

VICTOR JOSÉ MENDES CARDOSO

LUZ E SUBSTÂNCIAS DE CRESCIMENTO NA
GERMINAÇÃO DE *Cucumis anguria* L.

Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de
Biologia, Departamento de Fisiologia Vegetal,
da Universidade Estadual de Campinas

CAMPINAS
1982

C179L

4447/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



UNICAMP

COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PREÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: **Victor José Mendes Cardoso**

Nº de Identificação: **795342**

Endereço para Correspondência: **Depto. de Fisiol. Vegetal - IB, UNICAMP**

Curso: **Biologia Vegetal**

Nome do Orientador: **Gil Martins Felipe**

Título da Dissertação ou Tese: **Luz e Substâncias de Crescimento na Germinação de Cucumis anguria L.**

Data proposta para a Defesa: **12 de março de 1982**

(O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo)

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir desta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

 / /
Data

assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

 / /
Data

assinatura do aluno

X 3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consulte, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o fornecimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a interessados.

05/02/82
Data

Victor José Mendes Cardoso
assinatura do aluno

De acordo

Gil Martins Felipe
Orientador

VICTOR JOSÉ MENDES CARDOSO

"LUZ E SUBSTÂNCIAS DE CRESCIMENTO NA GERMINAÇÃO DE *Cucumis
anguria* L."

Tese de Mestrado apresentada
ao Instituto de Biologia,
Departamento de Fisiologia
Vegetal da Universidade Esta-
dual de Campinas.

Orientador: Prof. Dr. Gil M. Felipe

1982

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Gil Martins Felipe, pela sua orientação segura e objetiva no transcorrer deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pela auxílio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

À minha irmã, Monica Mendes Cardoso, pela confecção dos gráficos originais.

Ao professor Massanori Takaki, que me transmitiu informações sobre técnicas de cromatografia gasosa durante estágio realizado na Seção de Fitoecologia do Instituto de Botânica de São Paulo, a quem estendo estes agradecimento.

À professora Áurea Maria Randi, a quem devo boa parte de meu aprendizado em técnicas de laboratório, quando comecei a trabalhar no Departamento de Fisiologia Vegetal.

Aos professores do Departamento de Fisiologia Vegetal e, em particular, aos Drs. Ivany F. M. Válio e Ladaslav Sodek, pelas contribuições valiosas dadas no decorrer deste trabalho.

Ao Sr. Aribis J. Fonseca, responsável pela obtenção do material de trabalho, à Sra. Sebastiana R. Viei

ra, pelos auxílios prestados ao longo do trabalho, e aos demais funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal.

À Sra. Maria Célia Giorgi Almeida, pelo cuidadoso trabalho datilográfico.

A todos os colegas do Departamento de Fisiologia Vegetal que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho, assim como por seu apoio e amizade.

Enfim, a todos os amigos que compartilharam comigo desta caminhada, os meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE GERAL

	Pág.
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	12
Material	12
Métodos	13
A. Germinação	13
1. Métodos gerais	13
2. Períodos de luz vermelha e escuro	15
3. Embebição	16
4. Consumo de oxigênio	17
5. Reguladores de crescimento	18
6. Embebição e verificação da presença de GA ₃ e 6-BA dentro da semente	19
7. Experimentos de interação	20
B. Verificação de hormônios	22
1. Citocininas	22
2. Giberelinas	24
3. Etileno	27
3.1. Utilização do nitrato de prata	27
3.2. Dosagem de etileno liberado pelas se- mentes	28
C. Análise estatística	30
RESULTADOS	32
A. Germinação de <i>Cucumis anguria</i>	32

1. Embebição de sementes mantidas em luz branca ou escuro constantes	32
2. Consumo de oxigênio em sementes mantidas em luz branca e escuro constantes	36
3. Efeito de luz vermelha na germinação	36
4. Período mínimo de escuro capaz de causar germinação	38
5. Período de embebição em luz branca antes de choque de vermelho	40
6. Efeito de diferentes períodos de vermelho ...	42
7. Efeito da vedação das placas de Petri em sementes mantidas em luz branca constante	42
8. Efeito de 6-BA, etrel e GA ₃ na germinação de sementes mantidas em luz branca constante ...	43
9. Embebição em 6-BA e GA ₃	46
10. Efeito de GA ₃ em concentrações abaixo de 50 ppm	49
11. Efeito de 6-BA em concentrações abaixo de 25 ppm	49
12. Efeito de etrel em concentrações abaixo de 5 ppm	51
13. Estudo de possível interação entre luz vermelha, GA ₃ , 6-BA e etrel	51
 B. Verificação de hormônios antes e durante a germinação de <i>Cucumis anguria</i>	 57
1. Citocininas	57
2. Giberelinas	60
2.1. Extratos não purificados	60

2.2. Extratos purificados	63
3. Etileno	65
3.1. Uso de nitrato de prata	65
3.1.1. Germinação em escuro em várias concentrações de AgNO_3	65
3.1.2. Demonstração do efeito inibitório do AgNO_3	67
3.1.3. Aplicação de AgNO_3 após diferen- tes períodos em embebição em água, em escuro constante	71
3.2. Dosagem de etileno liberado pelas semen- tes	72
DISCUSSÃO	76
RESUMO	105
SUMMARY	108
BIBLIOGRAFIA	111

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 - Embebição de sementes de <i>Cucumis anguria</i> L. mantidas em placas de Petri em luz branca e escuro constantes	33
FIGURA 2 - Consumo de oxigênio e germinação de sementes de <i>Cucumis anguria</i> L.	37
FIGURA 3 - Período mínimo de escuro, após diferentes períodos de luz branca, capaz de causar germinação em sementes de <i>Cucumis anguria</i> L.	39
FIGURA 4 - Efeito de luz vermelha na germinação de <i>Cucumis anguria</i> L.	41
FIGURA 5 - Efeito de 6-BA, etrel e GA ₃ na germinação de <i>Cucumis anguria</i> L. em luz branca constante	45
FIGURA 6 - Embebição de sementes de <i>Cucumis anguria</i> L. em GA ₃ e 6-BA, em luz constante	48
FIGURA 7 - Efeito de GA ₃ em concentrações abaixo de 50 ppm, em luz branca, na germinação de sementes de <i>Cucumis anguria</i> L. ...	50
FIGURA 8 - Efeito de 6-BA e etrel, em luz branca contínua, na germinação de <i>Cucumis anguria</i> L.	52
FIGURA 9 - Estudo de possível interação entre período de 6 horas de vermelho, GA ₃ a 50 ppm, 6-BA a 20 ppm e etrel a 1 ppm, na germinação de <i>Cucumis anguria</i> L.	54

FIGURA 10 - Estudo de possível interação entre período de 6 horas de luz vermelha e substâncias de crescimento	56
FIGURA 11 - Resultados de biotestes para citocininas. Extratos básicos de sementes de <i>Cucumis anguria</i> L. embebidas e não embebidas	59
FIGURA 12 - Resultados dos bioensaios para giberelinas. Extratos obtidos pelo método de Zeevaart (1966), de sementes de <i>Cucumis anguria</i> L. após 48 horas de embebição	61
FIGURA 13 - Resultados dos biotestes para extratos obtidos pelo método de Zeevaart (1966), de sementes de <i>Cucumis anguria</i> L. embebidas por 72 horas	62
FIGURA 14 - Resultado dos biotestes de frações ácidas dos extratos de sementes de <i>Cucumis anguria</i> L.	64
FIGURA 15 - Efeito de nitrato de prata (AgNO_3) na germinação de <i>Cucumis anguria</i> L. mantidas em escuro constante	66
FIGURA 16 - Efeito do nitrato de prata na germinação de sementes de <i>Cucumis anguria</i> L. mantidas em escuro constante	68
FIGURA 17 - Efeito de AgNO_3 sobre a germinação de sementes de <i>Cucumis anguria</i> L. mantidas em escuro constante	70
FIGURA 18 - Germinação de <i>Cucumis anguria</i> L. e do	

sagem de etileno liberado pelas semen-	
tes	73
FIGURA 19 - Dosagem de etileno durante a germinação	
de <i>Cucumis anguria</i> L.	74

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1 - Germinação de sementes de <i>Cucumis anguria</i> L. mantidas em escuro e luz branca constantes	35
TABELA 2 - Efeito da vedação de placa de Petri na germinação de <i>Cucumis anguria</i> L. mantida em luz branca constante	44

INTRODUÇÃO

Fisiologicamente, a germinação é um processo que se inicia com a embebição da semente (embrião quiescente). O crescimento do embrião é então retomado, e o processo termina com a protrusão de alguma parte do mesmo através do tegumento. Na maioria dos casos, o primeiro órgão a emergir é a radícula. O processo de germinação inicia-se, portanto, com o ressurgimento das atividades metabólicas, que foram paralisadas quando da maturação da semente. Evidentemente, para que a germinação ocorra, há necessidade de que as sementes estejam viáveis e que as condições ambientais sejam favoráveis.

Uma semente com embrião quiescente germinará quando for colocada em condições adequadas de umidade, temperatura e composição de gases. Uma semente dormente requer para sua germinação, além dessas três condições, uma

classe de estímulos mais específicos.

Crocker em 1916 (in CARVALHO e NAKAGAWA, 1980) afirmou que a dormência de sementes era resultante dos seguintes fatores: a) imaturidade do embrião; b) impermeabilidade do tegumento à água; c) resistência mecânica do tegumento ao crescimento do embrião; d) baixa permeabilidade do tegumento a gases; e) bloqueio metabólico do embrião, devido à necessidade de luz ou pré-resfriamento; f) combinação de dois ou mais dos fatores anteriores; g) dormência secundária.

Neste trabalho, apenas o efeito da luz, em dormência de sementes, será discutido.

As sementes, cuja quebra de dormência depende das condições de luz, são denominadas fotoblásticas (EVENARI, 1965). Sementes fotoblásticas positivas são aquelas que necessitam de luz para germinar, enquanto que as sementes fotoblásticas negativas são inibidas pela luz branca (NOGGLE e FRITZ, 1976). O fotoblastismo da semente pode depender não só da espécie, mas também das condições de armazenamento como mostrado por NORONHA, VICENTE e FELIPPE (1976). Esses autores mostraram que em *Cucumis anguria* à medida em que se aumentava o período de armazenamento, a semente passava de indiferente à luz à fotoblástica negativa.

Em certas espécies a necessidade de luz para a germinação ocorre somente no período logo após a colheita; em outras, o fotoblastismo persiste no mínimo por um ano, como por exemplo em *Epilobium parviflorum* (MAYER e POLJA-

KOFF-MAYBER, 1975).

Entre as plantas cultivadas, a luz parece não ser de muita importância para a germinação das sementes, sendo em geral indiferentes. Evidentemente há exceções, como é o caso de alface (BORTHWICK et al., 1952), de morango e tabaco (DOWNS, 1964), de maxixe (NORONHA, VICENTE e SILBERSCHMIDT, 1971), de maracujá (VÁLIO, comunicação pessoal) e da espécie recentemente introduzida na agricultura, *Stevia rebaudiana* (FELIPPE et al., 1971; RANDI e FELIPPE, 1981).

A sensibilidade das sementes à luz também é afetada pela temperatura: certas variedades de alface a 25°C necessitam de luz para germinar, mas germinam no escuro quando em temperaturas baixas (WAREING e PHILLIPS, 1973); sementes fotoblásticas negativas de *Cucumis anguria* L. germinam em luz branca quando submetidas a um choque de 0°C (FELIPPE, 1980). MAYER e POLJAKOFF-MAYBER (1975) correlacionaram espécies com luz e temperatura, e dessa correlação conseguiram quatro grupos de sementes: a) acima de 20°C, 270 espécies eram fotoblásticas positivas e 114 negativas; b) com frio severo, 190 germinavam na luz e 81 no escuro; c) temperatura relativamente baixa (entre frio severo e 20°C), 52 espécies germinavam em luz e 32 no escuro; d) independentemente do tratamento de temperatura, 33 espécies eram insensíveis à luz para germinar.

Em certas espécies fotoblásticas positivas, a alternância de temperatura e o tratamento com produtos inor

gânicos (principalmente nitrato) ou substâncias orgânicas, como ácido giberélico ou tioureia, ou mesmo a retirada do tegumento, podem induzir a germinação na ausência de luz (FELIPPE, 1978; FELIPPE, 1980; FELIPPE et al., 1970; WAREING e PHILLIPS, 1973).

O efeito da luz sobre a germinação vem sendo estudado há muito tempo. Já em 1860, Caspary observara que sementes de *Bulliardea aquatica* não germinavam na ausência de luz (SMITH, 1975). Em 1903, Heinricher demonstrou um efeito hinibitório da luz sobre a germinação de sementes de *Acanthostachys strobilacea* (EVENARI, 1965). KENDRICK (1976) mostrou que a partir destas primeiras observações, muitos exemplos de sementes fotoblásticas foram encontrados, o que pode ser visto em algumas revisões importantes como ROLLIN (1975) e KENDRICK (1976).

FLINT e McALISTER (1935, 1937), trabalhando com sementes fotoblásticas positivas de alface, mostraram que a maior promoção da germinação ocorria na região vermelha do espectro, enquanto que a inibição máxima ocorria na região do espectro correspondente ao que foi mais tarde chamado de vermelho extremo.

BORTHWICK et al. (1952), utilizando sementes fotoblásticas de alface, postularam a existência de um pigmento único, responsável pela germinação desses sementes sensíveis à luz. Em 1959 esse pigmento foi isolado a partir de plantinhas estioladas de milho e denominado fitocromo, por Butler e colaboradores (BUTLER et al., 1959).

O fitocromo é encontrado nos tecidos vegetais sob duas formas interconvertíveis pela luz: uma forma, Fv, cujo pico de absorção está a 660 nm (vermelho); e uma forma, Fve, que apresenta seu pico de absorção a 730 nm (vermelho extremo). A forma fisiologicamente ativa do fitocromo é a Fve. Desse modo, quando as sementes são mantidas embebidas sob luz vermelha, o fitocromo na forma Fv absorve esse comprimento de onda e se converte na forma Fve, determinando a germinação. Por outro lado, se as sementes forem embebidas sob vermelho extremo, o fitocromo que está sob a forma Fve absorve esse comprimento de onda e passa para a forma Fv, que é fisiologicamente inativa, provocando a inibição da germinação (MOHR, 1972).

A alternância de exposição ao vermelho ou ao vermelho extremo irá provocar a promoção ou inibição da germinação, sendo que a resposta final dependerá apenas do último comprimento de onda dado, isto é, se a última exposição for ao vermelho extremo a germinação será inibida e se for ao vermelho a germinação será promovida (BORTHWICK et al., 1952). Esse tipo de resposta das sementes, indicando a ação do fitocromo, já foi demonstrada em diversas espécies como *Rumex obtusifolius* (ISIKAWA e FUJII, 1961; VICENTE, ENGELHARDT e SILBERSCHMIDT, 1962), tomate, pepino (YANIV, MANCINELLI e SMITH, 1967), maxixe (NORONHA, VICENTE e FELIPPE, 1978) e *Stevia rebaudiana* (RANDI e FELIPPE, 1981).

