974), etileno foi apenas parcialmente promotor. Neste último caso, ele se tornou altamente efetivo quando em combinação com vermelho ou giberelinas. SAINI et al. (1989) demonstraram que em Lactuca sativa ocorreu uma maior liberação de etileno em sementes mantidas na luz em comparação com aquelas mantidas no escuro. Já em Cucumis anguria - semente fotoblástica negativa - a liberação de etileno se mostrou maior no escuro (CARDOSO & FELIPPE, 1983). No entanto, nestes casos, não tem havido evidências para relação do fitocromo com etileno. Quanto ao ácido abscísico, foi mostrado que ele pode inibir a germinação induzida pelo vermelho (GRUBIŠIĆ et al., 1988; KARSSSEN, 1976), mas o seu efeito ocorre provavelmente por inibição do alongamento das células da radícula.

O gênero Impatiens (Balsaminaceae) contém um grande número de espécies - cerca de 900 - distribuídas principalmente nos trópicos e subtrópicos do Velho Mundo, especialmente em áreas de florestas úmidas montanhosas, com espécies também em regiões temperadas da China e Ja-

pão e algumas poucas na América do Norte (GREY-WILSON, 1985).

Várias espécies de Impatiens, devido à sua capacidade de produzir flores de cores diversas e vivas, são bastante cultivadas como plantas ornamentais na Europa e Estados Unidos (GREY-WILSON, 1980) e têm sido objeto de estudos na área de ecologia, botânica e fisiologia, existindo, inclusive, alguns estudos envolvendo bioquímica, dormência e germinação de sementes de algumas das espécies, as quais frequentemente necessitam de um período de estratificação (JOURET, 1977 apud SIMMONDS, 1980a; NOZZOLILLO & THIE, 1983; NOZZOLILLO et al., 1986; MUMFORD, 1988).

Impatiens wallerana Hook.f., nativa do leste da África Tropical, é provavelmente a espécie mais cultivada do gênero, sendo de ocorrência frequente no Brasil, onde é conhecida vulgarmente pelo nome de "beijo" ou "maria-sem-vergonha". Segundo JOLY (1983), esta espécie já se transformou em planta subespontânea, tendo invadido recentemente as regiões sombrias e úmidas de todo o sul do Brasil. Em geral, pode ser encontrada em margens sombreadas de rios, beiras sombreadas de estradas e caminhos, e frequentemente perto de habitações (GREY-WILSON, 1985). Esta espécie é também conhecida pelos sinônimos I. sultani Hook.f. e I. holstii Engler & Warb e a descrição de seus caracteres taxonômicos pode ser encontrada em GREY-WILSON (1985).

Apesar de seu largo uso como planta ornamental, não são muito comuns estudos envolvendo a espécie. Existem algumas referências na literatura a respeito de fitopatologia (WALKER, 1980; LOCKHART & BETZOLD, 1980; KOENIG et al., 1983), crescimento (HIGUCHI et al., 1987) e abscisão (SEXTON, 1979; WARREN WILSON et al., 1987a, 1987b,

1988a, 1988b).

Com relação a dados de germinação foram encontrados na literatura apenas alguns poucos trabalhos envolvendo sementes de cultivares comerciais de I. wallerana, disponíveis na América do Norte, as quais parecem não apresentar qualquer tipo de dormência ou exigência especial - como os de SIMMONDS (1980a) sobre comparação da razão de germinação entre diferentes cultivares, de SIMMONDS (1980b) sobre o efeito de pré-tratamentos osmóticos e de baixas temperaturas e de FRETT & PILL (1989) sobre determinação de condições de osmocondicionamento que possibilitam aumento na razão de germinação - e citações, retiradas de manuais comerciais para produtores, sobre o efeito promotor da luz na germinação de sementes de espécies de Impatiens (CATHEY, 1969 apud SIMMONDS, 1980a; EWART, 1976 apud SIMMONDS, 1980b).

O objetivo deste trabalho consistiu em caracterizar a resposta das sementes de Impatiens wallerana à luz, procurando analisar o envolvimento do fitocromo na germinação, verificar a interação de tratamentos de luz com diferentes temperaturas e estudar o efeito da aplicação de tratamentos de estratificação e de ácido giberélico em substituição à luz e em interação com esta, a fim de buscar um possível esclarecimento do mecanismo de fotocontrole da germinação nesta espécie.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Material Vegetal

As sementes de Impatiens wallerana Hook.f.(= I. sultani Hook.f.; = I. holstii Engler & Warb.) utilizadas neste trabalho foram coletadas em canteiros localizados no campus da Universidade Estadual de Campinas (SP) e nas dependências do Centro Experimental de Campinas - Instituto Agrônomo de Campinas (SP).

Os frutos das espécies de Impatiens apresentam deiscência explosiva, de modo que eles se abrem a um simples toque. Portanto, durante a coleta, tomou-se cuidado para evitar a expulsão e perda das sementes.

No laboratório, o material foi selecionado, separando-se as sementes dos restos dos frutos e eliminando-se aquelas cuja coloração era diferente da apresentada por sementes encontradas em frutos maduros. Estas apresentam coloração marrom, ao passo que sementes expulsas de frutos perturbados, não completamente maduros, são esbranquiçadas ou ligeiramente amarronzadas.

As sementes selecionadas foram deixadas expostas ao ar no laboratório por 2 a 3 dias e então armazenadas em frascos de vidro tampados em condições ambientais não controladas, até serem utilizadas nos diferentes experimentos.

As sementes foram caracterizadas quanto ao tamanho - através de medidas de seus eixos maior e menor sob microscópio estereoscópico equipado com ocular milimétrica - e quanto ao peso*. Sementes muito pequenas, que se afastavam muito da média geral, nunca foram utilizadas.

Para os experimentos de germinação, procurou-se utilizar, sempre que possível, sementes recém-colhidas ou com poucas semanas de armazenamento.

2. Curva de Embebição

Para a construção da curva de embebição, 4 amostras de 10 sementes foram colocadas para embeber em água destilada, sob luz e temperatura do ambiente, após ter sido determinado o seu peso inicial. As sementes foram, a seguir, pesadas com 1, 2, 3, 5 e 24 horas de embebição. Para a pesagem, as sementes foram secas rapidamente com papel absorvente, pesadas em balança analítica e colocadas de volta em água destilada. Foi calculado o aumento do peso das sementes, em porcentagem, em relação ao peso inicial.

* Neste trabalho, optou-se pelo termo peso, utilizado internacionalmente, embora os valores apresentados se refiram, na realidade, à massa do material.

3. Método Geral de Germinação

Nos experimentos de germinação, foram utilizados, em todos os tratamentos, 4 amostras de 25 sementes. As sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri, de 5 cm de diâmetro, forradas com dois discos de papel de filtro umedecidos com água destilada ou com 1 ml da solução a ser testada. As placas de Petri foram mantidas no interior de caixas gerbox forradas com papel de filtro úmido. Foram utilizadas câmaras de germinação FANEM 347F. ou FORMA SCIENTIFIC mod. 24, com condições controladas de luz e temperatura. Exceto quando citado, os experimentos foram mantidos à temperatura de 25°C.

Para a maioria dos tratamentos, a germinação das sementes foi acompanhada durante 14 dias. O critério para se considerar a semente germinada foi a protrusão da radícula. As sementes germinadas foram removidas das placas após as contagens. Sempre que necessário, os papéis de filtro foram reumedecidos com água destilada. Nos tratamentos de escuro, as contagens foram feitas sob luz verde de segurança.

4. Tratamentos com Luz

Nos experimentos com luz branca constante foram utilizadas lâmpadas fluorescentes brancas do tipo luz do dia de 15W, que proporcionavam ao nível das placas uma irradiância de $320\mu\text{Wcm}^{-2}$. Nos tratamentos de escuro contínuo ou períodos curtos de escuro, as placas foram colo-

cadadas dentro de três sacos plásticos pretos.

Para obtenção de luz monocromática de banda larga, nos casos de luz vermelha e de luz azul, foi utilizado um filtro formado por duas folhas de papel celofane vermelho e azul, respectivamente (LEWAK & KHAN, 1977; CARDOSO, 1985), sob luz de duas lâmpadas fluorescentes brancas - marca Sylvania - de 15W cada. Para o vermelho-extremo, o filtro foi formado por três folhas de papel celofane azul e duas de papel celofane vermelho (VÁLID, 1986) sob uma lâmpada incandescente branca - marca Sylvania - de 40W. Em todos estes casos, as placas foram mantidas a uma distância de 20cm das lâmpadas.

Os espectros de emissão das lâmpadas fluorescentes e incandescentes - fornecidos pela GTE do Brasil, Divisão Sylvania - e os espectros de transmissão dos filtros para vermelho e vermelho-extremo - medidos em espectrofotômetro - são apresentados no Apêndice.

4.1. Tratamento com Luz Contínua de Diferentes Qualidades

As sementes foram mantidas sob tratamentos de luz branca, luz vermelha, luz azul, vermelho-extremo e escuro contínuos. Após a avaliação da porcentagem final de germinação, as sementes dos tratamentos onde não houve germinação significativa foram transferidas para luz branca contínua para nova avaliação da porcentagem final de germinação.

4.2. Tratamentos com Luz Vermelha

4.2.1. Sensibilidade a uma exposição ao vermelho

As sementes foram expostas a uma irradiação de 2h com luz vermelha após 0h, 2h, 6h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h de embebição no escuro, sendo então mantidas em escuro contínuo até o final do experimento.

4.2.2. Irradiação inicial com vermelho

As sementes foram tratadas desde o início do período de embebição por 8h, 24h, 48h, 72h e 96h com luz vermelha, sendo então transferidas para escuro contínuo.

4.2.3. Irradiação intermitente com vermelho

Nos casos de iluminação intermitente com luz vermelha, quando não citado, o início das exposições à luz se deu após 2h de embebição no escuro, a duração de cada exposição foi de 2h e as irradiações foram fornecidas a cada 24h, ou seja, com intervalos de escuro entre as exposições de 22h. Após o término da sequência de exposições à luz, as sementes foram sempre mantidas em escuro até o final do experimento.

Foi verificada a resposta à irradiação repetida com vermelho, testando-se diferente número de exposições - de 1 a 5 ou de 1 a 7 - em vários lotes de sementes, separados por época de coleta.

O efeito da duração de cada exposição foi também estudado. Neste caso, as sementes receberam o tratamento de 5 exposições ao vermelho, uma a cada 24h, tendo cada uma delas a duração de 1, 5, 10, 15, 30, 60 ou 120 minutos.

Para verificar se a resposta de germinação era dependente do número de exposições a que eram submetidas as sementes ou do período no qual estas eram aplicadas, um conjunto de testes foi desenvolvido.

O experimento no qual se verificava a resposta a diferente número de exposições ao vermelho foi repetido, mas de modo que todos os tratamentos fossem completados em um mesmo período, fixado em 100 horas, variando-se, para isto, o intervalo de escuro entre as exposições. Assim sendo, nos tratamentos de 5, 4, 3 e 2 exposições ao vermelho, os intervalos de escuro entre as irradiações foram, respectivamente, de 22h, 30h, 46h e 94h.

Os tratamentos de 2 e 3 exposições ao vermelho foram oferecidos, separadamente, com as irradiações sendo aplicadas em diferentes períodos: após 2h de embebição e após 48h de embebição, no esquema comumente empregado; após 2h de embebição, mas com as exposições distribuídas no período de 100h; e no final do período de 100h, modificando-se, para isto, o período de incubação no escuro anterior ao início das exposições (50h e 74h para os tratamentos de 2 e 3 exposições, respectivamente).

Foi testado ainda o efeito da variação do intervalo de escuro entre as irradiações, utilizando-se intervalos de 10h, 22h, 46h, 70h e 94h no tratamento de 5 exposições.

4.3. Tratamentos com Vermelho-extremo

A reversibilidade dos efeitos da luz vermelha pelo vermelho-extremo foi testada com os tratamentos de 2, 3 e 4 exposições ao vermelho. Nestes casos, cada irradiação de 2h com vermelho foi imediatamente seguida de uma irradiação de 2h com vermelho-extremo.

Na tentativa de determinação do tempo de escape, foram utilizados vários tratamentos: o tratamento de uma única exposição ao vermelho após 48h de embebição, o que permitiu a aplicação de vermelho-extremo 0h, 24h, 48h e 72h após o vermelho; o tratamento de 5 exposições ao vermelho, no qual o vermelho-extremo foi aplicado subsequentemente e até 20h após o vermelho, ou seja, imediatamente antes de uma nova exposição ao vermelho; e o tratamento de 3 e 5 exposições ao vermelho, fornecidas a cada 48h, o qual permitiu a aplicação de vermelho-extremo logo após o vermelho e depois de decorridos períodos de até 44h de escuro. Nestes casos, para cada irradiação de 2h com vermelho, correspondeu sempre uma irradiação com vermelho-extremo de igual duração.

O mesmo tipo de tratamento foi repetido com exposições ao vermelho e ao vermelho-extremo de 15 minutos.

Para melhor investigação das respostas às exposições ao vermelho-extremo, foram comparados os efeitos do vermelho-extremo aplicado durante os intervalos de escuro dos tratamentos de 5 exposições ao vermelho fornecidas uma a cada 48h e a cada 96h. Vermelho-extremo foi também fornecido durante um período de embebição das sementes anterior a uma exposição ao vermelho, de modo contínuo por 144h ou na forma de uma exposição de 2h após as 144h de embebição.

5. Tratamentos com Temperaturas

5.1. Temperaturas Constantes e Alternadas

Foi estudada a germinação das sementes nas temperaturas constantes de 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C sob condições de luz branca e escuro contínuos. Nas temperaturas em que houve pouca ou nenhuma germinação, as sementes foram transferidas para 25°C, mantendo-se a condição luminosa (luz ou escuro) prévia, para avaliação da porcentagem final de germinação.

Foram também testadas as temperaturas alternadas de 25°C-5°C, 25°C-10°C e 25°C-20°C, com duração de 12h para cada temperatura, sob condições de luz branca e escuro contínuos.

5.2. Interação entre Temperatura e Exposições à Luz Vermelha

Foi verificada a resposta das sementes a diferente número de exposições ao vermelho nas temperaturas de 15°C, 25°C e 30°C.

Foi também verificada a resposta das sementes a uma única exposição ao vermelho sob diferentes temperaturas. Os tempos de embebição no escuro, anteriores à irradiação, foram basicamente os mesmos utilizados anteriormente - 0h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h - e as temperaturas testadas foram 15°C, 20°C e 25°C.

6. Giberelinas

6.1. Tratamento com Ácido Giberélico

Diversas concentrações de ácido giberélico (GA₃) foram testadas na germinação das sementes sob escuro contínuo. Foram utilizadas as concentrações de 0.1, 1, 10, 50, 100, 500 e 1000 µg/ml, ao lado do controle em água destilada.

6.2. Interação entre GA₃ e Exposições à Luz

Foi analisado o efeito de exposições sub-ótimas à luz vermelha e exposição ao vermelho-extremo na germinação de sementes colocadas para germinar na presença de GA₃ 50 µg/ml (0,15mM). Para tanto, as sementes assim tratadas foram expostas, após as 2h de embebição normalmente utilizadas, a 1 e 2 exposições (2h) ao vermelho e a 1 exposição (0,5h) ao vermelho-extremo, ao lado de controles em escuro contínuo.

6.3. Inibidores de Biossíntese de Giberelinas em Tratamento Indutivo de Luz

As sementes foram submetidas ao tratamento indutivo de 5 exposições ao vermelho na presença de 2 inibidores de biossíntese de giberelinas: CCC (cloreto de 2-cloroetil-trimetilamônio) na concentração 1mM e paclobutrazol [(2RS,3RS)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pentan-3-ol] na concentração 5µM.

7. Estratificação

Para os tratamentos de estratificação, as sementes foram colocadas em placas de Petri, da maneira descrita anteriormente, e mantidas em câmara de germinação, a 10°C, sob escuro contínuo. Após o período

de estratificação, as placas foram transferidas para câmaras a 25°C, mantendo-se sempre a condição de escuro contínuo, para avaliação da porcentagem de germinação. Exceto quando citado, as sementes foram mantidas, quando da transferência para 25°C, nas soluções usadas durante a estratificação.

Foram testados períodos de 30, 45 e 60 dias de estratificação.

7.1. Estratificação na Presença de Giberelinas

O efeito da aplicação de giberelinas durante o período de estratificação foi observado. Para tanto, as sementes foram estratificadas por 45 dias na presença de GA₃ 50 µg/ml, ao lado da estratificação em água destilada (controle). Foi testada também a estratificação em água destilada seguida da transferência para solução de GA₃ 50 µg/ml.

7.2. Estratificação na Presença de Inibidores de Biossíntese de Giberelinas

Os tratamentos de estratificação foram realizados na presença de inibidores de biossíntese de giberelinas. CCC foi utilizado em diferentes concentrações. Paclobutrazol foi utilizado na concentração 5µM. Em um dos experimentos, sementes estratificadas na presença destes inibidores foram, após a avaliação da porcentagem final de germinação a 25°C, transferidas para placas contendo GA₃ 50 µg/ml para testar a

reversão do efeito dos inibidores pelo ácido giberélico.

Adicionalmente, foi verificado o efeito da estratificação na presença de paclobutrazol 5 μ M seguida da transferência para água destilada e o efeito da estratificação em água destilada seguida da transferência para solução de paclobutrazol 5 μ M.

Em todos estes casos, o tratamento de estratificação durou 45 dias.

7.3. Interação entre Tratamento de Estratificação e Exposições à Luz

As sementes estratificadas por 45 dias foram submetidas, no momento da transferência para 25°C, a uma exposição de 2h ao vermelho ou ao vermelho-extremo, sendo a seguir mantidas em escuro contínuo, com o intuito de se verificar se os tratamentos de luz eram capazes de ampliar ou anular o efeito da estratificação.

8. Análise de Giberelinas Endógenas

A presença de giberelinas endógenas foi investigada em sementes incubadas a 25°C por 72h em escuro contínuo e em sementes estratificadas por 30 dias em água destilada e paclobutrazol 5µM.

Foram utilizadas 2.5g de sementes secas, as quais foram distribuídas em placas de Petri de 9cm de diâmetro com papel de filtro umedecido com 4 ml de água destilada ou de solução de paclobutrazol. Após os períodos citados acima, as sementes foram reunidas em béquer mantido em banho de gelo, e o peso das sementes embebidas foi determinado. Deste modo, para a extração, foram utilizadas 5,0g de sementes incubadas a 25°C, 4,5g de sementes estratificadas em água destilada e 4,8g de sementes estratificadas na presença do inibidor.

Nos três casos, 4 amostras de 25 sementes foram separadas para o teste de germinação sob escuro contínuo.

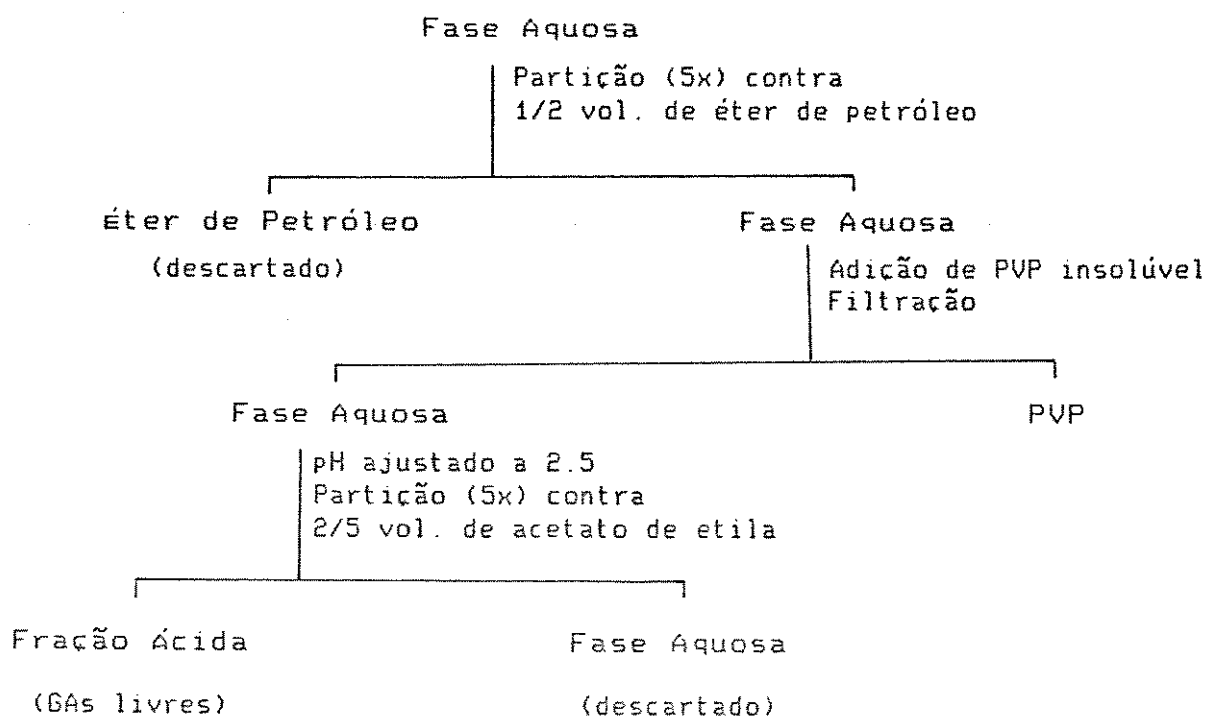
8.1. Extração e Fracionamento

Para extração e fracionamento, utilizou-se o método descrito por Reeve & Crozier (1978).

As sementes foram trituradas em graal e homogeneizadas em Polytron, com metanol p.a. gelado, na proporção de 10 ml para cada 1 grama de sementes. O extrato foi filtrado a vácuo e o resíduo foi extraído por mais 2 vezes, com igual volume de metanol, sendo os filtrados reunidos.

O extrato metanólico assim obtido foi reduzido à fase aquosa em evaporador rotatório, a vácuo, em temperatura de 30°C. Ao resíduo aquoso, foram adicionados dois volumes de tampão fosfato 0.5M pH 8.0 e, se necessário, o pH foi ajustado a 8.0 com KOH. A seguir, procedeu-se ao fracionamento do extrato para obtenção da fração ácida.

A fase aquosa foi extraída por 5 vezes com 1/2 volume de éter de petróleo e à fase aquosa resultante foi adicionado PVP (polivinilpirrolidona) insolúvel na proporção de 50 mg/ml de extrato. Esta mistura foi filtrada a vácuo e a fase aquosa teve seu pH ajustado a 2.5 com HCl, sendo a seguir extraída por 5 vezes com 2/5 volumes de acetato de etila. O esquema resumido do fracionamento é apresentado a seguir:



Após a obtenção da fração ácida, esta foi submetida à temperatura de congelamento da água para remoção da água residual. Após a remoção dos cristais de água congelada, foi adicionado sulfato de sódio anidro em excesso ao extrato, seguido de filtração, para remoção da água ainda presente.

A fração ácida foi reduzida em evaporador rotatório (volume final de 1ml/g de semente embebida), a 30°C, e mantida em freezer.

8.2. Purificação e Preparo da Amostra

Uma alíquota da fração ácida a ser analisada - o correspondente a 1g de sementes embebidas - foi separada e submetida à evaporação até a secagem completa em evaporador rotatório. O material foi ressuscitado em metanol (volume final de 2ml) e a amostra foi purificada em mini-colunas SEP-PAK C18 (Waters Associates). A mini-coluna foi estabilizada previamente pela passagem de 10 ml de metanol e a amostra eluída com 8 ml de metanol. A amostra coletada foi submetida à evaporação completa em evaporador rotatório, o material novamente ressuscitado em 1 ml de metanol e a amostra evaporada sob fluxo de nitrogênio até a secagem. O material foi ressuscitado finalmente em metanol (MERCK): ácido acético 0.5% na proporção 40:60 v/v. Quando necessário, a amostra foi centrifugada para remoção de quaisquer resíduos presentes.

8.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os compostos presentes nas amostras foram separados através de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, onde se utilizou coluna Hypersil-ODS 5 μ m, 250mm X 4.6mm. A fase móvel consistiu em ácido acético 0.5% (solvente A) e metanol p.a (MERCK) (solvente B), em gradiente de eluição de 40 a 85% de metanol em 30 minutos, com fluxo de 1 ml/min.

Os eluatos foram coletados de 2 em 2 minutos, resultando, portanto, em 15 frações disponíveis para a montagem do bioensaio para detecção de atividade giberelínica.

8.4. Bioteste do Alongamento do Hipocótilo de Alface

Para a realização dos bioensaios, os 2 ml coletados de cada fração foram subdivididos em 4 alíquotas de 0,5 ml - a fim de se obter 4 repetições para cada fração - e estas foram distribuídas em cubetas de 2x2 cm forradas com papel de filtro. Para se obter o controle, alíquotas do solvente foram também distribuídas em cubetas. As placas foram deixadas expostas ao ar e, após a evaporação do solvente, procedeu-se à montagem do bioensaio do alongamento do hipocótilo de alface (FRANKLAND & WAREING, 1960).

Sementes de alface cv. Grand Rapids foram colocadas para germinar em placas de Petri a 25°C por 24h sob luz branca contínua. Após este período, as plântulas foram selecionadas por homogeneidade de tamanho

e estas foram transferidas em grupos de 4 para cada cubeta, sobre o papel de filtro então umedecido com 0,5 ml de água destilada.

As placas foram mantidas em câmara de crescimento a 25°C sob luz branca constante. Após 4 dias da montagem, foram medidos os hipocóti-
los e as medidas transformadas em porcentagem do controle.

9. Cálculo do Tempo Médio de Germinação

O tempo médio de germinação (em dias) e sua variância - a partir da qual foi calculado o erro padrão apresentado nas tabelas - foram calculados utilizando-se as seguintes expressões (LABOURIAU, 1983):

$$\bar{t} = \frac{\sum n_i t_i}{\sum n_i} \quad \text{e} \quad s^2_t = \frac{\sum n_i (t_i - \bar{t})^2}{-1 + \sum n_i}$$

onde,

$\bar{t}$ = tempo médio de germinação

t_i = tempo de germinação, variando de t_0 (tempo mínimo de germinação) a t_g (tempo máximo de germinação)

n_i = número de sementes germinadas nos intervalos de tempo t_{i-1} e t_i

s^2_t = variância do tempo médio de germinação

10. Análise Estatística

Os dados obtidos dos experimentos de germinação foram analisados estatisticamente quando necessário. Com a finalidade de normalização, as porcentagens de germinação foram transformadas em valor angular ($=\arcsin \sqrt{p}$), sendo p a proporção das sementes germinadas.

Para comparação entre dois tratamentos, utilizou-se o teste t de Student. Para a comparação entre vários tratamentos, utilizou-se análise de variância simples ou fatorial, determinando-se, se necessário, a diferença mínima significativa (DMS) pelo teste Tukey, a nível de 5% de probabilidade (PIMENTEL GOMES, 1976).

Os resultados das análises estão indicados nas figuras ou tabelas através de letras. Como regra geral, os valores ou pontos seguidos pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si. Os resultados dos biotestes para detecção de giberelinas foram analisados também através de análise de variância simples, calculando-se a DMS e transformando-a em porcentagem. As áreas hachuradas nos gráficos diferem significativamente do controle a 5%.

III - RESULTADOS

1. Determinação de Tamanho e Peso das Sementes

As sementes de 1. wallerana apresentam dimensões bastante pequenas, evidenciadas pelas medidas de tamanho e peso mostradas na Tabela 1.

2. Curva de Embebição

A embebição das sementes se mostrou relativamente rápida, havendo um aumento em peso de 74,8% após 24h. Somente nas primeiras 2 horas se atingiu um aumento de 53,5% em relação ao peso inicial. Após 5h de embebição, o valor máximo foi praticamente atingido (Fig. 1).

3. Padrão de Germinação

O comportamento das sementes sob luz branca contínua pode ser observado na Figura 2. A germinação se inicia no 3º ou 4º dia e aumenta rapidamente, de modo que, por volta do 8º ou 9º dia tem-se uma porcen

TABELA 1 - Medidas das sementes de I. wallerana.

Dimensões (mm) (média de 40 sementes)	
Eixo maior	1,9 ($\pm 0,23$)*
Eixo menor	1,2 ($\pm 0,17$)
Peso 200 sementes (mg) (média de 4 amostras)	
Sementes Secas	93,5 ($\pm 3,11$)
Sementes Embebidas (72h)	163,8 ($\pm 6,13$)

* Valores médios seguidos do desvio padrão.

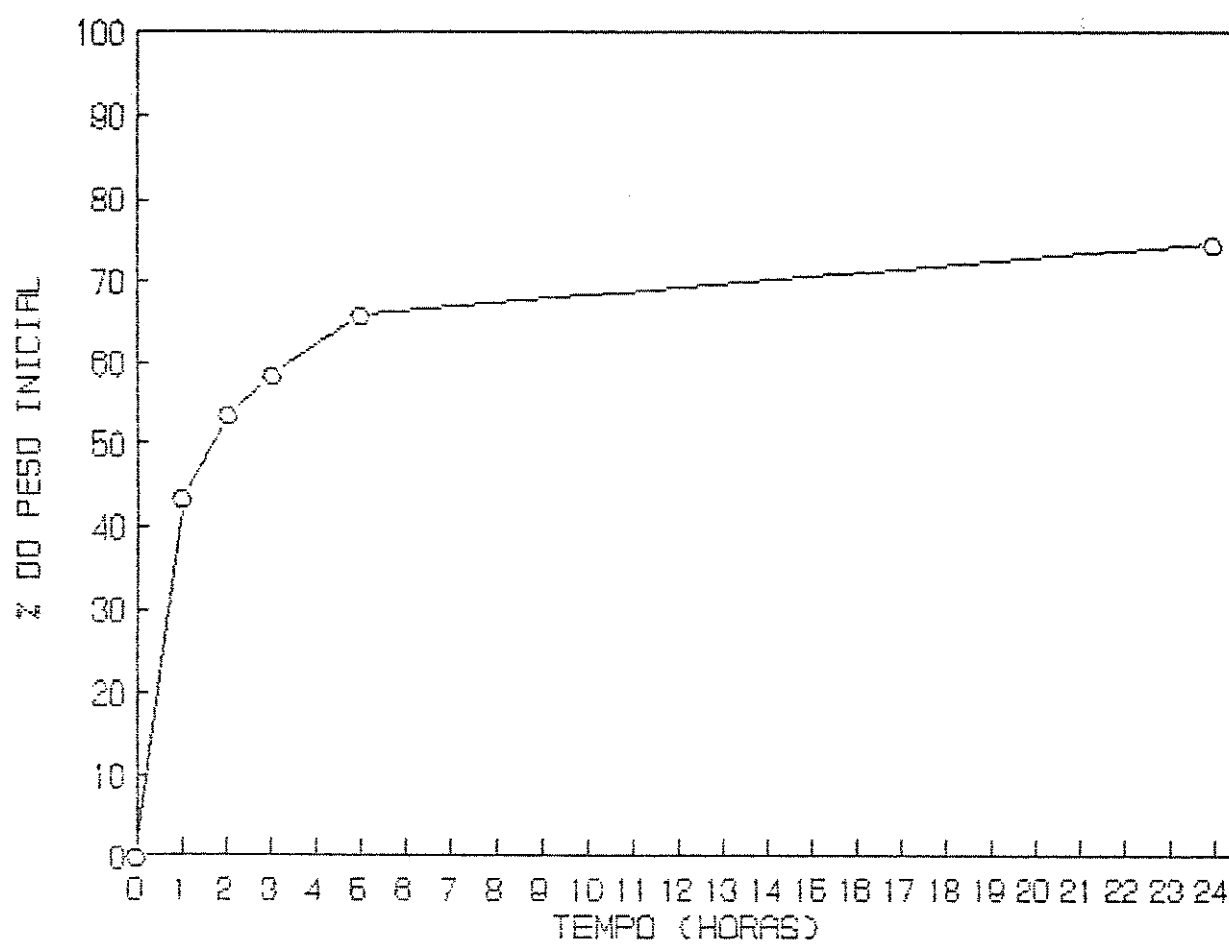


Figura 1 - Curva de embebição de sementes de *I. wallerana*.