Sementes fotoblásticas positivas precisam estar, pelo menos, parcialmente embebidas para poderem responder

ao período de luz vermelha, uma vez que o Fv não pode ser fotoconvertido em Fve em sementes não hidratadas. Antes da embebição, essas sementes apresentam a maior parte de seu fitocromo sob a forma Fv, sendo que a quantidade de Fve no interior da semente deve ser baixa, estando portanto abaixo do valor limiar requerido para iniciar a germinação de uma semente fotoblástica positiva. Além disso, a conversão de Fve para Fv ocorre naturalmente no escuro em sementes embebidas. Esta reversão no escuro de Fve para Fv é uma reversão térmica, que parece ocorrer através de uma série de intermediários, que normalmente ocorrem na conversão de Fve a Fv, mediada pelo vermelho extremo (KENDRICK, 1976).

Sementes fotoblásticas negativas apresentam provavelmente parte de seu fitocromo sob a forma Fve, numa quantidade acima do valor limiar requerido para estimular a germinação, ou num dos intermediários que rapidamente podem ser convertidos a Fve (KENDRICK, 1976). Dessa maneira, as sementes embebidas no escuro podem germinar. Em presença da luz do dia, o Fve absorve o vermelho extremo e passa para a forma Fv, e a germinação não pode ocorrer (ZOUAGHI, MALCOSTE e ROLLIN, 1972).

No caso das sementes fotoblásticas negativas, a conversão no escuro de Fve para Fv não deve ser tão eficiente como a que foi proposta para as sementes fotoblásticas positivas (KENDRICK, 1976). Em sementes fotoblásticas negativas de pepino foi mostrado que ocorre um aumento no conteúdo de fitocromo total durante a germinação no escuro,

sendo a taxa de aumento dependente da temperatura; tratamentos com luz contínua resultaram em níveis de fitocromo mais baixos do que em sementes mantidas no escuro (MANCINELLI e TOLKOWSKY, 1968).

Em *Amaranthus caudatus*, que possui sementes fotoblásticas negativas, observou-se, em sementes mantidas a 25°C, duas fases no aumento do fitocromo. A primeira fase era caracterizada pela reidratação do fitocromo pré-existente, enquanto que a segunda fase era devida à síntese de fitocromo (KENDRICK e FRANKLAND, 1969). Esses mesmos autores postularam que o principal fator para o controle da germinação era a proporção entre o Fve e o fitocromo total.

O modo pelo qual o estímulo captado pelo fitocromo é convertido em resposta fisiológica ainda não está totalmente esclarecido. O processo deve ter uma complexa interação com hormônios e(ou) enzimas, embora ainda não haja muitas evidências que sugiram que a ação do fitocromo resulte na produção de algum hormônio essencial ou no aumento de atividade ou síntese "de novo" de alguma enzima (KENDRICK, 1976).

De acordo com Mohr, o fitocromo atua como controlador da atividade gênica, ativando ou reprimindo genes, regulando dessa forma a síntese proteica (MOHR, 1972). Segundo Black (in VILLIERS, 1975) os prováveis efeitos do estímulo luminoso na germinação das sementes poderiam ser sobre: a) metabolismo de lipídios; b) síntese de enzimas;

c) controle respiratório; d) síntese de hormônios; e) permeabilidade da membrana.

Alguns trabalhos na literatura mostram a interação entre fitocromo e certos hormônios. As citocininas foram os primeiros hormônios estudados que estimulavam a germinação de sementes fotoblásticas positivas no escuro (MILLER, 1956; 1958). Esse autor também mostrou que as giberelinas estimulam a germinação no escuro de sementes fotoblásticas positivas de alface cv. "Grand Rapids". Foi também verificada uma interação entre o ácido giberélico (GA_3) e a luz vermelha de baixa intensidade (IKUMA e THIMANN, 1960; KAHN, GOSS e SMITH, 1957). Há a hipótese de que o GA_3 e a luz vermelha atuariam em fases diferentes da germinação, ambos induzindo, mas de modo diferente (IKUMA e THIMANN, 1960).

Trabalhando com folhas de cevada mantidas no escuro, REID, CLEMENTS e CARR (1968) mostraram que havia aparecimento de giberelina, após choque de luz vermelha. Tratando-se as folhas com CCC (cloreto de 2-cloroetil trimetilamônio) ou AMO-1618 (cloreto de 4-hidroxil-5-isopropil-2-metil-fenil-trimetilamônio-1-carboxilato piperidina), que são inibidores da síntese de giberelina, não havia produção desse hormônio após o choque de luz vermelha. Mais tarde, a relação entre luz e giberelinas foi também mostrada durante a germinação.

Em sementes de *Rumex obtusifolius* mantidas no escuro não foi possível a detecção de giberelinas. Toda-

via, tal hormônio podia ser extraído imediatamente após um lampejo de luz (FELIPPE et al., 1970). Em *Rumex*, tanto o choque de luz como o de temperatura alta causaram aparecimento de giberelina, mas neste caso (ao contrário das folhas de cevada) o CCC não teve efeito inibitório em relação aos dois choques (FELIPPE et al., 1970).

Quando se expôs sementes de *Rumex obtusifolius* à luz vermelha verificou-se um rápido aumento no conteúdo de citocininas endógenas. Este efeito pôde ser revertido se o tratamento com luz vermelha era imediatamente seguido de irradiação com vermelho extremo (STADEN e WAREING, 1972). A aplicação de citocininas diminui a quantidade de luz necessária à germinação de sementes de alface, sendo que esse efeito talvez seja consequência do desenvolvimento de algum outro fator na semente, imediatamente após a iluminação (REYNOLDS e THOMPSON, 1973).

Acredita-se que o fitocromo atue no controle da produção de giberelinas ou (e) citocininas, as quais desencadeariam uma série de processos que levariam à germinação (SMITH, 1975). O fitocromo e os hormônios endógenos devem ou podem operar por caminhos diferentes, mas ambos são necessários no processo de germinação (SMITH, 1975).

As sementes de *Cucumis anguria* L. (maxixe) são fotoblásticas negativas (NORONHA et al., 1971). Em maxixe mostrou-se que o fotoblastismo parece depender da procedência da semente. Vários experimentos mostraram que o fotoblastismo negativo verificado em sementes originários de

São Paulo não ocorre em sementes provindas de Minas Gerais (NORONHA et al., 1976).

A germinação de *Cucumis anguria* é inibida pelos comprimentos de onda do azul e do vermelho extremo, enquanto que escuro e luz vermelha promovem a germinação. O escuro é mais efetivo em reverter o efeito do azul do que do vermelho extremo. A aplicação de escuro após tratamentos com azul provocou porcentagens finais de germinação maiores do que após tratamentos com vermelho extremo (NORONHA et al., 1978). Além disso, a inibição por vermelho extremo pode ser revertida também por luz vermelha, sendo que a reversão por vermelho foi mais efetiva que a reversão por escuro (NORONHA et al., 1978).

Por outro lado, FELIPPE e LITJENS (1979 e 1980) testaram algumas substâncias reguladoras de crescimento sobre a germinação de *Cucumis anguria*, variando-se também as condições de luz. Esses autores mostraram que 6-benziladenina (6-BA), ácido giberélico (GA_3) e etrel promoveram a germinação em luz branca, sendo que o etrel foi mais efetivo em reverter o efeito inibitório da luz branca.

Em sementes mantidas em vermelho extremo não foi observada ação do GA_3 , mas o etrel reverteu parcialmente tal efeito (FELIPPE e LITJENS, 1979; 1980). Esses mesmos autores mostraram também que auxinas tiveram um efeito inibidor sobre a germinação de *Cucumis anguria*. Ácido abscísico inibiu inteiramente a germinação.

FELIPPE (1980) observou que em sementes de *Cucu-*

mis anguria choques de 0°C e pares alternantes de temperatura de 25-10 e 25-5°C promoveram a germinação em luz branca. Associando-se o par de temperaturas alternantes 25-5°C com vermelho extremo, observou-se que a aplicação do vermelho extremo quando a temperatura era 25°C causou inibição da germinação. Por outro lado, a aplicação do vermelho extremo com a temperatura de 5°C, seguindo-se luz branca ou escuro a 25°C, não causou qualquer inibição da germinação, sendo que luz branca foi mais efetiva em reverter o efeito do vermelho extremo nessas condições. Resultados semelhantes foram obtidos com sementes fotoblásticas positivas de *Rumex obtusifolius* (FELIPPE, 1980).

Em relação ao que foi dito acima a respeito da germinação de *Cucumis anguria*, verifica-se que muita pesquisa ainda tem que ser feita para esclarecer a germinação dessa espécie. Assim, neste trabalho, dois foram os objetivos principais: a) estudo de possíveis interações entre substâncias de crescimento e luz vermelha e; b) investigação dos hormônios durante a germinação das sementes mantidas no escuro, em relação a sementes não embebidas ou embebidas e mantidas em luz branca constante.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram utilizadas sementes de *Cucumis anguria* L. (maxixe) obtidas a partir de plantas cultivadas no Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas. Foram usadas nos experimentos amostras com até cerca de doze meses de armazenamento, pois previamente havia sido verificado que neste período não há queda na germinação.

Para a obtenção das sementes limpas procedeu-se da seguinte maneira: os frutos eram coletados quando já estavam bem amadurecidos e os pedúnculos secos; em seguida cada fruto era cortado longitudinalmente em duas partes, sendo que cada uma delas era esfregada contra a superfície de uma peneira de malha grossa para que as semen-

tes fossem removidas; as sementes eram então lavadas por cerca de 10 minutos com água corrente e, em seguida, postas para secar em bandejas sob luz branca à temperatura ambiente. Após estarem secas, as sementes eram escolhidas pressionando-se ligeiramente cada uma delas, descartando-se aquelas que cediam facilmente à pressão aplicada.

Em alguns experimentos também foram utilizadas sementes de alface, cv. "Grand Rapids" e rabanete, cv. "Vermelho Redondo".

Métodos

A. Germinação:

1. Métodos gerais:

As sementes selecionadas para os experimentos de germinação foram esterilizadas de acordo com o seguinte procedimento:

- lavagem com detergente durante aproximadamente três minutos;
- lavagem com água corrente;
- permanência em solução de água sanitária a 4% por 1 hora (4 ml de água sanitária em 96 ml de água destilada);
- lavagem com água destilada;
- permanência em água destilada por uma hora;

- secagem, sob luz branca à temperatura ambiente.

Os experimentos da germinação foram realizados em câmaras de crescimento "Forma Scientific" - modelo 24, com temperatura constante de 25°C.

Em todos os experimentos foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro, cada qual forrada com uma folha de papel de filtro qualitativo "Klabin" e esterilizada a 100°C durante 60 minutos. A cada placa eram adicionados 5 ml de água destilada ou da solução a ser usada. Foram utilizadas cinco placas por tratamento, com trinta sementes por placa.

Os tratamentos de escuro contínuo ou choques de escuro foram feitos colocando-se as placas de Petri dentro de um invólucro formado por três sacos de plástico preto, os quais eram colocados nas câmaras de crescimento a 25°C. Nos experimentos com luz branca constante foram utilizadas lâmpadas fluorescentes de 15 W, com intensidade total de $3,6 \mu\text{W}/\text{cm}^2 \cdot \text{nm}$ (RANDI e FELIPPE, 1981).

A germinação era verificada a cada dois ou três dias, sendo que as sementes eram consideradas germinadas a partir do momento da protrusão da radícula. As sementes germinadas eram retiradas das placas após a contagem, excetuando-se alguns experimentos em que as placas estavam vedadas com fita adesiva (a tampa firmemente presa à parte inferior).

Nos tratamentos de escuro, as conta-

gens de germinação eram feitas sob luz verde de segurança, que não afeta a germinação de *Cucumis anguria* (NORONHA et al., 1978).

Testes de germinação sob luz branca e escuro constantes foram realizados como controle para a maioria dos experimentos. Nos gráficos apresentados em Resultados, o dia zero representa sempre o início da embebição.

2. Períodos de luz vermelha e escuro:

Nos experimentos com luz vermelha, foi utilizada uma lâmpada vermelha de 15 W, com intensidade de $1,2 \mu\text{W}/\text{cm}^2 \cdot \text{nm}$.

Foi determinado o período prévio de luz branca após o qual as sementes embebidas poderiam responder mais eficientemente à luz vermelha. Os períodos prévios de luz branca foram de 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Em seguida as sementes eram transferidas para luz vermelha, e depois retornavam para luz branca. Os períodos de vermelho utilizados foram de 3, 6, 12, 24 e 48 horas.

Testou-se também o efeito de diferentes períodos de escuro sobre a germinação de *Cucumis anguria*. Procurou-se determinar o período mínimo de escuro capaz de promover a germinação, assim como o efeito dos diferentes períodos de escuro após vários períodos prévios de luz branca. Os períodos prévios de luz branca foram de

1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias. Após cada um desses períodos de luz branca as sementes eram transferidas para 3, 6, 12 ou 24 horas de escuro. Após os tratamentos de escuro as sementes retornavam para luz branca.

3. Embebição:

Foram realizados experimentos para se verificar se havia diferença na embebição das sementes de *Cucumis anguria* mantidas em luz branca ou escuro.

Lotes de cinquenta sementes foram pesados e, em seguida, colocados para embeber em placas de Petri em luz branca ou escuro (cada lote colocado em uma placa). Cada um desses lotes correspondia a um determinado tempo de embebição a partir do início do experimento. Após cada um desses períodos de tempo, o lote de sementes correspondente era secado com papel de filtro e pesado. Após esta pesagem, as sementes eram colocadas em estufa a 80°C por vinte e quatro horas, para em seguida se determinar o peso seco. Os períodos de tempo de embebição utilizados foram: 1, 2, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 e 34 horas.

A porcentagem de embebição das sementes foi calculada como a porcentagem do aumento de peso após a embebição em relação ao peso fresco inicial. Esse cálculo foi feito sem levar em consideração a quantidade de água presente nas sementes antes delas serem colocadas para embeber (aproximadamente 8% de seu peso fresco). A quanti

dade de água nas sementes frescas pode ser estimada pela diferença entre peso fresco e peso seco.

4. Consumo de oxigênio:

Foram feitas medidas do consumo de oxigênio de *Cucumis anguria* nos tratamentos de luz branca e escuro constantes, após 24 e 48 horas.

As sementes ou plântulas de cada tratamento eram transferidas para o aparelho de Warburg onde eram feitas as leituras de consumo de oxigênio, de acordo com metodologia descrita por UMBREIT, BURRIS e STAUFFER (1964).

Foram feitas três repetições por tratamento, sendo utilizadas dez sementes ou plântulas por repetição. Cada replicata era colocada em um frasco do Warburg. A preparação prévia de cada frasco era feita colocando-se 1 ml de água destilada no espaço situado ao redor da cisterna, colocando-se em seguida 0,5 ml de hidróxido de potássio (KOH) a 20% no interior da cisterna do frasco (para captar CO_2 liberado). Antes das sementes ou plântulas de cada replicata serem colocadas na respectiva câmara, estas eram colocadas em uma proveta graduada com água destilada para a medida do volume.

Após o período de incubação, isto é, permanência nos frascos do Warburg, as sementes eram secas com papel de filtro e pesadas. Como controle do aparelho

de Warburg foram utilizados três termobarômetros.

Foram feitas leituras da variação do consumo de oxigênio após 10, 20, 30 e 40 minutos de incubação, calculando-se após cada leitura a média aritmética dos resultados obtidos entre as três replicações de cada tratamento. As medidas de consumo de oxigênio foram feitas em termos de μl de oxigênio consumido/tempo de incubação / peso das sementes. Os valores representam a média obtida entre os resultados dos diferentes tempos de incubação para cada tratamento.

5. Reguladores de crescimento:

Foi verificado o efeito de ácido giberélico (GA_3), 6-benziladenina (6-BA) e ácido 2-cloroetilfosfônico (etrel) na germinação de *Cucumis anguria* em luz branca contínua.

O GA_3 (Sigma) foi testado nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 e 250 ppm.

A 6-BA (Sigma) foi testada nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 50 e 100 ppm.

O Etrel (Amchem) foi testado nas concentrações de 1; 2,5; 5; 10; 15; 20 e 25 ppm. As soluções de etrel eram preparadas imediatamente antes de serem colocadas nas placas. Em seguida cada placa era vedada com fita adesiva e colocada na câmara de crescimento.

6. Embebição e verificação da presença de GA₃ e 6-BA dentro da semente:

Foram feitos experimentos para se verificar a embebição de *Cucumis anguria* em soluções de GA₃ a 250 ppm e 6-BA a 50 ppm, em luz branca constante, durante o período de 24 horas.

Cada tratamento constou de uma placa de Petri de 15 cm com cem sementes. Após intervalos de 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas a partir do início da embebição, um lote de sementes correspondente a cada tratamento era retirado da placa, enxugado com papel de filtro e pesado. Após a pesagem, as sementes voltavam para a placa onde permaneciam até a próxima pesagem.

A etapa seguinte foi verificar se o GA₃ e a 6-BA haviam penetrado no interior das sementes após 24 horas de permanência nas soluções dessas substâncias. Para isso foram utilizados os mesmos lotes de sementes usados no teste de embebição.

Após 24 horas de embebição nas soluções de GA₃ e 6-BA, as sementes foram cuidadosamente lavadas para se remover as substâncias (6-BA e GA₃) da casca e submetidas à extração de acordo com o método desenvolvido por ZEEVAART (1966). A presença das substâncias de crescimento nos extratos foi demonstrada segundo a metodologia que será descrita na seção "Verificação de hormônios".

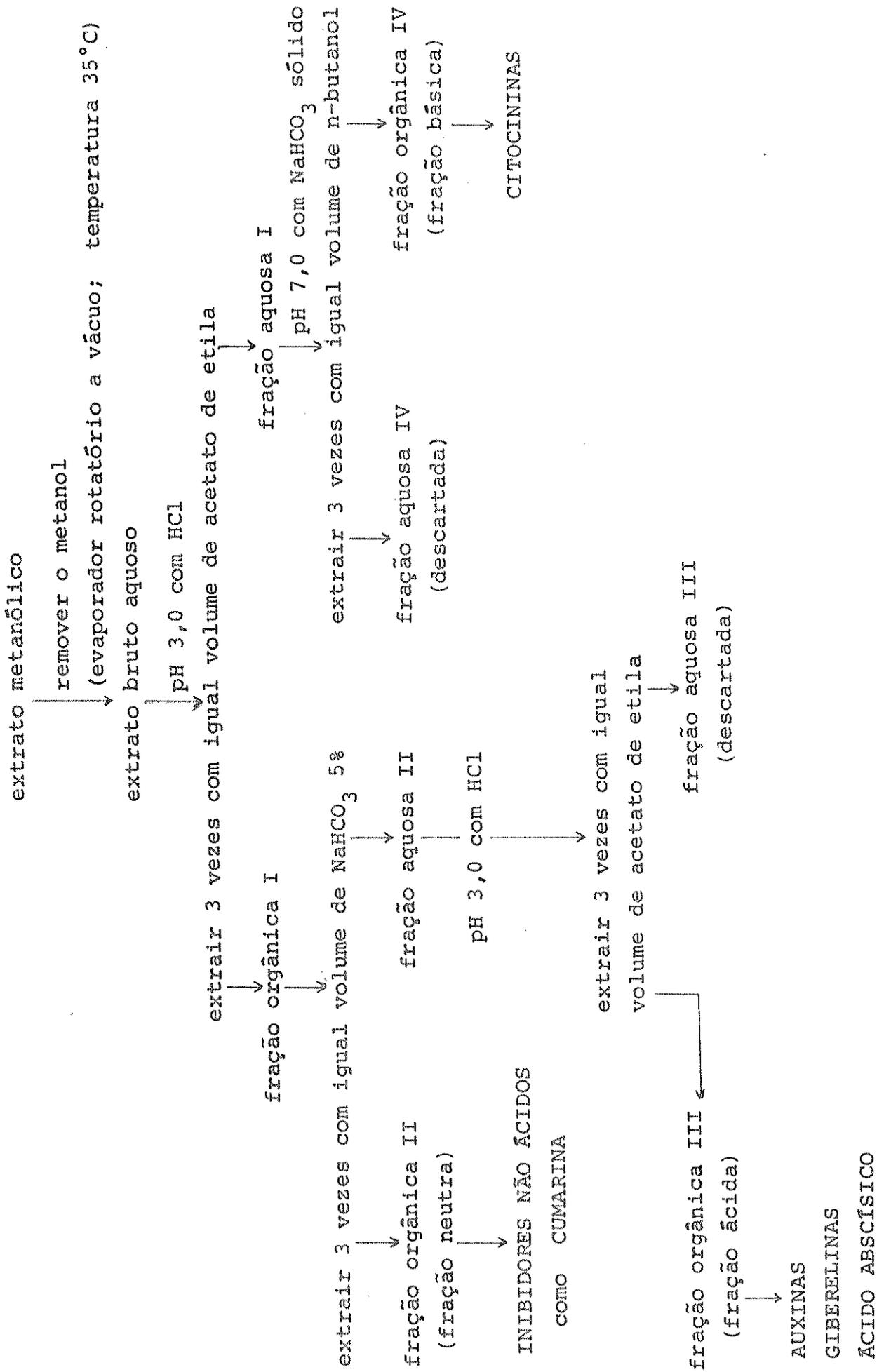
7. Experimentos de interação:

Após os experimentos em que se verificou principalmente o efeito de substâncias de crescimento (GA_3 , 6-BA e etrel) e luz vermelha, foram montados experimentos em que se procurou verificar uma eventual interação entre GA_3 , 6-BA, etrel e luz vermelha na germinação de *Cucumis anguria*.

Para esse experimento utilizaram-se GA_3 a 50 ppm, 6-BA a 20 ppm, etrel a 1 ppm (concentrações finais) e o período de seis horas de luz vermelha. Foram escolhidos esses tratamentos por terem apresentado individualmente pouco ou nenhum efeito sobre a germinação de *Cucumis anguria*, prestando-se portanto para o estudo de uma eventual interação entre esses fatores. As sementes eram colocadas nas soluções desde o início do experimento.

Foram testadas as seguintes interações: GA_3 com luz vermelha (LV); 6-BA com LV; etrel com LV; GA_3 com 6-BA; GA_3 com etrel; 6-BA com etrel; 6-BA com GA_3 e etrel; GA_3 com 6-BA e LV; GA_3 com etrel e LV; 6-BA com etrel e LV e; GA_3 com 6-BA, etrel e LV. Para os tratamentos em que era aplicado o período de luz vermelha, as sementes ficavam previamente em luz branca durante 24 horas. Após o período de luz vermelha as sementes retornavam para luz branca, onde permaneciam até o final do experimento.

EXTRAÇÃO DOS HORMÔNIOS



B. Verificação de hormônios:

Os testes para determinação da presença de giberelinas e citocininas foram feitos a partir de extratos de sementes embebidas previamente em luz branca ou escuro por 24, 48 e 72 horas, e de sementes não embebidas (sementes frescas). Cada tratamento, em geral, constou de um lote de 100 sementes. A embebição era feita em placas de Petri de 15 cm de diâmetro forradas com uma folha de papel de filtro qualitativo "Klabin".

1. Citocininas:

Sementes frescas e sementes embebidas e mantidas em luz branca ou escuro por 24 e 48 horas foram submetidas à extração. O esquema de extração foi o adotado por VÁLIO (1969), modificado por GHERARDI (1974) e descrito em detalhe por FELIPPE (1979). O esquema é apresentado na página 21.

Inicialmente as sementes foram homogeneizadas em almofariz com 50 ml de metanol 80% e mantidas a 5°C durante 24 horas. Após esse período o extrato foi filtrado a vácuo e o resíduo re-extraído em metanol 80% durante 24 horas. Foi feita nova filtração, a vácuo, e o filtrado obtido foi juntado ao obtido na primeira extração. Procedeu-se em seguida à eliminação do metanol por meio de um evaporador rotatório, sob pressão reduzida, à temperatura de 35°C. Obteve-se assim o extrato aquoso que foi sub-

metido ao processo de fracionamento (extração completa), de acordo com o esquema já mencionado. Para citocininas foram testadas as frações básicas.

As frações básicas foram cromatografadas em papel Whatman nº 3, num desenvolvimento descendente de 30 cm. As cubas cromatográficas eram previamente saturadas com o sistema de solventes, que era constituído de isopropanol : amônia : água, na proporção de 10 : 1 : 1 v/v.

O cromatograma foi seco sob corrente de ar e dividido em dez faixas transversais de tamanho igual. Em seguida, o cromatograma foi submetido ao teste químico pelo reagente de Wood (AgNO_3 2% em água : azul de bromofenol 0,4% em acetona 1/1) que é específico para substâncias purínicas, desenvolvendo forte coloração azul em presença de tais grupos (WOOD, 1955). A técnica utilizada foi retirar uma faixa longitudinal de cerca de 1 cm de largura do cromatograma e mergulhar essa faixa diretamente no reagente, determinando-se assim as regiões com reação positiva para substâncias purínicas. Somente foram biotestadas as faixas correspondentes às regiões que apresentaram reação positiva. Usando-se um cromatograma onde foi aplicada apenas uma solução de 6-BA, pode-se determinar o R_f para identificação de 6-BA nesse sistema.

O bioteste utilizado foi o dos cotilédones de rabanete (LETHAM, 1968). Substâncias com atividade citocinínica promovem aumento do peso fresco de cotiléd-

done de rabanete, devido principalmente a uma maior absorção de água (expansão celular). Sementes de rabanete cv. Vermelho Redondo foram colocadas para germinar em placas de Petri por 40 horas, em escuro contínuo, à temperatura de 30°C. Após esse período foram selecionados, dentre os cotilédones, aqueles que apresentavam tamanho mais uniforme. Estes eram excisados, lavados com água destilada e transferidos para cubetas de plástico de 2,5 por 3,5 cm, onde ficavam em contato com um terço de uma faixa entre dois Rfs de um cromatograma com reação positiva ao reagente de Wood ou de controle (faixa do cromatograma não percorrida pelo extrato). Previamente haviam sido colocados 2 ml de água destilada por cubeta. As cubetas foram transferidas para câmaras de crescimento a 25°C, sob luz fluorescente branca contínua, onde permaneceram por seis dias. Após esse período era feita a pesagem de cada grupo de cotilédones contido em cada cubeta.

2. Giberelinas:

Nos testes para giberelinas foram utilizados extratos purificados e não purificados. Os extratos purificados foram obtidos pela técnica de fracionamento, já mencionada (FELIPPE, 1979). Os extratos não purificados foram obtidos de acordo com o método de ZEEVAART (1966). As sementes foram maceradas em almofariz com cerca de 25 ml de metanol a 5°C e mantidas nessa temperatura por 24 horas. Após esse período, o macerado foi filtrado e o resíduo re-extraído em metanol por 24 horas à

temperatura ambiente. Filtrou-se novamente o material e repetiu-se a operação. Os filtrados foram juntados e, em seguida, evaporados até que restasse cerca de 1 ml do extrato.

Os extratos foram aplicados em papel Whatman nº 3. O desenvolvimento foi descendente em um percurso de 30 cm, realizado em cubas cromatográficas previamente saturadas com o sistema de solventes, constituído de n-butanol : ácido acético : água, na proporção de 4 : 1 : 1. Os cromatogramas foram secos sob corrente de ar e, em seguida, divididos em dez faixas transversais entre o ponto de aplicação e a frente do cromatograma. Cada faixa foi, por sua vez, cortada no sentido transversal em três partes iguais. Cada uma das três repetições foi colocada ao acaso em cubetas de polietileno de 2 x 2 cm e umedecida com 1 ml de água destilada. Como controle utilizou-se uma faixa do cromatograma onde só correu o sistema de solventes. As cubetas eram em seguida colocadas à temperatura de 5 °C durante 24 horas, para que houvesse uma melhor eluição do extrato.

O bioteste utilizado foi o do hipocótilo de alface, segundo a técnica de FRANKLAND e WAREING (1960). Substâncias com atividade giberelínica promovem o alongamento do hipocótilo de alface. Foi utilizado alface cv. Grand Rapids, que foi colocado para germinar em placas de Petri por 24 horas, à temperatura de 25 °C, sob luz branca contínua. Após esse período foram selecionadas plântulas de tamanho uniforme, as quais eram transferidas para

as cubetas de polietileno, sendo colocadas 4 plântulas por cubeta. As plântulas permaneceram em contato com um terço de cada uma das dez faixas dos Rfs do cromatograma em teste ou do controle, as quais já estavam umedecidas com água destilada. Em seguida as cubetas foram transferidas para câmara de crescimento a 25°C, sob luz fluorescente branca contínua, onde permaneceram por três dias. Após esse período eram medidos os hipocótilos das plântulas de alface.

Para a verificação da presença de ácido giberélico (GA_3) dentro das sementes, estas foram extraídas pelo método de ZEEVAART (1966), como já foi descrito, mas utilizou-se cromatografia de camada delgada. A placa foi preparada, espalhando-se uma mistura de sílica gel G (Typ 60 Merck) e água, na proporção de 1:2, sobre uma placa de vidro de 20 x 20 cm. A espessura da camada de sílica foi de 0,5 mm. O sistema de solventes utilizado foi n-butanol : ácido acético : água, na proporção de 4 : 1 : 1 v/v. Após completa evaporação do solvente, o cromatograma foi dividido em 10 faixas transversais, correspondentes aos valores dos Rfs. Dessa forma, a primeira faixa correspondia ao intervalo entre os Rfs 0,0 e 0,1. Foi selecionada uma faixa longitudinal do cromatograma com 2 cm de largura, a qual foi submetida ao teste de MCMILLAN e SUTER (1963) para ácido giberélico. A faixa selecionada foi pulverizada com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico na proporção de 5 : 95 v/v, aquecida a 100°C por 5 minutos e em seguida observada sob luz ultra-violeta. Foram biotestadas apenas

as faixas dos Rfs correspondentes às regiões do cromatograma revelado que apresentaram fluorescência azul sob a luz ultra-violeta (verificado também para o cromatograma controle, onde só foi aplicada uma solução de ácido giberélico). Cada uma das faixas selecionadas foi dividida no sentido transversal, correspondendo a três replicações. Cada replicação era raspada em uma cubeta de polietileno de 2 x 2 cm, forrada com dois pedaços de papel de filtro qualitativo "Klabin". A seguir acrescentava-se 1 ml de água destilada por cubeta. Como controle utilizaram-se faixas do cromatograma não percorridas pelo extrato. O bioteste foi o do hipocótilo de alface (FRANKLAND e WAREING, 1960).