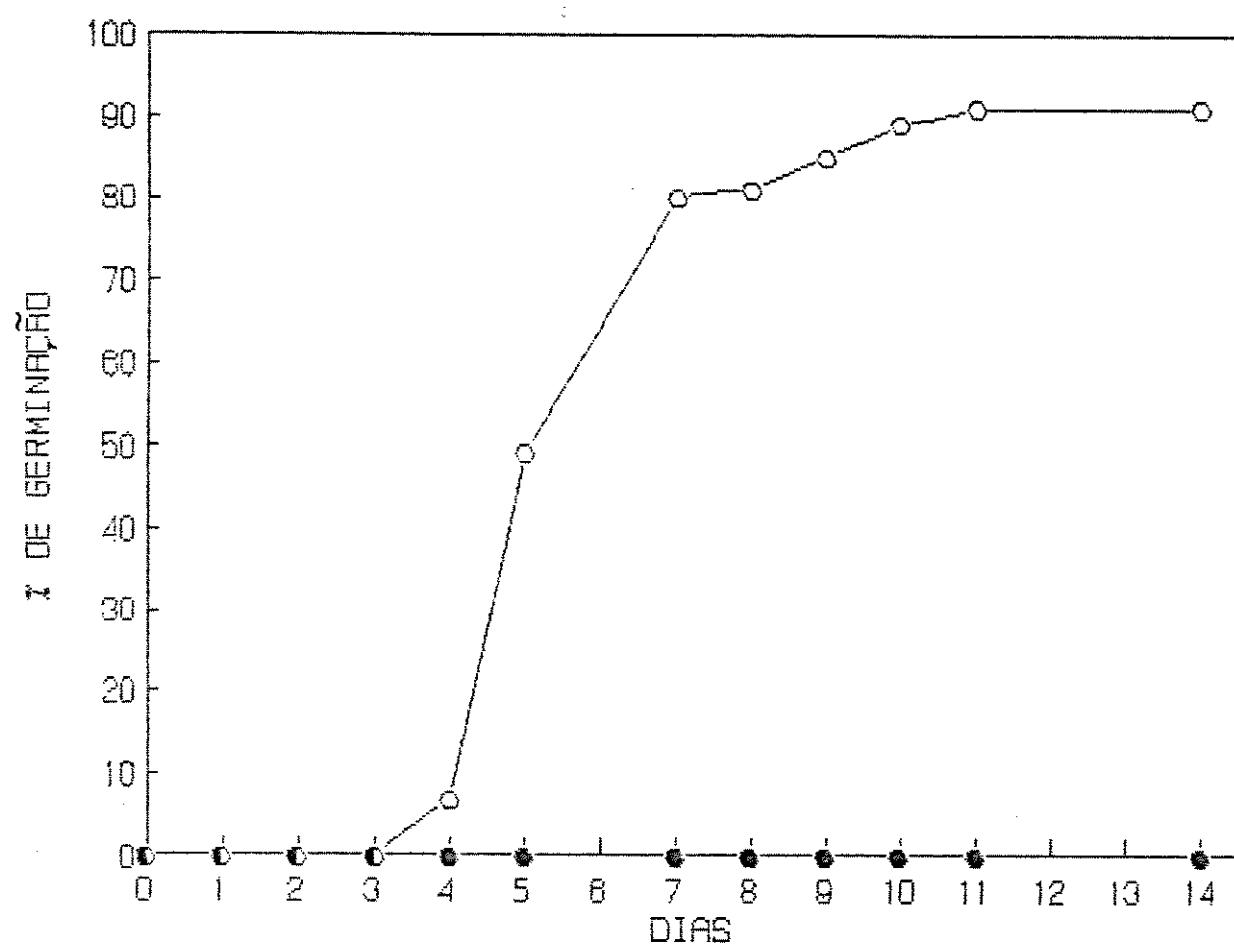


Figura 2 - Curva de Germinação de sementes de I. wallerana.

○ luz branca contínua

● escuro contínuo

tagem de germinação já próxima da porcentagem máxima atingida. Em nenhum experimento, observou-se o início da germinação anterior ao 30 dia. Em escuro contínuo, não ocorreu germinação.

4. Relação da Coloração do Tegumento com a Necessidade de Luz para a Germinação

Com o intuito de se verificar se as sementes com diferenças na coloração do tegumento diferiam em seus requisitos de luz, a germinação das sementes expulsas de frutos não completamente maduros - aquelas com tegumento esbranquiçado - foi testada sob luz branca e escuro contínuos. Sob luz branca constante, as sementes alcançaram germinação máxima (96%), evidenciando a maturidade do embrião. Sob escuro contínuo, a germinação foi nula, não havendo diferenças, portanto, de resposta em relação às sementes de tegumento marrom.

5. Tratamentos com Luz

5.1. Tratamento com Luz Contínua de Diferentes Qualidades

As sementes de *I. wallerana* mostraram alta porcentagem de germinação sob luz branca contínua. Sob escuro contínuo, não ocorreu germinação, corroborando os resultados obtidos anteriormente. Luz vermelha contínua promoveu igualmente a germinação, enquanto que os comprimentos de onda azul e vermelho-extremo se mostraram inibitórios (Tabela 2). As sementes não germinadas sob escuro, vermelho-extremo ou luz azul, quando transferidas para luz branca, vieram a germinar normalmente, atingindo as altas porcentagens finais comumente observadas (Tabela 2).

5.2. Tratamentos com Luz Vermelha

5.2.1. Sensibilidade a uma exposição ao vermelho

As sementes de *I. wallerana* não responderam ou responderam muito pouco a uma exposição de 2h à luz vermelha aplicada após vários períodos de embebição no escuro (Fig. 3). Verificou-se um pequeno aumento de sensibilidade a esta exposição com períodos crescentes de embebição até 48h. Após este período, no entanto, a sensibilidade voltou a cair,

TABELA 2 - Efeito de luz contínua de diferentes qualidades na germinação de sementes de I. wallerana.

TRATAMENTOS	% GERMINAÇÃO APÓS 14 DIAS	% GERMINAÇÃO 14 DIAS APÓS TRANSFERÊNCIA PARA LUZ BRANCA
Luz Branca contínua	90a	-
Vermelho contínuo	85a	-
Azul contínuo	0	90
Vermelho-extremo contínuo	1	92
Escuro contínuo	0	95

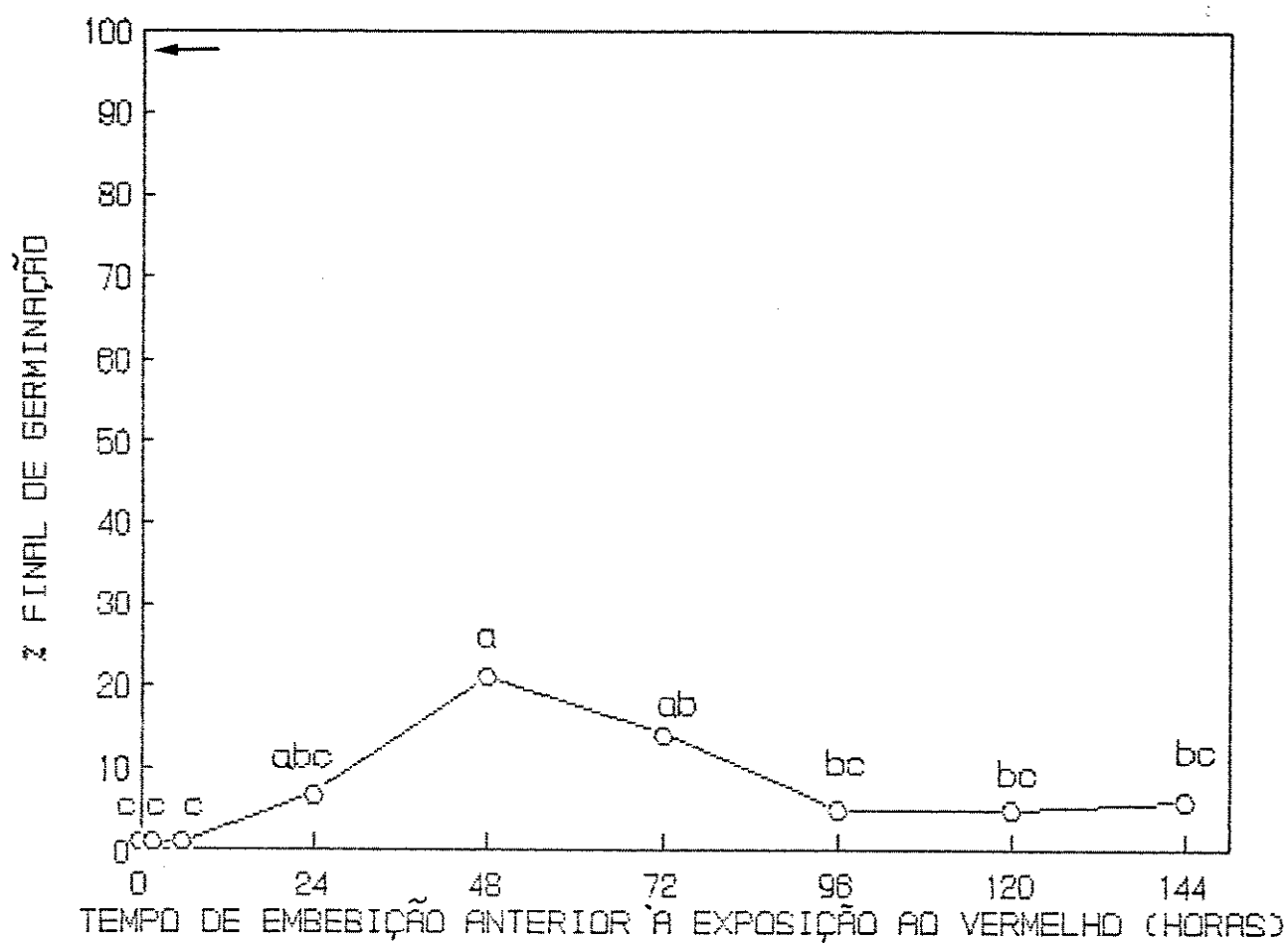


Figura 3 - Resposta das sementes de *I. wallerana* a uma exposição curta (2h) à luz vermelha. Valores obtidos no 14º dia de germinação.

A seta indica a porcentagem final de germinação sob luz branca contínua.

se estabilizando em níveis bastante baixos.

5.2.2. Irradiação inicial com vermelho

As sementes de I. wallerana alcançaram porcentagens finais de germinação comparáveis àquelas obtidas com luz vermelha contínua quando expostas a períodos longos de iluminação. Verificou-se que o tratamento de 8h de irradiação inicial foi bastante inefetivo na promoção da germinação, havendo um aumento gradativo da resposta com o aumento do período de iluminação. Somente os tratamentos de 72h e 96h chegaram a se igualar com o controle em vermelho contínuo (Fig. 4).

5.2.3. Irradiação intermitente com vermelho

Níveis de germinação comparáveis àqueles obtidos com luz branca ou vermelha contínuas também foram alcançados através de exposições curtas repetidas ao vermelho. Houve a necessidade de um certo número mínimo de exposições para a promoção máxima da germinação. Este número mínimo exigido pode apresentar uma certa variação de lote para lote de sementes, como evidenciado na Tabela 3. Apesar desta variação, a maioria dos lotes testados exigiu um número mínimo de 5 exposições para a resposta máxima, assemelhando-se ao padrão de resposta do lote D.

A Figura 5 apresenta as curvas de germinação das sementes submetidas a várias exposições ao vermelho. Observou-se que, também neste

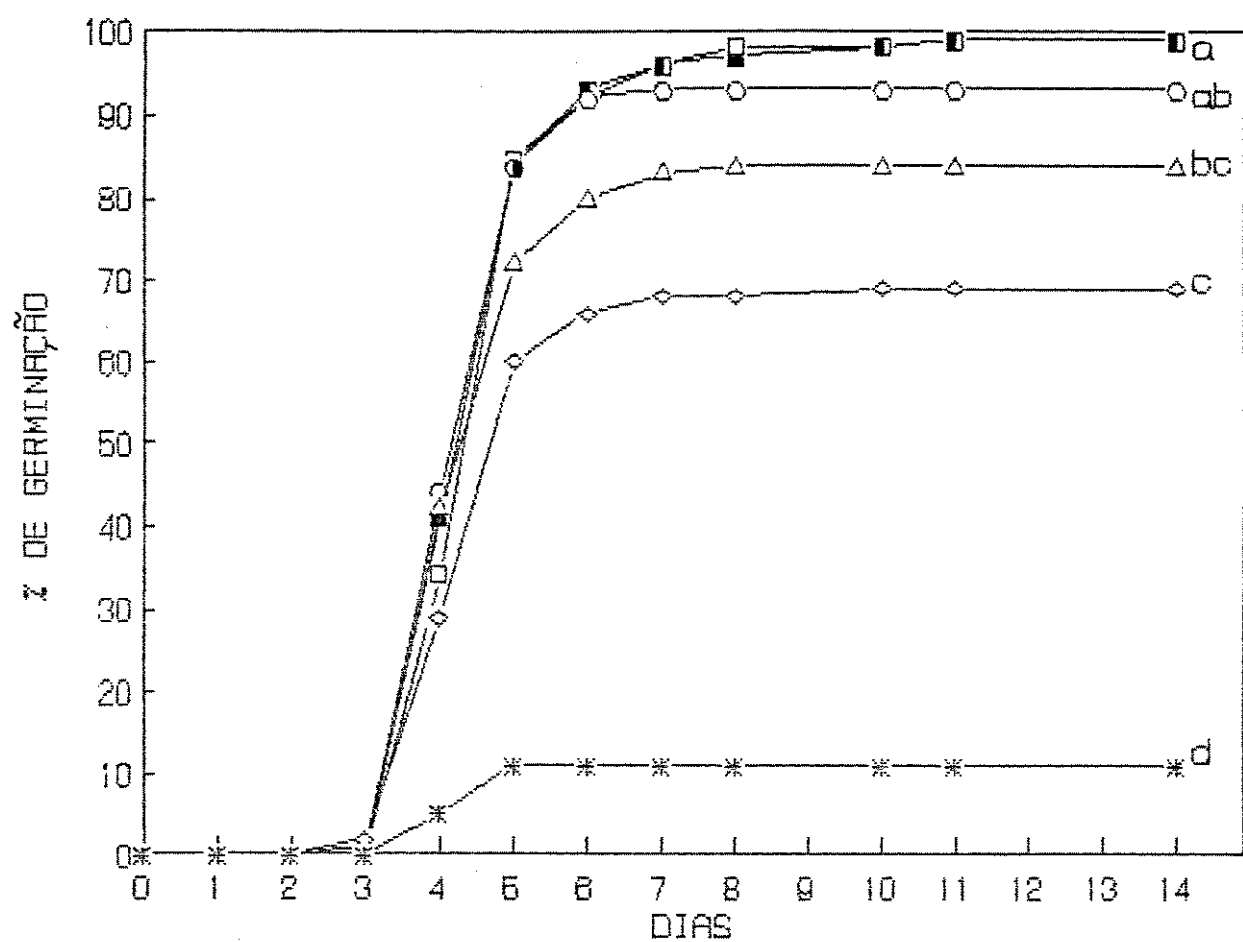


Figura 4 - Curvas de germinação de sementes de *I. wallerana* submetidas a diferentes períodos de irradiação inicial com luz vermelha.

*	8h	Δ	48h	□	96h
◇	24h	○	72h	■	vermelho contínuo

TABELA 3 - Porcentagens finais de germinação de sementes de I. wallerana submetidas a diferente número de exposições curtas ao vermelho. Valores obtidos no 14º dia de germinação.

NÚMERO DE EXPOSIÇÕES AO VERMELHO	% GERMINAÇÃO			
	LOTE A	LOTE B	LOTE C	LOTE D
1	0d	0e	28c	25d
2	1d	14d	59b	50cd
3	18c	41c	71b	75bc
4	36b	68b	91a	87ab
5	50b	69b	89a	97a
6	-	78ab	-	-
7	-	89a	-	-
Luz Vermelha contínua	91a	91a	-	-
Luz Branca contínua	-	-	91a	-

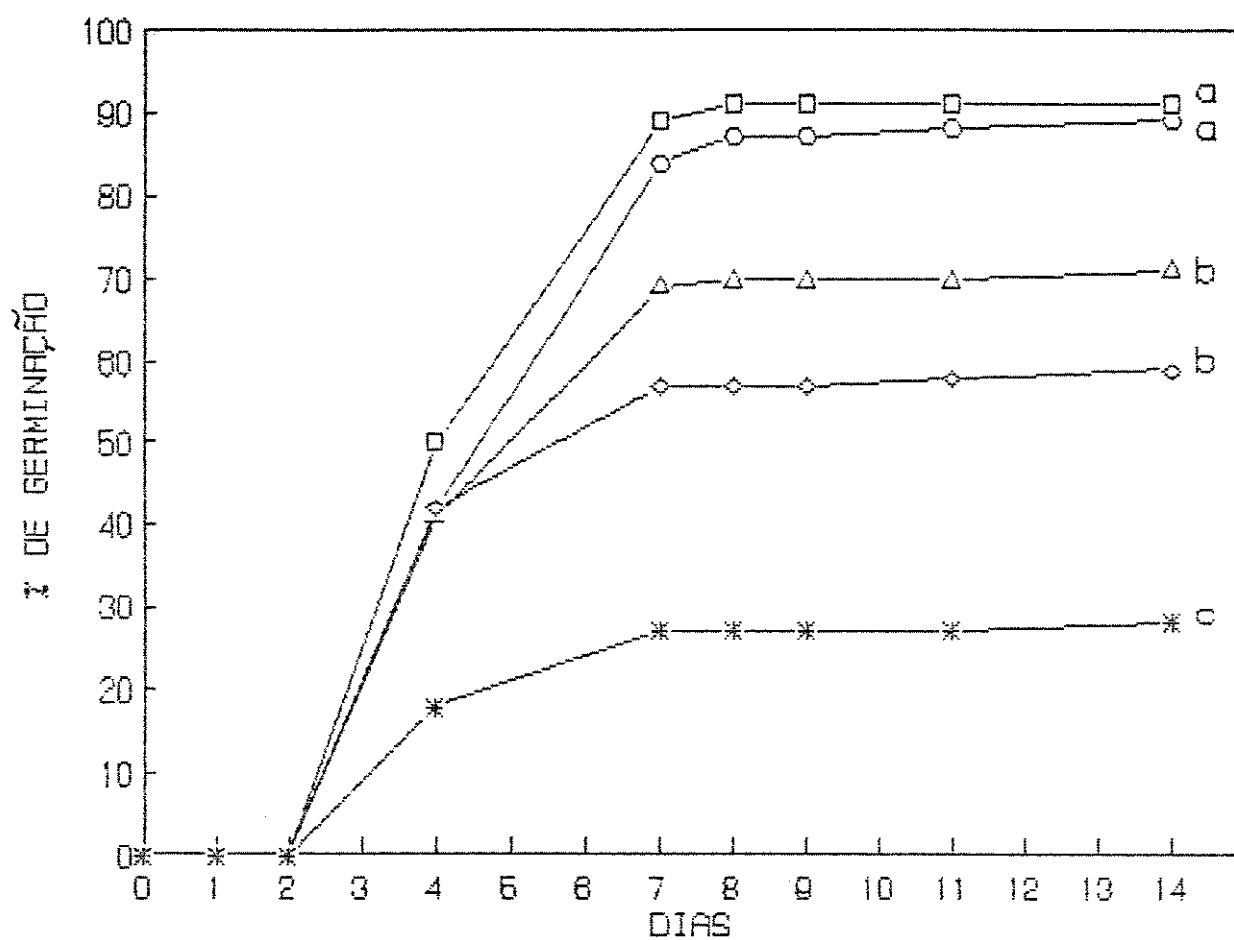


Figura 5 - Curvas de Germinação de sementes de *I. wallerana* submetidas a tratamentos de várias exposições curtas ao vermelho.

* 1 exposição	□ 4 exposições
◇ 2 exposições	○ 5 exposições
Δ 3 exposições	

caso, a resposta se mostrou gradativa, com um número crescente de exposições sendo mais efetivo.

A duração de cada exposição ao vermelho não influenciou a resposta final ao tratamento, com irradiações bastante curtas, de até 1 minuto, sendo tão efetivas quanto as exposições de 2 horas (Fig. 6).

Quando os intervalos de escuro entre as exposições ao vermelho foram ajustados para que todos os tratamentos fossem completados em 100h, o mesmo padrão de resposta foi mantido (Fig. 7), assemelhando-se bastante aos resultados apresentados anteriormente (Fig. 5).

As Figuras 8 e 9 mostram que o período em que foram aplicadas as irradiações não influenciou a porcentagem final de germinação obtida, evidenciando dois pontos importantes: 1) o aumento do intervalo de escuro entre as exposições não causou prejuízo ao resultado final e 2) o aumento do período de embebição anterior ao início das exposições não refletiu nenhum aumento significativo da resposta.

Apesar da não interferência com a porcentagem final de germinação, verificou-se, com estes tratamentos, mudanças na velocidade de germinação, refletidas pelos valores de tempo médio de germinação obtidos (Tabela 4). Os tratamentos onde houve um tempo de embebição maior antes do início das exposições (2V e 3V finais, 2V após 48h) resultaram em um tempo médio de germinação menor em comparação com aqueles obtidos nos tratamentos com apenas 2h de embebição (2V e 3V iniciais). Por outro lado, os tratamentos onde as exposições foram distribuídas em 100h (2V e 3V em 100h) resultaram em um maior tempo médio de germinação.

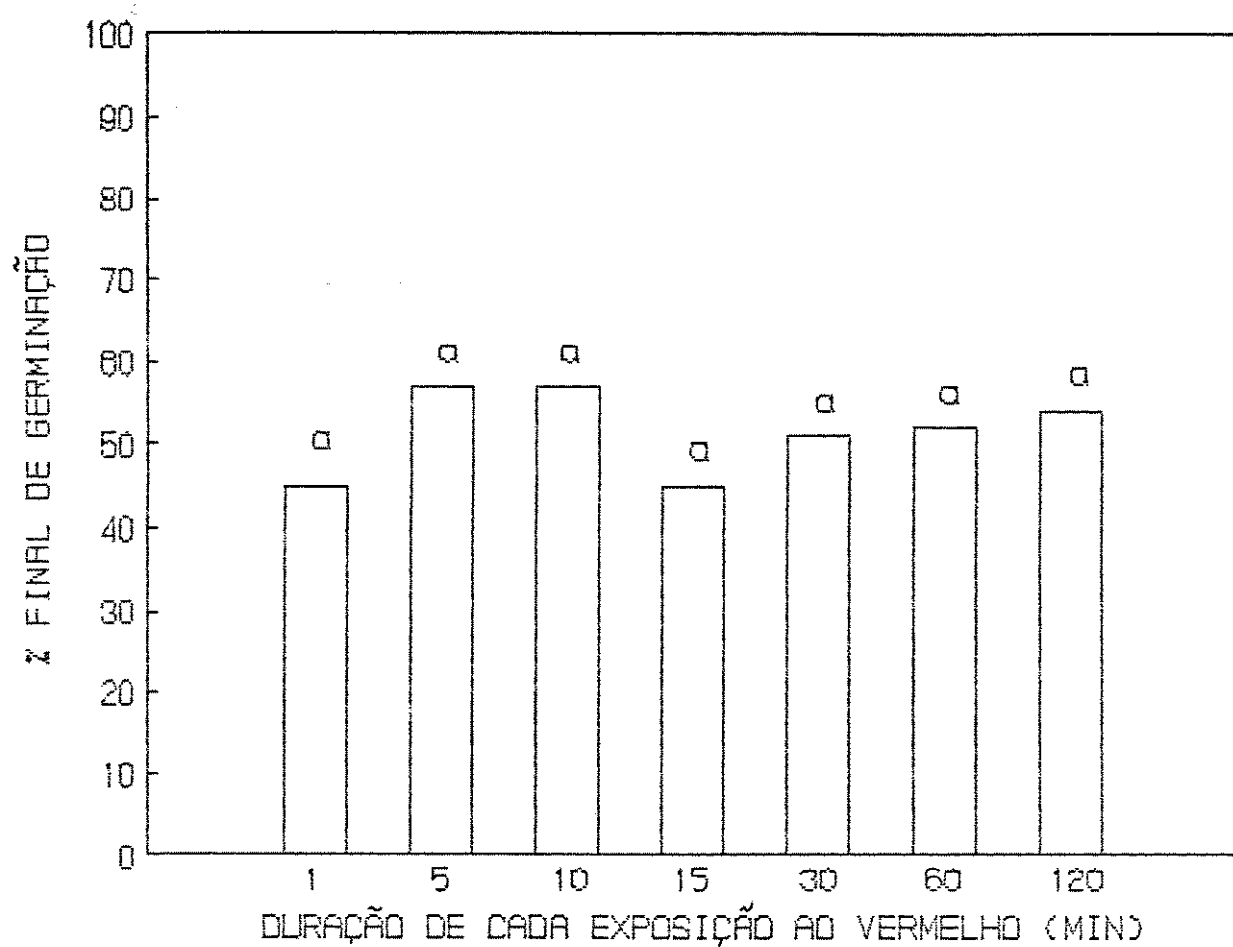


Figura 6 - Resposta das sementes de *I. wallerana* a 5 exposições ao vermelho de diferentes durações. Valores obtidos no 14º dia de germinação.

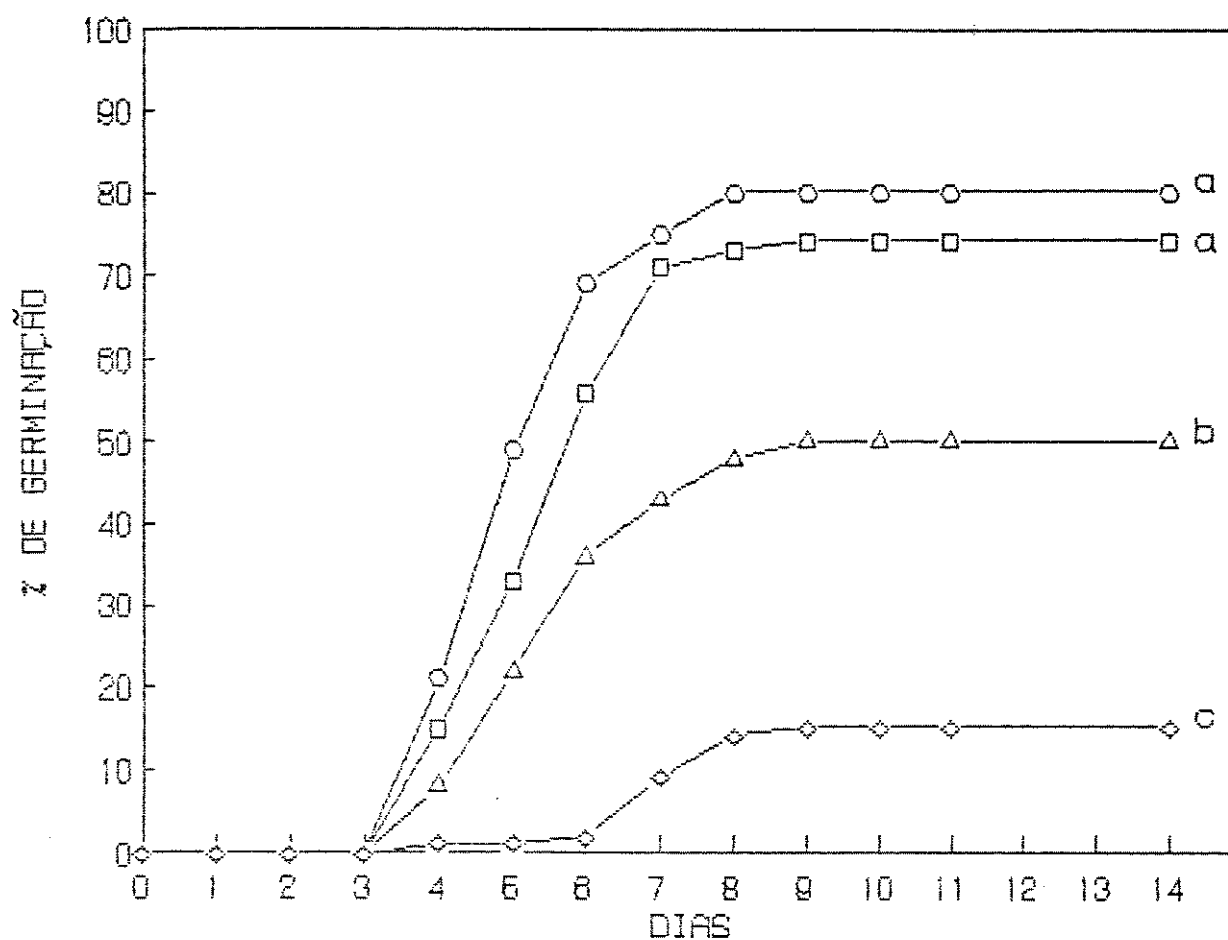


Figura 7 - Resposta das sementes de *I. wallerana* a tratamentos de várias exposições curtas ao vermelho fornecidas em um período de 100h.

◇ 2 exposições - intervalo de 94h

△ 3 exposições - intervalo de 46h

□ 4 exposições - intervalo de 30h

○ 5 exposições - intervalo de 22h

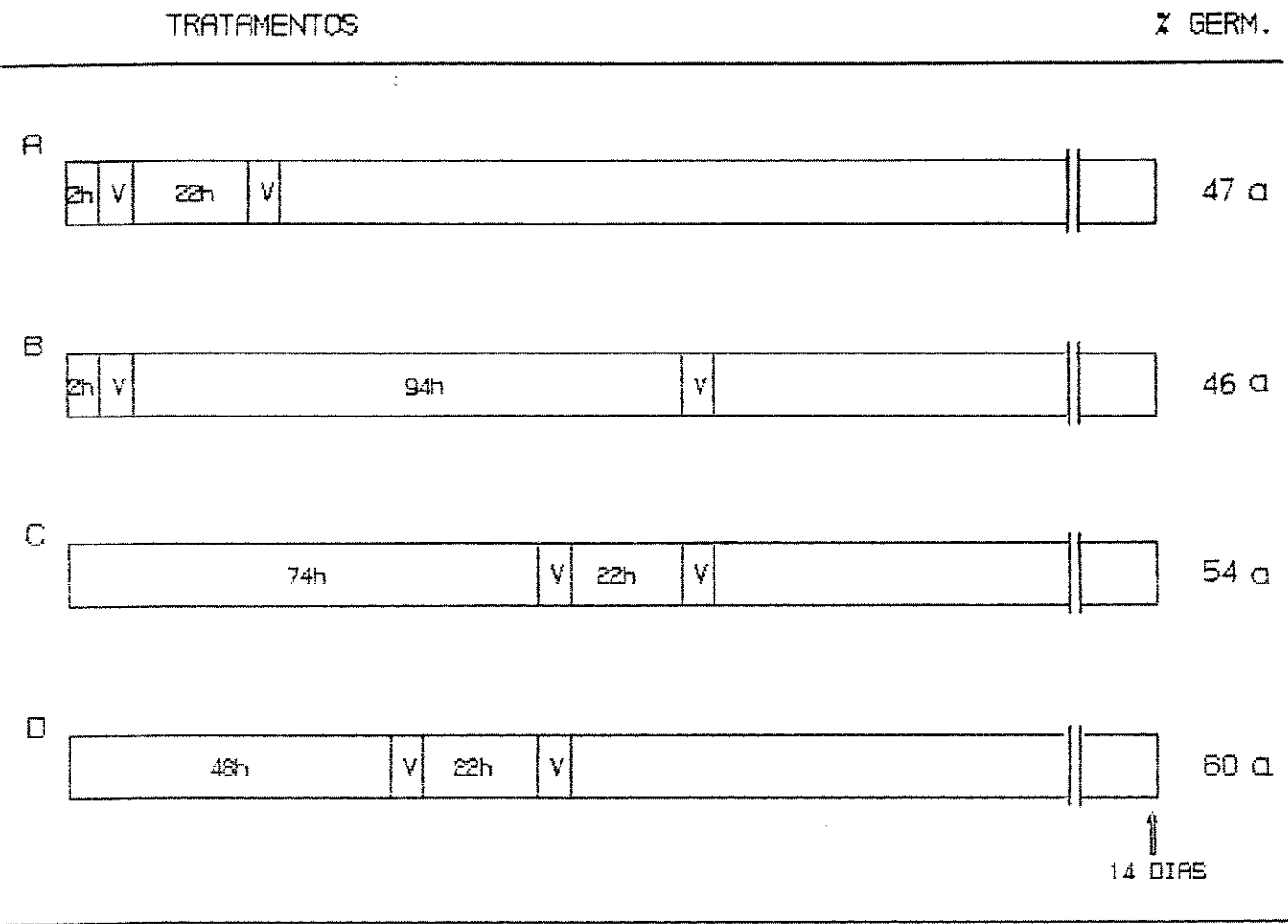


Figura 8 - Resposta das sementes de I. wallerana a 2 exposições ao vermelho fornecidas em períodos diferentes.

V 2h de vermelho escuro

Tratamentos: A= 2V iniciais C= 2V finais
 B= 2V em 100h D= 2V após 48h

TABELA 4 - Valores de tempo médio de germinação ($\bar{t}$) ($\pm$ erro padrão) de sementes de I. wallerana submetidas a 2 e 3 exposições curtas ao vermelho em períodos diferentes. Para efeito de cálculo, o dia 0 foi considerado como o dia do início das exposições.