3. Etileno:

Para a detecção de etileno endógeno foram utilizados dois métodos: o primeiro consistiu na verificação do efeito de etileno endógeno por intermédio do uso do nitrato de prata (AgNO_3), que é um potente inibidor da ação do etileno em plantas (BEYER JR, 1976); o segundo método consistiu na dosagem do etileno liberado pelas sementes durante a germinação, por meio de cromatografia gasosa.

3.1 - Utilização do nitrato de prata

Primeiramente foram montados experimentos nos quais se verificou o efeito de diversas concentrações de AgNO_3 na germinação de *Cucumis anguria*.

Comprovada a inibição pelo ni-

trato de prata, foram feitos testes para se verificar se esta substância não estava matando as sementes. Primeiramente as sementes foram mantidas em diferentes concentrações de AgNO_3 , em escuro contínuo, durante 72 horas; as sementes dos tratamentos que apresentaram as maiores porcentagens de inibição da germinação foram lavadas e, em seguida, transferidas para placas de Petri contendo água ou solução de etrel a 25 ppm (que é uma concentração promotora da germinação de *Cucumis anguria*). Esses tratamentos foram mantidos em escuro contínuo a 25°C.

Outro tipo de experimento foi feito para se verificar em qual período, após o início da embebição, o nitrato de prata era mais efetivo na inibição da germinação de *Cucumis anguria*. Nesse experimento, as sementes foram primeiramente mantidas por diferentes períodos de tempo em água destilada. Esses períodos foram: 0; 6; 12; 24 e 48 horas. Após cada um desses períodos, as sementes de cada tratamento eram transferidas para uma solução de AgNO_3 a 500 ppm (que inibe fortemente a germinação de *Cucumis anguria*), onde permaneciam por 24 horas. Após esse intervalo de tempo, as sementes eram lavadas e retornavam para água destilada. Cada um desses experimentos teve a duração de 72 horas e os tratamentos foram mantidos em placas de Petri em escuro contínuo, a 25°C.

3.2 - Dosagem de etileno liberado pelas sementes

O experimento foi realizado em

frascos de vidro, com volume de 10 ml, dotados de tampa de borracha. Dentro de cada frasco era colocado um retângulo de papel de filtro, o qual era umedecido com 1 ml de água destilada. Em seguida colocavam-se as sementes e os frascos eram tampados, vedados com vaselina sólida e transferidos para câmara de crescimento a 25°C. Foram aplicados os tratamentos de escuro e luz fluorescente branca contínua, sendo utilizados quatro frascos por tratamento com 25 sementes por frasco.

Após intervalos de 6, 12, 24 e 48 horas do início da embebição, eram coletadas amostras de 0,5 ml de ar do interior de cada frasco por meio de uma seringa, cuja agulha era introduzida através da tampa de borracha. Cada amostra do ar era então submetida à cromatografia gasosa para se tentar verificar a presença de etileno no interior dos frascos. A metodologia baseou-se, em geral, em ABELES (1973). Paralelamente, era verificada também a germinação; em um experimento comparou-se a germinação das sementes mantidas em frascos fechados e abertos.

Foi utilizado o cromatógrafo a gás "Varian" modelo 2440 equipado com detector de ionização de chama. Foi utilizado coluna Pirex de 6' x 1/4" preenchida com Porapak T 80/100 "mesh", utilizando-se nitrogênio como gás de arraste. As temperaturas de operação do aparelho foram as seguintes: coluna, 100°C; injetor, 120°C e detector, 175°C. As velocidades dos fluxos dos gases foram: ar sintético, 300 ml/min.; nitrogênio, 40 ml/min. e hidrogênio, 40 ml/min. Em geral utilizou-se o controle do

atenuador em 2×10^{-11} . Como padrão foi utilizado etileno (White Martins) na concentração de 0,027 μ moles em 660 ml. As alturas dos picos obtidos no registrador foram transformadas e apresentadas na unidade nmoles de etileno/volume de gás injetado/nº de sementes.

Também foram montados frascos sem as sementes e com sementes não embebidas, os quais foram testados para etileno. Não houve liberação do etileno nestes frascos controle.

C. Análise estatística:

Para a análise estatística, os valores de germinação apresentados em porcentagem foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{\%}$ ou simplesmente $\sqrt{\%}$, que foram utilizados na análise de variância, onde se usou o teste F. Quando os valores obtidos para F foram significativos a 5%, determinou-se a Diferença Mínima Significativa (DMS) que foi utilizada para análise das diferenças entre as médias dos tratamentos (SNEDECOR e COCHRAN, 1967). Foram utilizados três tipos de análise de variância: dentro e entre colunas; entre colunas e fileiras e análise fatorial (para os experimentos sobre interação entre luz vermelha e substâncias de crescimento).

No caso dos bioensaios foram utilizados os valores obtidos nas leituras (sem transformação) para a análise de variância e a DMS foi calculada, sendo apresenta

da nos histogramas pelas regiões hachuradas.

Para os experimentos em que foi necessário comparar as médias de dois tratamentos, foi utilizado o teste T - Student para 5% de probabilidade (SNEDECOR e COCHRAN, 1967).

RESULTADOS

A. Germinação de *Cucumis anguria*

1. Embebição de sementes mantidas em luz branca ou escuro constantes

Os resultados de um experimento de embebição são apresentados na Figura 1, onde são representados três parâmetros: porcentagem de embebição (Fig. 1A); peso fresco (1B) e peso seco (1C).

A teor de umidade na semente antes de embeber é de 8% do peso fresco. Como pode ser visto na Figura 1A, não há diferença na porcentagem de embebição durante as 25 primeiras horas entre sementes mantidas no escuro ou luz branca. A embebição de ambos os lotes de sementes ocorreu nas duas primeiras horas. Portanto, em relação à

FIGURA 1 - Embebição de sementes de *Cucumis anguria* L. mantidas em placas de Petri em luz branca e escuro constantes.

1º experimento: de 0 a 8 horas, e 27 e 34 horas;

2º experimento: de 9 a 25 horas; os dois experimentos são indicados por linhas interrompidas.

● = escuro

O = luz branca

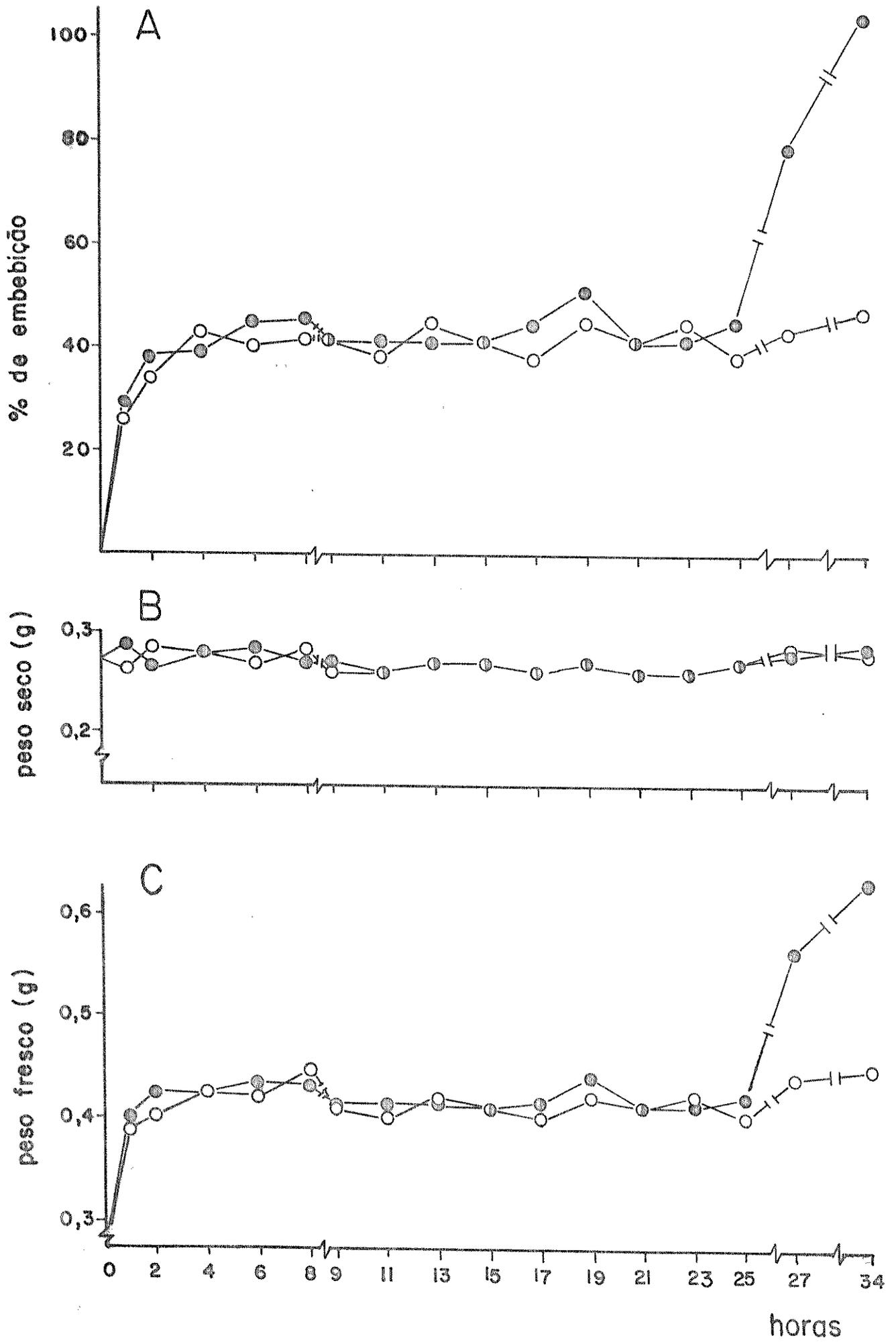
A. porcentagem de embebição:

$$\frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}} \cdot 100$$

B. peso seco

C. peso fresco

FIGURA 1



embebição, as sementes mantidas em luz se comportam da mesma maneira que as sementes mantidas no escuro. A diferença ocorre ao redor de 27 horas, onde há um aumento na porcentagem de embebição das sementes mantidas no escuro em relação às sementes mantidas em luz. O peso seco das sementes dos dois tratamentos (Fig. 1B) foi o mesmo e não se alterou durante as 34 horas do experimento. O peso fresco (Fig. 1C) dos dois lotes foi o mesmo durante as primeiras horas, tendo aumentado após 27 horas apenas nas sementes de escuro.

Pela Tabela 1 pode-se ver que não há germinação de sementes mantidas em luz nos primeiros três dias. No caso do escuro a germinação é nula nas primeiras 24 horas, mas atinge 84 por cento após 48 horas. Esta diferença em comportamento germinativo não é, pois, consequência de uma diferença na embebição, como visto na Fig. 1A.

A mudança após 27 horas nas sementes de escuro vista nas Figuras 1A e 1C, evidentemente está correlacionada com o resultado de germinação da Tabela 1. Começa a ocorrer a germinação e há um aumento de peso fresco; portanto, nos estádios iniciais da germinação, o crescimento do embrião e a consequente protrusão da radícula não é por incremento de matéria nova, mas pode ser consequência da entrada de água e transferência de matéria seca já existente para o embrião.

TABELA 1 - Germinação de sementes de *Cucumis anguria* L.
mantidas em escuro ou luz branca constantes.
Resultados em porcentagem de germinação.

Tratamento	Dias		
	1	2	3
escuro	0	84	86
luz branca	0	0	0

2. Consumo de oxigênio em sementes mantidas em luz branca e em escuro constantes

O consumo de oxigênio foi medido em sementes embebidas por 24 horas e 48 horas. Os resultados podem ser vistos na Figura 2A. Com 24 horas de embebição já há maior consumo de oxigênio nas sementes mantidas no escuro. Estatisticamente há maior consumo de oxigênio nas sementes mantidas no escuro do que em luz, após 24 horas de embebição. Houve também diferença estatística entre sementes mantidas no escuro após 24 e 48 horas, isto é, a respiração aumenta no escuro, entre 24 e 48 horas. Isto está de acordo com os experimentos de germinação (Tabela 1), pois quando ocorreu a germinação, aumentou também o consumo de oxigênio. Não houve diferença significativa na respiração de sementes mantidas em luz por 24 e 48 horas.

3. Efeito de luz vermelha na germinação

Os resultados são apresentados na Figura 2B. Observa-se que o vermelho e o escuro promoveram a germinação, enquanto que luz branca inibiu a germinação. Embora os tratamentos com escuro e luz vermelha tenham alcançado o mesmo valor final de germinação, as curvas de ambos os tratamentos mostram que as sementes mantidas em escuro contínuo germinaram mais rapidamente do que o tratamento com vermelho. Exemplificando, com base na Fig. 2B pode-se observar que, logo ao segundo dia de embebição, enquanto o

FIGURA 2 - Consumo de oxigênio e germinação de sementes de *Cucumis anguria* L.

A. Consumo de oxigênio de sementes mantidas em luz branca e escuro após 24 e 48 horas de germinação

L = Luz branca

E = Escuro

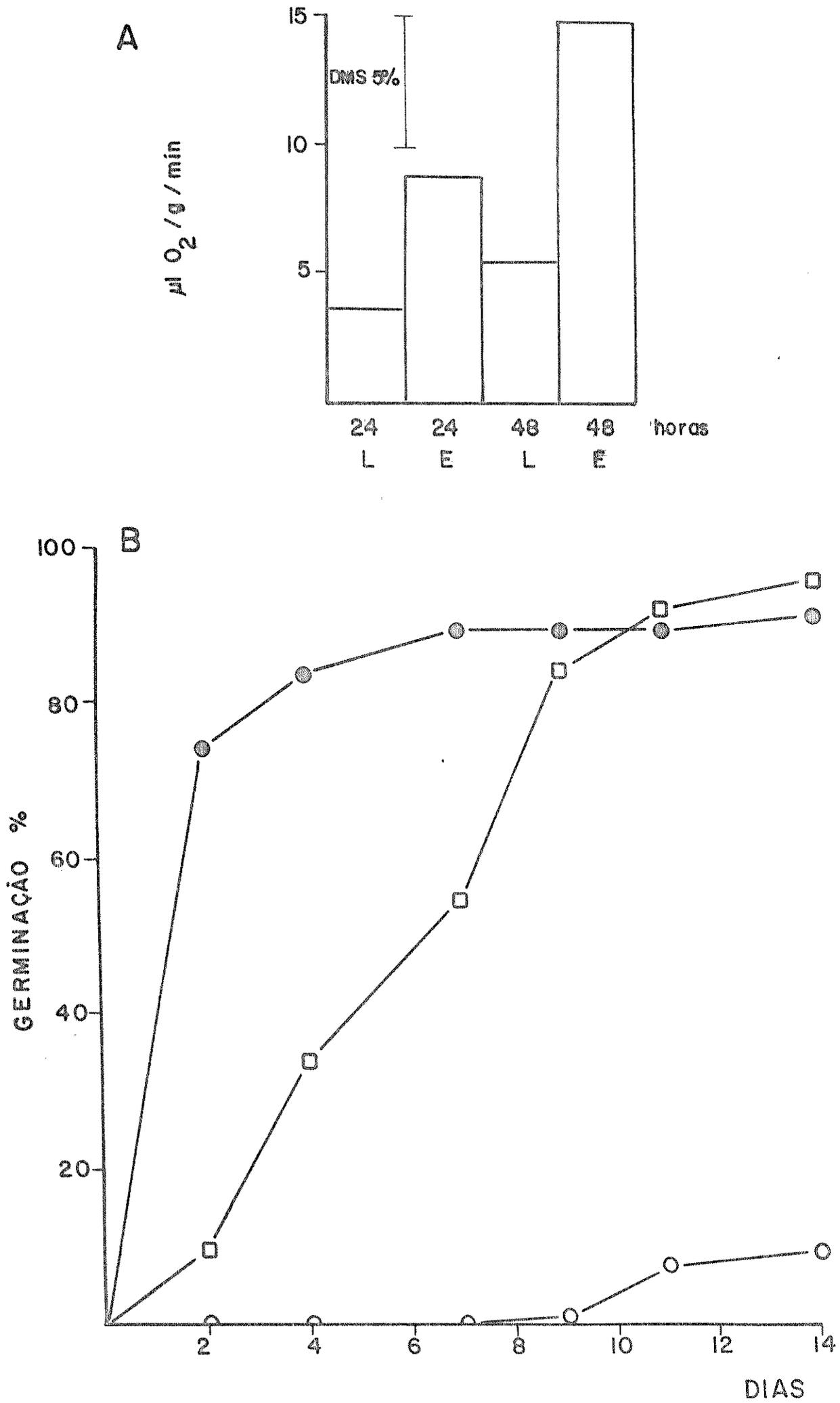
B. Efeito de luz vermelha na germinação. Diferença não significativa entre escuro e vermelho no 14º dia.

⊙ = Escuro

○ = Luz branca

◻ = Vermelho

FIGURA 2



tratamento com escuro atingiu cerca de 75 por cento de germinação, o tratamento com vermelho alcançou apenas 10 por cento. Portanto, a germinação de *Cucumis anguria* é promovida pelo escuro e vermelho constantes, mas a taxa é maior com o escuro.

4. Período mínimo de escuro capaz de causar germinação

Até agora foi mostrado que o escuro constante causa a germinação de *Cucumis anguria*. Neste experimento tentou-se verificar o período mínimo de escuro, em relação a um período prévio em luz branca, capaz de promover germinação. Os resultados deste experimento são mostrados na Figura 3. Os períodos de escuro de 3, 6 e 24 horas foram dados às sementes após estas terem permanecido embebidas em luz branca constante por 1, 2, 3, 4, 5 e 7 dias (Figuras 3A, B, C, D, E, e F, respectivamente). Após o tratamento de escuro, as sementes voltavam para luz branca constante. Sempre o escuro constante promoveu germinação e a luz branca inibiu. Pela análise estatística foi mostrado que o efeito do período de escuro não depende do período prévio de luz branca ao qual as sementes foram submetidas; por exemplo, o período de 24 horas de escuro era tão efetivo após as sementes permanecerem previamente em 1 ou 7 dias em luz branca.

Com relação aos períodos de escuro, os períodos de 3 e 6 horas não promoveram a germinação, sendo

FIGURA 3 - Período mínimo de escuro, após diferentes períodos de luz branca, capaz de causar germinação em sementes de *Cucumis anguria*.L.

O dia zero representa sempre o início da embebição.

O = luz branca

● = escuro

△ = 03 horas de escuro

▽ = 06 horas de escuro

∇ = 24 horas de escuro

A. Períodos de escuro após 1 dia (24 horas) em luz branca

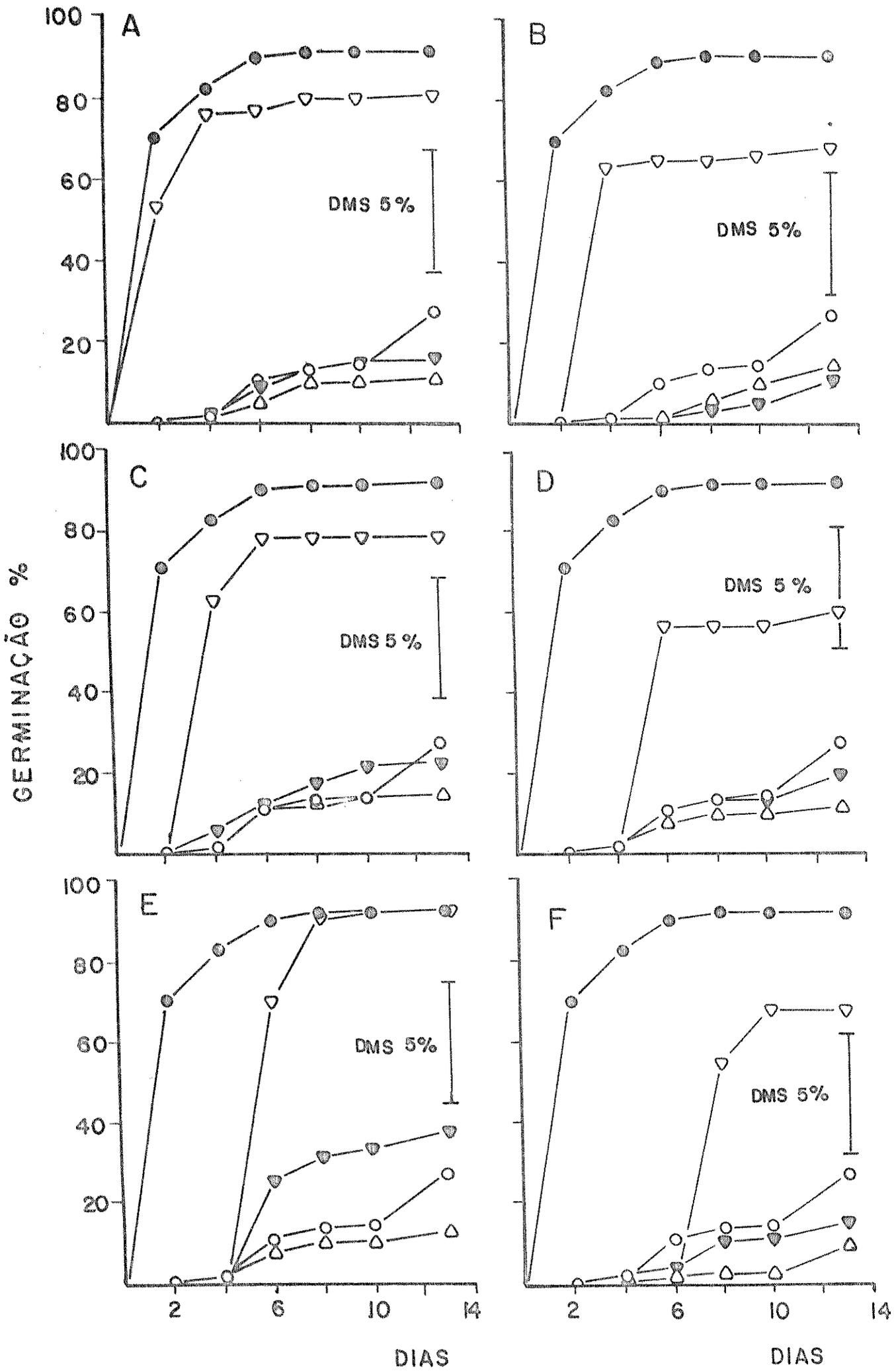
B. Períodos de escuro após 2 dias em luz branca

C. Períodos de escuro após 3 dias em luz branca

D. Períodos de escuro após 4 dias em luz branca

E. Períodos de escuro após 5 dias em luz branca

F. Períodos de escuro após 7 dias em luz branca



estatisticamente iguais ao tratamento com luz branca constante. O período de 24 horas promoveu e, estatisticamente, os valores finais foram iguais ao controle de escuro constante. Pela inclinação das curvas pode-se ver que a germinação só ocorre após um período de 24 horas de escuro, mas a velocidade de germinação é sempre a mesma entre escuro constante e período de 24 horas de escuro. Em um outro experimento foi também testado um período de escuro de 12 horas, não ocorrendo diferença significativa entre este período de escuro e o de 6 horas.

Portanto, o período de escuro mínimo para causar germinação fica entre 12 e 24 horas.

5. Período de embebição em luz branca antes de choque de vermelho

Os resultados podem ser observados na Figura 4A. Com esse experimento procurou-se determinar o período prévio mais adequado em luz branca, após o qual as sementes poderiam responder a um choque de vermelho de 24 horas de duração. Observa-se que, após os períodos prévios de luz branca testados (com exceção do de 72 horas), o choque de vermelho promoveu a germinação em relação ao controle de luz branca. É demonstrado, por outro lado, que as sementes que estiveram previamente em luz branca por 6 e 12 horas responderam melhor ao choque de vermelho, apresentando porcentagem final de germinação significativamente maior do que os tratamentos com 24 e 48 horas prévias em

FIGURA 4 - Efeito de luz vermelha na germinação de *Cucumis anguria* L.

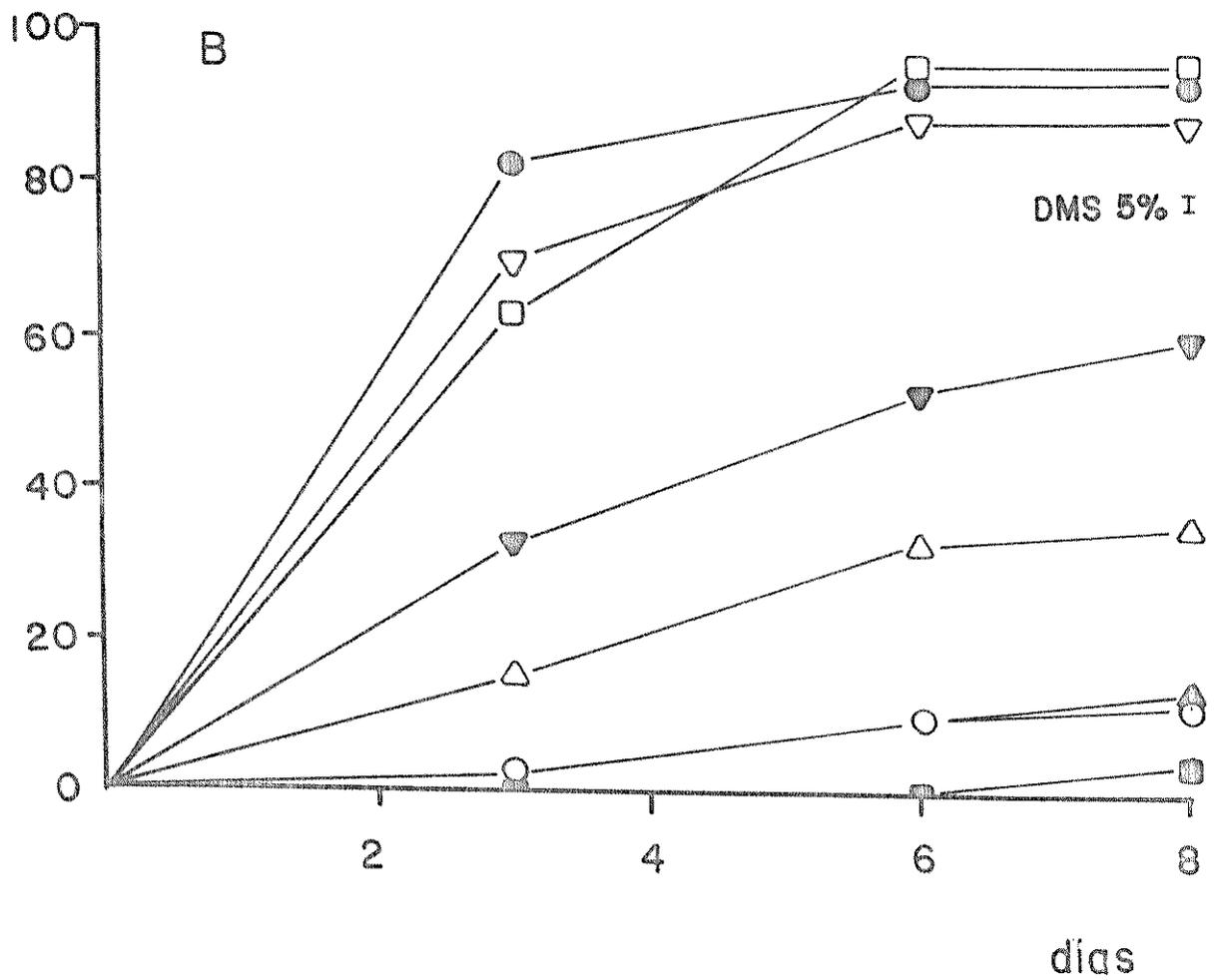
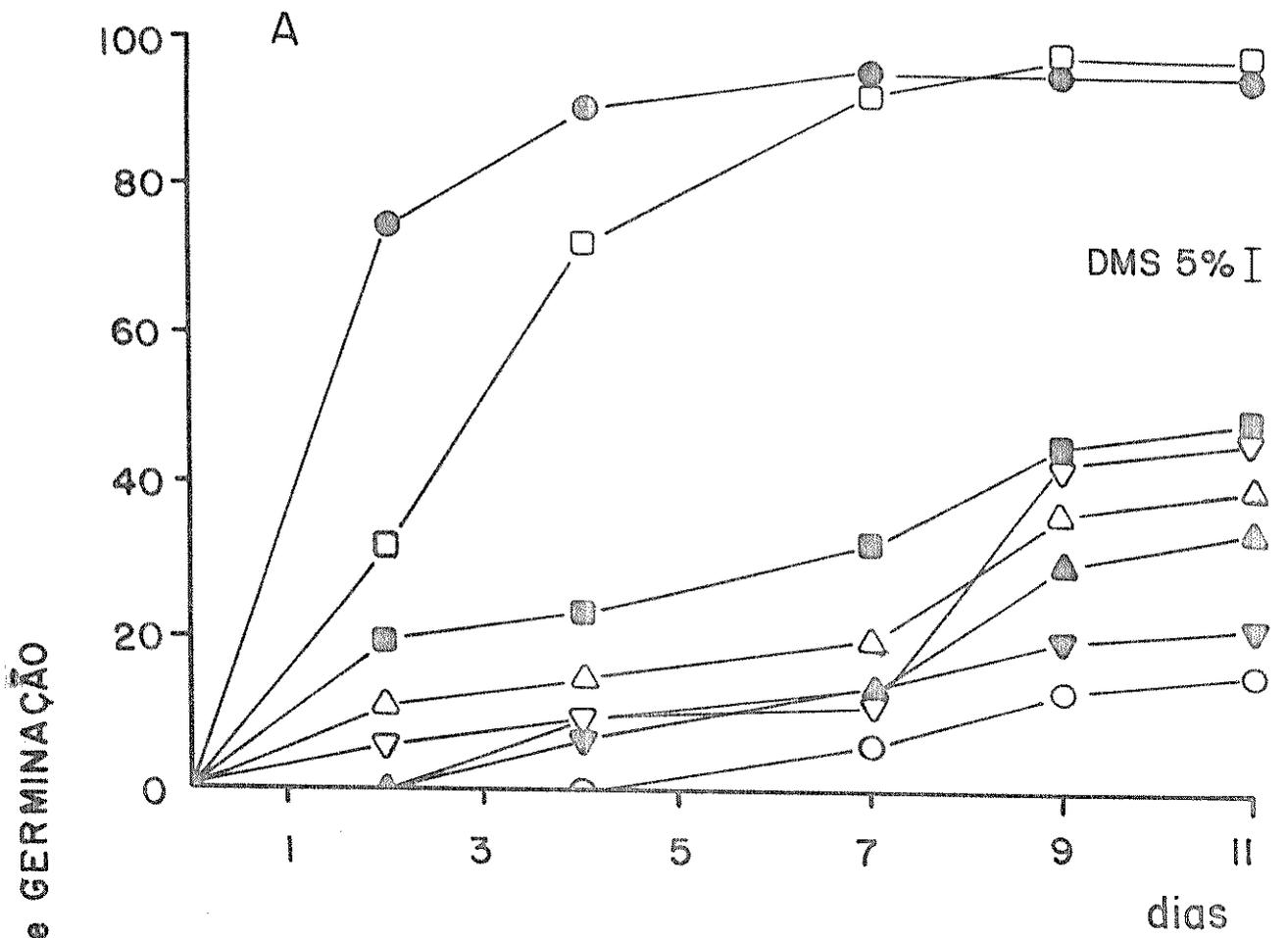
A. Efeito de diferentes períodos de luz branca antes de um período de 24 horas de vermelho.