TRATAMENTOS	$\bar{t}$ ($\pm$ erro padrão)
-------------	--------------------------------

Dados referentes à Fig. 8:

2V	A. 2V iniciais	4,79 ($\pm$ 0,152)
	B. 2V em 100h	6,59 ($\pm$ 0,207)
	C. 2V finais	3,44 ($\pm$ 0,194)
	D. 2V após 48h	3,38 ($\pm$ 0,160)

Dados referentes à Fig. 9:

3V	A. 3V iniciais	4,72 ($\pm$ 0,132)
	B. 3V em 100h	5,74 ($\pm$ 0,173)
	C. 3V finais	4,05 ($\pm$ 0,156)

Com um aumento considerável - de 22h para até 94h - dos intervalos de escuro entre as irradiações, não houve diminuição da porcentagem final de germinação atingida. O mesmo não ocorreu, porém, com a diminuição da duração destes intervalos para 10h, o que levou a uma queda no valor final da resposta (Fig.10).

5.3. Tratamentos com Vermelho-Extremo

Os efeitos induzidos por exposições à luz vermelha foram completamente revertidos quando cada exposição ao vermelho foi seguida imediatamente por uma exposição ao vermelho-extremo (Tabela 5).

Quando os períodos de escuro foram inseridos entre as exposições ao vermelho e ao vermelho-extremo, para determinação do tempo de escape, os seguintes resultados foram observados.

No tratamento de apenas uma exposição ao vermelho, verificou-se ~~uma perda gradativa da capacidade do vermelho-extremo em promover a~~ reversão da resposta à medida em que se aumentou o intervalo de escuro entre os dois tipos de exposição. Com um intervalo de 48h entre elas, a resposta deixou completamente de ser revertida (Fig. 11). Porém, neste caso, a porcentagem de germinação induzida pelo vermelho foi, como esperado, bastante baixa.

No tratamento de 5 exposições ao vermelho, observou-se que as irradiações com vermelho-extremo, ao serem fornecidas imediatamente após o vermelho, foram capazes de reverter totalmente o efeito promotor

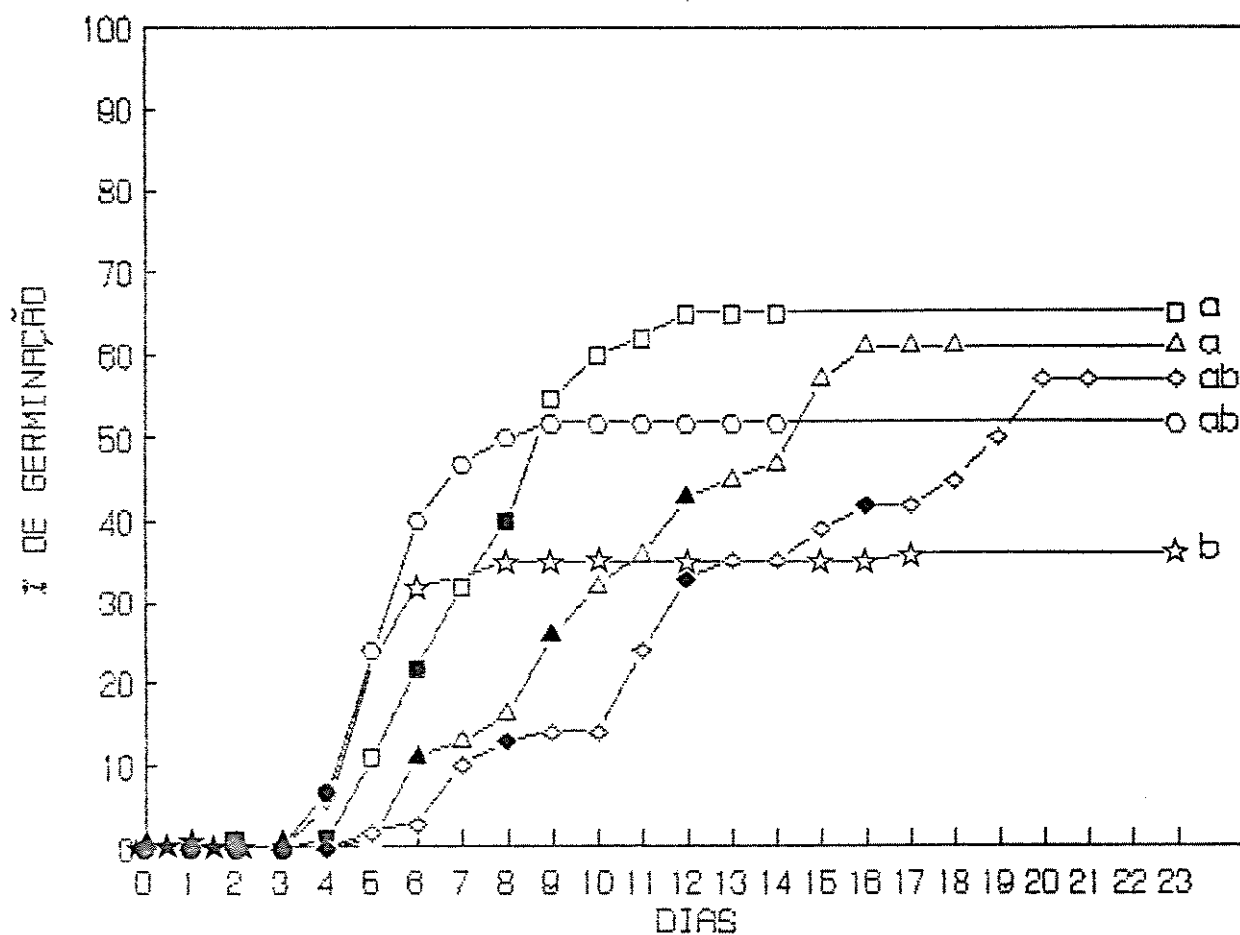


Figura 10 - Efeito da variação dos intervalos de escuro do tratamento de 5 irradiações curtas com luz vermelha na germinação de sementes de *I. wallerana*.

Os símbolos cheios indicam os dias em que as sementes receberam as irradiações.

Intervalos de: ☆ 10h △ 70h
 ○ 22h ◇ 94h
 □ 46h

TABELA 5 - Porcentagens finais de germinação de sementes de I. wallerana submetidas à iluminação intermitente com vermelho (V)/vermelho-extremo (VE) fornecidas a cada 24h. Valores obtidos no 14º dia de germinação.

TRATAMENTOS	% GERMINAÇÃO
2x (2hV)	20
2x (2hV + 2hVE)	0
3x (2hV)	44
3x (2hV + 2hVE)	0
4x (2hV)	59
4x (2hV + 2hVE)	0

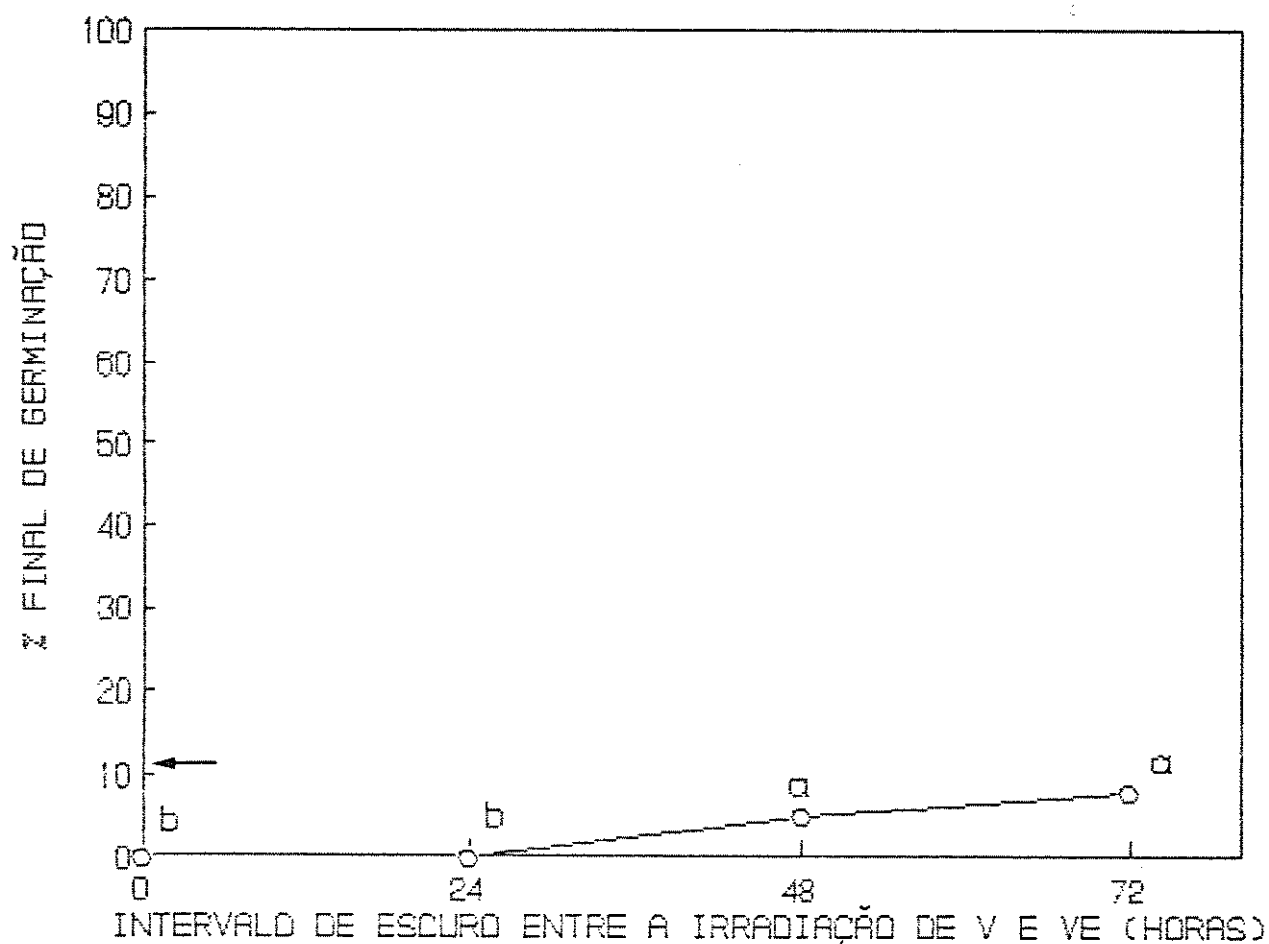


Figura 11- Curva de escape para sementes de *I. wallerana* submetidas a uma exposição ao vermelho (V) fornecida após 48h de embebição no escuro. Valores obtidos no 14º dia de germinação. A seta indica a porcentagem final de germinação no controle sem vermelho-extremo (VE). O valor obtido no controle não diferiu estatisticamente dos valores obtidos nos tratamentos 48h e 72h.

deste, confirmando os resultados anteriores. Ao serem fornecidas 20h após o vermelho, permitiram uma pequena porcentagem de germinação (Fig. 12).

Com o intuito de se aumentar o tempo de escuro decorrido entre as irradiações com vermelho e vermelho-extremo, utilizou-se o tratamento de 3 exposições ao vermelho fornecidas uma a cada 48h. Neste caso, observou-se que um período de 22h de escuro decorrido entre as irradiações com os dois comprimentos de onda, não forneceu a mesma resposta observada anteriormente com 20h (Fig. 12), obtendo-se uma reversão praticamente máxima (Fig. 13). É importante notar que, ao contrário do caso anterior (Fig. 12), onde o vermelho-extremo era seguido imediatamente por uma nova exposição ao vermelho, aqui o vermelho-extremo foi seguido por um período de escuro antes da próxima exposição ao vermelho. Ainda referente à Figura 13, observou-se também que, quando o vermelho-extremo foi fornecido 44h após o vermelho - e, consequentemente, antes de uma próxima exposição a este - a porcentagem de germinação obtida foi significativamente maior.

Uma visão global dos resultados obtidos com exposições ao vermelho-extremo inseridas nos tratamentos de 5 exposições ao vermelho fornecidas uma a cada 24h e a cada 48h pode ser observada na Tabela 6. Confirmando as observações feitas anteriormente, nos tratamentos em que o vermelho-extremo foi seguido de escuro antes de nova exposição ao vermelho, a porcentagem de germinação se manteve baixa (alta porcentagem de reversão). Nos tratamentos em que o vermelho-extremo foi fornecido imediatamente antes de uma nova exposição ao vermelho, a porcentagem de germinação se mostrou maior, refletindo porcentagens de

TRATAMENTOS

Z GERM.

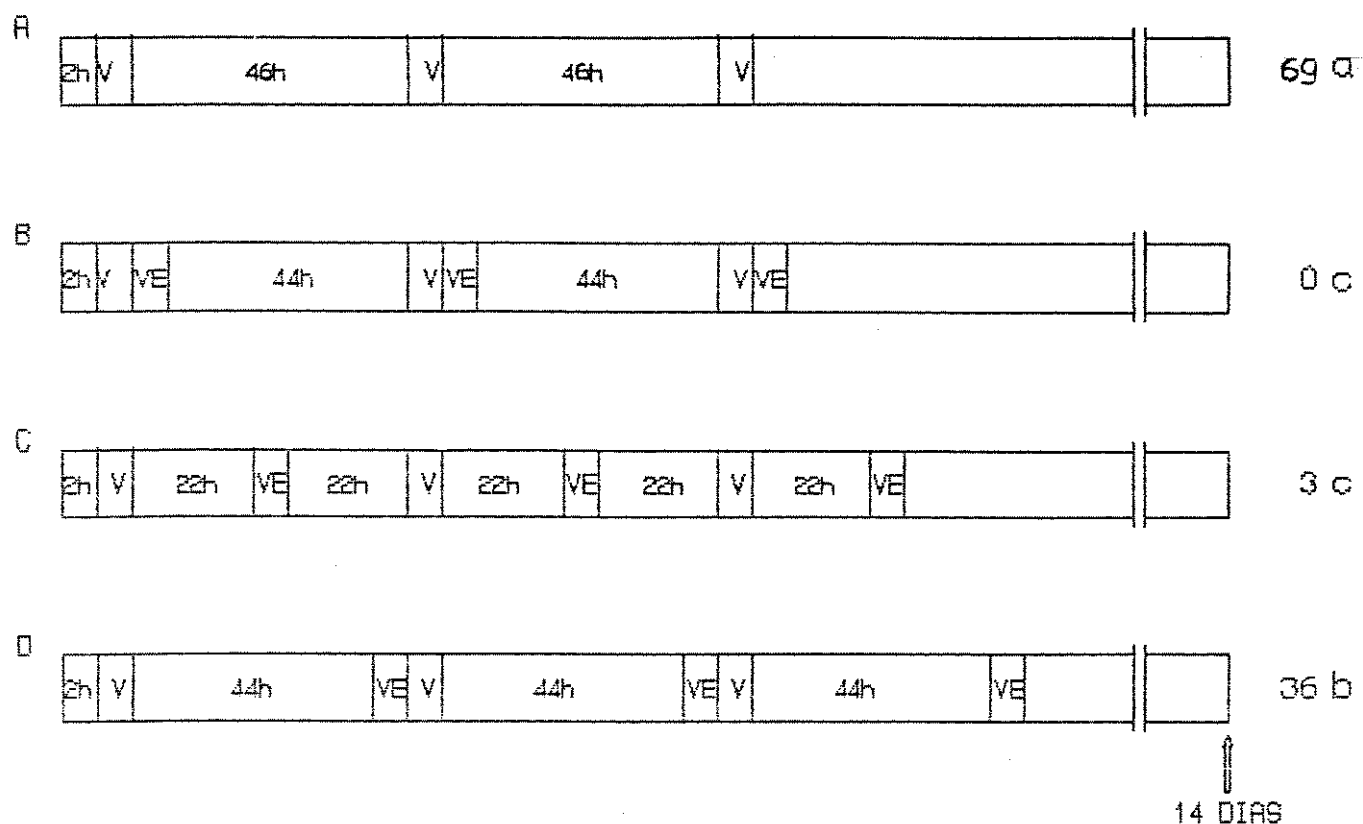


Figura 13 - Efeito na germinação de sementes de I. wallerana de exposições ao vermelho-extremo inseridas nos intervalos de escuro (E) do tratamento de 3 exposições ao vermelho fornecidas uma a cada 48h.

V 2h de vermelho

VE 2h de vermelho-extremo

escuro

Tratamentos: A= 3(V+46hE)

C= 3(V+22hE+VE+22hE)

B= 3(V+VE+44hE)

D= 3(V+44hE+VE)

TABELA 6 - Efeito na germinação de sementes de I. wallerana de exposições ao vermelho-extremo (VE) inseridas nos intervalos de escuro (E) dos tratamentos de 5 exposições ao vermelho (V). Valores obtidos no 14º dia de germinação.

6A- EXPOSIÇÕES AO VERMELHO FORNECIDAS UMA A CADA 24h:

TRATAMENTOS	EXPOSIÇÕES DE 2h		TRATAMENTOS	EXPOSIÇÕES DE 15min.	
	% Germinação	% Reversão		% Germinação	% Reversão
A. 5(V+22hE)	93a	-	A. 5(V+23:45hE)	84a	-
B. 5(VE+22hE)	01c	-	B. 5(VE+23:45hE)	0d	-
C. 5(V+VE+20hE)	01c	98,9	C. 5(V+VE+23:30hE)	0d	100
D. 5(V+10hE+VE+10hE)	02c	97,8	D. 5(V+11:45hE+VE+11:45hE)	05c	94,1
E. 5(V+20hE+VE)	42b	54,8	E. 5(V+23:30hE+VE)	56b	33,3

6B- EXPOSIÇÕES AO VERMELHO FORNECIDAS UMA A CADA 48h:

TRATAMENTOS	EXPOSIÇÕES DE 2h		TRATAMENTOS	EXPOSIÇÕES DE 15min.	
	% Germinação	% Reversão		% Germinação	% Reversão
A. 5(V+46hE)	85a	-	A. 5(V+47:45hE)	93a	-
B. 5(V+VE+44hE)	03b	96,5	B. 5(V+VE+47:30hE)	01b	98,9
C. 5(V+22h+VE+22hE)	12b	85,9	C. 5(V+23:45hE+VE+23:45hE)	07b	92,5
D. 5(V+44hE+VE)	82a	3,5	D. 5(V+47:30hE+VE)	85a	8,6

reversão mais baixas. Nestes casos, os períodos de escuro decorridos entre as exposições ao vermelho e ao vermelho-extremo influenciaram a resposta final. Com um período de 20h, observou-se uma porcentagem de germinação intermediária, ao passo que, com um período de 44h, a porcentagem de germinação chegou a se igualar estatisticamente ao controle.

Os dados apresentados na Tabela 6 mostram também que exposições de 15 minutos ao vermelho e ao vermelho-extremo resultaram essencialmente nos mesmos valores obtidos com irradiações de 2h.

A Figura 14 mostra a comparação direta dos efeitos do vermelho-extremo, aplicado sempre 44h após a irradiação com vermelho, quando seguido de exposição ao vermelho ou de período de escuro. O tratamento B desta Figura, no qual o vermelho-extremo foi seguido de vermelho, repetiu o resultado obtido anteriormente (tratamento D - Tabela 6B), com a sua porcentagem final de germinação se igualando ao controle. No tratamento D, onde se tem um intervalo de escuro após o vermelho-extremo, a porcentagem de germinação obtida foi significativamente mais baixa.

Vermelho-extremo aplicado durante um período de 144h de incubação das sementes, anterior à aplicação de 1 exposição ao vermelho, se mostrou inibitório quando fornecido de modo contínuo. Quando fornecido como irradiação curta no final do período de 144h não teve efeito nem em inibir nem em promover o efeito do vermelho (Fig. 15).

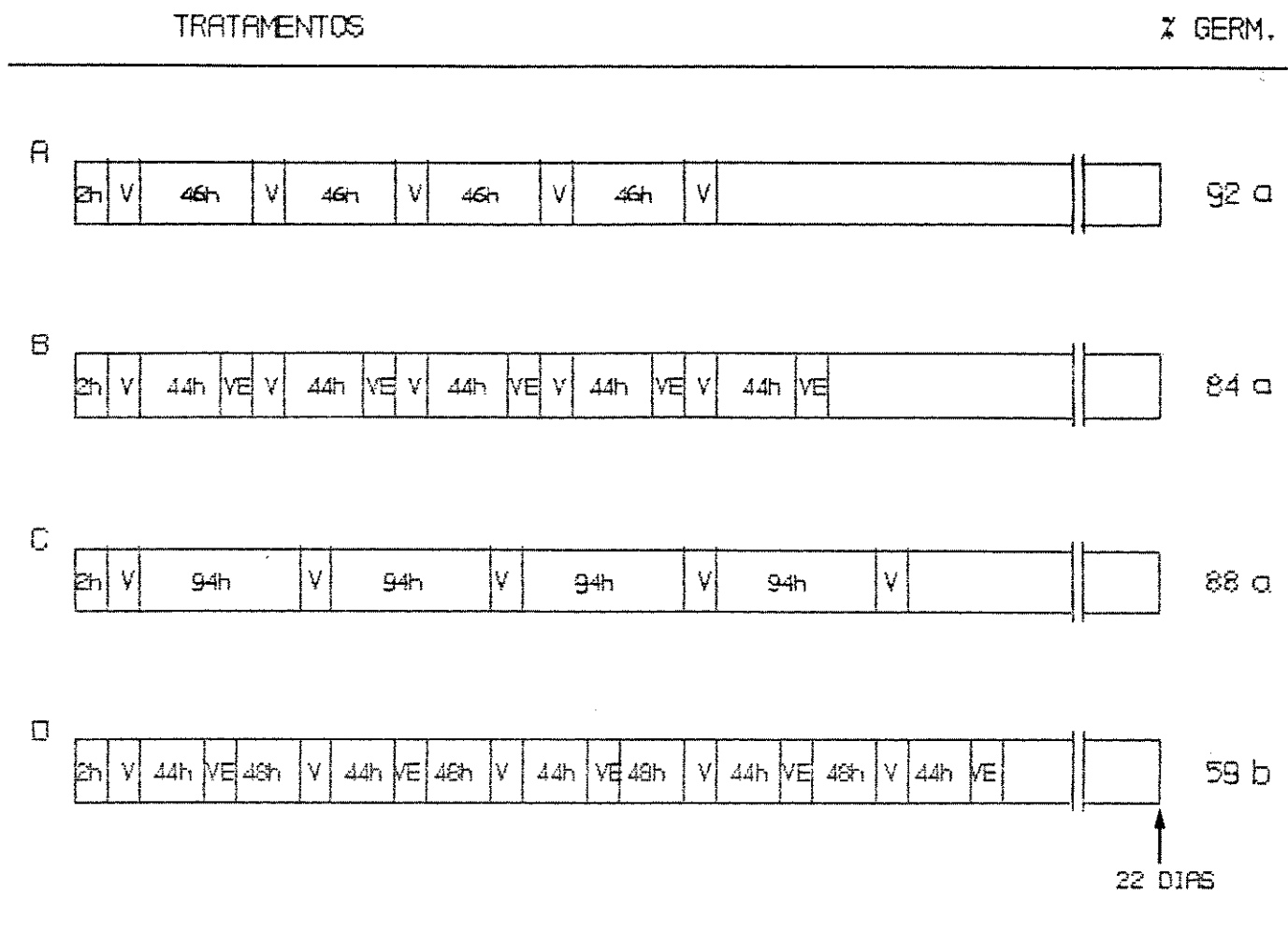


Figura 14 - Efeito na germinação de sementes de *I. wallerana* de exposições ao vermelho-extremo seguidas de exposição ao vermelho ou de período de escuro(E).

V 2h de vermelho

VE 2h de vermelho-extremo

escuro

Tratamentos: A= 5(V+46hE)

C= 5(V+94hE)

B= 5(V+44hE+VE)

D= 5(V+44hE+VE+48hE)

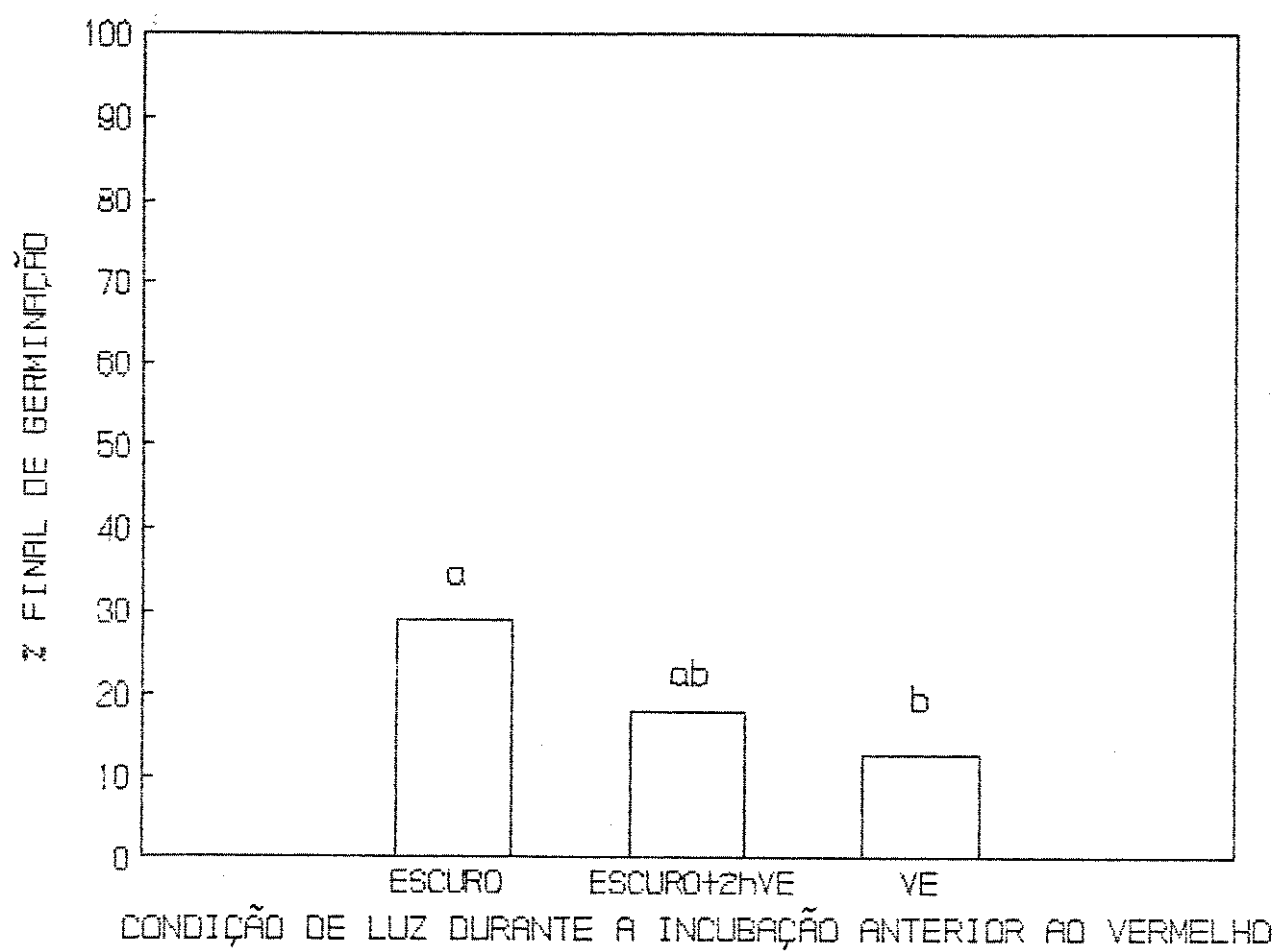


Figura 15 - Efeito da aplicação de vermelho-extremo (VE) durante um período de 144h de incubação das sementes de I. wallerana na resposta a uma exposição curta (2h) ao vermelho (V). Valores obtidos no 14º dia de germinação.

6. Tratamentos com Temperaturas

6.1. Temperaturas constantes e alternadas

As sementes de I. wallerana apresentaram, sob luz branca contínua, porcentagens de germinação altas e semelhantes entre si nas temperaturas constantes de 15°C, 20°C e 25°C (Fig. 16; Fig. 17). Nas temperaturas de 5°C e 10°C, não ocorreu germinação em um período de 30 dias. A 35°C também não ocorreu germinação. Na temperatura de 30°C, a germinação foi significativamente inferior à obtida nas temperaturas de 15°C, 20°C e 25°C, podendo ser mesmo nula em alguns lotes testados.

Sob escuro contínuo, a maioria dos lotes testados apresentou germinação nula ou bastante baixa na faixa de temperaturas testadas, como exemplificado pelos dados da Figura 16. Em alguns lotes, observou-se uma certa porcentagem de germinação a 15°C, 20°C e 25°C, a qual se mostrou dependente de temperatura, sendo maior nas temperaturas mais baixas (Fig. 17). Não obstante, a germinação sob luz branca foi sempre superior e estatisticamente diferente da observada em escuro contínuo.

A transferência das sementes dos tratamentos onde ocorreu germinação baixa ou nula para 25°C mostrou que as sementes mantidas inicialmente sob luz branca constante nas temperaturas de 5°C, 10°C e 30°C germinaram quase que totalmente, ao passo que as mantidas inicialmente sob 35°C apresentaram germinação baixa (Tabela 7). Em escuro, somente nos tratamentos de 10°C e 15°C observou-se uma germinação considerável, embora não próxima da máxima, após a transferência. O

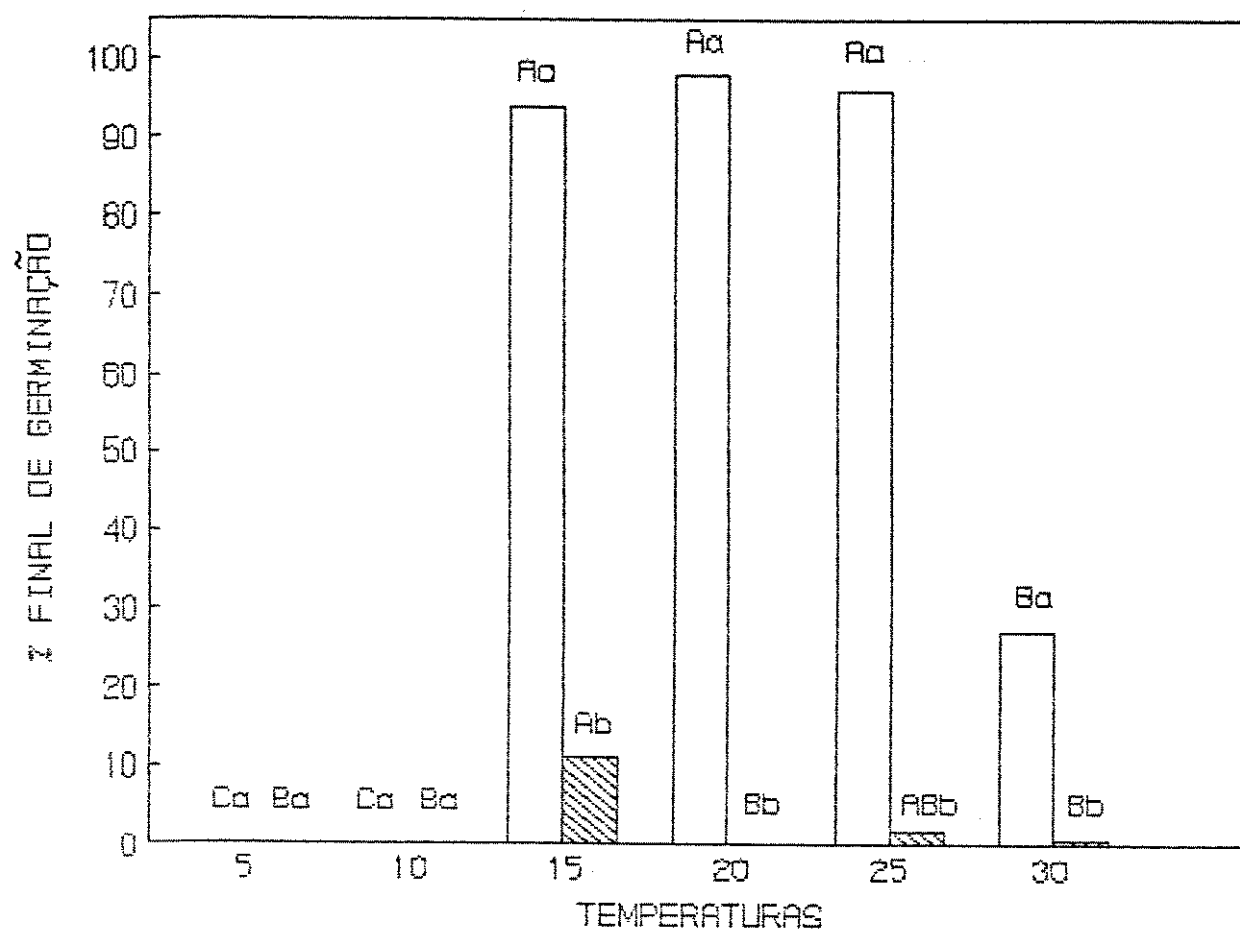


Figura 16 - Efeito de temperaturas constantes na germinação sob luz branca e escuro de sementes de *I. wallerana*. Valores obtidos no 30º dia de germinação.

Letras maiúsculas: comparação do efeito das temperaturas dentro de cada condição luminosa (luz/escuro). Letras minúsculas: comparação do efeito de luz/escuro dentro de cada temperatura.

- luz branca contínua
 escuro contínuo

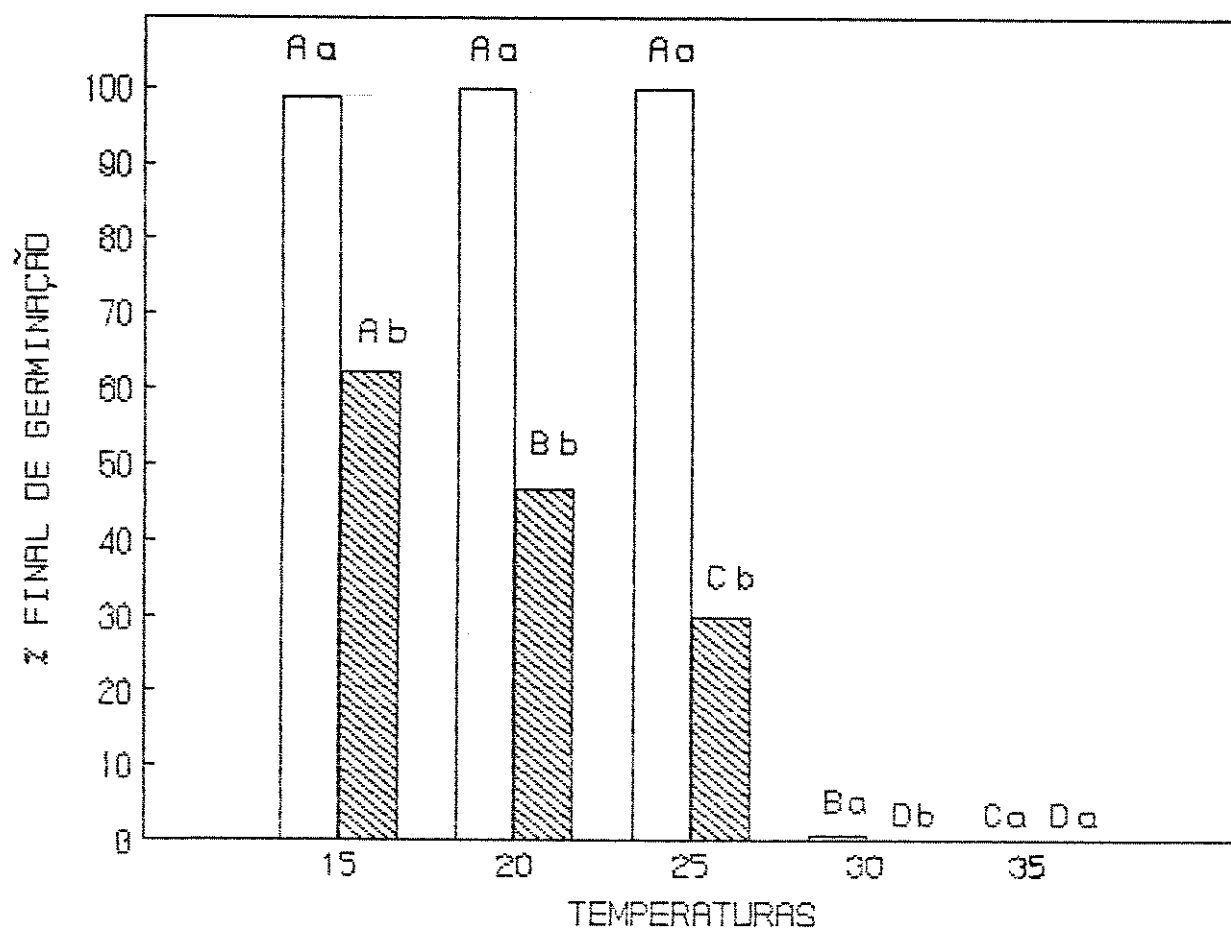


Figura 17 - Efeito de temperaturas constantes na germinação sob luz branca e escuro de sementes de *I. wallerana*. Valores obtidos no 18º dia de germinação.

Letras maiúsculas: comparação do efeito das temperaturas dentro de cada condição luminosa (luz/escuro). Letras minúsculas: comparação do efeito de luz/escuro dentro de cada temperatura.

- ☐ luz branca contínua
☒ escuro contínuo

TABELA 7 - Porcentagens finais de germinação de sementes de I. wallerana submetidas a diferentes temperaturas constantes, após a transferência para 25°C, mantida a condição luminosa (luz ou escuro) anterior.

TEMPERATURA	CONDIÇÃO	% DE GERMINAÇÃO 14 DIAS APÓS TRANSFERÊNCIA PARA 25°C	
		Dados referentes à Fig. 16	Dados referentes à Fig. 17
5°C	escuro	07	-
	luz	83	-
10°C	escuro	44	-
	luz	91	-
15°C	escuro	34	-
	luz	-	-
20°C	escuro	03	-
	luz	-	-
25°C	escuro	04	-
	luz	-	-
30°C	escuro	04	06
	luz	95	99
35°C	escuro	-	03
	luz	-	33

restante dos tratamentos permaneceu com níveis baixos de germinação no escuro.

Verificaram-se diferenças quanto à velocidade de germinação das sementes mantidas sob luz branca constante nas diferentes temperaturas testadas (Tabela 8). A temperatura de 25°C foi a que resultou no menor tempo médio de germinação, o qual aumentou com a diminuição da temperatura para 20°C e para 15°C. Estas observações foram válidas também para as sementes mantidas sob escuro contínuo, quando a germinação, mesmo em porcentagens baixas, ocorreu sob esta condição. Observou-se uma tendência do tempo médio de germinação ser mais elevado sob escuro que sob luz branca.

Com relação às temperaturas alternadas, a germinação sob luz branca constante se manteve sempre superior à germinação obtida no escuro em todas as alternâncias testadas, durante o período de 14 dias do experimento. No escuro contínuo, na alternância 25°C-10°C, observou-se uma elevação da porcentagem de germinação em relação à observada sob temperatura constante de 25°C (Fig. 18).

6.2. Interação entre Temperatura e Exposições à Luz Vermelha

O número mínimo de exposições à luz vermelha necessário para levar à promoção completa da germinação se mostrou dependente de temperatura. Enquanto que a 25°C houve a necessidade de 5 exposições para a promoção máxima da resposta, a 15°C esta foi atingida com somente 3

TABELA 8 - Valores de tempo médio de germinação ($\bar{t}$) ($\pm$ erro padrão) de sementes de I. wallerana sob diferentes temperaturas constantes em condições de luz e escuro.

TEMPERATURA	CONDIÇÃO	$\bar{t}$ ($\pm$ erro padrão)
15°C	escuro	11,97($\pm 0,179$)
	luz	11,36($\pm 0,169$)
20°C	escuro	6,28($\pm 0,123$)
	luz	5,47($\pm 0,180$)
25°C	escuro	4,83($\pm 0,130$)
	luz	4,68($\pm 0,095$)

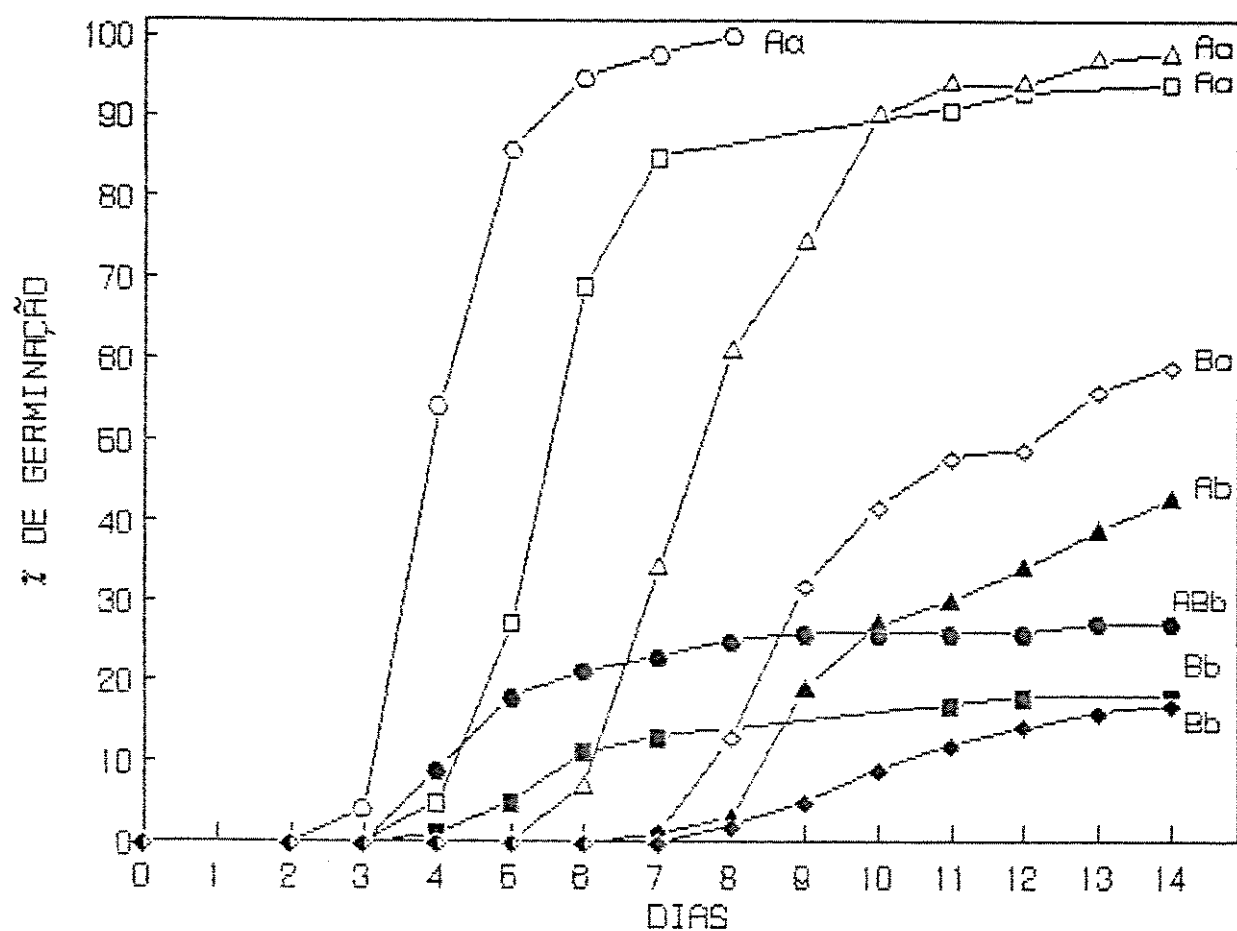


Figura 18 - Efeito de temperaturas alternadas (12h/12h) na germinação de sementes de *I. wallerana*.

Letras maiúsculas: comparação do efeito das temperaturas dentro de cada condição luminosa (luz/escuro). Letras minúsculas: comparação do efeito de luz/escuro dentro de cada temperatura.

Símbolos cheios: escuro contínuo

Símbolos vazios: luz branca contínua

○ 25°C-25°C	△ 25°C-10°C
□ 25°C-20°C	◇ 25°C-5°C

exposições (Fig. 19). A germinação a 15°C se mostrou sempre superior à obtida a 25°C, exceto no tratamento de 5 exposições, onde os tratamentos se igualaram estatisticamente. Na temperatura testada de 30°C, não ocorreu germinação sob nenhum dos tratamentos de exposição à luz.

A curva de sensibilidade a uma exposição ao vermelho também se mostrou dependente de temperatura, bem como da duração do período de escuro que antecedeu a exposição à luz. Nas temperaturas de 20°C e 15°C, o mesmo padrão da resposta exibida a 25°C foi apresentado nos menores tempos de embebição: até 96h a 20°C e até 72h a 15°C. Para os tempos de embebição maiores que estes, a análise estatística mostrou que houve uma interação com a temperatura, de tal modo que, quanto menor a temperatura, maior a resposta a uma exposição ao vermelho (Fig. 20).

7. Efeito do Armazenamento sobre o Fotoblastismo

Sementes armazenadas por diferentes períodos foram testadas quanto a sua germinação sob luz branca ou escuro contínuos. Foi verificado, com o aumento do período de armazenamento, um pequeno, mas significativo, decréscimo da porcentagem de germinação obtida sob luz branca, acompanhado de um aumento considerável da porcentagem de germinação sob escuro contínuo (Fig. 21).

Sementes com tempo superior de armazenamento àqueles apresentados na Figura 21 - a saber, 390, 480, 535, 650 e 730 dias - também foram

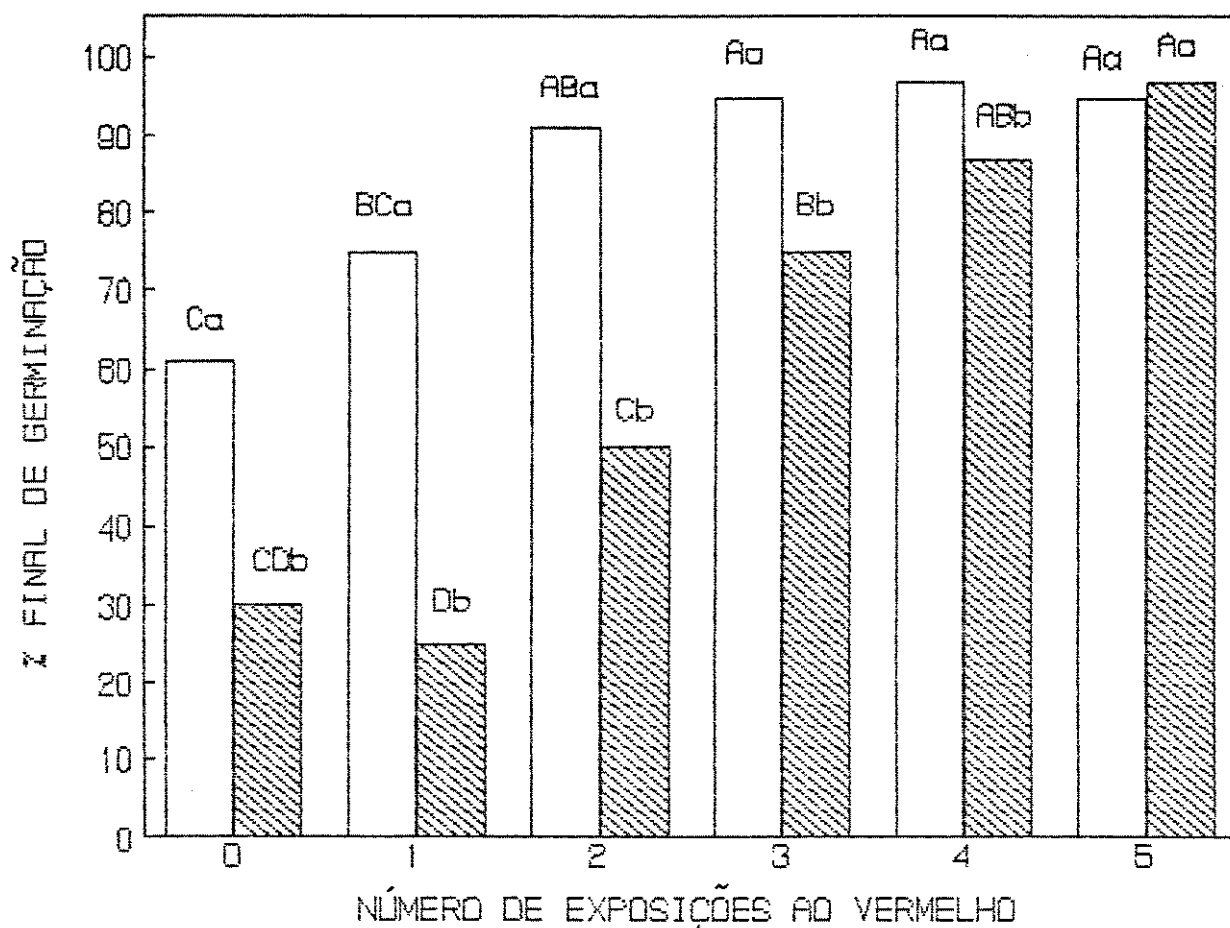


Figura 19 - Efeito de temperaturas constantes na resposta de sementes de *I. wallerana* aos tratamentos de várias exposições curtas ao vermelho. Valores obtidos no 14º dia de germinação. Letras maiúsculas: comparação do efeito do número de exposições à luz dentro de cada temperatura. Letras minúsculas: comparação do efeito das temperaturas dentro de cada tratamento de exposição à luz.

□ 15°C

▨ 25°C

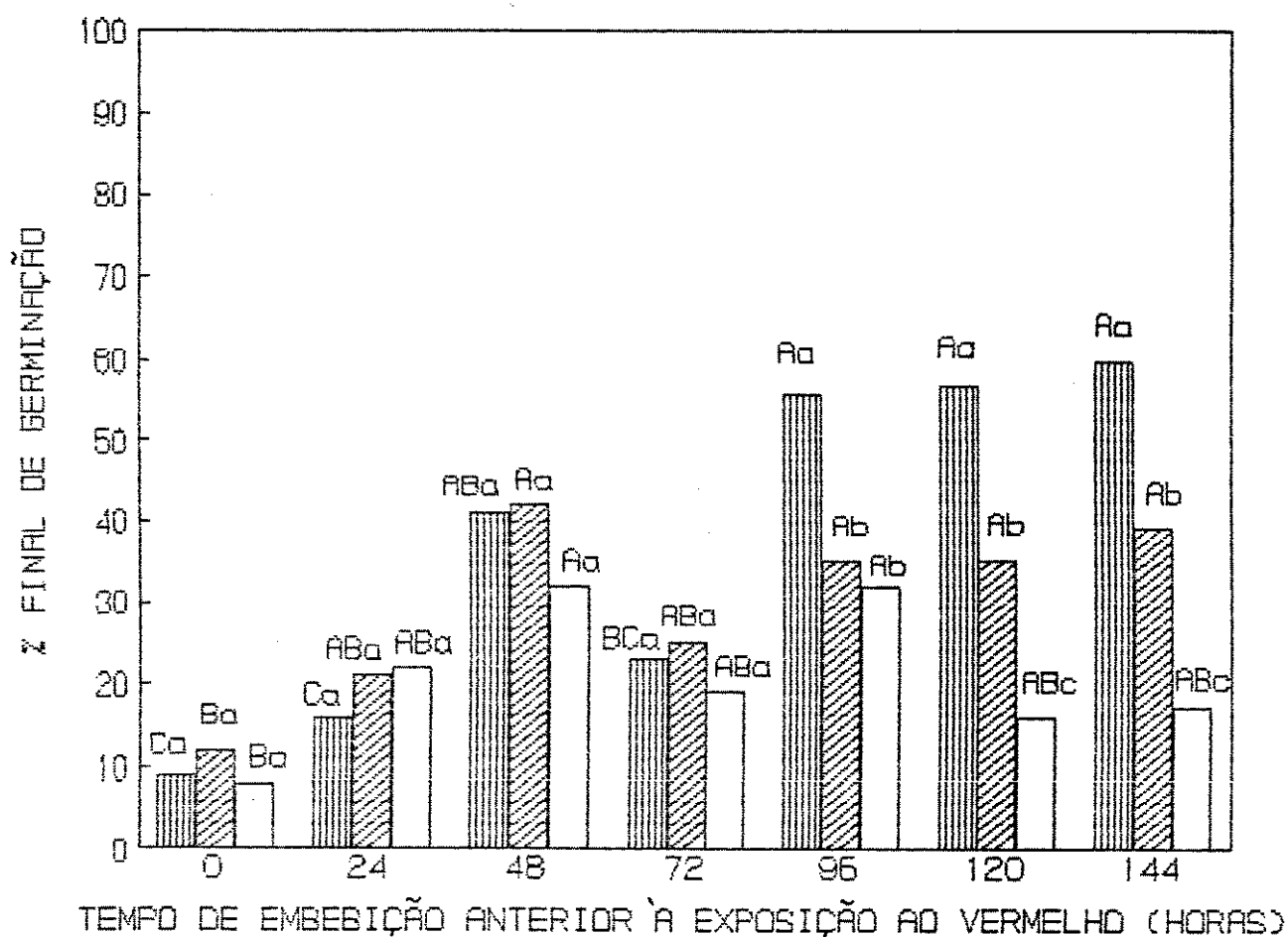


Figura 20 - Efeito de temperaturas constantes na resposta das sementes de *I. wallerana* a uma exposição curta (2h) ao vermelho. Valores obtidos no 14º dia de germinação.

Letras maiúsculas: comparação do efeito do tempo de embebição dentro de cada temperatura. Letras minúsculas: comparação do efeito das temperaturas dentro de cada tempo de embebição.

15°C

20°C

25°C

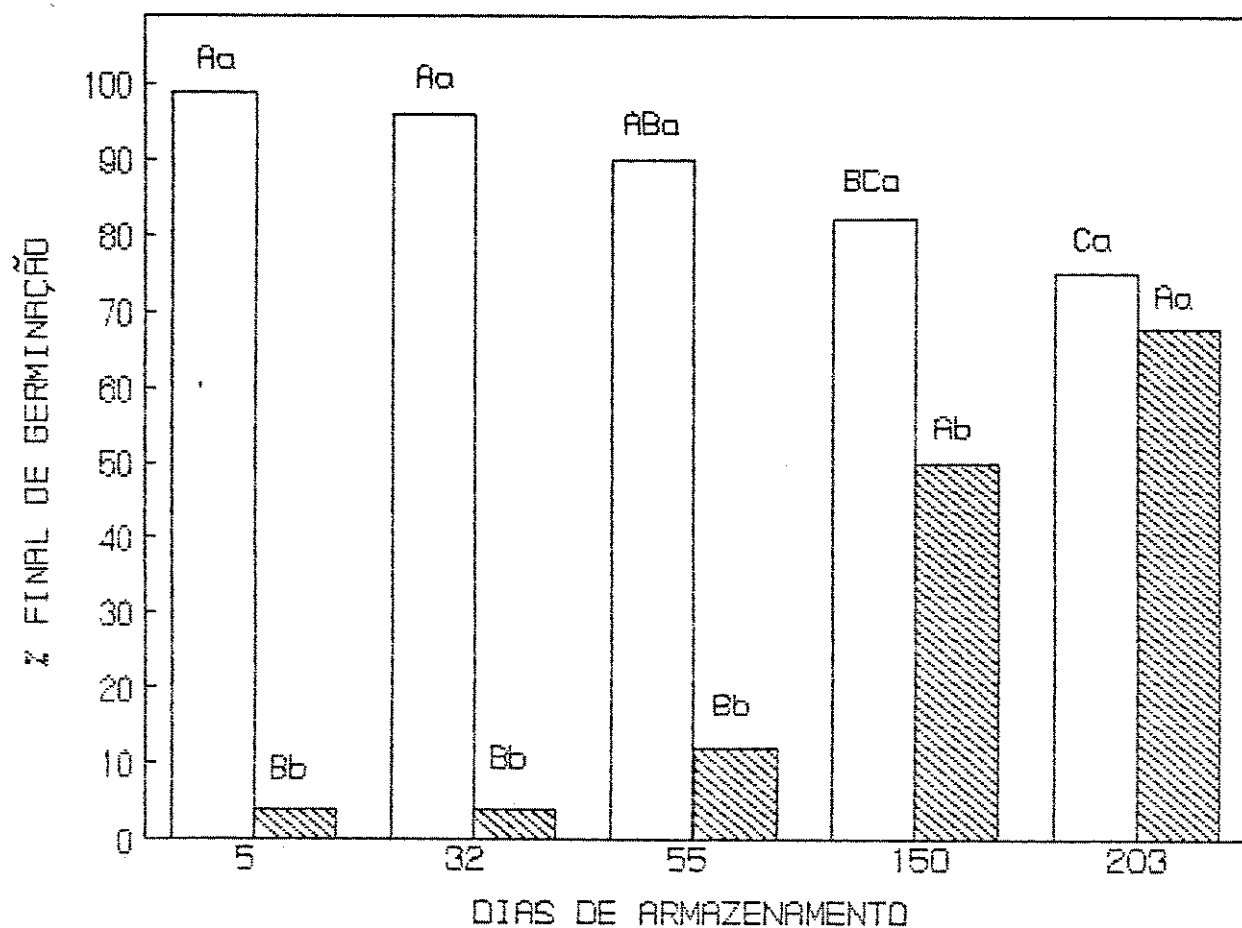


Figura 21 - Efeito do armazenamento sobre a germinação em luz branca e escuro de sementes de *I. wallerana*. Valores obtidos no 149 dia de germinação.

Letras maiúsculas: comparação do efeito do armazenamento dentro de cada condição (luz/escuro). Letras minúsculas: comparação do efeito luz/escuro dentro de cada período de armazenamento.

 luz branca contínua
 escuro contínuo

testadas e apresentaram germinação praticamente nula tanto na luz como no escuro. Estas sementes foram submetidas ao teste do tetrazólio (cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio), o qual indicou a inviabilidade das mesmas.

Não foram observadas diferenças consistentes na velocidade de germinação com diferentes períodos de armazenamento (Tabela 9).

8. Giberelinas

8.1. Tratamento com Ácido Giberélico

A aplicação exógena de GA₃ causou uma promoção parcial da germinação das sementes de *I. wallerana* mantidas sob condições de escuro contínuo (Fig. 22). Foi verificado um efeito de concentração bastante claro, com uma tendência de aumento da germinação com o aumento da concentração de GA₃ até 50 µg/ml, que mostrou ser a concentração mais efetiva. Concentrações superiores a esta causaram um decréscimo gradativo da germinação, com a solução de 1000 µg/ml sendo inefetiva.

TABELA 9 - Valores de tempo médio de germinação ($\bar{t}$) ($\pm$ erro padrão) de sementes armazenadas de *I. wallerana*.

DIAS DE ARMAZENAMENTO	CONDIÇÃO	$\bar{t}$ ($\pm$ erro padrão)
05	escuro	-
	luz	5,47($\pm 0,154$)
32	escuro	-
	luz	6,78($\pm 0,201$)
55	escuro	7,50($\pm 0,247$)
	luz	6,44($\pm 0,199$)
150	escuro	5,76($\pm 0,139$)
	luz	5,09($\pm 0,107$)
203	escuro	5,51($\pm 0,186$)
	luz	5,04($\pm 0,155$)

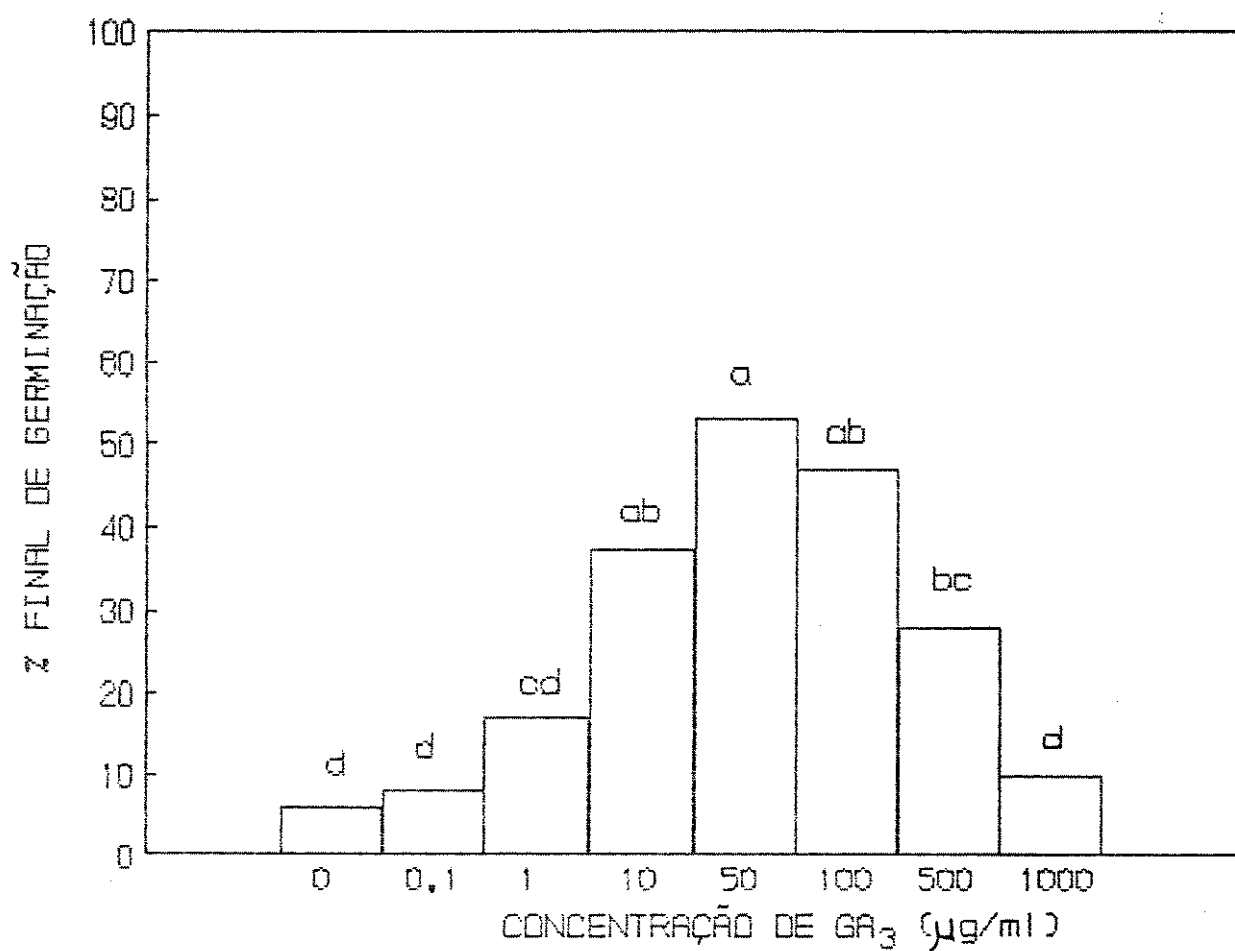


Figura 22 - Efeito de GA₃ na germinação de sementes de *I. wallerana* sob escuro contínuo. Valores obtidos no 14º dia de germinação.

8.2. Interação entre GA₃ e Exposições à Luz

O efeito de exposições sub-ótimas ao vermelho foi promovido pela aplicação de GA₃ (Fig. 23). Este foi capaz de aumentar a resposta das sementes a 1 e 2 exposições ao vermelho, de modo que, no tratamento de apenas 2 exposições, pode-se observar uma germinação quase máxima. Por outro lado, GA₃ não se mostrou capaz de estimular a germinação de sementes submetidas a uma exposição curta ao vermelho-extremo (Fig. 24), o qual inibiu, portanto, o efeito do GA₃.

8.3. Inibidores de Biossíntese de Giberelinas em Tratamento Indutivo de Luz

As sementes submetidas ao tratamento indutivo de 5 exposições ao vermelho tiveram sua germinação diminuída pelos inibidores de biossíntese de giberelinas utilizados. Enquanto CCC 1 mM causou uma inibição relativamente pequena da germinação, paclobutrazol 5μM foi bastante efetivo em anular o efeito promotor da luz (Fig. 25).