- O = luz branca constante
- = luz vermelha constante
- = escuro constante
- ▽ = 06 horas de luz branca
- = 12 horas de luz branca
- △ = 24 horas de luz branca
- ▲ = 48 horas de luz branca
- ▽ = 72 horas de luz branca

B. Efeito de diferentes períodos de vermelho após 24 horas de luz branca.

- O = luz branca constante
- = luz vermelha constante
- = escuro constante
- = 03 horas de vermelho
- ▲ = 06 horas de vermelho
- △ = 12 horas de vermelho
- ▽ = 24 horas de vermelho
- ▽ = 48 horas de vermelho

FIGURA 4



luz branca. A partir de 24 horas em luz branca, quanto mais longo foi o período prévio em luz branca, menos efetivo foi o choque de vermelho. Os tratamentos com 6 e 12 horas de luz branca não foram significativamente diferentes entre si.

6. Efeito de diferentes períodos de vermelho

Neste experimento as sementes foram mantidas durante 24 horas em luz branca e então submetidas à luz vermelha por 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Após o vermelho retornavam para luz branca. Os resultados apresentados na Figura 4B mostram que os choques de vermelho com duração de 12, 24 e 48 horas promoveram significativamente a germinação de *Cucumis anguria* em relação à luz branca, embora tenham apresentado diferenças entre si, observando-se que, quanto mais longo o choque, maior a germinação. O choque de 48 horas alcançou uma porcentagem final de germinação semelhante à dos controles de vermelho e escuro contínuos.

Por outro lado, não se verificou promoção com choques de 3 e 6 horas de vermelho. A promoção da germinação deve ocorrer, portanto, entre 6 e 12 horas em luz vermelha.

7. Efeito da vedação das placas de Petri em sementes mantidas em luz branca constante

Os resultados do experimento são apresenta-

dos na Tabela 2. Os valores das porcentagens finais de germinação foram submetidos ao teste T, mostrando-se que não houve diferença significativa entre os resultados das placas vedadas e não vedadas. Esses resultados mostraram que, durante esse tempo de embebição, a vedação das placas de Petri "per se" não afeta a germinação das sementes. Esse experimento serviu como controle para experimentos posteriores, onde havia necessidade de se trabalhar com placas vedadas com fita adesiva.

8. Efeito de 6-benziladenina (6-BA), etrel e ácido giberélico (GA_3) na germinação de sementes mantidas em luz branca constante

6-BA, GA_3 e etrel promoveram a germinação de *Cucumis anguria* nas concentrações testadas, sendo que os resultados são apresentados na Figura 5. Para 6-BA (Fig. 5A) a concentração mais efetiva quanto à promoção de germinação foi a de 50 ppm, enquanto que 25 ppm foi a menos efetiva. Até 7 dias a partir do início do experimento não havia qualquer efeito promotor de 6-BA.

Na Figura 5B é apresentado o efeito do etrel nas concentrações de 10, 15, 20 e 25 ppm, sendo que todas elas promoveram significativamente a germinação de *Cucumis anguria*. A concentração mais efetiva na promoção foi a de 25 ppm. Observa-se que, logo no 3º dia após o início do experimento, já ocorre uma alta taxa de germinação em relação ao controle de luz branca, principalmente

TABELA 2 - Efeito da vedação de placa de Petri na germinação de *Cucumis anguria* L. mantida em luz branca constante. Resultados em porcentagens de germinação. Teste T não significativo para os valores do 11º dia.

Tratamento	Dias				
	2	4	7	9	11
placa vedada	0,0	1,0	4,3	14,3	21,0
placa não vedada	0,0	0,0	1,0	21,0	25,5

FIGURA 5 - Efeito de 6-BA, etrel e GA₃ na germinação de *Cucumis anguria* L. em luz branca constante.

A. Efeito de 6-BA

- = água
- △ = 6-BA a 25 ppm
- ▲ = 6-BA a 50 ppm
- ▽ = 6-BA a 100 ppm

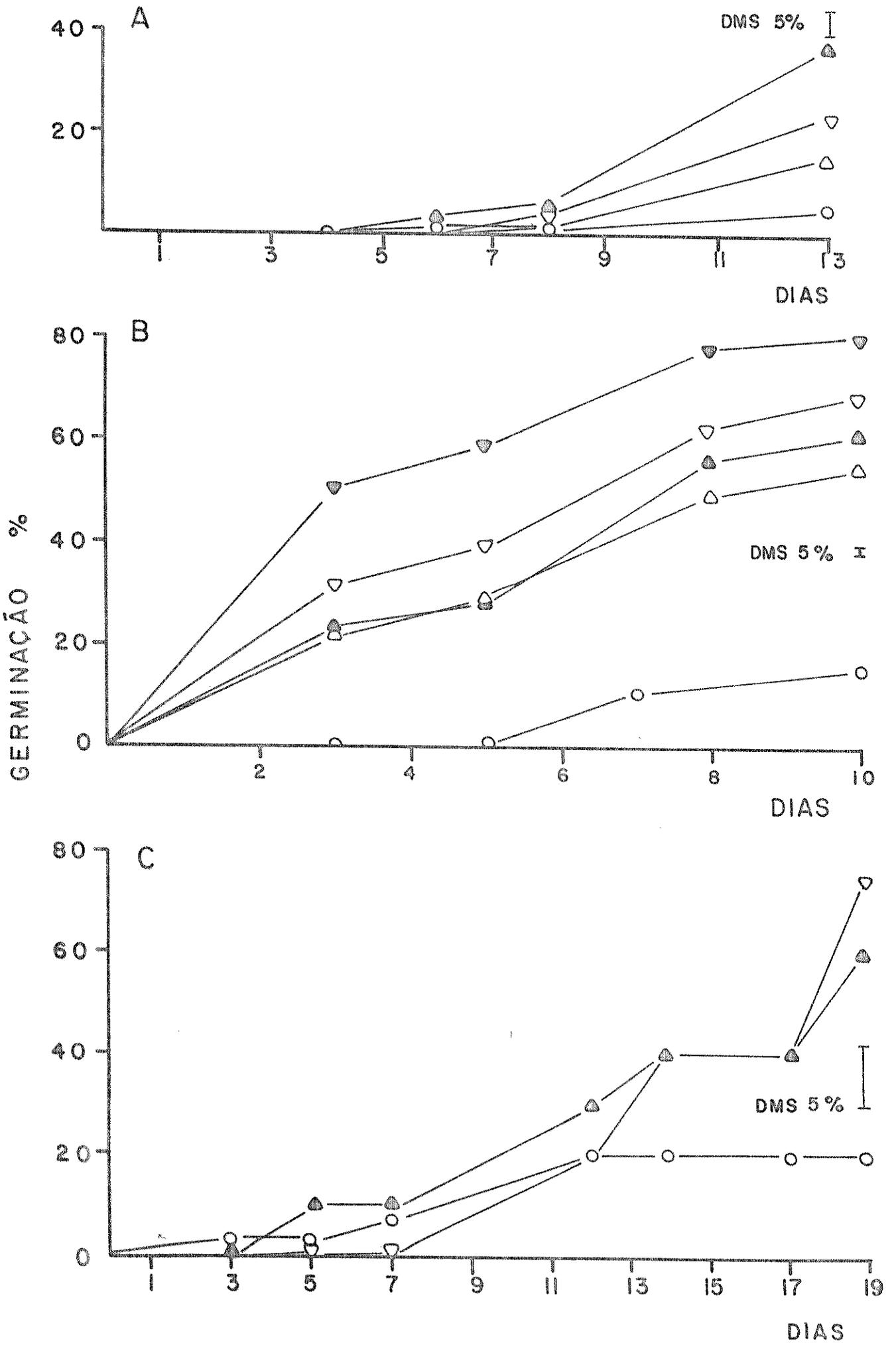
B. Efeito de etrel

- = água
- △ = etrel a 10 ppm
- ▲ = etrel a 15 ppm
- ▽ = etrel a 20 ppm
- ▽ = etrel a 25 ppm

C. Efeito de GA₃

- = água
- ▲ = GA₃ a 100 ppm
- ▽ = GA₃ a 250 ppm

FIGURA 5



nos tratamentos com 20 e 25 ppm.

Na Figura 5C, onde é mostrado o efeito do ácido giberélico, observa-se que a promoção da germinação, assim como no experimento com 6-BA, começa a ocorrer mais tarde, no caso após 12 dias. A concentração de 250 ppm provocou a maior porcentagem de germinação ao final do 19º dia de experimento.

Esses resultados demonstram que o etrel acelera a germinação de *Cucumis anguria* em relação a 6-BA e GA₃, nas concentrações testadas.

9. Embebição de *Cucumis anguria* em 6-BA e GA₃

Como foi visto no experimento anterior, as concentrações utilizadas de 6-BA e GA₃ promoveram a germinação em relação à luz branca, mas não tanto quanto o etrel, no qual a germinação final no dia 10 se aproxima da porcentagem de germinação, que em geral, se obtém com tratamento de escuro. No caso de GA₃ a germinação também é alta, mas a promoção só é observada depois do dia 17. Poder-se-ia imaginar que, em solução de GA₃, a embebição da semente é mais lenta e no caso de 6-BA em que, além da embebição ser mais lenta, a substância talvez não conseguisse penetrar no interior das sementes. Assim, foi realizado um experimento para verificar se isto era verdade.

Os resultados são apresentados na Figura

ra 6. A Fig. 6A mostra que as porcentagens de embebição praticamente foram as mesmas para as sementes mantidas em água e soluções de GA_3 e 6-BA. Para os três tratamentos a penetração nas sementes foi mais rápida nas primeiras duas horas de embebição, quando ocorreu um rápido aumento na porcentagem de embebição, processando-se em seguida mais lentamente. Em outro experimento, cujos resultados são mostrados na Fig. 6B, observa-se que não ocorreu promoção da germinação em sementes mantidas em 6-BA a 50 ppm e GA_3 a 250 ppm (que também foram utilizadas no experimento de embebição) até o 6º dia de embebição (F não significativo, concordando com os dados das Figuras 5A e 5C).

O passo seguinte foi verificar se GA_3 e 6-BA haviam realmente penetrado nas sementes. Sementes embebidas por 24 horas em solução de GA_3 a 250 ppm e de 6-BA a 50 ppm foram extraídas e os extratos cromatografados para verificar se havia 6-BA e GA_3 dentro das sementes.

No caso das sementes embebidas em 6-BA, uma faixa longitudinal do cromatograma foi colocada em contato com o reagente de Wood, observando-se uma mancha de 6-BA na região do R_f 0,1. Foram biotestados as faixas de papel entre os R_f s 0,1 e 0,2, sendo os resultados mostrados na Figura 6C. Houve atividade de 6-BA na faixa entre os R_f s 0,0 e 0,1.

Uma faixa longitudinal do cromatograma onde foi aplicado o extrato das sementes embebidas em solução de GA_3 foi revelado para ácido giberélico de acordo com o método

FIGURA 6 - Embebição de sementes de *Cucumis anguria* L. em GA₃ e 6-BA, em luz branca constante.

A. Embebição em água, GA₃ e 6-BA. Resultados em porcentagem de embebição =

$$\frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}} \cdot 100$$

- = água
- = GA₃ a 250 ppm
- ▲ = 6-BA a 50 ppm

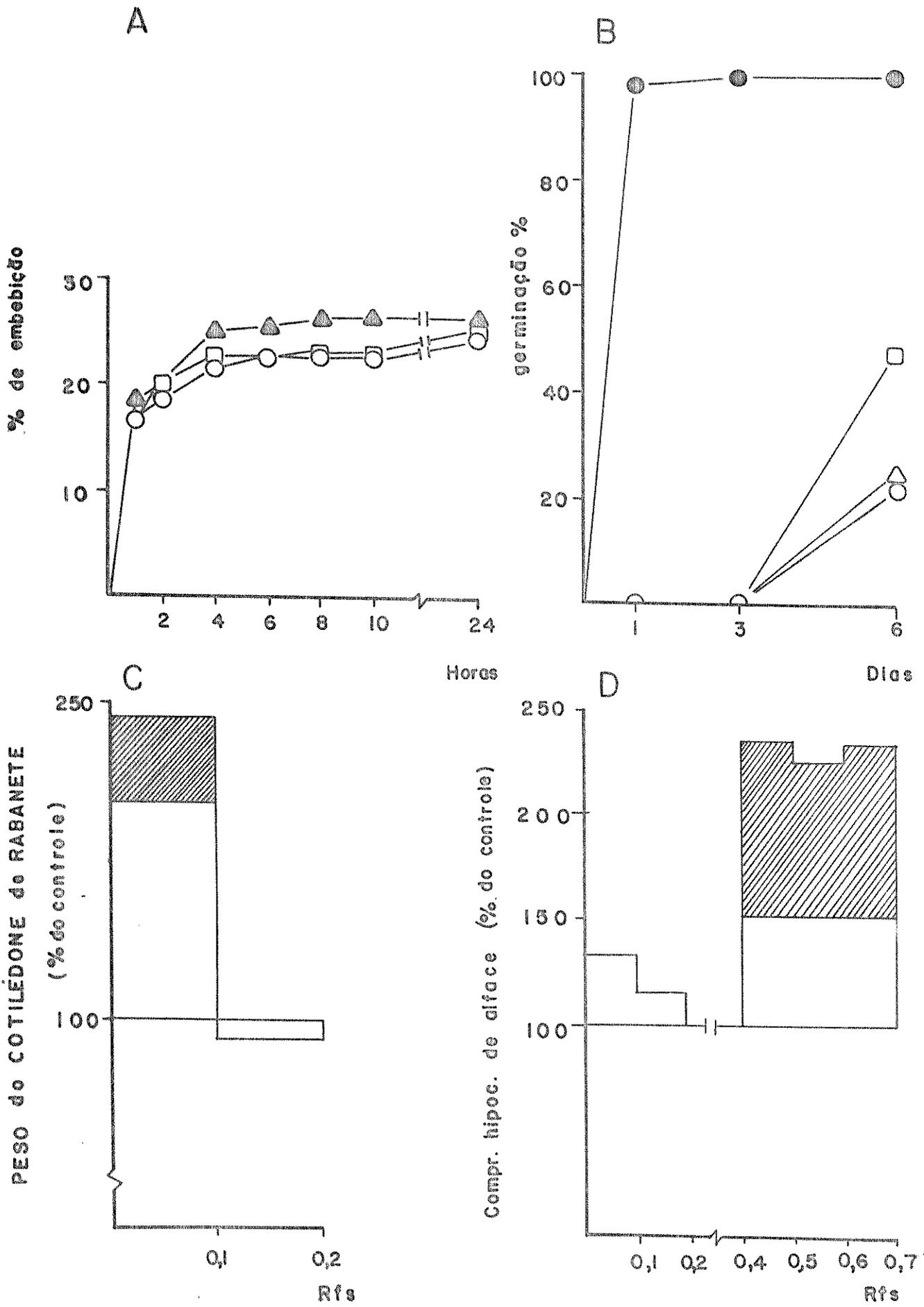
B. Germinação das sementes em GA₃ e 6-BA. *F* a 5% não significativo para o sexto dia de germinação, não incluindo o valor de escuro

- = controle de água em luz branca
- = controle de água em escuro
- = GA₃ a 250 ppm
- △ = 6-BA a 50 ppm

C. Verificação de 6-BA no interior de sementes que foram embebidas durante 24 horas em 6-BA a 50 ppm. A parte hachurada do histograma representa região estatisticamente significativa (análise de variância).