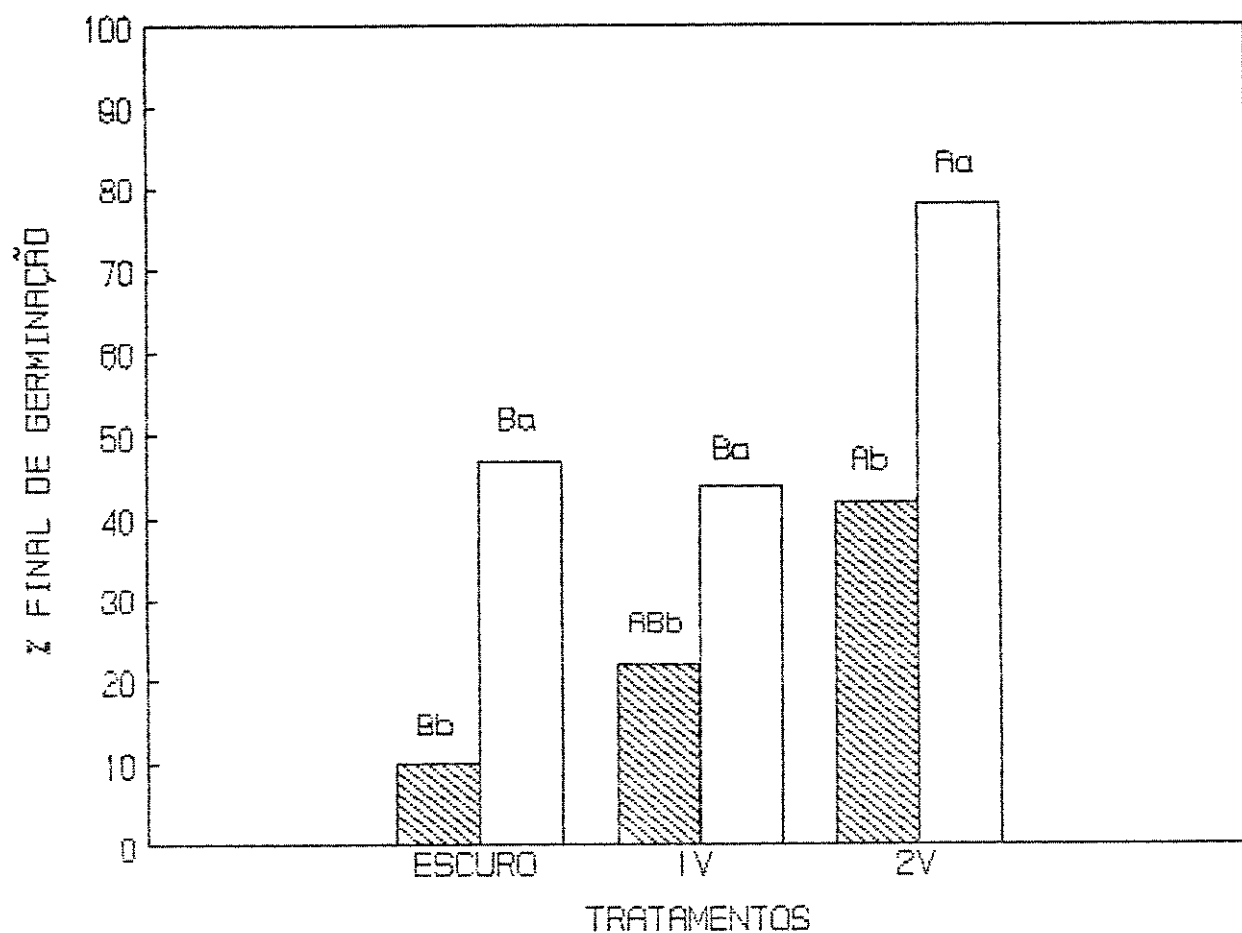


Figura 23 - Efeito de GA₃ na germinação de sementes de *I. wallerana* submetidas a tratamentos de 1 e 2 exposições curtas ao vermelho (1V e 2V). Valores obtidos no 14º dia de germinação.

Letras maiúsculas: comparação do efeito de exposições à luz dentro de cada tratamento (água/GA₃). Letras minúsculas: comparação do efeito de água/GA₃ dentro de cada condição de luz.



água destilada



GA₃ 50 µg/ml

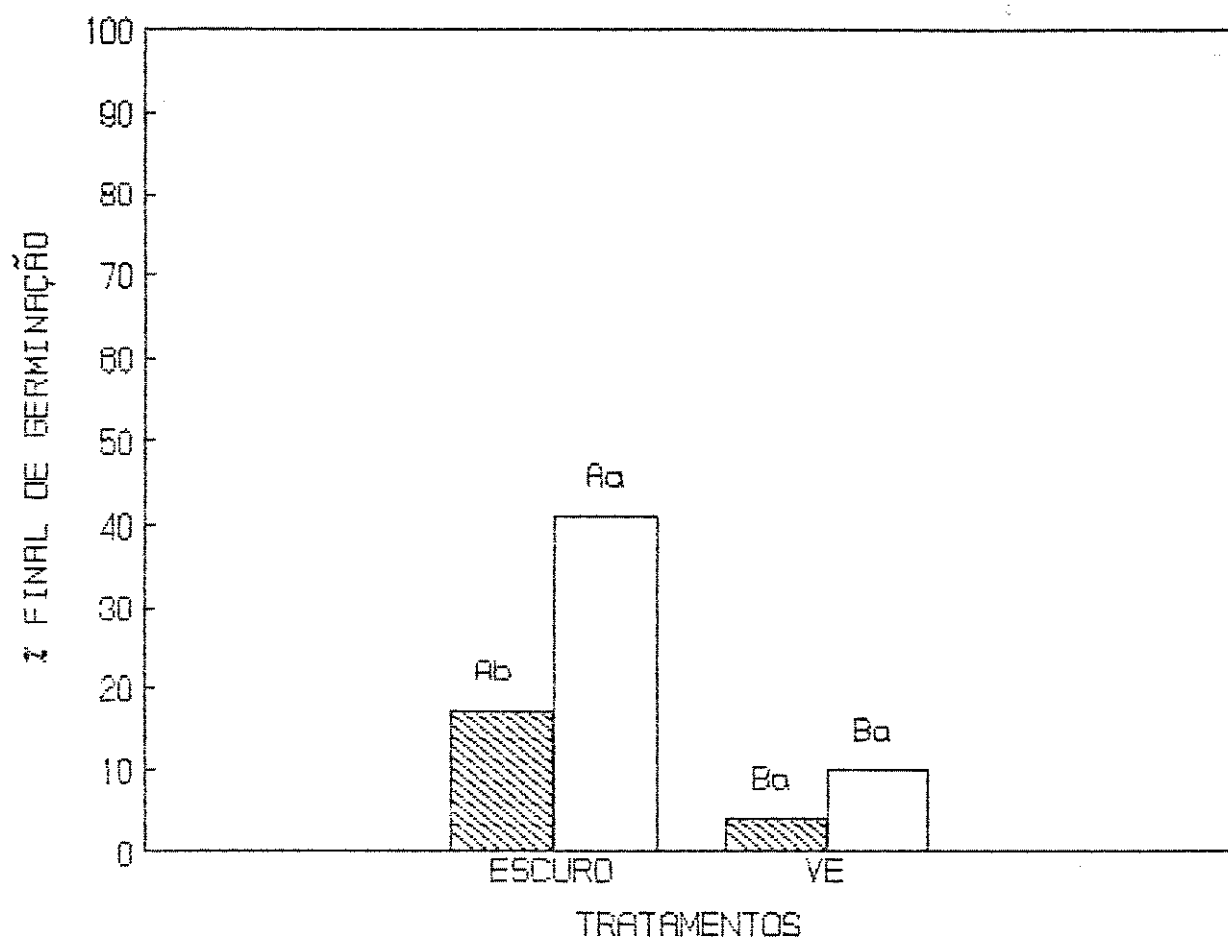


Figura 24 - Efeito de GA₃ na germinação de sementes de *I. wallerana* submetidas a uma exposição curta (0,5h) ao vermelho-extremo (VE). Valores obtidos no dia 14º dia de germinação. Letras maiúsculas: comparação do efeito de luz dentro de cada tratamento (água/GA₃). Letras minúsculas: comparação do efeito de água/GA₃ dentro de cada condição de luz.



água destilada



GA₃ 50 µg/ml

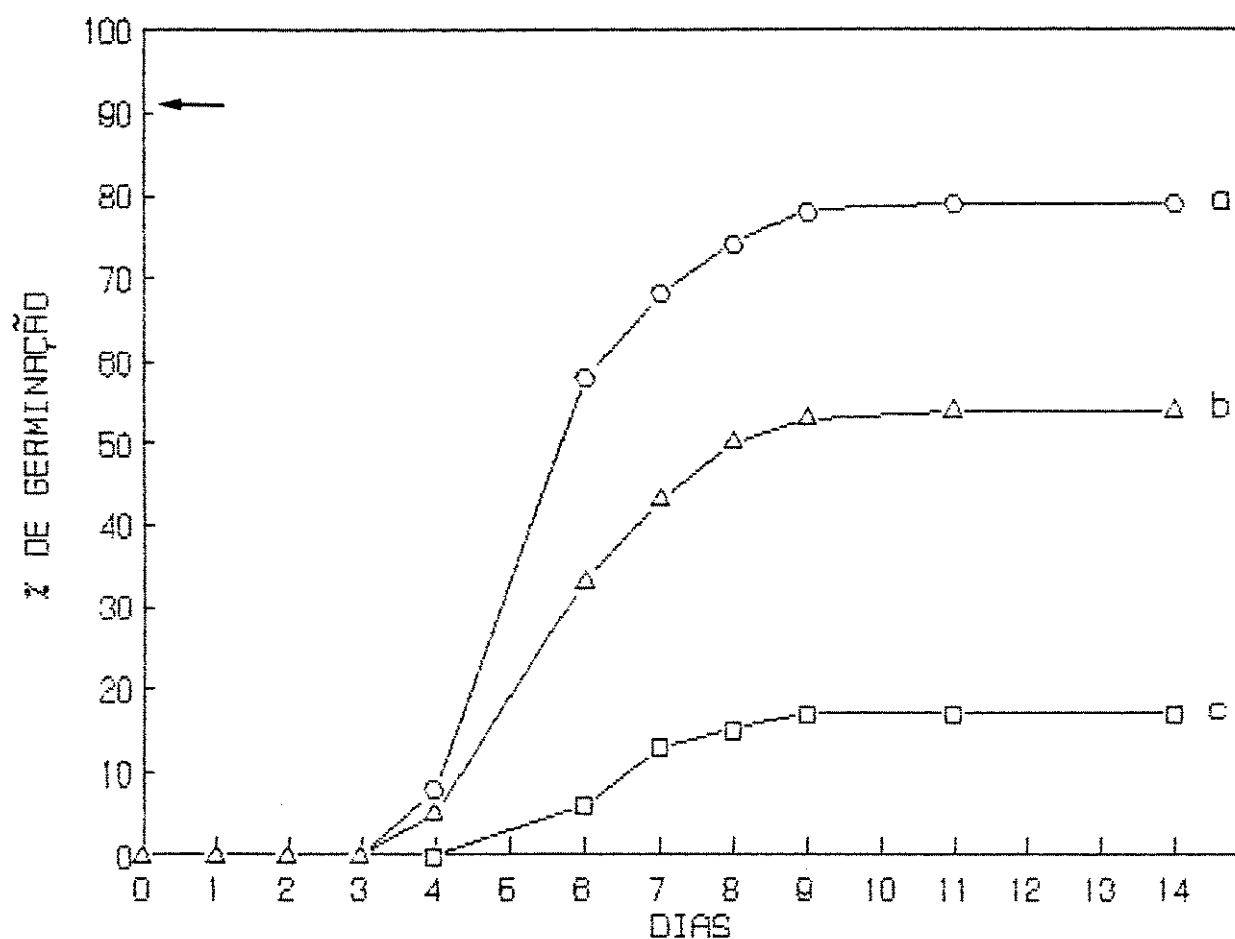


Figura 25 - Efeito de inibidores de biossíntese de giberelinas na germinação de sementes de *I. wallerana* submetidas a 5 exposições ao vermelho.

A seta indica a porcentagem final de germinação sob luz branca constante.

O água destilada

□ paclobutrazol 5µM

△ CCC 1mM

9. Estratificação

9.1. Duração da Estratificação

O tratamento de estratificação a 10°C causou uma estimulação parcial da germinação das sementes em escuro contínuo a 25°C. Períodos de 30, 45 ou 60 dias de estratificação se mostraram igualmente efetivos, não se observando aumento significativo da resposta com o aumento do período de tratamento (Fig. 26).

9.2. Estratificação na Presença de Giberelinas

A aplicação de GA₃ durante o período de estratificação não se mostrou efetiva em ampliar o efeito desta. As sementes estratificadas em água destilada e transferidas a seguir para solução de GA₃ 50 µg/ml não apresentaram também aumento da resposta em relação ao tratamento controle em água destilada (Fig. 27).

9.3. Estratificação na Presença de Inibidores de Biossíntese de Giberelinas

CCC se mostrou capaz de inibir o efeito promotor da estratificação na germinação de sementes em escuro contínuo. Obteve-se o mesmo

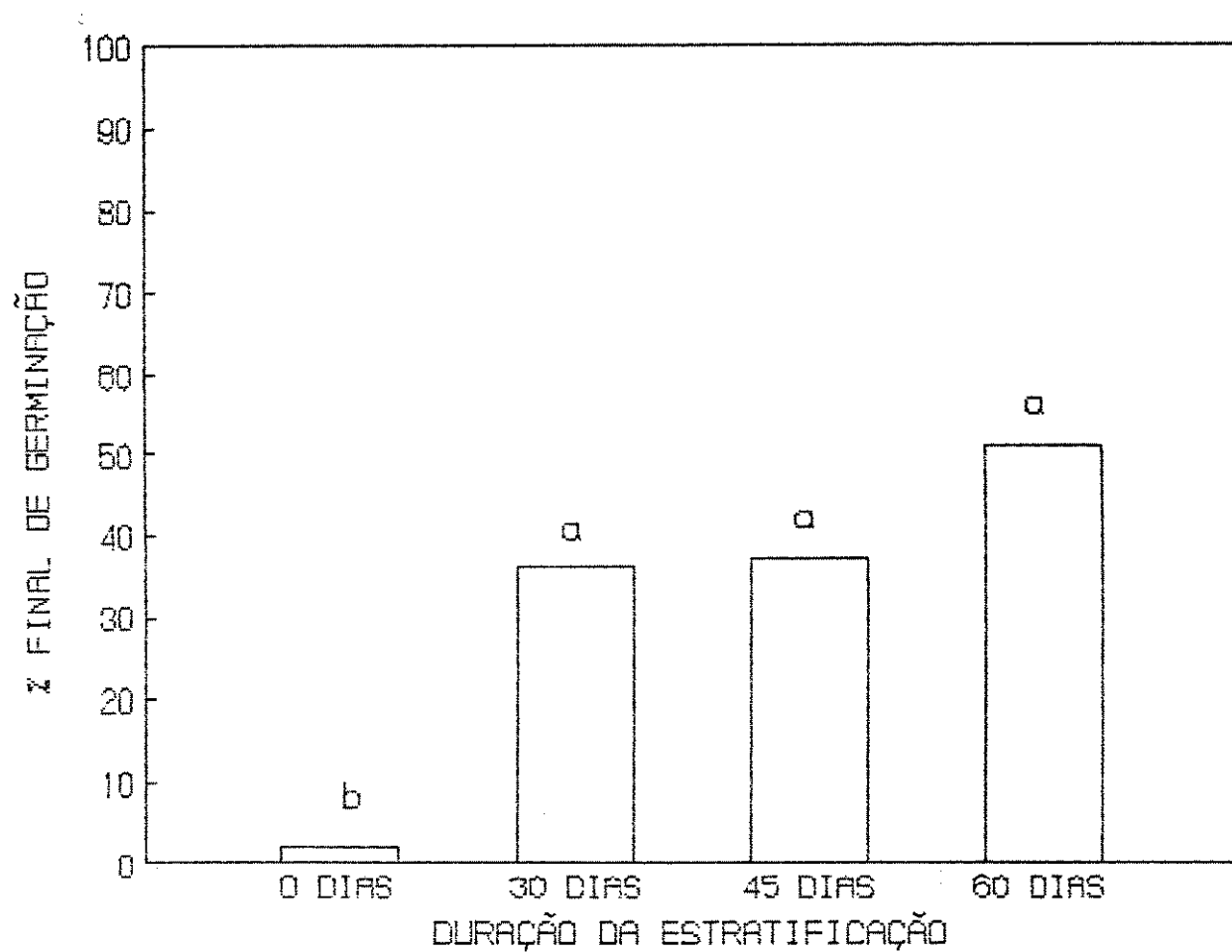


Figura 26 - Efeito de tratamentos de estratificação a 10°C na germinação de sementes de *I. wallerana* sob escuro contínuo. Valores obtidos após 14 dias a 25°C.

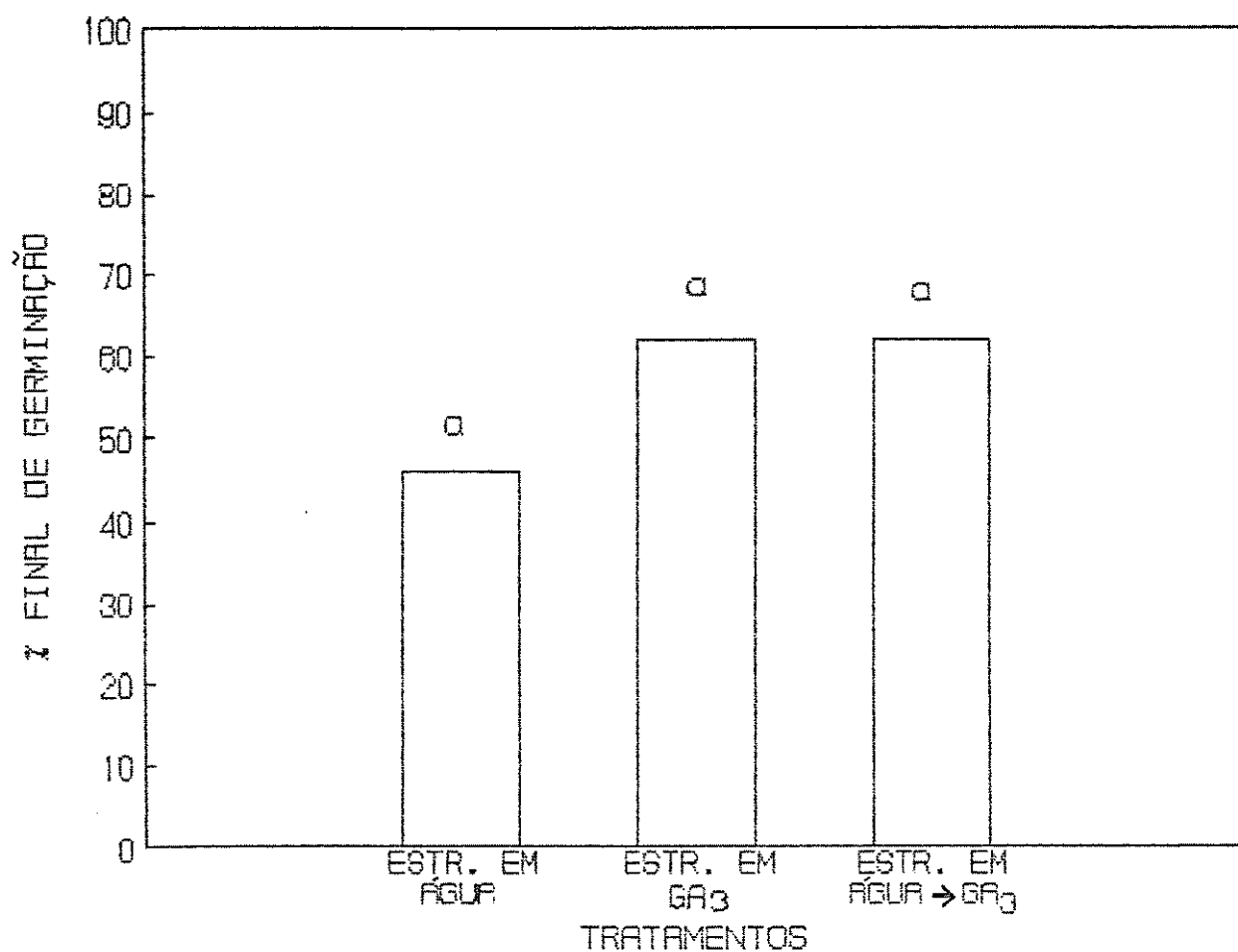


Figura 27 - Efeito de GA₃ 50 µg/ml aplicado durante e após a estratificação (45 dias) de sementes de *I. wallerana*. Valores obtidos após 14 dias a 25°C.

grau de inibição com as três concentrações - 6,3mM, 9,5mM e 12,6mM - utilizadas (Fig. 28).

Paclobutrazol 5 μ M causou uma inibição total da germinação das sementes estratificadas, sendo mais efetivo que CCC 1mM (Fig. 29). O efeito de ambos inibidores foi revertido pela transferência das sementes não germinadas para solução de GA₃ 50 μ g/ml, não se observando diferenças significativas nas porcentagens de germinação então obtidas. Paclobutrazol inibiu o efeito promotor da estratificação tanto ao ser aplicado somente durante o tratamento de frio quanto ao ser aplicado somente após a transferência para 25°C (Fig. 30).

9.4. Interação entre Tratamento de Estratificação e Exposições à Luz

Quando o tratamento de estratificação foi imediatamente seguido por uma exposição curta ao vermelho, observou-se uma ampliação da resposta, obtendo-se, portanto, uma porcentagem final de germinação superior à obtida no controle (Fig. 31). Por outro lado, uma exposição curta ao vermelho-extremo aplicada também imediatamente após o término do período de estratificação causou uma inibição ou reversão do efeito promotor desta.

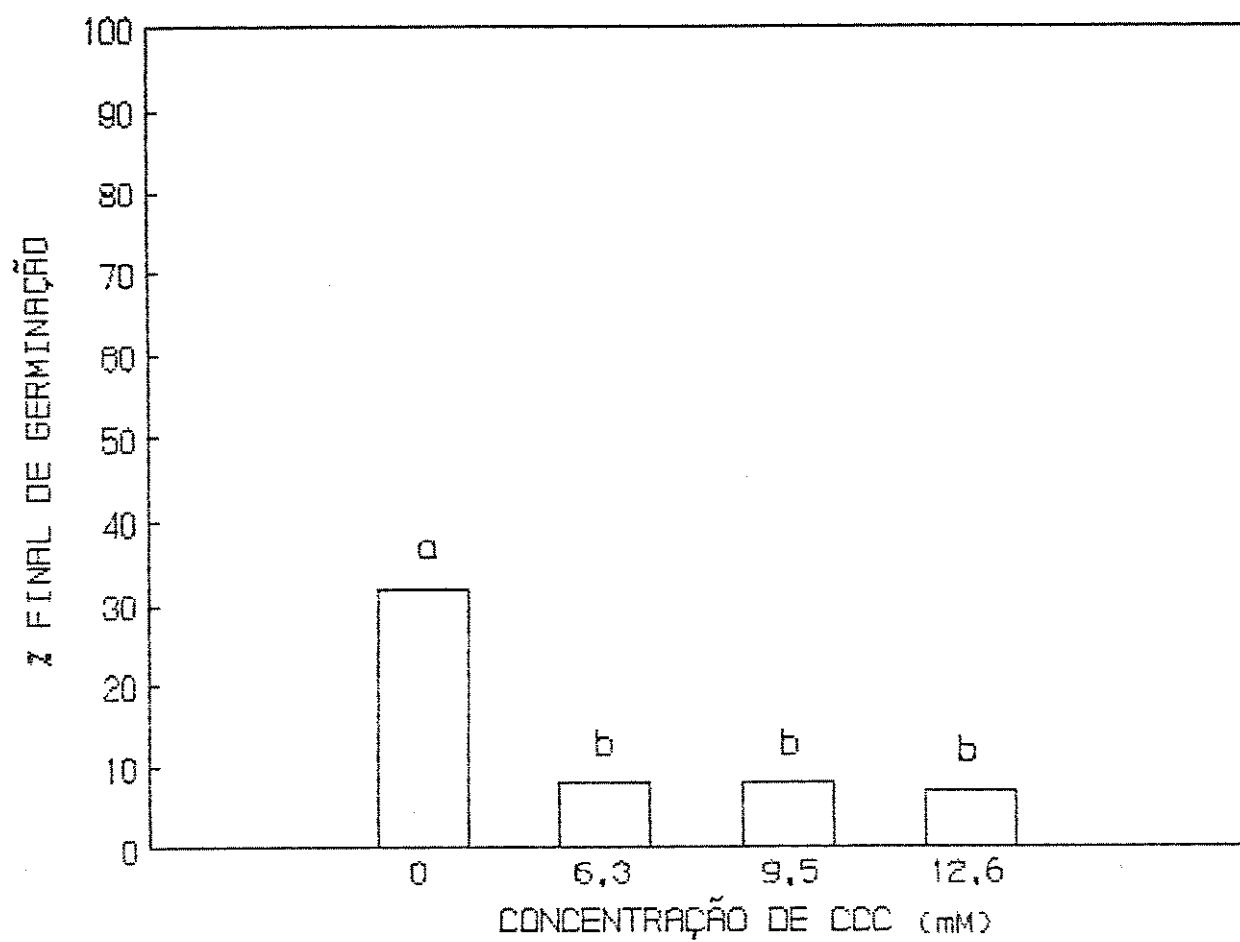


Figura 28 - Efeito de CCC aplicado durante a estratificação (45 dias) de sementes de *I. wallerana*. Valores obtidos após 14 dias a 25°C.

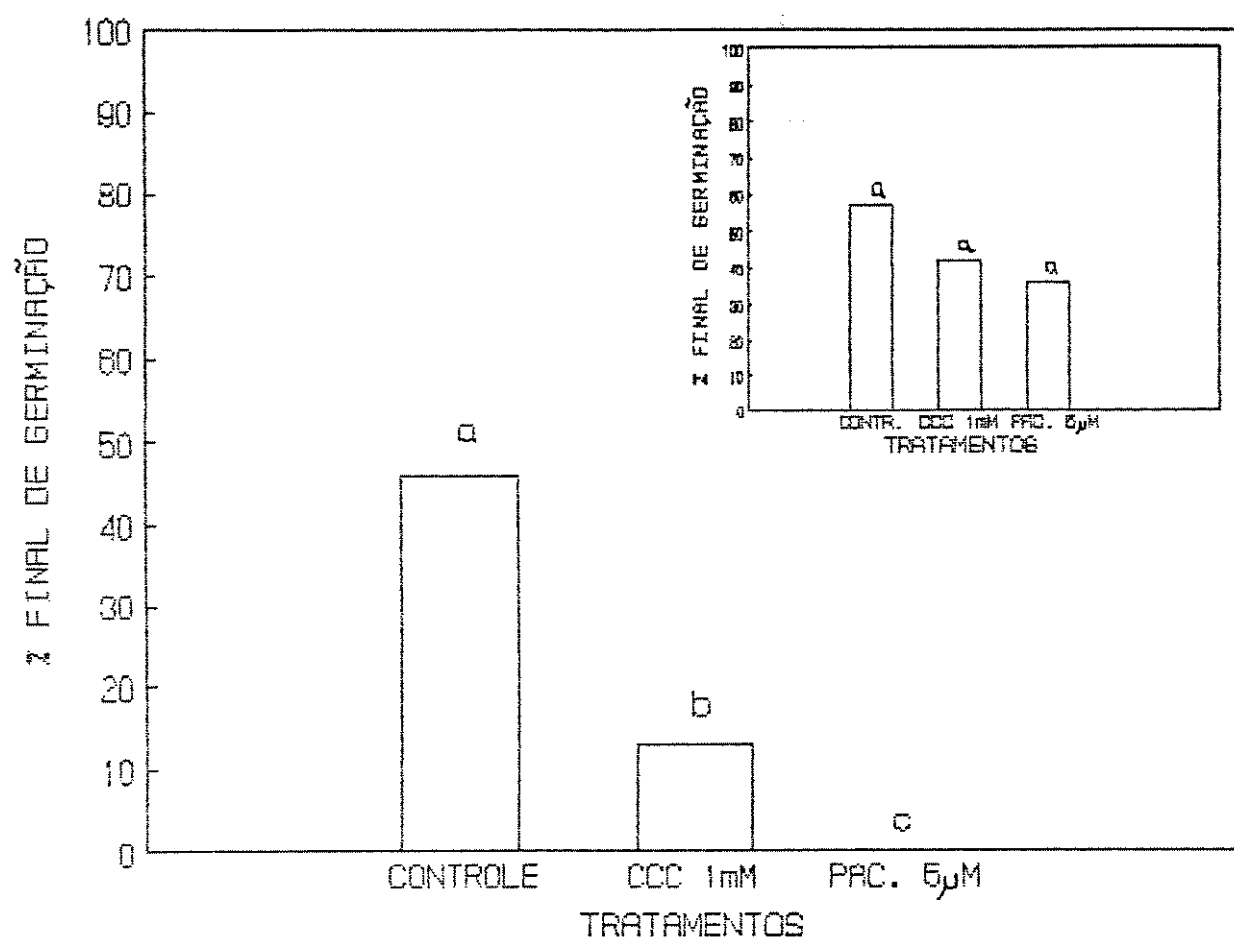


Figura 29 - Efeito de inibidores de biossíntese de giberelinas aplicados durante a estratificação (45 dias) de sementes de *I. wallerana*. Valores obtidos após 14 dias a 25°C.

No quadro inserido acima, reversão do efeito dos inibidores pela transferência das sementes não germinadas para solução de GA₃ 50 µg/ml. Valores obtidos após 14 dias.

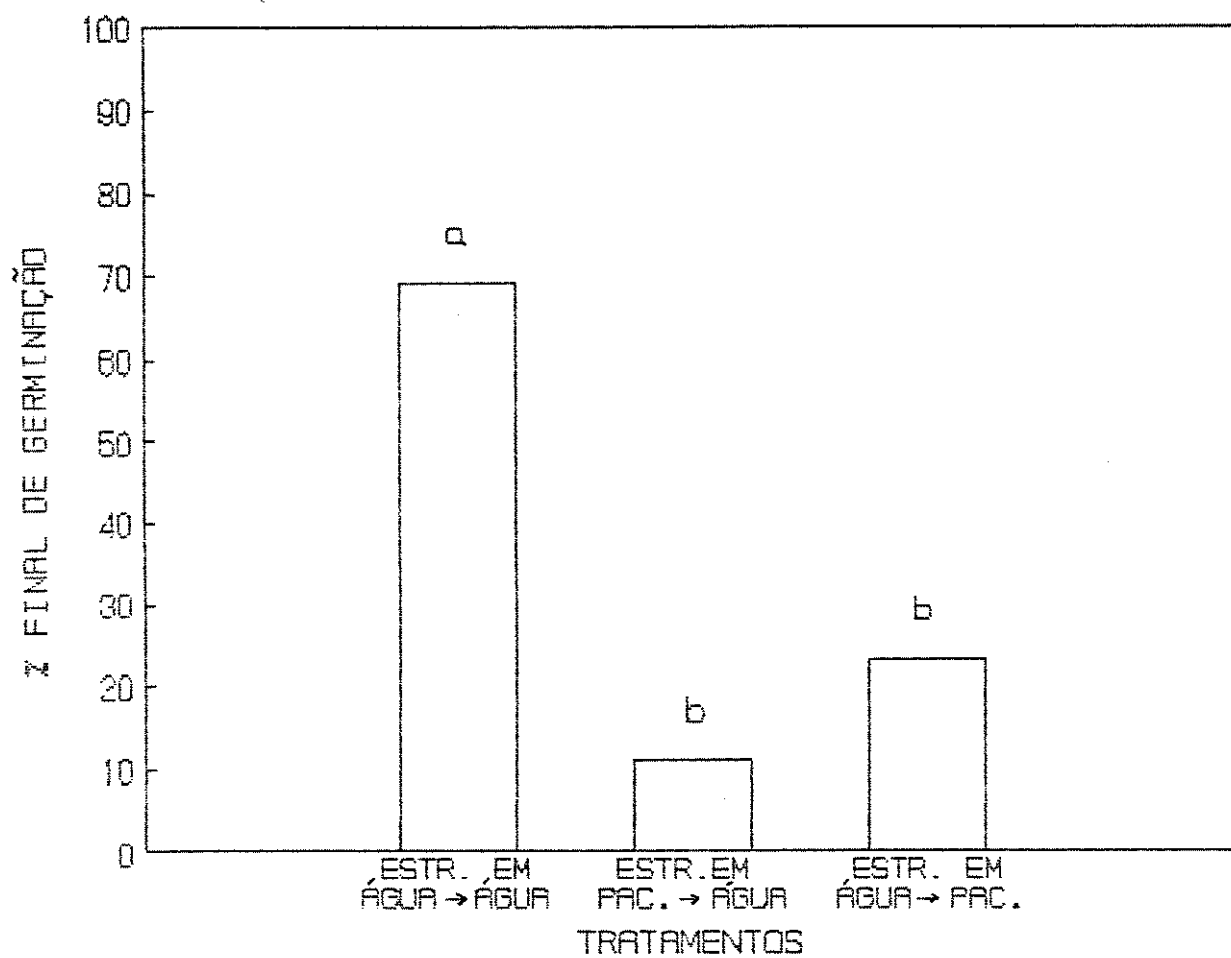


Figura 30 - Efeito de paclobutrazol 5 μ M aplicado durante e após tratamento de estratificação (45 dias) das sementes de I. wallerana. Valores obtidos após 14 dias a 25°C.