D. Verificação de GA₃ no interior de sementes embebidas durante 24 horas em GA₃ a 250 ppm. A parte hachurada do histograma representa região estatisticamente significativa (análise de variância).

FIGURA 6



do de McMILLAN e SUTER (1963) e apresentou mancha de GA_3 que abrangia as regiões dos Rfs 0,5 e 0,6. Foram biotes-
tados as faixas entre os Rfs 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 e 0,7,
sendo os resultados apresentados na Figura 6D. Houve pro-
moção do alongamento do hipocótilo de alface entre os Rfs
0,4 e 0,7, mostrando que o extrato apresentava ácido giberé-
lico.

Esses resultados mostraram que em 24 horas
de embebição sementes de *Cucumis anguria* absorvem GA_3 e
6-BA, e que a baixa ou lenta promoção da germinação por
essas substâncias não é consequência nem da embebição vaga-
rosa nem da ausência das substâncias dentro das sementes.

10. Efeito de GA_3 em concentrações abaixo de 50 ppm

Foi verificado o efeito de concentrações de
 GA_3 a 50 ppm e inferiores (5, 10, 20, 30, 40 e 50 ppm). Os
resultados desse experimento (Figura 7), foram submetidos
a análise de variância (com exceção do controle de escuro)
no 17º dia de experimento, apresentando valor de F não
significativo. Isso demonstrou que nenhuma das concentra-
ções de GA_3 testadas promoveu a germinação.

11. Efeito de 6-BA em concentrações abaixo de 25 ppm

Os resultados são apresentados na Figura 8A.

FIGURA 7 - Efeito de GA_3 em concentrações abaixo de 50 ppm, em luz branca, na germinação de sementes de *Cucumis anguria* L. Para o 17º dia de germinação foi feita análise de variância, sendo F a 5% não significativo para as várias concentrações de GA_3 e luz branca (água).

○ = água em luz branca contínua

● = água em escuro contínuo

□ = GA_3 a 05 ppm

■ = GA_3 a 10 ppm

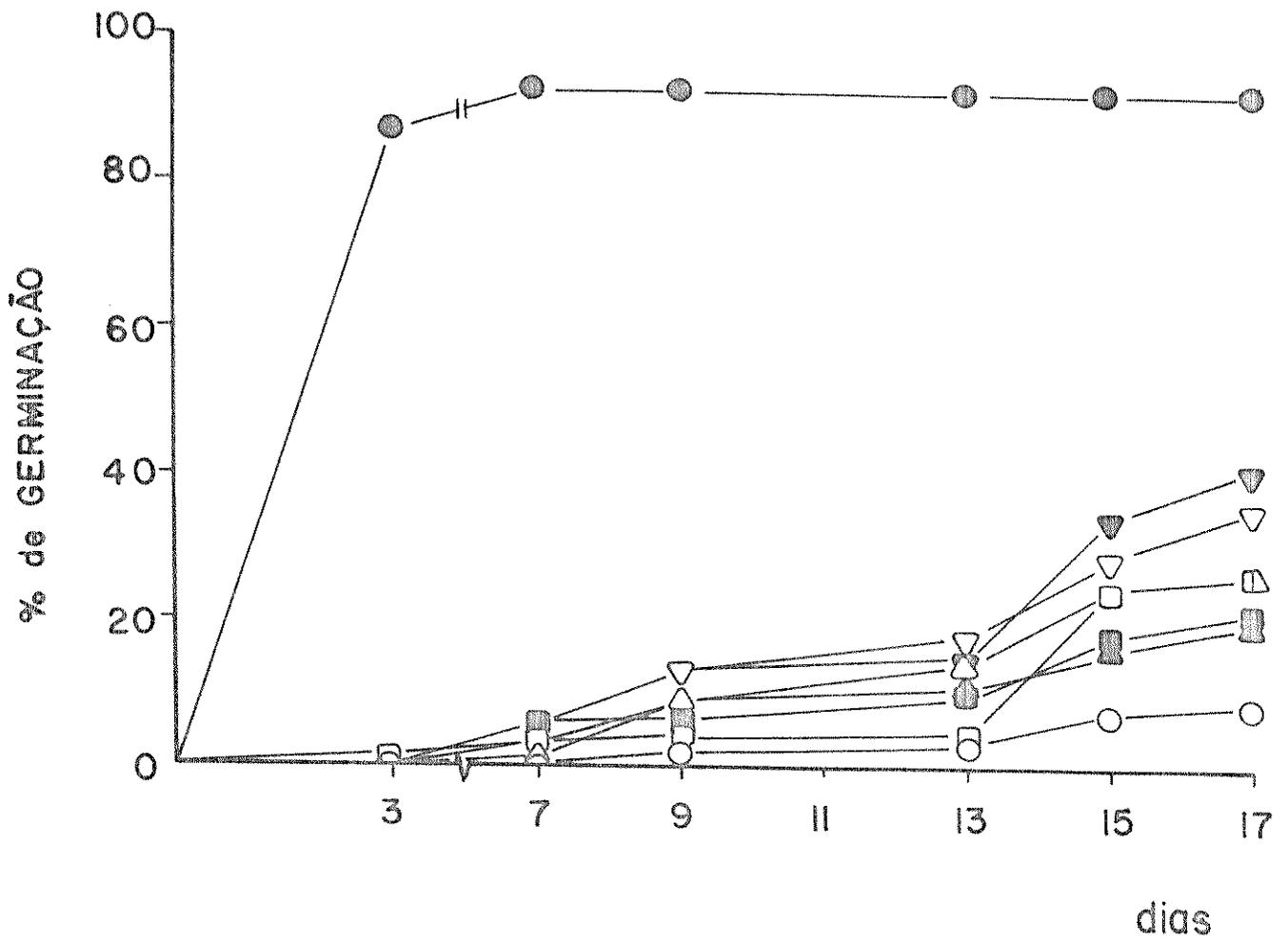
△ = GA_3 a 20 ppm

▲ = GA_3 a 30 ppm

▽ = GA_3 a 40 ppm

▽ = GA_3 a 50 ppm

FIGURA 7



Os testes estatísticos feitos para as porcentagens de germinação no 20º dia de embebição mostraram que nenhuma das concentrações testadas promoveu a germinação de *Cucumis anguria*, sendo todas elas consideradas sublímiares.

12. Efeito de etrel em concentrações abaixo de 5 ppm

Pelos resultados mostrados na Figura 8B, pode-se observar que o etrel promoveu a germinação nas concentrações de 5 e 2,5 ppm, havendo ainda uma promoção na concentração de 1 ppm ao final do 8º dia de embebição. No 4º dia de embebição já se verificava promoção nas três concentrações testadas.

13. Estudo de possível interação entre luz vermelha, GA₃, 6-BA e etrel

Pelos resultados dos experimentos com diferentes períodos de luz vermelha e concentrações baixas de etrel, 6-BA e GA₃, foram escolhidos o período de choque de vermelho e a concentração das substâncias para os experimentos em que se procurava verificar uma interação entre esses fatores. Assim foi escolhido um período de luz vermelha de 6 horas, GA₃ na concentração de 50 ppm, 6-BA na concentração de 20 ppm (que não promoveram a germinação) e etrel a 1 ppm, em que a promoção foi muito leve.

Os resultados de um desses experimentos são

FIGURA 8 - Efeito de 6-BA e etrel, em luz branca contínua, na germinação de *Cucumis anguria* L.

A. Efeito de 6-BA em concentrações abaixo de 25 ppm. Foi feita análise de variância para os tratamentos em luz branca, sendo F a 5% não significativo.

- = luz branca constante, água
- = escuro constante, água
- = 6-BA a 05 ppm
- = 6-BA a 10 ppm
- △ = 6-BA a 15 ppm
- ▲ = 6-BA a 20 ppm
- ▽ = 6-BA a 25 ppm

B. Efeito de etrel em concentrações abaixo de 05 ppm.

- = luz branca constante, água
- = escuro constante, água
- = etrel a 01 ppm
- △ = etrel a 2,5 ppm
- = etrel a 05 ppm

apresentados na Figura 9, como porcentagens de germinação. Os quatro gráficos representam o desdobramento dos resultados, que foi feito da seguinte maneira: na Fig. 9A são mostradas as curvas de germinação dos tratamentos aplicados isoladamente, isto é, luz vermelha, etrel, 6-BA e GA₃, além dos controles de água em luz branca e escuro constantes; na Fig. 9B são mostrados os efeitos de cada uma das substâncias de crescimento utilizadas mais 6 horas de vermelho; na Fig. 9C aparecem os resultados da combinação entre as substâncias de crescimento sem o período de luz vermelha; na Fig. 9D aparecem as curvas de germinação dos tratamentos feitos com a combinação das substâncias de crescimento mais luz vermelha. Como pode ser visto, nenhuma das combinações causou uma germinação semelhante a do tratamento de escuro.

Para uma melhor visualização de todos os tratamentos em conjunto, foram feitos histogramas para os dias 3, 7 e 11 de germinação. Os resultados podem ser vistos na Figura 10. Em 10A, B e C pode ser visto que em vários tratamentos a germinação teve valores mais altos do que nos tratamentos em que as sementes ficavam em água com luz branca constante.

Os resultados mostrados na Figura 10C (11º dia de experimento) foram submetidos a uma análise de variância fatorial. A análise revelou que nenhuma interação foi significativa, isto é, não houve nenhuma interação entre etrel, GA₃, 6-BA e luz vermelha. A análise mostrou, entretanto, que etrel e luz vermelha apresentaram indivi-

FIGURA 9 - Estudo de possível interação entre período de 6 horas de vermelho, GA₃ a 50 ppm, 6-BA a 20 ppm e etrel a 1 ppm, na germinação de *Cucumis anguria* L. O período de 6 horas de vermelho foi dado após 24 horas de luz branca. Foi feita análise de variância fatorial para o 11º dia, mostrando que não houve interação.

A. Efeito de escuro contínuo, luz branca contínua e, isoladamente, GA₃, 6-BA, etrel e luz vermelha.

- ▽ ——— ▽ = escuro constante, água
- ——— ○ = luz branca constante, água
- ——— □ = 06 horas de luz vermelha
- ——— ■ = etrel, em luz branca
- ▽ ——— ▽ = 6-BA, em luz branca
- △ - - - - - △ = GA₃, em luz branca

B. Efeito de etrel, 6-BA e GA₃ em conjunto com 6 horas de luz vermelha (LV).

- ▽ ——— ▽ = escuro constante, água
- △ ——— △ = LV com GA₃
- ▽ - - - - - ▽ = LV com etrel
- ——— ● = LV com 6-BA

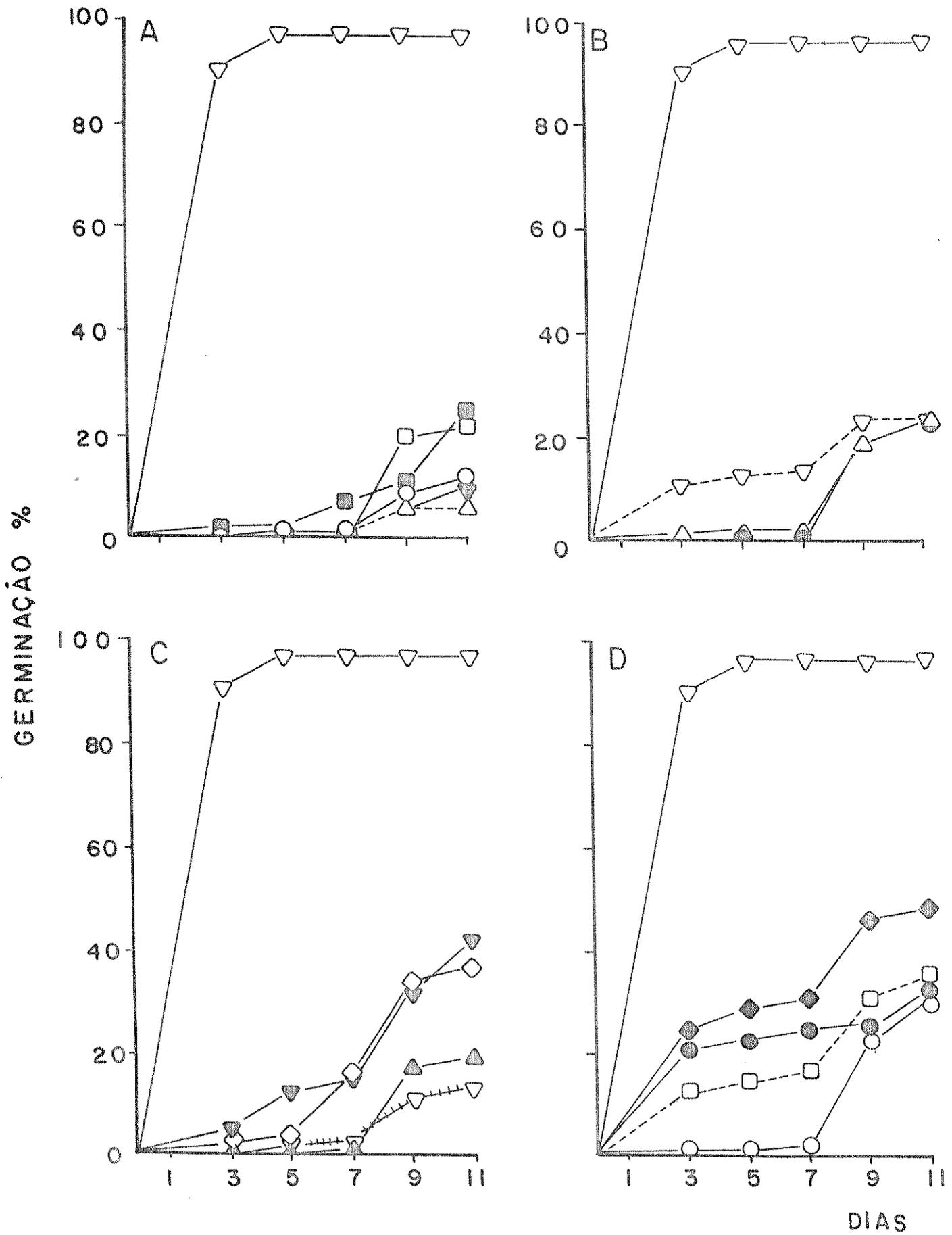
C. Efeito da combinação das substâncias de crescimento em luz branca constante.