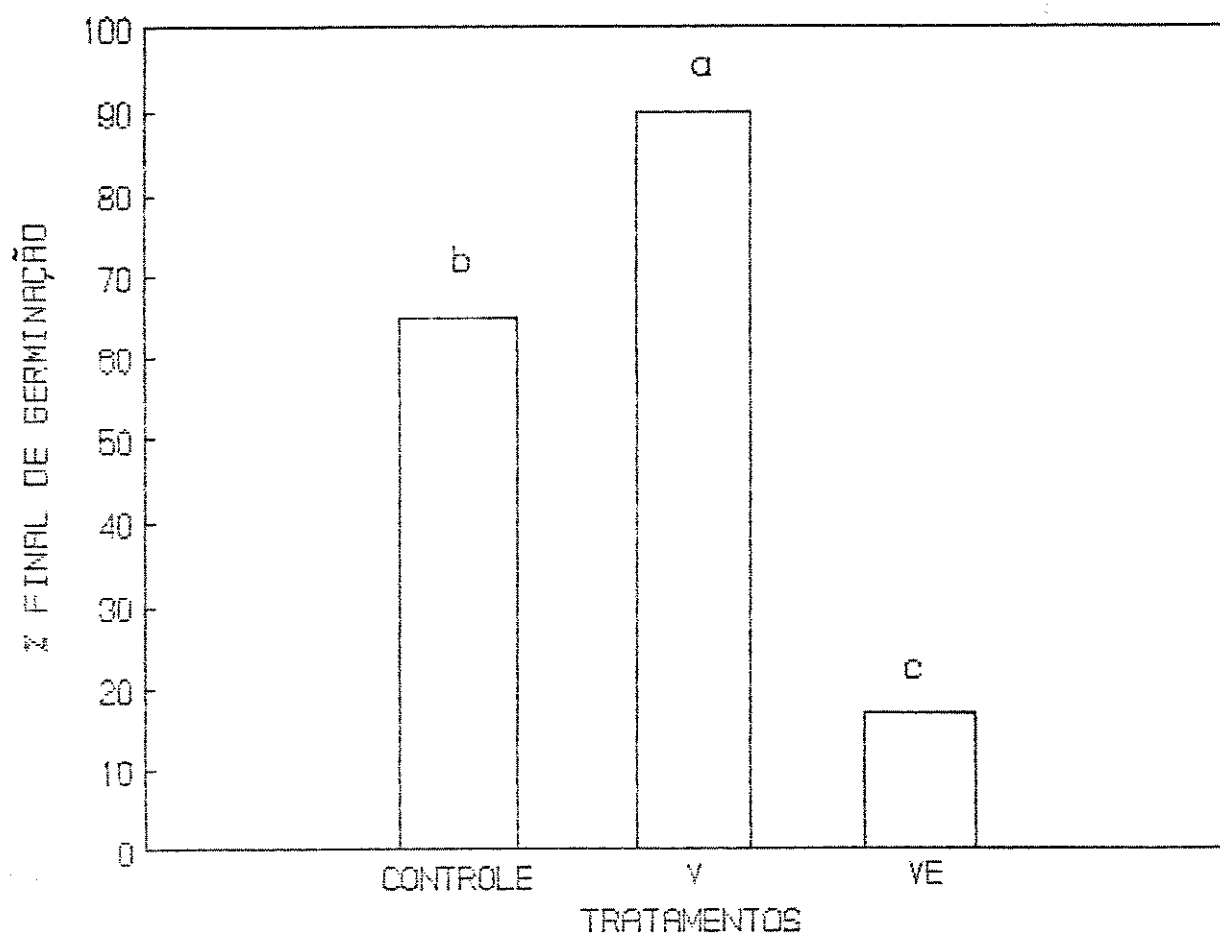


Figura 31 - Efeito de exposição curta (2h) ao vermelho (V) e ao vermelho-extremo (VE) fornecida imediatamente após o tratamento de estratificação (45 dias) das sementes de *I. wallerana*. Valores obtidos após 14 dias a 25°C.

9.5. Estratificação e Níveis de Giberelinas Endógenas

Nas Figuras 32 a 35 são apresentados os resultados dos biotestes de alongamento do hipocótilo de alface obtidos com os extratos de sementes de *I. wallerana* estratificadas e não estratificadas.

As sementes sem estratificação - aquelas com 72h de incubação a 25°C - mostraram a inexistência de atividade giberelínica em seu extrato em todas as frações testadas (Fig. 32). O teste de germinação em escuro contínuo destas sementes indicou uma porcentagem de germinação de 17%.

O extrato das sementes estratificadas por 30 dias (porcentagem final de germinação sob escuro contínuo de 41%) apresentou um pico de atividade giberelínica na fração 4, não se detectando nenhuma atividade significativa nas demais frações (Fig. 33).

O bioteste realizado com o extrato de sementes estratificadas na presença de paclobutrazol 5µM (porcentagem final de germinação sob escuro contínuo de 2%) revelou também uma atividade giberelínica na fração 4 (Fig. 34).

A comparação do nível de atividade giberelínica nesta fração, através de resultados de biotestes realizados simultaneamente, evidenciou não haver diferenças significativas entre os resultados obtidos com os extratos de sementes estratificadas em água destilada e na presença do inibidor (Fig. 35).

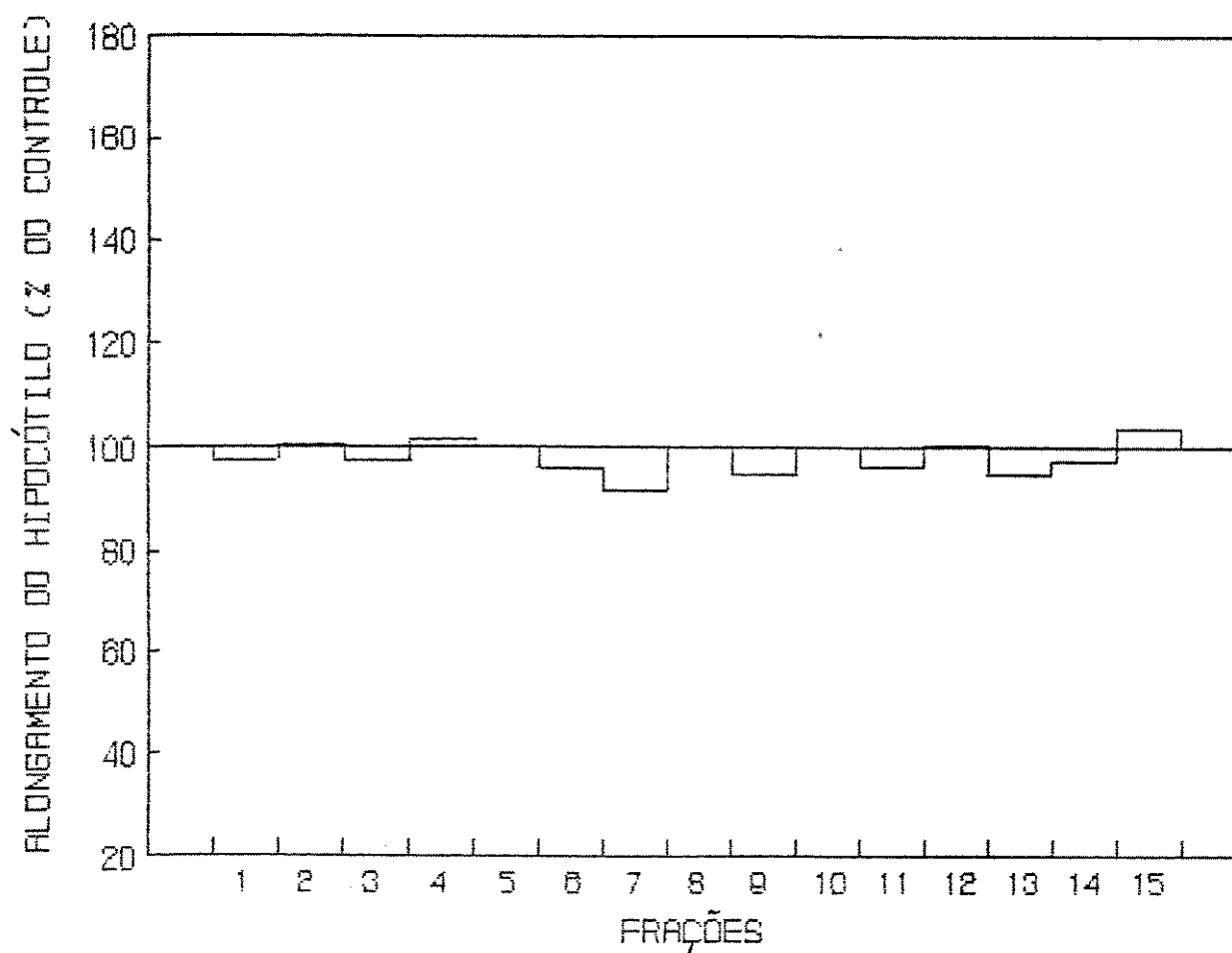


Figura 32 - Efeito no bioteste do alongamento do hipocótilo de alfaca do extrato de sementes de *I. wallerana* incubadas a 25°C por 72h.

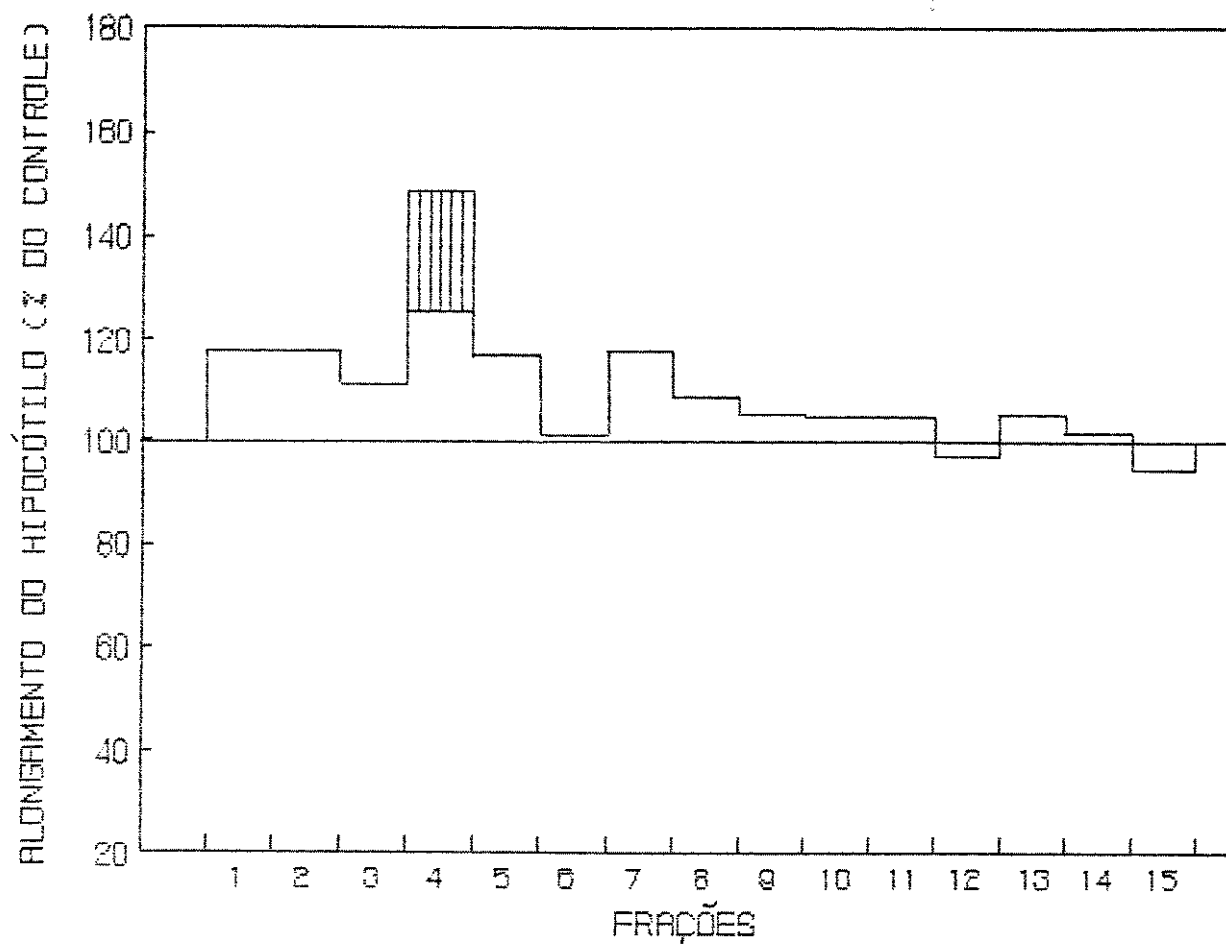


Figura 33 - Efeito no bioteste do alongamento do hipocótilo de alface do extrato de sementes de *I. wallerana* estratificadas por 30 dias. A área hachurada é significativa a nível de 5%.

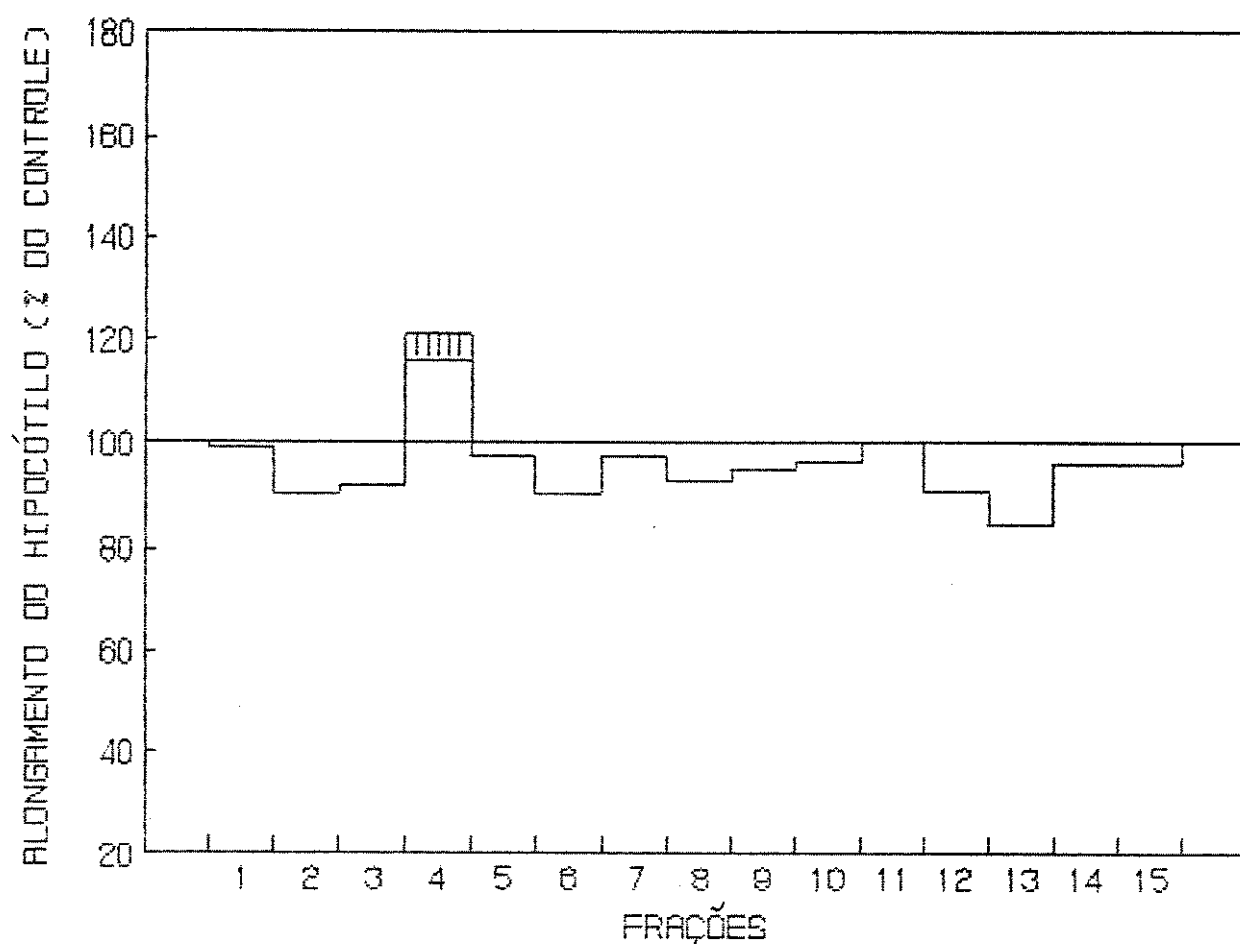


Figura 34 - Efeito no bioteste do alongamento do hipocótilo de alface do extrato de sementes de *I. wallerana* estratificadas por 30 dias na presença de paclobutrazol 5µM. A área hachurada é significativa a nível de 5%.

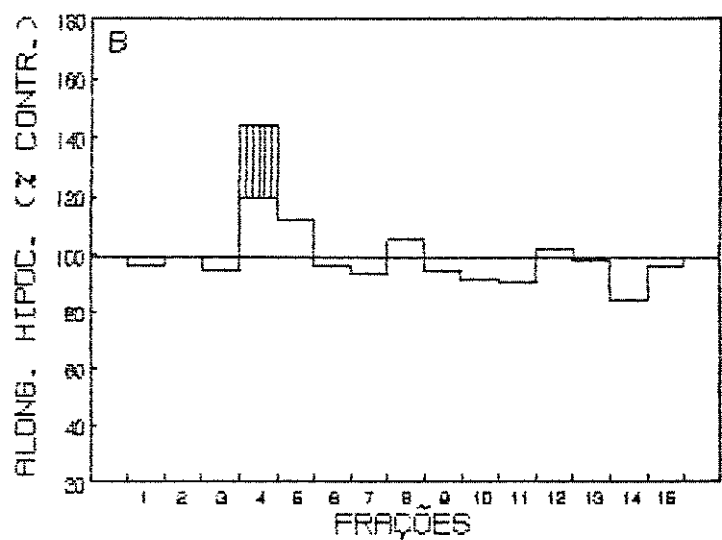
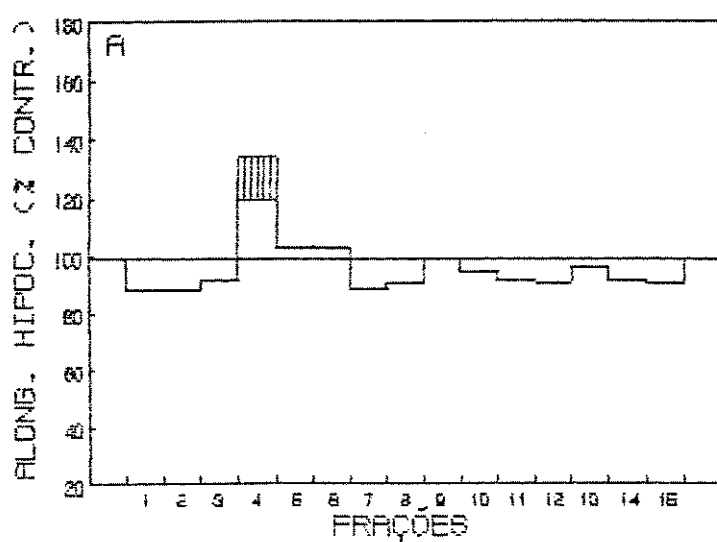


Figura 35 - Efeito no bioteste do alongamento do hipocótilo de alface dos extratos de sementes de *I. wallerana* estratificadas por 30 dias em água destilada (A) e paclobutrazol 5 μ M (B). A área hachurada é significativa a nível de 5%.

IV - DISCUSSÃO

A germinação das sementes de Impatiens wallerana foi promovida por luz branca, de modo que estas apresentam-se, portanto, como sementes fotoblásticas positivas. De modo geral, foi observado um fotoblastismo positivo bastante acentuado, com germinação no escuro nula ou em níveis baixos.

A ocorrência do fotoblastismo positivo nas sementes de I. wallerana, verificado tanto para as sementes de tegumento marrom quanto para as de tegumento esbranquiçado, pode, ao menos em parte, ser consequência do fato de o desenvolvimento e a maturação das sementes ocorrerem no interior de frutos verdes, os quais mantêm esta coloração até a deiscência. CRESWELL & GRIME (1981) mostraram, para uma série de espécies, que a retenção de clorofila nos tecidos dos frutos está fortemente correlacionada com a necessidade de luz para a germinação. Sementes amadurecidas no interior de frutos verdes, devido à absorção do vermelho pela clorofila, recebem luz com baixa razão vermelho/vermelho-extremo. Como, nos embriões em desenvolvimento, o fitocromo é capaz de sofrer fotoconversões até o início da desidratação, estas sementes, quando secas, possuem a maior parte do pigmento na forma inativa, necessitando de estímulo de luz para a germinação. Em contraste, sementes expostas à luz não filtrada antes da desidratação podem apresentar o fitocromo na forma ativa e, conseqüentemente, capacidade para germinar no escuro (CRESWELL & GRIME, 1981).

A germinação das sementes foi promovida pela luz vermelha, enquanto vermelho-extremo e azul a inibiram. Apesar de algumas exceções (BLACK & WAREING, 1957; VÁLIO *et al.*, 1972; BARTLEY & FRANKLAND, 1984), este parece ser o efeito geral destes comprimentos de onda em sementes sensíveis à luz (BEWLEY & BLACK, 1982), como mostrado para inúmeras espécies, como Lactuca sativa (WAREING & BLACK, 1958), Cucumis anguria (NORONHA *et al.*, 1978) e Stevia rebaudiana (RANDI & FELIPPE, 1981). Enquanto vermelho e vermelho-extremo agem no controle da germinação através do sistema fitocromo, os efeitos inibitórios da luz azul não são ainda claramente explicados. Em virtude das fotoconversões de Fv a Fve ocorrerem sob luz azul, é possível que a inibição ocorra em consequência do baixo valor de estado fotoestacionário estabelecido (KENDRICK, 1976), o qual estaria abaixo do limiar exigido pela espécie. Por outro lado, existe a possibilidade do envolvimento do receptor específico de luz azul/ultra-violeta na inibição sob iluminação contínua, hipótese esta considerada por NORONHA *et al.* (1978) para sementes de Cucumis anguria. Os resultados obtidos por TOMIZAWA *et al.* (1983) em estudo sobre germinação de esporos, a qual é controlada pelo fitocromo na região vermelho/vermelho-extremo do espectro, sugerem fortemente o envolvimento deste outro fotorreceptor. Estes autores demonstraram que o efeito do azul não pôde ser revertido pelo vermelho, e que o nível de Fve estabelecido pelo azul - 16% a 34% - deveria determinar uma porcentagem de germinação entre 10% e 20%, ao passo que se obteve germinação nula. Além disso, SUGAI (1982) apresentou diferenças quanto à inibição pelo azul e pelo vermelho-extremo e SUGAI *et al.* (1984) apresentaram um espectro de ação para inibição da germina-

ção de esporos consistente com o envolvimento de uma flavina como fotorreceptor. Face a estas evidências, é provável que a luz azul esteja agindo através deste outro sistema fotorreceptor em I. wallerana.

Das sementes que dependem de luz para a germinação, a maior parte responde a uma única conversão de Fv a Fve (TAYLORSON & HENDRICKS, 1977). Nestas, uma exposição curta à luz é capaz de levar a uma promoção completa da germinação, desde que as sementes estejam pelo menos parcialmente embebidas. O conteúdo de água das sementes é crucial para a hidratação do fitocromo e suas subseqüentes fototransformações (HSAIO & VIDAVER, 1971). Porém, tem sido mostrado não haver necessidade de uma embebição completa para tornar as sementes capazes de responder à luz. HSAIO & VIDAVER (1971) demonstraram que, em alface, a resposta máxima ao vermelho e ao vermelho-extremo ocorre com conteúdos de 11% a 16% de água. Em Amaranthus retroflexus, a reidratação do fitocromo está completa após cerca de 12h de embebição, o que corresponde a apenas 10% de água (TAYLORSON & HENDRICKS, 1971). Em Cucumis anguria, existe a necessidade de um conteúdo mínimo de água de 30% nas sementes para que o fitocromo pré-existente esteja completamente fotorreversível (TAKAKI *et al.*, 1981b) e em Rumex obtusifolius, a completa estimulação da germinação pelo vermelho necessita de 10h de embebição, o que corresponde a um conteúdo de água de 29% (TAKAKI *et al.*, 1981a).

Em I. wallerana, a embebição se mostrou relativamente rápida e após 2h do início do processo, as sementes já apresentaram um aumento em peso fresco de mais de 50%. No entanto, uma irradiação curta com vermelho fornecida às sementes com 2h de embebição foi pouco efetiva.

Mesmo com o aumento do tempo de embebição pré-irradiação até 144h, a resposta a uma exposição ao vermelho foi pequena, de modo que esta não pode ser atribuída à hidratação insuficiente do fitocromo, mas reflete um comportamento particular das sementes desta espécie.

A indução da germinação das sementes de I. wallerana a níveis comparáveis àqueles obtidos com iluminação branca contínua foi obtida através da exposição prolongada à luz vermelha, assemelhando-se ao comportamento apresentado por sementes de espécies como Artemisia monosperma (KOLLER et al., 1964b), Jussiae suffruticosa (WULFF & MEDINA, 1969) e Oenothera biennis (ENSMINGER & IKUMA, 1987a, 1987b), onde irradiação prolongada se mostrou necessária para a ocorrência da germinação máxima. Esta exigência, tanto em I. wallerana quanto nas espécies citadas acima, pôde ser substituída por uma série de exposições curtas ao vermelho, separadas por períodos de escuro. Exemplos de outras espécies com necessidade de exposições intermitentes à luz, onde não foram verificados efeitos de irradiação prolongada, incluem Kalanchoë blossfeldiana (ELDABH et al., 1974), Piper auritum, Cecropia obtusifolia (VÁZQUEZ-YANES & SMITH, 1982), Talinum triangulare (NWOKE, 1982) e Dactylis glomerata (PROBERT & SMITH, 1986).

Em I. wallerana, o número mínimo de exposições necessário para a promoção máxima da germinação pode variar dependendo do lote de sementes utilizado. Variação entre populações ou lotes de sementes em relação à sensibilidade à luz e também em relação à capacidade de germinação no escuro é um fenômeno de ocorrência comum. Por exemplo, lotes diferentes de Jussiae suffruticosa apresentam níveis diferentes de resposta a um mesmo período de iluminação prolongada (WULFF & MEDINA,

1969); diferentes populações de Dactylis glomerata apresentam variação na capacidade de germinação no escuro, tendo sido os baixos e altos níveis de germinação atingidos no escuro correlacionados, respectivamente, com baixos e altos níveis de Fve pré-existente nas sementes maduras (PROBERT *et al.*, 1985). Em Ranunculus sceleratus, uma espécie que necessita ciclos diários de luz e de alteração de temperatura, PROBERT *et al.* (1989) demonstraram que a variação existente entre os indivíduos de uma população em relação à sensibilidade aos efeitos da luz encontra-se distribuída normalmente. Estes autores foram capazes de selecionar, a partir de uma população original, populações altamente dormentes, com necessidade de aproximadamente 11 ciclos para causar 50% de germinação e populações levemente dormentes, onde apenas 2 ciclos se mostraram efetivos, demonstrando assim uma base genética para as diferenças nas respostas.

No caso de iluminação intermitente, o efeito da luz foi cumulativo, mesmo com irradiações saturantes - um minuto de luz sendo tão efetivo quanto 120 minutos em promover a germinação. Esta saturação da resposta com um pequeno tempo de exposição demonstra que a incapacidade de alcançar a germinação máxima com irradiação única não pode ser devido à não saturação da conversão fotoquímica de Fv a Fve, como também verificado em Artemisia monosperma (KOLLER *et al.*, 1964b) e em Dactylis glomerata (PROBERT & SMITH, 1986).

Em certos casos, como em Talinum triangulare (NWOKE, 1982), a alteração do período em que são aplicadas as irradiações, principalmente com o aumento do período pré-irradiação no escuro, pode causar uma redução do número de exposições necessárias. Isto não foi observado para

as sementes de I. wallerana, onde as porcentagens finais de germinação não sofreram mudanças estatisticamente significativas com a mudança do período de aplicação das exposições - incluindo aí não só o aumento do período pré-irradiação, mas também a distribuição das exposições em um período maior de tempo. Isto demonstra uma dependência bastante clara do número de exposições a que são submetidas as sementes e não do momento de aplicação destas.

No entanto, durante o período de escuro pré-irradiação, devem ocorrer processos importantes e independentes de luz, uma vez que, com o aumento da duração deste, foi observada uma redução do tempo médio de germinação das sementes. Portanto, pode ser sugerido que alguns eventos iniciais ocorrem na semente embebida, e a partir do momento em que o estímulo luminoso é fornecido, a germinação pode ocorrer mais rapidamente. Segundo ENSMINGER & IKUMA (1987a), o período inicial de incubação no escuro é uma fase preparatória para a germinação. O maior tempo médio de germinação apresentado pelas sementes que receberam exposições distribuídas por um período maior de tempo e, consequentemente, com intervalos de escuro de maior duração entre elas, pode ser entendido pela dependência dos processos desencadeados pela luz para o prosseguimento da resposta.

Parece haver um intervalo mínimo entre as exposições necessário para que a luz possa exercer o seu efeito cumulativo. Intervalos curtos de escuro - 10h - entre as exposições se mostraram menos eficientes em induzir a germinação a níveis comparáveis àqueles obtidos com intervalos de 22h, ao passo que durações maiores - até 94h - promoveram a resposta a um mesmo nível. A necessidade de um intervalo mínimo

entre as exposições tem sido encontrada também em várias das espécies que apresentam comportamento semelhante. Em Artemisia monosperma, intervalos menores de 12h entre duas exposições foram ineficazes em aumentar a resposta acima do nível atingido por apenas uma exposição (KOLLER *et al.*, 1964b); em Jussiaea suffruticosa, intervalos de escuro curtos, da ordem de 5 a 8h, resultaram em germinação baixa (WULFF & MEDINA, 1969), à semelhança também do que ocorreu em Oenothera biennis (ENSMINGER & IKUMA, 1987b). Este fato sugere que a duração do intervalo de escuro é importante para que as sementes respondam à exposição seguinte. Por outro lado, a não redução do nível de resposta com o aumento da duração do intervalo de escuro só tem encontrado similaridade com a resposta apresentada por Artemisia monosperma, onde intervalos de até 192h foram testados sem haver diminuição da resposta (KOLLER *et al.*, 1964b). Nas outras espécies onde este aspecto foi verificado, intervalos longos resultaram em germinação inferior ao nível apresentado por um intervalo considerado ótimo (WULFF & MEDINA, 1969; ENSMINGER & IKUMA, 1987b). A não redução da resposta pode indicar a estabilidade de um processo ou de um produto da ação do Fve. Em esporos de Dryopteris filix-mas, os quais necessitam de irradiação intermitente para a promoção da germinação (HAUPT, 1985), tal como ocorre nas sementes das várias espécies aqui citadas, HAUPT & FILLER (1986) sugeriram que o Fve controlaria a síntese de uma substância necessária para a germinação. Este produto, por ser estável, permaneceria no sistema, mesmo com a retirada do Fve, de modo que uma ação subsequente deste não teria que começar do nível zero, mas do nível induzido pela irradiação anterior. O padrão de germinação das sementes de I. wallerana

submetidas a tratamentos com intervalos longos de escuro entre as exposições, onde é possível verificar o aumento da germinação induzido por cada uma das irradiações seguido por um pequeno platô, indica que deve estar ocorrendo, após cada irradiação, a retomada do processo iniciado pelas irradiações anteriores.

A natureza fisiológica da estimulação da germinação por iluminação prolongada ou intermitente não está ainda claramente entendida (ENSMINGER & IKUMA, 1987a). A maioria dos autores (VÁZQUEZ-YANES & SMITH, 1982; NWOKE, 1982; PROBERT & SMITH, 1986; RAI, 1987; ENSMINGER & IKUMA, 1987b), no entanto, tem aceito a hipótese de que a exigência de tais tratamentos de luz reflete a necessidade de que a ação do Fve se dê por um longo período de tempo. Neste sentido, as irradiações repetidas agiriam por manter o Fve no sistema contra a sua reversão térmica no escuro. A necessidade do Fve por um longo período de tempo pode ser devido ao suprimento de um cofetecedor que limita a resposta ou à necessidade de acúmulo de algum produto do Fve (KENDRICK & FRANKLAND, 1981).

Esta hipótese pode ser aplicada às sementes de *I. wallerana*, com a ressalva de que a ação prolongada do Fve não precisaria ser contínua. Esta afirmação pode ser baseada no fato da não redução da resposta com intervalos longos de escuro entre as irradiações, desde que se assuma que, durante estes períodos, ocorra a reversão térmica do Fve. Além disso, o platô observado após cada irradiação, na curva de germinação das sementes submetidas a tais tratamentos com intervalos longos, reflete uma interrupção da resposta, e conseqüentemente do processo subjacente a esta, provavelmente em consequência do Fve ter dei-

xado de agir. Alternativamente à reversão térmica, é possível considerar que o Fve estabelecido por cada uma das irradiações seja completamente utilizado, sendo necessária nova irradiação para estabelecimento de novo Fve e prosseguimento da resposta.

As exposições repetidas ao vermelho não tiveram efeito quando cada exposição foi seguida imediatamente por vermelho-extremo. A ocorrência da fotorreversibilidade, juntamente com o fato de exposições bastante curtas serem efetivas - indicando que a saturação da resposta se dá com baixos níveis de energia - demonstra que o fitocromo está controlando a germinação em I. wallerana através da reação de baixa energia. Demonstração semelhante de fotorreversibilidade foi também encontrada nos casos de Cecropia obtusifolia e Piper auritum (VÁZQUEZ-YANES & SMITH, 1982).

Os resultados obtidos com aplicação de vermelho-extremo vários tempos após uma única exposição ao vermelho, apesar de não poderem ser tomados como conclusivos devido à baixa porcentagem final de germinação atingida, podem ser tomados como indício de que o tempo de escape para cada irradiação seja bastante longo, já que mesmo 24h de escuro após o vermelho, o vermelho-extremo reverteu completamente o seu efeito. O tempo de escape longo é consistente com a hipótese de ação do Fve por um longo período de tempo. Tentativas de determinação de tempo de escape para as sementes com necessidade de irradiação intermitente aqui citadas não foram realizadas. Em geral, valores de tempo de escape podem ser bastante variáveis entre as espécies (BEWLEY & BLACK, 1982), sendo, por exemplo, de 8h em Chloris orthothon (CRUZ & TAKAKI, 1983), 5h em Sinapis arvensis (BARTLEY & FRANKLAND, 1982), 10h

em Lactuca sativa (BLAAUW-JANSEN & SEWMAR, 1985) e também em Rumex obtusifolius (TAKAKI et al., 1981a) e 60h em Paulownia tomentosa (GRUBIŠIĆ et al., 1985).

A determinação do tempo de escape através da inserção de vermelho-extremo nos períodos de escuro entre as exposições ao vermelho não foi obtida, uma vez que o mesmo período de escuro entre os dois comprimentos de onda resultaram em respostas diferentes: se o vermelho-extremo foi seguido por um período de escuro, a resposta foi sempre inferior do que quando seguido imediatamente por nova exposição ao vermelho. Desde que o período de ação do Fve, em ambos os casos, foi o mesmo, sendo o seu término marcado pela aplicação do vermelho-extremo, parece haver uma interação entre vermelho-extremo e vermelho aplicados seguidamente e nesta ordem, levando a uma resposta superior. De qualquer modo, o aumento nas porcentagens de germinação obtido com o aumento do período de escuro entre as exposições ao vermelho e ao vermelho-extremo, quando este foi seguido de escuro - onde se anula o suposto efeito de interação - pode indicar um avanço em direção à determinação do tempo de escape.

Quanto à ocorrência de uma possível interação entre vermelho-extremo e vermelho, foi mostrado, por exemplo, que nas sementes fotoblásticas negativas de Cucumis anguria, a efetividade da luz vermelha em promover a germinação foi maior quando esta foi aplicada após uma incubação prolongada sob vermelho-extremo em comparação com a incubação no escuro (CARDOSO & FELIPPE, 1988). Os autores sugeriram que o vermelho-extremo induziria uma concentração relativamente alta de Fv, através de síntese "de novo" ou reversão, aumentando assim o efeito

promotor do vermelho. Resultados semelhantes foram obtidos também para Lactuca sativa (THANOS & GEORGHIOU, 1988). MOHR et al. (1979) sugeriram que uma potenciação do efeito indutor do fitocromo poderia ocorrer por meio de uma reação de alta irradiância precedente. No entanto, em I. wallerana, este não parece ser o caso, já que os resultados obtidos foram essencialmente os mesmos quando irradiações curtas, de apenas 15 minutos, ao vermelho e ao vermelho-extremo foram testadas. Além disso, um período prolongado de incubação sob vermelho-extremo não aumentou a resposta a uma exposição ao vermelho.

O modelo de ação do fitocromo proposto por Johnson & Tasker, o qual pode ser utilizado para explicar tanto a reação de baixa energia quanto as respostas de alta irradiância (KENDRICK, 1983) talvez possa contribuir para uma tentativa de esclarecimento deste tipo de resposta. Neste modelo, é sugerido que ocorre uma interação entre um produto da fotoconversão de Fv a Fve e o próprio Fve (JOHNSON, 1980). Desse modo, a aplicação de vermelho-extremo otimizaria a fotoconversão e conseqüentemente a formação de seu produto, ao passo que o vermelho aplicado imediatamente após estabeleceria altos níveis de Fve. Estes dois fatores agindo conjuntamente poderiam contrapor, em certo grau, o efeito inibitório do vermelho-extremo em si. No entanto, é possível que outras interpretações possam ser ou vir a ser aplicadas a este problema.

O fotoblastismo das sementes sensíveis à luz pode ser alterado pelas temperaturas a que estas são submetidas, sendo vários os casos de modificação da resposta com aumento ou diminuição da temperatura (FELIPPE & SILVA, 1984; LAGÔA & PEREIRA, 1987; SAINI et al., 1989). Em

I. wallerana, dentro da faixa de temperaturas onde ocorreu a germinação, o fotoblastismo positivo foi mantido. No entanto, nos lotes de sementes que apresentaram certa capacidade de germinação no escuro, esta foi dependente da temperatura, sendo maior nas temperaturas mais baixas, apesar de não ter ocorrido alteração do fotoblastismo. Aumento da germinação no escuro com diminuição da temperatura ocorre, por exemplo, em Lactuca sativa, onde o fotoblastismo chega a ser alterado, passando as sementes a serem indiferentes à luz nas temperaturas abaixo de 20°C (SAINI *et al.*, 1989). Duas explicações podem ser consideradas para explicar tal fato (SAINI *et al.*, 1989). Assumindo que a fração de sementes que germina no escuro o faz devido ao Fve endógeno, uma das explicações considera que o aumento da germinação no escuro em temperaturas mais baixas pode ser atribuído a uma redução da razão de reversão do Fve pré-existente a Fv. Deste modo, as temperaturas baixas agiriam por manter este Fve presente por mais tempo, suficiente para induzir a germinação. A outra hipótese propõe que as alterações da resposta provocadas pela temperatura podem ser reflexo de alterações de necessidade a nível do fitocromo. Assim, a fração de sementes capaz de responder a um dado nível de Fve pode aumentar progressivamente com o decréscimo na temperatura (BEWLEY & BLACK, 1982; SAINI *et al.*, 1989).

Além de poder interferir com as respostas fotoblásticas das sementes, as temperaturas afetam também a capacidade e a razão de germinação (BEWLEY & BLACK, 1985). A germinação em I. wallerana ocorreu na faixa de 15°C a 30°C, sendo que, a 30°C, a resposta foi apenas parcial e presente somente em alguns lotes. Os resultados obtidos com a trans-

ferência para 25°C das sementes submetidas às diferentes temperaturas constantes indicaram que a temperatura de 30°C apenas bloqueou a germinação de parte das sementes. Já a temperatura de 35°C deve ter sido letal para a maioria dos indivíduos, uma vez que um nível baixo de germinação foi observado após a transferência para 25°C. As temperaturas baixas de 5°C e 10°C também não foram letais, já que as sementes vieram a germinar normalmente quando transferidas para 25°C. De acordo com LABOURIAU (1980), a limitação da germinação em temperaturas baixas deve ocorrer por uma insuficiência de transconformação ou desdobramento de proteínas, a qual seria necessária para exposição de sítios reativos, necessários, por sua vez, para a ativação de processos fisiológicos. Por outro lado, a limitação da germinação em temperaturas altas deve ser decorrência da termodenaturação de proteínas.

Dentre as temperaturas testadas, a temperatura ótima - aquela que determina a maior porcentagem de germinação em menor intervalo de tempo (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982) - foi a de 25°C, já que nesta temperatura a velocidade se mostrou maior.

Tratamentos com temperaturas alternadas podem promover a germinação no escuro de sementes fotoblásticas positivas de várias espécies (WULFF & MEDINA, 1971; FELIPPE, 1980; ROBERTS & TOTTERDELL, 1981; BARNHILL *et al.*, 1982). Em *I. wallerana*, o fotoblastismo positivo também não se alterou com tais tratamentos. Contudo, a alternância 25°C-10°C causou um pequeno aumento da germinação no escuro. É interessante o fato de que as sementes submetidas à temperatura constante de 10°C e transferidas posteriormente para 25°C apresentaram também uma germinação considerável no escuro, de modo que é provável que esta

temperatura esteja agindo através de um efeito similar em ambos os casos. Enquanto não parece provável que este efeito seja devido à redução da reversão térmica do fitocromo, é possível que a temperatura de 10°C cause um aumento de sensibilidade ao nível endógeno de Fve, enquanto a temperatura de 25°C permita a ocorrência de processos fisiológicos. Uma hipótese levantada por POPAY & ROBERTS (1970 apud TOTTERDELL & ROBERTS, 1980) para explicar as respostas às temperaturas alternadas das sementes de Capsella bursa-pastoris poderia ser também aplicada para I. wallerana. Foi sugerido, neste caso, que o efeito das temperaturas alternadas poderia ser explicado pela soma dos efeitos de estratificação causados pela exposição a períodos de baixa temperatura superiores a 10h por dia.

A redução do número de exposições ao vermelho necessárias para a promoção da germinação com a redução na temperatura, observada para I. wallerana, foi também verificada em outros casos. Em Artemisia monosperma, por exemplo, duas irradiações a 10°C ou 15°C foram suficientes para saturar a resposta, ao passo que a 25°C, 4 exposições se fizeram necessárias (KOLLER *et al.*, 1964b). No caso de I. wallerana, tal redução parece ser consequência direta do aumento da germinação no escuro em temperaturas mais baixas.

Uma outra constatação sobre o efeito de temperaturas em I. wallerana foi com relação à sua influência sobre a sensibilidade à luz vermelha em função do tempo de embebição no escuro. Em muitos casos, como em Oldenlandia corymbosa (CORBINEAU & CÔME, 1985) e Lactuca sativa (THANOS & GEORGHIOU, 1988), a sensibilidade à luz aumenta inicialmente com o tempo, sendo este aumento mais rápido quanto mais ele-

vada a temperatura, e decresce posteriormente em razão também dependente de temperatura. No entanto, em temperaturas baixas, da ordem de 10°C a 20°C em Oldenlandia corymbosa e abaixo de 17,5°C em Lactuca sativa, este decréscimo não é observado e a capacidade de resposta se mantém constante. Em ambos os casos, considera-se que os níveis finais de germinação atingidos são determinados pela disponibilidade de Fve e de um componente X com o qual o Fve interage, conforme o modelo proposto por DUKE et al. (1977) para explicar as alterações de sensibilidade à luz em função do período de embebição no escuro. Estes autores apresentaram evidências de que o nível do fitocromo se mantém constante durante a incubação no escuro, de modo que as mudanças na sensibilidade à luz, crescentes ou decrescentes, seriam resultantes do aumento ou da diminuição, respectivamente, dos níveis do citado componente.

Em I. wallerana, embora não se notem alterações muito evidentes na capacidade de resposta em função do período de embebição no escuro a 25°C, o que, de acordo com as colocações anteriores, refletiria uma estabilidade tanto dos níveis do Fve estabelecido quanto do componente X, a 20°C e a 15°C, foi observado claramente um aumento da capacidade de resposta seguido da sua manutenção em um nível constante. Portanto, de acordo com o modelo proposto e conforme sugerido para dados similares em Lactuca sativa (THANOS & GEORGHIOU, 1988), este fato seria atribuído ao aumento inicial do componente X seguido da sua manutenção nas sementes em temperaturas mais baixas.

O armazenamento a seco das sementes pode causar alterações na resposta fotoblástica. Aumento da germinação no escuro de sementes fotoblásticas positivas devido ao armazenamento foi verificado para se-

mentes de Hyptis suaveolens (WULFF & MEDINA, 1971), Portulaca oleracea (LIMA & FELIPPE, 1986), Talinum patens (LIMA & FELIPPE, 1988) e Lactuca sativa (CHOI et al., 1989). Este efeito do armazenamento foi também verificado para as sementes de I. wallerana, onde se observou um aumento gradativo da porcentagem de germinação no escuro com o aumento do período de armazenamento até a perda total do fotoblastismo. Este fato tem sido atribuído ou à existência de uma maior quantidade de Fve nas sementes ou à maior capacidade de resposta a uma mesma quantidade de Fve (CHOI et al., 1989).

Os experimentos relativos ao armazenamento demonstraram também que as sementes de I. wallerana mantiveram a viabilidade por um período curto de tempo quando armazenadas sob condições ambiente, já que sementes com pouco mais de um ano de armazenamento se mostraram completamente inviáveis. Precedendo a perda de viabilidade, é esperado que ocorra uma diminuição da razão de germinação com o aumento do período de armazenamento (ELLIS & ROBERTS, 1980 apud ROBERTS & TOTTERDELL, 1981), o que, porém, não foi observado para I. wallerana.

A germinação no escuro de várias espécies fotoblásticas positivas pode ser estimulada pela aplicação exógena de giberelinas (FELIPPE & LUCAS, 1971; GRUBIŠIĆ et al., 1988; THOMAS, 1989), fato que tem levado à hipótese de que o fitocromo controlaria a biossíntese deste fitormônio. No entanto, em alguns casos, como em Lamium amplexicaule, foram apresentadas evidências de que a ação das giberelinas é dependente da presença de Fve nas sementes (TAYLORSON & HENDRICKS, 1976). Deste modo tem sido sugerido que o processo de germinação deve depender de ambos os fatores - tanto Fve quanto giberelinas - e não apenas de uma síntese

se de giberelinas mediada pelo Fve (TAYLORSON & HENDRICKS, 1977; FRANKLAND & TAYLORSON, 1983). TAYLORSON & HENDRICKS (1976) chegaram a sugerir que o Fve é necessário para permitir, de algum modo, a ação das giberelinas.

Em I. wallerana, a aplicação exógena de giberelinas causou uma estimulação apenas parcial das sementes mantidas sob condições de escuro. Este fato, juntamente com a verificação de que GA₃ foi capaz de promover o efeito de exposições sub-ótimas à luz vermelha, sugere que a sua ação seja dependente do nível de Fve. Corroborando esta sugestão, está a incapacidade do GA₃ de estimular a germinação das sementes tratadas com vermelho-extremo, nas quais quase todo o Fve endógeno deve ter sido removido pelo tratamento. Efeito de GA₃ em causar aumento de sensibilidade à luz - como verificado em Kalanchoë blossfeldiana, de modo que as sementes se tornam capazes de responder a baixos níveis de Fve, mesmo aqueles estabelecidos por irradiação com vermelho-extremo (RETHY et al., 1987) - não parece ser o que ocorre com I. wallerana, onde os resultados obtidos apontam preferencialmente para uma necessidade de ação conjunta destes dois fatores.

O efeito dos tratamentos de estratificação foi comparável com o efeito da aplicação de giberelinas, causando apenas uma estimulação parcial da germinação das sementes no escuro. Os resultados obtidos forneceram evidências, tanto indiretas - como a incapacidade do GA₃ de ampliar o efeito da estratificação - quanto diretas - como a verificação do aumento do nível de substâncias giberelínicas em sementes estratificadas - que a germinação no escuro estimulada pela estratificação ocorre provavelmente via ação das giberelinas. O efeito promotor

da estratificação através do aumento do nível endógeno de giberelinas foi também observado em outros casos, como, por exemplo, em Vitis vinifera (PEREIRA & MAEDA, 1986).

A interação observada entre o tratamento de estratificação e exposições ao vermelho e ao vermelho-extremo, havendo, respectivamente, uma ampliação e uma inibição do efeito, foi similar à interação observada entre GA₃ e luz, sendo, portanto, consistente com o efeito da estratificação via giberelinas. Promoção do efeito da estratificação pelo vermelho e inibição pelo vermelho-extremo foi verificado também em sementes de Betula papyrifera (BEVINGTON & HOYLE, 1981) e Xanthium pennsylvanicum (ESASHI *et al.*, 1986), demonstrando, assim, a dependência da presença do Fve para a manifestação dos efeitos da estratificação.

A semelhança da hipótese feita por RETHY *et al.* (1987) sobre aumento da sensibilidade à luz induzido por giberelinas, existe uma proposta feita por VANDERWOUDE & TOOLE (1980) de que a estratificação teria o efeito de potenciar a ação de um baixo nível de Fve, de modo que o vermelho-extremo se tornaria efetivo em combinação com a estratificação. Da mesma maneira comentada anteriormente em relação às giberelinas, esta proposta não pode ser aplicada para I. wallerana.

Em geral, a inibição da germinação induzida pela luz por meio da aplicação de inibidores de biossíntese de giberelinas - os chamados retardantes de crescimento - é tomada como evidência de que a ação da luz é mediada através da biossíntese de giberelinas (FELIPPE & LUCAS, 1971; GRUBIŠIĆ *et al.*, 1988; THOMAS, 1989), uma conclusão aparentemente lógica em vista do conhecimento sobre a inibição exercida por tais

substâncias nos passos enzimáticos envolvidos no caminho biossintético das giberelinas (GRAEBE, 1987).

Os inibidores de biossíntese de giberelinas utilizados neste trabalho - CCC e paclobutrazol - causaram inibição da germinação das sementes submetidas aos tratamentos indutivos de luz e de estratificação. Considerando-se que CCC inibe a ciclização do geranilgeranil-pirofosfato a caureno (SEMBDENER *et al.*, 1980), enquanto que paclobutrazol exerce inibição nos passos entre caureno e ácido caurenóico (LÜRSSEN, 1987), a inibição da germinação causada por estes inibidores poderia apontar para o envolvimento da biossíntese de giberelinas na resposta aos tratamentos indutivos de luz e estratificação. No entanto, conclusões a este respeito devem ser cautelosas, em vista das informações disponíveis atualmente.

Na realidade, têm sido levantadas dúvidas quanto à efetividade do CCC em inibir a formação do caureno (FROST & WEST, 1977). REID & CROZIER (1970) mostraram que aumentos nos níveis endógenos de giberelinas podem ocorrer sob tratamentos com este inibidor. Além disso, foi também mostrado que CCC é capaz de inibir a biossíntese de esteróis (DOUGLAS & PALEG, 1974). Para os inibidores triazólicos, entre os quais se inclui o paclobutrazol, foi demonstrado também que eles podem interferir com a biossíntese de esteróis (LÜRSSEN, 1987). Os esteróis têm papel importante para a estrutura e função de membranas (GRUNWALD, 1978). Alterações na sua composição ou inibição da sua síntese podem interferir com a permeabilidade de membranas, movimentos de troca iônica e atividades enzimáticas (DOUGLAS & PALEG, 1981), de modo que parte da inibição da germinação pode ser devido a esta outra ação dos

retardantes.

A detecção em I. wallerana de atividade giberelínica em sementes estratificadas na presença de paclobutrazol, em nível semelhante ao detectado em sementes estratificadas em água destilada, indica que este inibidor, pelo menos na concentração aqui utilizada, não interferiu com a biossíntese de giberelinas, embora tenha inibido a germinação. A interferência com a biossíntese de esteróis pode talvez explicar a inibição aqui observada sob os tratamentos com paclobutrazol. É interessante colocar que, devido às alterações provocadas em propriedades de membranas, é possível que mudanças na composição de esteróis possam afetar também a sensibilidade ou a capacidade de resposta às giberelinas (SINGH & PALEG, 1985), uma vez que é provável que estas interajam com componentes de membranas (TAYLORSON & HENDRICKS, 1977).

O efeito inibidor do paclobutrazol na germinação estimulada pela estratificação foi revertido pela transferência das sementes para solução de GA₃. Segundo LÜRSSEN (1987), quando outro fator, além da interferência com giberelinas, está envolvido na inibição, esta não é completamente compensada por giberelinas. No entanto, foi mostrado que GA₃ foi capaz de reverter completamente o efeito inibidor do crescimento de certos agentes inibidores específicos da biossíntese de esteróis (DOUGLAS & PALEG, 1981).

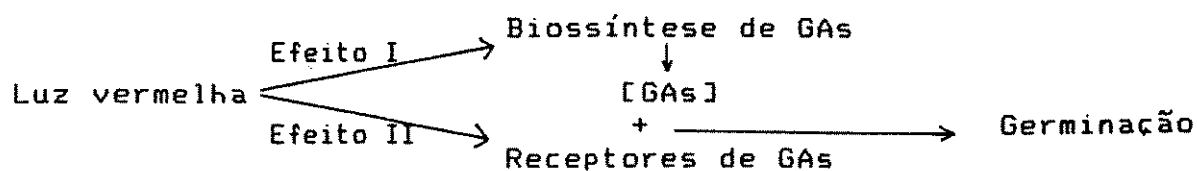
O fato do paclobutrazol ter inibido o efeito promotor da estratificação tanto ao ser aplicado durante o tratamento de frio quanto após a transferência para 25°C - o que viria a indicar, caso a sua ação fosse a interferência com a biossíntese de giberelinas, se esta aconteceria durante o período de baixa temperatura ou após este - pode ser

entendido em vista da interferência com a biossíntese de esteróis aqui proposta. A análise da atividade giberelínica feita imediatamente após o término do tratamento de frio mostrou, por sua vez, que a biossíntese de giberelinas ocorreu durante o período de baixa temperatura.

Quanto ao CCC, não foi investigado se a sua ação inibitória ocorreu em consequência do bloqueio da biossíntese de giberelinas. Como o CCC também não apresenta especificidade para a inibição da biossíntese de giberelinas, existe a possibilidade de seu efeito inibitório ter sido devido à interferência com outros processos.

No entanto, os resultados obtidos com os inibidores, apesar de não permitirem a afirmação de que a luz promove a germinação através da biossíntese de giberelinas, não descartam a possibilidade de que isto ocorra. Dado que os resultados comentados anteriormente indicam que há necessidade de uma ação tanto do Fve quanto de giberelinas e dado que sementes incubadas no escuro não apresentam atividade giberelínica detectável, é possível que o Fve estimule a síntese de tais substâncias, além de ser necessário em um passo posterior para permitir a ação destas.

Neste sentido, a resposta de I. wallerana à luz e a giberelinas pode se adequar ao esquema proposto por HILHORST et al. (1986) para explicar as respostas das sementes de Sysimbrium officinale e de Arabidopsis thaliana (HILHORST & KARSSSEN, 1988). Os autores propõem que a luz estimula a germinação nestas espécies através de dois efeitos: o primeiro estimulando a biossíntese de giberelinas e o segundo aumentando a sensibilidade a estas, através da estimulação ou formação de sítios receptores para giberelinas, conforme o esquema abaixo:



Este esquema, segundo os seus autores, poderia explicar porque a aplicação de giberelinas não é capaz de substituir completamente a necessidade de luz em certas espécies, tal como ocorre em I. wallerana, já que o efeito II estaria agindo como fator limitante nestes casos.

Em Paulownia tomentosa, a necessidade de ação prolongada do Fve foi relacionada com o seu envolvimento na biossíntese de giberelinas (GRUBIŠIĆ et al., 1988). Em I. wallerana, o envolvimento do fitocromo em mais de um processo, sendo um deles a biossíntese de giberelinas, poderia ser consistente com a necessidade da ação prolongada do Fve discutida anteriormente.

V. RESUMO

Entre os fatores ambientais capazes de influenciar a germinação das sementes, a luz é de reconhecida importância, sendo a responsável pela indução da germinação em sementes fotoblásticas positivas. O objetivo deste trabalho consistiu em caracterizar a resposta das sementes de I. wallerana à luz, verificar a interação da luz com diferentes tratamentos de temperatura e estudar o efeito da aplicação exógena de GA₃ e de tratamentos de estratificação em substituição à luz e em interação com esta.

As sementes de I. wallerana mostraram-se fotoblásticas positivas, sendo a germinação controlada pelo sistema fitocromo através da reação de baixa energia. As sementes desta espécie apresentaram resposta baixa a uma irradiação única com luz vermelha, necessitando, para a promoção da germinação, de exposição prolongada ou intermitente à luz. Em geral, no caso de exposições repetidas à luz vermelha, 5 exposições, desde que separadas por um intervalo mínimo adequado de escuro, foram efetivas na indução da resposta máxima. A variação do momento de aplicação das exposições, a duração das mesmas, bem como o aumento da duração dos intervalos de escuro entre as irradiações, não afetaram o nível final de resposta atingido. Em geral, considera-se que a exigência de iluminação prolongada ou intermitente para a promoção da germinação reflete a necessidade de que a ação do Fve, a forma ativa do fitocromo, se dê por um longo período de tempo. A fotorreversibilidade

vermelho/vermelho-extremo pode ser observada, havendo indícios de que o tempo de escape da resposta seja longo. Além disso, parece haver um efeito de interação entre vermelho-extremo e vermelho aplicados seguidamente e nesta ordem, cuja natureza fisiológica é desconhecida.

A germinação das sementes de *I. wallerana* ocorreu na faixa de 15°C a 30°C, sendo 25°C a temperatura ótima. O fotoblastismo positivo não foi alterado pelas diferentes temperaturas constantes ou alternadas testadas, embora em certos tratamentos, tenha ocorrido um aumento da germinação no escuro. Perda do fotoblastismo positivo ocorreu com o armazenamento a seco das sementes, as quais mantiveram a viabilidade por um período relativamente curto de tempo.

A germinação das sementes no escuro foi parcialmente promovida pela aplicação exógena de GA₃ e por tratamento de estratificação. Evidências foram obtidas que o tratamento de frio promoveu o aumento do nível endógeno de giberelinas, sendo o seu efeito promotor mediado provavelmente pela ação destas. Ambos os tratamentos foram capazes de promover o efeito de um número sub-ótimo de exposições à luz vermelha e incapazes de estimular a germinação de sementes tratadas com vermelho-extremo, o que sugere a necessidade de uma ação tanto do Fve quanto das giberelinas na promoção da germinação, o primeiro sendo necessário para a expressão dos efeitos das giberelinas.

Apesar de ter sido obtida a inibição da germinação induzida pela luz através da utilização de inibidores de biossíntese de giberelinas, o possível envolvimento do Fve na biossíntese deste fitormônio não pode ser esclarecido, em vista do conhecimento sobre a inespecificidade de ação dos mesmos. Foi, inclusive, constatada a incapacidade do pa-

clobutrazol, um dos inibidores utilizados, de bloquear o aumento do nível de substâncias giberelínicas nas sementes estratificadas de I. wallerana.

VI. LITERATURA CITADA

- BARNHILL, M.A.; CUNNINGHAM, M. & FARMER, R.E., 1982. Germination characteristics of Paulownia tomentosa. Seed Sci. Technol., 10: 217-221.
- BARTLEY, M.R. & FRANKLAND, B., 1982. Analysis of the dual role of phytochrome in the photoinhibition of seed germination. Nature, 300: 750-752.
- BARTLEY, M.R. & FRANKLAND, B., 1984. Phytochrome intermediates and action spectra for light perception by dry seeds. Plant Physiol., 74: 601-604.
- BASKIN, J.M. & BASKIN, C.C., 1985. The light requirement for germination of Aster pilosus seeds: temporal aspects and ecological consequences. J. Ecol., 73: 765-773.
- BEVINGTON, J.M. & HOYLE, M.C., 1981. Phytochrome action during prechilling induced germination of Betula papyrifera Marsh. Plant Physiol., 67: 705-710.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M., 1982. Physiology and Biochemistry of Seeds in relation to germination. vol. 2. Springer-Verlag, Berlin. 375pp.

- BEWLEY, J.D. & BLACK, M., 1985. Seeds. Physiology of Development and Germination. Plenum Press, New York. 367pp.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. & NEGBI, M., 1967. Immediate action of phytochrome in light-stimulated lettuce seeds. Nature, 215: 648-649.
- BLAAUW-JANSEN, J., 1983. Thoughts on the possible role of phytochrome destruction in phytochrome-controlled responses. Plant Cell Environ., 6: 173-179.
- BLAAUW-JANSEN, G. & SEWMAR, R., 1985. Red light-induced germination of lettuce seeds: relationship between escape from reversibility and fluence. Photochem. Photobiol., 42: 705-707.
- BLACK, M. & WAREING, P.F., 1957. Sensitivity of light-inhibited seeds to certain spectral regions. Nature, 180: 395.
- BOTHA, F.C. & SMALL, J.G.C., 1988. The germination response of the negatively photoblastic seeds of Citrullus lanatus to light of different spectral compositions. J. Plant Physiol., 132: 750-753.
- CARDOSO, V.J.M., 1985. Germinação de sementes de Cucumis anguria. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 163pp.
- CARDOSO, V.J.M. & FELIPPE, G.M., 1983. Endogenous hormones and the germination of Cucumis anguria L. Revta. brasil. Bot., 6: 29-31.

- CARDOSO, V.J.M. & FELIPPE, G.M., 1988. Relationship between far-red and supra-optimal temperature on the germination of Cucumis anguria L. Revta. brasil. Bot., 48: 645-649.
- CHOI, K.; WATANABE, M. & FURUYA, M., 1989. Effects of long-term storage on phytochrome-mediated germination in lettuce seeds. Bot. Mag., 102: 181-191.
- COLBERT, J.T., 1988. Molecular biology of phytochrome. Plant Cell Environ., 11: 305-318.
- CONE, J.W. & KENDRICK, R.E., 1986. Photocontrol of seed germination. In: KENDRICK, R.E. & KRONENBERG, G.H.M. Photomorphogenesis in Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. pp. 443-465.
- CONE, J.W.; JASPERS, P.A.P.M. & KENDRICK, R.E., 1985. Biphasic fluence-responses curves for light induced germination of Arabidopsis thaliana seeds. Plant Cell Environ., 8: 605-612.
- CORBINEAU, F. & CÔME, D., 1985. Effect of temperature, oxygen and gibberellic acid on the development of photosensitivity of Oldenlandia corymbosa L. seeds during their incubation in darkness. Plant Physiol., 79: 411-414.

CRESWELL, E.G. & GRIME, J.P., 1981. Induction of a light requirement during seed development and its ecological consequences. Nature, 291: 583-585.

CRUZ, M.S.D. & TAKAKI, M., 1983. Dormancy and germination of seeds of Chloris orthonothos. Seed Sci. Technol., 11: 323-329.

DI NOLA, L. & TAYLORSON, R.B., 1989. Brief high temperature exposure to release dormancy affects soluble and membrane-bound protein composition in Echinochloa crus-galli (L.) Beauv. seeds. J. Plant Physiol., 135: 117-121.

DOUGLAS, T.J. & PALEG, L.G., 1974. Plant growth retardants as inhibitors of sterol biosynthesis in tobacco seedlings. Plant Physiol., 54: 238-245.

DOUGLAS, T.J. & PALEG, L.G., 1981. Inhibition of sterol biosynthesis and stem elongation of tobacco seedlings induced by some hypocholesterolemic agents. J. Exp. Bot., 32: 59-68.

DUKE, S.O., EGLEY, G.H. & REGER, B.J., 1977. Model for variable light sensitivity in imbibed dark-dormant seeds. Plant Physiol., 59: 244-249.

- ELDABH, R.H.; FREDERICQ, H.; MATON, J. & DE GREEF, J., 1974. Photophysiology of Kalanchoë seed germination. I. Interrelationship between photoperiod and terminal far-red light. Physiol. Plant., 30: 185-191, 1974.
- ELLIS, R.H.; HONG, T.D. & ROBERTS, E.H., 1986. The response of seeds of Bromus sterilis L. and Bromus mollis L. to white light of varying photon flux density and photoperiod. New Phytol., 104: 485-496.
- ENSMINGER, P.A. & IKUMA, H., 1987a. Photoinduced seed germination of Oenothera biennis L. I. General characteristics. Plant Physiol., 85: 879-884.
- ENSMINGER, P.A. & IKUMA, H., 1987b. Photoinduced seed germination of Oenothera biennis L. II. Analysis of the photoinduced period. Plant Physiol., 85: 885-891.
- ESASHI, Y.; FUWA, N.; KOJIMA, K. & HASE, S., 1986. Light action in the germination of cocklebur seeds. IV. Disappearance of red light requirement for the germination of upper seeds subject to anoxia, chilling, cyanide or azide pretreatment. J. Exp. Bot., 37: 1652-1662.
- FELIPPE, G.M., 1980. Germination of the light-sensitive seeds of Cucumis anguria and Rumex obtusifolius: effects of temperature. New Phytol., 84: 439-448.

FELIPPE, G.M. & LUCAS, N.M.C., 1971. Estudos de germinação em Porophyllum lanceolatum DC. II. Efeito de luz vermelha, GA₃ e CCC. Hoehnea, 1: 11-19.

FELIPPE, G.M. & POLO, M., 1983. Germinação de ervas invasoras: efeito de luz e escarificação. Revta. brasil. Bot., 6: 55-60.

FELIPPE, G.M. & SILVA, J.C.S., 1984. Estudos de germinação em espécies do cerrado. Revta. brasil. Bot., 7: 157-163.

FELIPPE, G.M.; GIULETTI, A.M. & LUCAS, N.M.C., 1971. Estudos de germinação em Porophyllum lanceolatum DC. I. Efeitos de luz, temperatura e fotoperíodo. Hoehnea, 1: 1-9.

FELIPPE, G.M.; SILVA, J.C.S. & CARDOSO, V.J.M., 1983. Germination studies in Andropogon gayanus Kunth. Revta. brasil. Bot., 6: 41-48.

FRANKLAND, B., 1981. Germination in shade. In: SMITH, H. Plants and the Daylight Spectrum. Academic Press, London. pp. 187-204.

FRANKLAND, B. & LETENDRE, R.J., 1978. Phytochrome and effects of shading on growth of woodland plants. Photochem. Photobiol., 27: 223-230.

- FRANKLAND, B. & TAYLORSON, R. B., 1983. Light control of seed germination. In: SHROPSHIRE, Jr., W. & MOHR, H. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. vol. 16a. Springer-Verlag, Berlin. pp. 428-456.
- FRANKLAND, B. & WAREING, P. F., 1960. Effect of gibberellic acid on hypocotyl growth of lettuce seedlings. Nature, 185: 255-256.
- FRETT, J. J. & PILL, W. G., 1989. Germination characteristics of osmotically primed and stored Impatiens seeds. Sci. Hortic., 40: 171-179.
- FROST, R. G. & WEST, C., 1977. Properties of kaurene synthetase from Marah macrocarpus. Plant Physiol., 59: 22-29.
- FROUD-WILLIAMS, R. J. & CHANCELLOR, R. J., 1986. Dormancy and seed germination of Bromus catharticus and Bromus commutatus. Seed Sci. Technol., 14: 439-450.
- FURUYA, M., KADOTA, A. & UEMATSU-KANEDA, H., 1982. Percent Pfr-dependent germination of spores in Pteris vittata. Plant Cell Physiol., 23: 1213-1217.
- GABA, V. & BLACK, M., 1979. Two separate photoreceptors control hypocotyl growth in green seedlings. Nature, 278: 51-53.

- GIANFAGNA, T.J. & RACHMIEL, S., 1986. Changes in gibberellin-like substances of peach seed during stratification. Physiol. Plant., 66: 154-158.
- GONZÁLEZ, E.; IGLESIAS, I. & DIAZ, T., 1989. Effect of pre-imbibition, temperature, gibberellic acid and light on the germination of Capsicum annuum L. var. acuminatum Fingerh. Phyton, 49: 83-87.
- GÓRSKI, T. & GÓRSKA, K., 1979. Inhibitory effects of full daylight on the germination of Lactuca sativa L. Planta, 144: 121-124.
- GRAEBE, J.E., 1987. Gibberellin biosynthesis and control. Annu. Rev. Plant Physiol., 38: 419-465.
- GREY-WILSON, C., 1980. Impatiens in Papuasias. Studies in Balsaminaceae: I. Kew Bull., 34: 661-688.
- GREY-WILSON, C., 1985. Balsaminaceae. In: DASSANAYAKE, M.D. & FOSBERG, F. R. A Revised Handbook to the Flora of Ceylon. Vol. V. Amerind Publishing Co., New Delhi. pp. 76-120.
- GRUBIŠIĆ, D.; NEŠKOVIĆ, M. & KONJEVIĆ, R., 1985. Changes in light sensitivity of Paulownia tomentosa and P. fortunei seeds. Plant Sci., 39: 13-16.

- GRUBIŠIĆ, D.; KONJEVIĆ, R. & NEŠKOVIĆ, M., 1988. The effect of some growth regulators on light-induced germination of Paulownia tomentosa seeds. Physiol. Plant., 72: 525-528.
- GRUNWALD, C., 1978. Functions of sterols. Phil. Trans. R. Soc. Lond B., 284: 541-558.
- HAUPT, W., 1985. Effects of nutrients and light pretreatment on phytochrome-mediated fern-spores germination. Planta, 164: 63-68.
- HAUPT, W. & FILLER, E., 1986. Sequential photoregulation of fern-spore germination. J. Plant Physiol., 125: 409-416.
- HENDRICKS, S.B. & TAYLORSON, R.B., 1978. Dependence of phytochrome action in seeds on membrane organization. Plant Physiol., 61: 17-19.
- HIGUCHI, H.; AMAKI, A.; MINAMI, M. & SUZUKI, S., 1987. Effects of high temperature on lateral shoot growth of Salvia and Impatiens after pruning. Hortscience, 22: 618-619.
- HILHORST, H.W.M. & KARSSSEN, C.M., 1988. Dual effect of light on the gibberellin- and nitrate-stimulated seed germination of Sisymbrium officinale and Arabidopsis thaliana. Plant Physiol., 86: 591-597.

- HILHORST, H.W.M., SMITT, A.I. & KARSSSEN, C.M., 1986. Gibberellin-biosynthesis and -sensitivity mediated stimulation of seed germination of Sisymbrium officinale by red light and nitrate. Physiol. Plant., 67: 285-290, 1986.
- HILTON, J.R., 1987. Photoregulation of germination in freshly-harvested and dried seeds of Bromus sterilis L. J. Exp. Bot., 38: 286-292.
- HSAID, A.I. & VIDAVER, W., 1971. Seed water content in relation to phytochrome-mediated germination of lettuce seeds (Lactuca sativa L. var. Grand Rapids). Can. J. Bot., 49: 111-115.
- JOHNSON, C.B., 1980. The effect of red light in the high irradiance reaction of phytochrome: evidence for an interaction between Pfr and a phytochrome cycling-driven process. Plant Cell Environ., 3: 45-51.
- JOLY, A.B., 1983. Botânica. Introdução à Taxonomia Vegetal. 6ª ed. Ed. Nacional, São Paulo. 777pp.
- JOSE, A.M. & VINCE-PRUE, 1978. Phytochrome action: a reappraisal. Photochem. Photobiol., 27: 209-216.
- KARSSSEN, C.M., 1976. Two sites of hormonal action during germination of Chenopodium album seeds. Physiol. Plant., 36: 264-270.

- KENDRICK, R.E., 1976. Photocontrol of seed germination. Sci. Prog., 63: 347-367.
- KENDRICK, R.E., 1983. The physiology of phytochrome action. In: COSENS, D.J. & VINCE-PRUE, D. The Biology of Photoreception. Cambridge Univ. Press, Cambridge. pp. 275-303.
- KENDRICK, R.E. & CONE, J.W., 1985. Biphasic fluence responses curves for induction of seed germination. Plant Physiol., 79: 299-300.
- KENDRICK, R.E. & FRANKLAND, B., 1981. Fitocromo e Crescimento Vegetal. Editora Pedagógica e Universitária e Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 76pp.
- KENDRICK, R.E. & HEERINGA, G., 1986. Photosensitivity of Rumex obtusifolius seeds for stimulation of germination: influence of light and temperature. Physiol. Plant., 67: 275-278.
- KENDRICK, R.E. & SPRUIT, C.J.P., 1977. Phototransformations of phytochrome. Photochem. Photobiol., 26: 201-214.
- KOENIG, R.; LESEMANN, D.E.; LOCKHART, B.; BETZOLD, J.A. & WEIDEMANN, H.L., 1983. Natural occurrence of Helenium virus S in Impatiens holstii. Phytopathol. Z., 106: 133-140.

- KOLLER, D., 1972. Environmental control of seed germination. In: KOSLOWSKI, T.T. Seed Biology, vol. 2. Academic Press, New York. pp. 1-101.
- KOLLER, D.; SACHS, M. & NEGBI, M., 1964a. Spectral sensitivity of seed germination in Artemisia monosperma. Plant Cell Physiol., 5: 79-84.
- KOLLER, D.; SACHS, M. & NEGBI, M., 1964b. Germination-regulating mechanism in some desert seeds. VII. Artemisia monosperma. Plant Cell Physiol., 5: 85-100.
- LABOURIAU, L.G., 1980. Effects of deuterium oxide on the lower temperature limit of seed germination. J. therm. Biol., 5: 113-117.
- LABOURIAU, L.G., 1983. A Germinação das Sementes. Organização dos Estados Americanos, Washington. 174pp.
- LADEIRA, A.M., GUARDIA, M.C. & TAKAKI, M., 1987. Manipulation of seed germination in Plantago tomentosa Lam. and Raphanus sativus L. Seed Sci. Technol., 15: 55-63.
- LAGÔA, A.M.M.A. & PEREIRA, M.F.D.A., 1987. Fotoblastismo em sementes de Ricinus communis. Revta. brasil. Bot., 10: 155-158.
- LEWAK, S. & KHAN, A., 1977. Mode of action of gibberellic acid and light on lettuce seed germination. Plant Physiol., 60: 575-577.

- LIMA, R.F. & FELIPPE, G.M., 1986. Efeito de luz e temperatura na germinação de Portulaca oleracea. Ciênc. Cult., 38: 1577-1580.
- LIMA, R.F. & FELIPPE, G.M., 1988. Efeitos de luz e temperatura na germinação de Talinum patens. Anais V Congr. SBSP: 15-21.
- LOCKHART, B.E. & BETZOLD, J.A., 1980. Leaf-curl of impatiens (Impatiens holstii) caused by tobacco streak virus infection. Plant Dis., 64: 289-290.
- LOPES, V.B. & TAKAKI, M., 1987. Seed germination in Phaseolus vulgaris L. I. Osmotic effect on light intensity. Arg. Biol. Technol., 30: 665-670.
- LÜRSSEN, K., 1987. The use of inhibitors of gibberellins and sterol biosynthesis to probe hormone action. In: HOAD, G.V.; LENTON, J.R.; JACKSON, M.B. & ATKIN, R.K. Hormone Action in Plant Development. A Critical Appraisal. Butterworths, London. pp. 133-145.
- MANCINELLI, A.L., 1978. The "high irradiance responses" of plant photomorphogenesis". Bot. Rev., 44: 129-180.
- MANDOLI, D.F. & BRIGGS, W.R., 1981. Phytochrome control of two low irradiance responses in etiolated oat seedlings. Plant Physiol., 67: 733-739.

- MARMÉ, D., 1977. Phytochrome: membranes as possible sites of primary action. Annu. Rev. Plant Physiol., 28: 173-198.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A., 1982. The Germination of Seeds. 3^a ed. Pergamon-Press, Oxford. 211pp.
- MELHEM, T.S., 1975. Fisiologia da germinação das sementes de Dypterix alata Vog. (Leguminosae- Lotoideae). Hoehnea, 5: 59-90.
- METIVIER, J.R., 1979. Dormência e Germinação. In: FERRI, M.G. Fisiologia Vegetal. vol. 2. Editora Pedagógica e Universitária e Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. pp. 343-392.
- MOHR, H., 1972. Phytochrome and seed germination. In: MOHR, H. Lectures on Photomorphogenesis. Springer-Verlag, Berlin. pp. 185-189.
- MOHR, H.; DRUMM, H.; SCHMIDT, R. & STEINITZ, B., 1979. The effect of light pretreatments on phytochrome-mediated induction of anthocyanin and of phenylalanine ammonia-lyase. Planta, 146: 369-376.
- MUMFORD, P.M., 1988. Alleviation and induction of dormancy by temperature in Impatiens glandulifera Royle. New Phytol., 109: 107-110.
- NORONHA, A.; VICENTE, M. & FELIPPE, G.M., 1978. Photocontrol of germination of Cucumis anguria L. Biol. Plant., 20: 281-286.

- NOZZOLILLO, C. & THIE, I., 1983. Aspects of germination of Impatiens capensis Meerb., formae capensis and immaculata, and I. pallida Nutt. Bull. Torrey Bot. Club, 110: 335-344.
- NOZZOLILLO, C.; RAHAL, H. & LILJENBERG, C., 1986. Lipid reserves of seeds of Impatiens capensis and I. pallida (Balsaminaceae): developmental aspects. Am. J. Bot., 73: 96-102.
- NWOKE, F.I.Q., 1982. Effects of photoperiod on germination of seeds of Talinum triangulare (Jacq.) Willd. Ann. Bot., 49: 23-29.
- PEREIRA, M.F.D.A. & MAEDA, J.A., 1986. Environmental and endogenous control of germination of Vitis vinifera seeds. Seed Sci. Technol., 14: 227-235.
- PIMENTEL GOMES, F., 1976. Curso de Estatística Experimental. 6ª ed. Livraria Nobel, Piracicaba, SP. 430pp.
- PONS, T.L., 1986. Responses of Plantago major seeds to the red/far-red ratio as influenced by other environmental factors. Physiol. Plant., 68: 252-258.
- PRESTI, D.E., 1983. The photobiology of carotenes and flavins. In: COSENS, D.J. & VINCE-PRUE, D. The Biology of Photoreception. Cambridge Univ. Press, Cambridge. pp. 133-180.

PROBERT, R.J. & SMITH, R.D., 1986. The joint action of phytochrome and alternating temperatures in the control of seed germination in Dactylis glomerata. Physiol. Plant., 67: 299-304.

PROBERT, R.; SMITH, R.D. & BIRCH, P., 1985. Germination responses to light and alternating temperatures in European populations of Dactylis glomerata L. I. Variability in relation to origin. New Phytol., 99, 305-316.

PROBERT, R.J.; DICKIE, J.B. & HART, M.R., 1989. Analysis of the effect of cold stratification on the germination response to light and alternating temperatures using selected populations of Ranunculus sceleratus L. J. Exp. Bot., 40: 293-301.

RAI, J.P.N., 1987. Effect of temperature, imbibition and light on achene germination of two weedy species of Eupatorium. Proc. Ind. Acad. Sci. (Plant Sci.), 97: 325-332.

RANDI, A.M. & FELIPPE, G.M., 1981. Efeito de temperatura, luz e reguladores de crescimento na germinação de Stevia rebaudiana Bert. Cienc. Cult., 33: 404-411.

REEVE, D.R. & CROZIER, A., 1978. The analysis of gibberellins by high performance liquid chromatography. In: HILLMAN, J.R. Isolation of Plant Growth Substances. Society for Experimental Biology. Seminar Series 4. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 41-77.

- REID, D.M. & CROZIER, A., 1970. CCC-induced increase of gibberellin levels in pea seedlings. Planta, 94: 95-106.
- RETHY, R.; DEDONDER, A.; FREDERICQ, H. & DE GREEF, J., 1983. Factors affecting the induction and release of secondary dormancy in Kalanchoë seeds. Plant Cell Environ., 6: 731-738.
- RETHY, R.; DEDONDER, A.; DE PETTER, E.; VAN WIEMEERSCH, L.; FREDERICQ, H.; DE GREEF, J.; STEYART, H. & STEVENS, H., 1987. Biphasic fluence-responses curves for phytochrome-mediated Kalanchoë seed germination. Sensitization by gibberellic acid. Plant Physiol., 83: 126-130.
- ROBERTS, E.H. & TOTTERDELL, S., 1981. Seed dormancy in Rumex species in response to environmental factors. Plant Cell Environ., 4: 97-106.
- SAINI, H.S.; CONSOLACION, E.D.; BASSI, P.K. & SPENCER, M.S., 1989. Control processes in the induction and relief of thermoinhibition of lettuce seed germination. Plant Physiol., 90: 311-315.
- SEMBDENER, G.; GROSS, D.; LIEBISCH, H.W. & SCHNEIDER, G., 1980. Biosynthesis and Metabolism of Plant Hormones. In: MacMillan, J. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. vol. 9. Springer-Verlag, Berlin. pp.281-444.

- SENDEN, J.W.; SCHENKEVELD, A.J. & VERKAAR, H.J., 1986. The combined effect of temperature and red:far-red ratio on the germination of some short-lived chalk grassland species. Acta Oecol. Oecol. Plant., 7: 251-259.
- SEXTON, R., 1979. Spatial and temporal aspects of cell separation in the foliar abscission zones of Impatiens sultani Hook. Protoplasma, 99: 53-66.
- SIMMONDS, J., 1980a. Increased stand establishment of Impatiens wallerana in response to maximized germination rates. Can. J. Plant Sci., 60: 259-264.
- SIMMONDS, J., 1980b. Increased stand establishment of Impatiens wallerana in response to low temperature or polyethylene glycol seed treatments. Can. J. Plant Sci., 60: 561-569.
- SINGH, S.P. & PALEG, L.G., 1985. Low-temperature-induced GA₃ sensitivity of wheat. V. Sterol conversions in the wheat aleurone tissue during imbibition. Austr. J. Plant Physiol., 12: 549-555.
- SMITH, H., 1975. Phytochrome and Photomorphogenesis. McGraw Hill, London. 235pp.
- SMITH Jr., W.D., 1981. Characterization of the photoreceptor protein, phytochrome. Photochem. Photobiol., 33: 961-964.

- SPEER, H.L.; HSAIO, A.I. & VIDAVER, W., 1974. Effects of germination-promoting substances given in conjunction with red light on the phytochrome-mediated germination of dormant lettuce seeds. Plant Physiol., 54: 852-854.
- SPRUIT, C.J.P.; BOUTEN, L. & TRIENEKENS, T., 1979. Far-red reversibility of the induction of rapid chlorophyll accumulation in dark grown seedlings. Acta Bot. Neerl., 28: 213--220.
- SUGAI, M., 1982. Effects of anaerobiosis and respiratory inhibitors on blue-light inhibition of spore germination in Pteris vittata. Plant Cell Physiol., 23: 1155-1160.
- SUGAI, M.; TOMIZAWA, K.; WATANABE, M. & FURUYA, M., 1984. Action spectrum between 250 and 800 nanometers for the photoinduced inhibition of spore germination in Pteris vittata. Plant Cell Physiol., 25: 205-212.
- TAKAKI, M.; KENDRICK, R.E. & DIETRICH, S.M.C., 1981a. Interaction of light and temperature on the germination of Rumex obtusifolius. Planta, 152: 209-214.
- TAKAKI, M.; KENDRICK, R.E. & DIETRICH, S.M.C., 1981b. Phytochrome in seeds of Cucumis anguria. Revta. brasil. Bot., 4: 53-55.

- TAKAKI, M.; DIETRICH, S.M.C.; FELIPPE, G.M. & CARDOSO, V.J.M., 1982. Cytokinin and ethylene during the germination of Rumex obtusifolius L. Revta. brasil. Bot., 5: 29-32.
- TAKAKI, M.; HEERINGA, G.H.; CONE, J.W. & KENDRICK, R.E., 1985. Analysis of the effect of light and temperature on the fluence response curves for germination of Rumex obtusifolius. Plant Physiol., 77: 731-734.
- TAYLORSON, R.B. & HENDRICKS, S.B., 1971. Changes in phytochrome expressed by germination of Amaranthus retroflexus L. seeds. Plant Physiol., 47: 619-622.
- TAYLORSON, R.B. & HENDRICKS, S.B., 1973. Phytochrome transformation and action in seeds of Rumex crispus L. during secondary dormancy. Plant Physiol., 52: 475-479.
- TAYLORSON, R.B. & HENDRICKS, S.B., 1976. Interactions of phytochrome and exogenous gibberellic acid on germination of Lamium amplexicaule L. seeds. Planta, 132: 65-70.
- TAYLORSON, R.B. & HENDRICKS, S.B., 1977. Dormancy in seeds. Annu. Rev. Plant Physiol., 28: 331-354.
- THANOS, C.A. & GEORGHIOU, K., 1988. On the mechanism of skotodormancy induction in Grand Rapids lettuce (Lactuca sativa L.) seeds. J. Plant Physiol., 133: 580-584.

- THANDS,C.A. & SKORDILLIS,A., 1987. The effects of light, temperature and osmotic stress on the germination of Pinus halepensis and P. brutia seeds. Seed Sci. Technol., 15: 163-174.
- THOMAS,B. & DICKINSON,H.G., 1979. Evidence for two photoreceptors controlling growth in de-etiolated seedlings. Planta, 146: 545-550.
- THOMAS,T.H., 1989. Gibberellin involvement in dormancy-break and germination of seeds of celery. Plant Growth Regul., 8: 255-261.
- TOMIZAWA,K.; SUGAI,M. & MANABE,K., 1983. Relationship between germination and Pfr level in spores of the fern Lygodium japonicum. Plant Cell Physiol., 24: 1043-1048.
- TOOLE,V.K. & KOCH,E.J., 1977. Light and temperature controls of dormancy and germination in bentgrass seeds. Crop Sci., 17: 806-811.
- TOTTERDELL,S. & ROBERTS,E.H., 1980. Characteristics of alternating temperatures which stimulated loss of dormancy in seeds of Rumex obtusifolius L. and Rumex crispus L. Plant Cell Environ., 3: 3-12.
- VÁLID,I.F.M., 1986. The role of seed coat in early stages of soybean germination. Biol. Plant., 28: 258-264.

- VÁLIO, I.F.M. & JOLY, C.A., 1979. Light sensitivity of the seeds on the distribution of Cecropia glaziovii Snethlage (Moraceae). Z. Pflanzenphysiol., 91: 371-376.
- VÁLIO, I.F.M.; KIRSZENZAF, S.L. & ROCHA, R.F., 1972. Germination of achenes of Bidens pilosa L. I. Effect of light of different wavelengths. New Phytol., 71: 677-682.
- VANDERWOUDE, W.J., 1985. A dimeric mechanism for the action of phytochrome: evidence from photothermal interactions in lettuce seed germination. Photochem. Photobiol., 42: 655-661.
- VANDERWOUDE, W.J. & TOOLE, V.K., 1980. Studies on the mechanism of enhancement of phytochrome-dependent lettuce seed germination by prechilling. Plant Physiol., 66: 220-224.
- VÁZQUEZ-YANES, C. & SMITH, H., 1982. Phytochrome control of seed germination in the tropical rain forest pioneer trees Cecropia obtusifolia and Piper auritum and its ecological significance. New Phytol., 92: 477-485.
- VIDAVER, W. & HSAIO, A.I., 1974. Actions of gibberellic acid and phytochrome on the germination of Grand Rapids lettuce seeds. Plant Physiol., 53: 266-268.

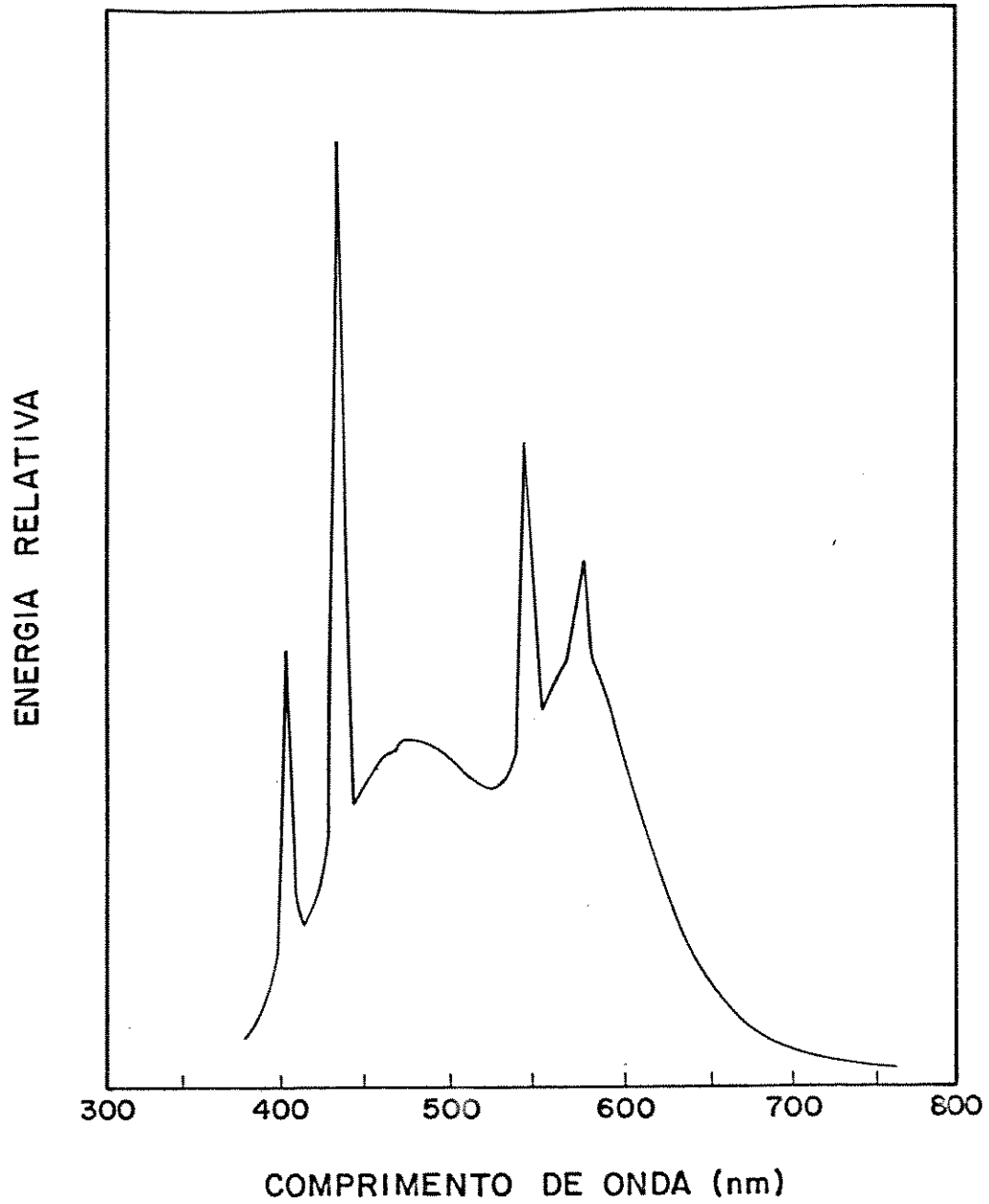
- VILLIERS, T.A., 1972. Seed dormancy. In: KOSLOWSKY, T.T. Seed Biology. vol. 2. Academic Press, New York. pp. 219-281.
- WALKER, J.T., 1980. Susceptibility of impatiens (Impatiens holstii) cultivars to root-knot nematodi, Meloidogyne arenaria. Plant Dis., 64: 184-185.
- WAREING, P.F. & BLACK, M., 1958. Similar effects of blue and infra-red radiation on light-sensitive seeds. Nature, 181: 1420-1421.
- WARREN WILSON, J.; WALKER, E.S.; WARREN WILSON, P.M. & HALL, P.J., 1987a. Morphogenetic, inductive and inhibitory effects of IAA conjugates on abscission sites in stem explants of Impatiens sultani. Ann. Bot., 60: 687-692.
- WARREN WILSON, J.; WARREN WILSON, P.M. & WALKER, E.S., 1987b. Abscission sites in nodal explants of Impatiens sultani. Ann. Bot., 60: 693-704.
- WARREN WILSON, J.; WARREN WILSON, P.M. & WALKER, E.S., 1988a. Effects of applied IAA on the position of abscission sites induced in wounded explants from Impatiens sultani internodes. Ann. Bot., 62: 235-243.
- WARREN WILSON, J.; WALKER, E.S. & WARREN WILSON, P.M., 1988b. The role of basipetal auxin transport in the positional control of abscission sites in Impatiens sultani stem explants. Ann. Bot., 62: 487-495.

WULFF,R.D., 1985. Germination of seeds of different sizes in Hyptis suaveolens: the response to irradiance and mixed red-far-red sources. Can. J. Bot., 63: 885-888.

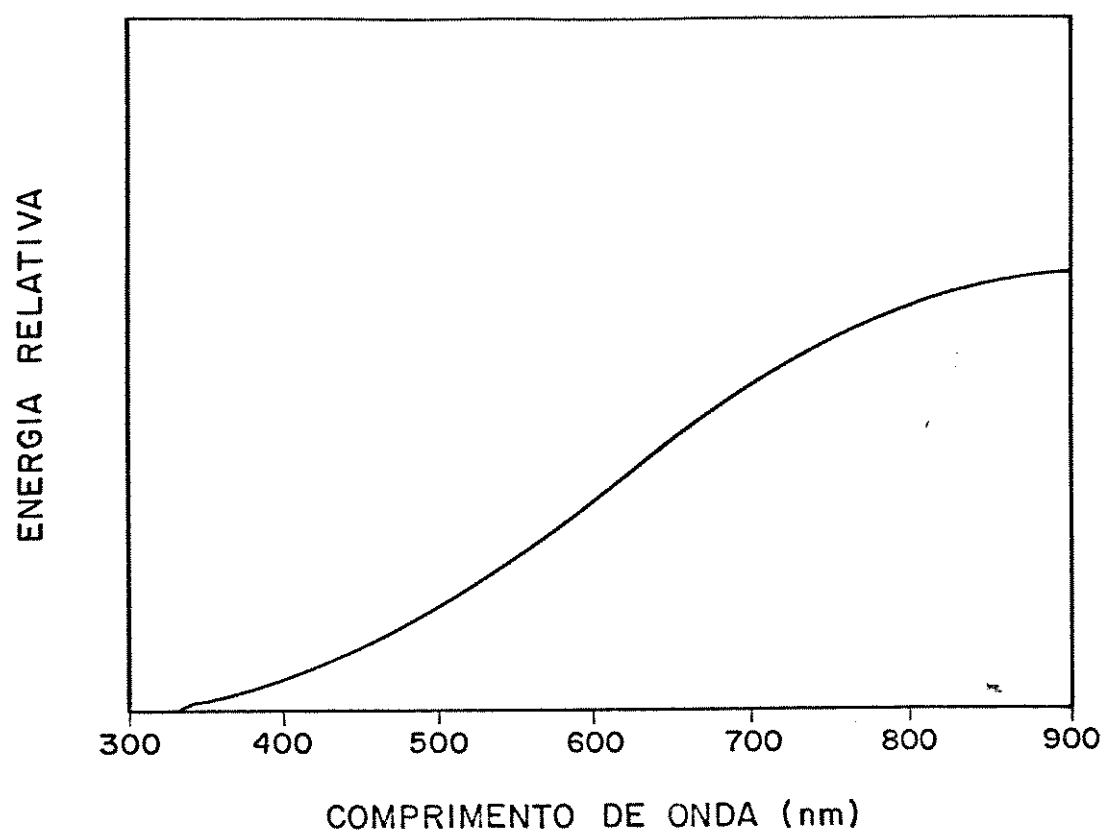
WULFF,R. & MEDINA,E., 1969. Germination of seeds in Jussiaea suffruticosa. Plant Cell Physiol., 10: 503-511.

WULFF,R. & MEDINA,E., 1971. Germination of seeds in Hyptis suaveolens Poit. Plant Cell Physiol., 12: 567-579.

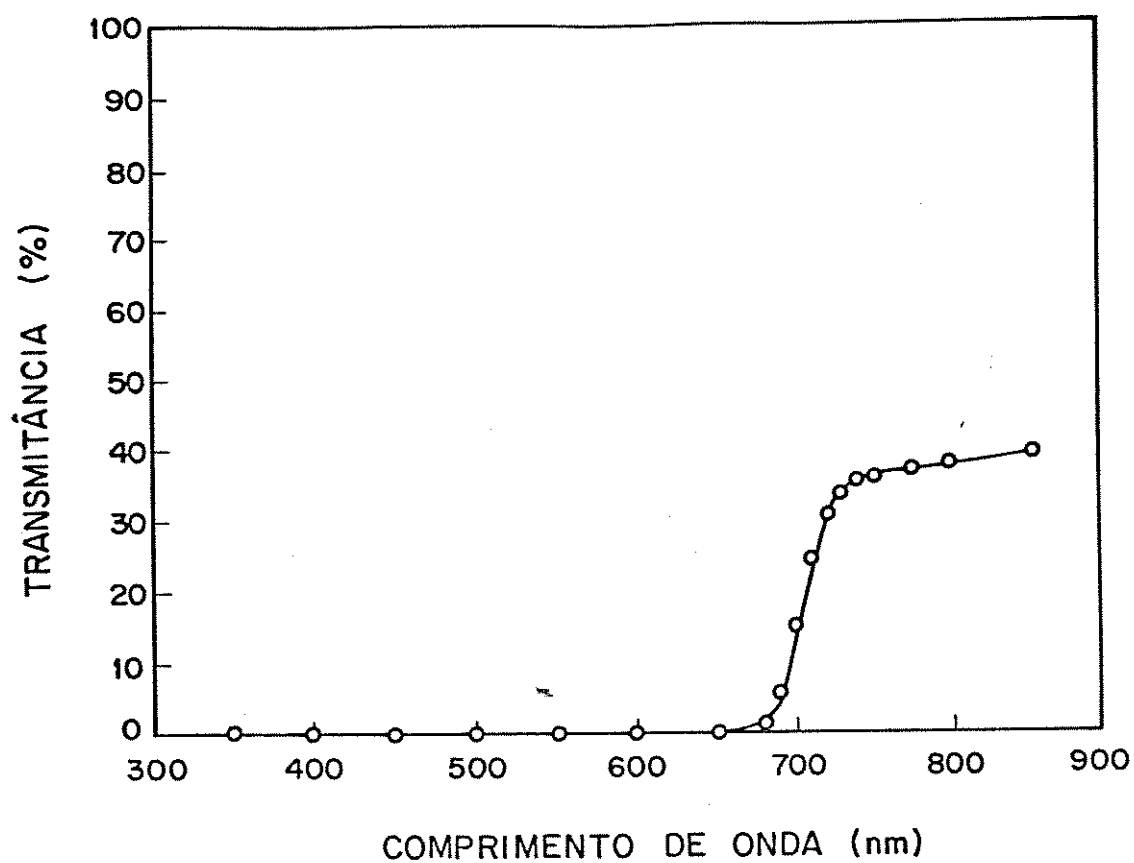
VII. APÊNDICE



Curva de distribuição espectral de energia de lâmpada fluorescente branca tipo luz do dia (Sylvania).



Curva de distribuição espectral de energia de lâmpada incandescente branca (Sylvania).



Espectro de transmissão do filtro (3 folhas de papel celofane azul + 2 folhas de papel celofane vermelho) para obtenção de vermelho-extremo.