- ▽ ——— ▽ = escuro constante, água
- ▽ ——— ▽ = etrel com 6-BA
- ◇ ——— ◇ = GA₃ com etrel
- ▲ ——— ▲ = GA₃ com 6-BA
- ▽ +++++ ▽ = GA₃ com 6-BA e etrel

D. Efeito da combinação das substâncias de crescimento com luz vermelha (LV).

- ▽ ——— ▽ = escuro constante, água
- ◆ ——— ◆ = 6-BA com etrel e LV
- ——— ● = GA₃ com etrel e LV
- ——— ○ = GA₃ com 6-BA e LV
- - - - - - □ = 6-BA com GA₃, etrel e LV

FIGURA 9



dualmente um efeito promotor estatisticamente significativo sobre a germinação de *Cucumis anguria*. Dessa maneira, nos tratamentos em que se observou promoção da germinação, esta promoção foi devida ao efeito isolado ou do etrel ou da luz vermelha, e não da ação conjunta desses tratamentos entre si ou com outras substâncias de crescimento. Não houve também interação entre luz vermelha e etrel. A análise estatística confirma portanto os resultados obtidos no 11º dia: as porcentagens de germinação relativamente mais altas foram em geral obtidas com os tratamentos em que apareciam ou etrel ou luz vermelha ou ambos. No tratamento feito com GA₃, 6-BA e etrel juntos, no qual a porcentagem final de germinação foi próxima ao do controle de luz branca, o etrel não teve efeito.

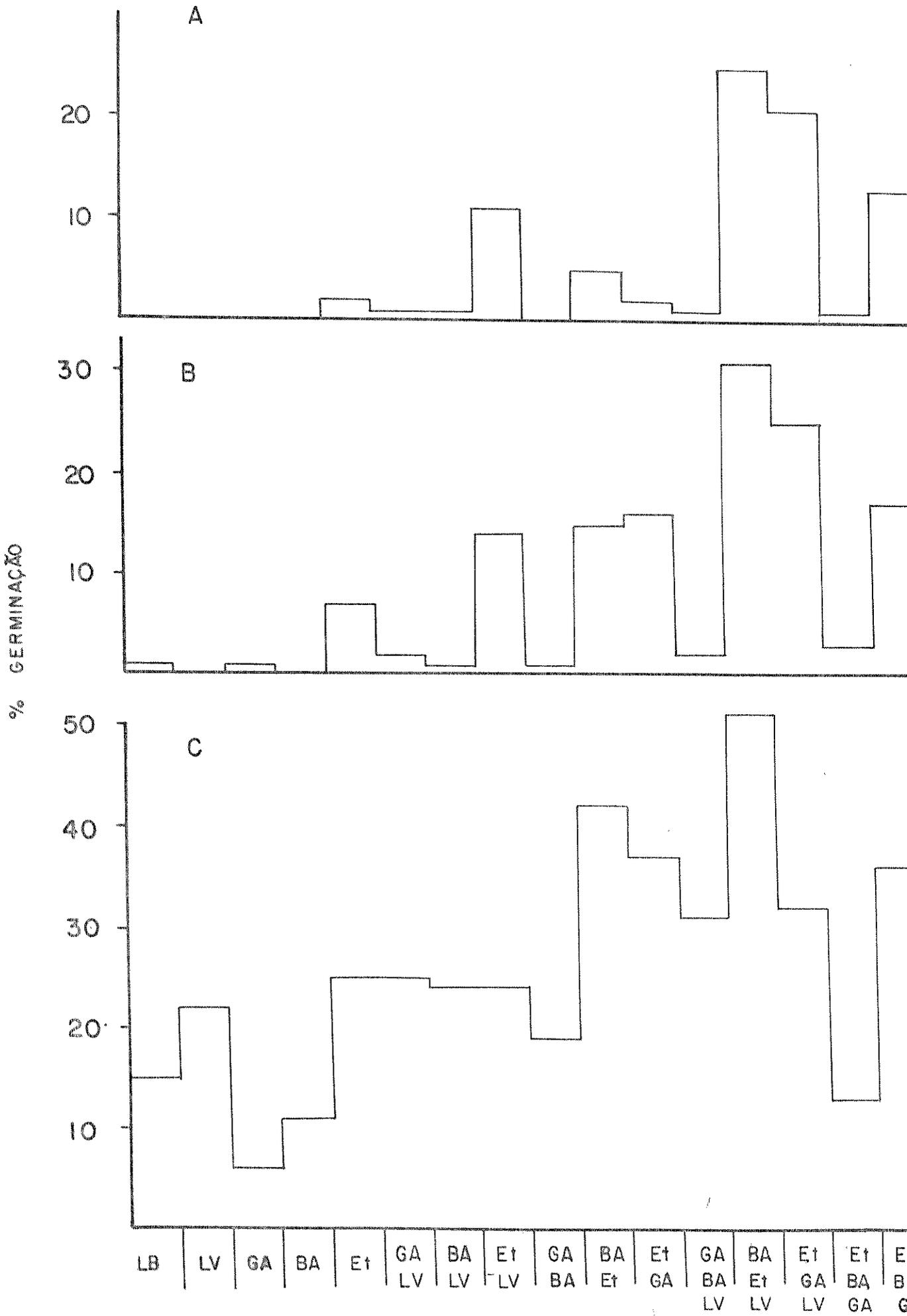
Na Figura 10A, onde todos os tratamentos estão colocados lado a lado, observa-se que as mais altas porcentagens de germinação, no 3º dia de experimento, são alcançadas pelos tratamentos em que etrel e luz vermelha são aplicados juntamente. Esses resultados sugerem que o etrel mais luz vermelha tendem a promover a velocidade de germinação de *Cucumis anguria* nos primeiros dias de embebição.

A promoção da porcentagem final de germinação que se verificou nos tratamentos envolvendo etrel e luz vermelha foi bastante baixa, pois verificou-se apenas em relação ao controle de luz branca, estando bem abaixo do efeito promotor do tratamento de escuro contínuo (Figura 9).

FIGURA 10 - Estudo de possível interação entre período de 6 horas de luz vermelha e substâncias de crescimento (ver legenda da Figura 9). Dados apresentados em forma de histograma (sem o controle de escuro, que é o mesmo da Figura 9) para melhor visualização. A análise de variância fatorial para o 11º dia mostrou que não houve qualquer interação entre as substâncias de crescimento e a luz. De acordo com essa análise, qualquer efeito verificado era causado por etrel ou luz vermelha isoladamente (não há interação também entre etrel e luz vermelha).

- A. 3º dia de germinação
- B. 7º dia de germinação
- C. 11º dia de germinação

LB = luz branca
LV = 6 horas de vermelho
Et = etrel
GA = ácido giberélico
BA = 6-benziladenina



Concluindo, a germinação de *Cucumis anguria* é promovida pelo escuro. Além disso, luz vermelha e etrel têm um efeito promotor bastante pronunciado, dando porcentagens de germinação semelhantes ao escuro. GA_3 e 6-BA em concentrações altas promoveram, mas a velocidade de germinação é muito lenta em relação ao escuro contínuo, e a germinação final é menor.

Não há interação entre substâncias de crescimento e luz vermelha na germinação de *Cucumis anguria*; quando há promoção, mesmo pequena, esta é causada por efeito isolado ou do etrel ou da luz vermelha.

B. Verificação de hormônios antes e durante a germinação de *Cucumis anguria*

A extração de substâncias de crescimento foi feita a partir de sementes não embebidas e sementes embebidas em luz branca e escuro constantes por 24, 48 e 72 horas. Foram escolhidos esses tempos de embebição já que a indução da germinação no controle de escuro ocorre dentro dos primeiros dois dias de embebição.

1. Citocininas

Sementes frescas (não embebidas) e embebidas em condição de luz ou escuro por 24 e 48 horas foram submetidas a extração completa e os extratos básicos cromat-

tografados. Uma faixa lateral de cada cromatograma foi mergulhada no reagente de Wood e apresentou uma mancha de cor azul na região correspondente ao Rf 0,1, indicando a presença de compostos de natureza purínica.

Foram biotestadas as faixas dos cromatogramas compreendidas entre os Rfs 0,0 e 0,3, sendo os resultados apresentados na Figura 11. Observa-se que, para os extratos de sementes frescas (Figura 11A), sementes embebidas por 24 horas em luz branca (Figura 11B) e embebidas por 24 horas em escuro (Figura 11C) não houve diferenças significativas das porcentagens de aumento de peso fresco dos cotilédones de rabanete em relação ao controle, embora tenha sido observada uma tendência a uma inibição entre os Rfs 0,2 e 0,3, não confirmada estatisticamente.

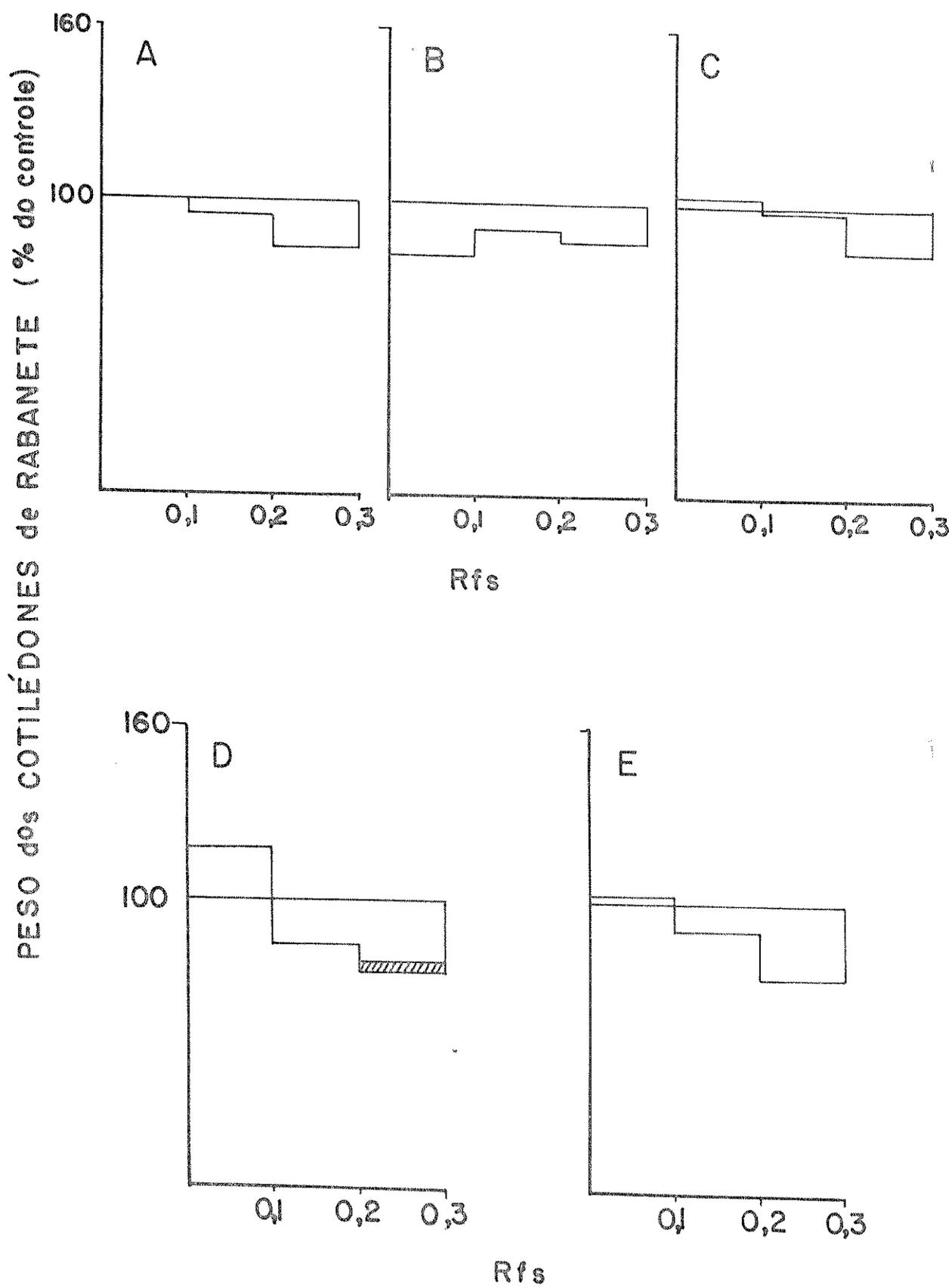
No bioteste de extratos de sementes embebidas por 48 horas em luz branca (Figura 11D), verificou-se promoção do aumento do peso dos cotilédones entre os Rfs 0,0 e 0,1 indicando atividade citocinínica, porém esta promoção não foi estatisticamente significativa. Observou-se também picos negativos estatisticamente significativos entre os Rfs 0,1 e 0,3 indicando inibição do aumento de peso fresco dos cotilédones de rabanete. No caso das sementes embebidas por 48 horas no escuro (Figura 11E) não foi verificado qualquer efeito no bioteste de citocininas, e a inibição entre os Rfs 0,2 e 0,3 não foi confirmada pela análise estatística.

Esses resultados mostraram que as citocininas endógenas provavelmente não estão envolvidas direta-

FIGURA 11 - Resultados dos biotestes para citocininas. Extratos básicos de sementes de *Cucumis anguria* L. embebidas e não embebidas.

- A. Sementes frescas (não embebidas)
- B. Sementes mantidas embebidas por 24 horas em luz branca
- C. Sementes mantidas embebidas por 24 horas em escuro
- D. Sementes mantidas embebidas por 48 horas em luz branca
- E. Sementes mantidas embebidas por 48 horas em escuro.

FIGURA II



te na indução da germinação de *Cucumis anguria*, pois não foi observada atividade citocinínica nos extratos das sementes embebidas em escuro. Entretanto, na mesma posição do cromatograma poderia existir um inibidor que estaria mascarando as citocininas.

2. Giberelinas

2.1 - Extratos não purificados

Sementes frescas ou embebidas sob luz branca ou escuro por 48 e 72 horas foram extraídas de acordo com o método de ZEEVAART (1966), sendo os extratos cromatografados e biotestados. Os resultados são apresentados nas Figuras 12 e 13.

Os extratos de sementes frescas, isto é, que não foram embebidas, não apresentaram nenhuma atividade giberelínica (Figuras 12A e 13A).

Verificou-se para os tratamentos com luz branca a presença de um pico promotor, estatisticamente significativo, entre os Rfs 0,2 e 0,3, para as sementes embebidas por 48 horas (Figura 12B), e entre os Rfs 0,3 e 0,4, para as sementes embebidas por 72 horas (Figura 13B), indicando a presença de substâncias com atividade giberelínica nos extratos.

Para as sementes embebidas sob condições de escuro, foi observada uma região promotora entre os

FIGURA 12 - Resultados dos bioensaios para giberelinas.
Extratos obtidos pelo método de Zeevaart (1966),
de sementes de *Cucumis anguria* L.

A. Sementes não embebidas

B. Sementes embebidas por 48 horas sob luz bran
ca

C. Sementes embebidas por 48 horas sob escuro

FIGURA 12

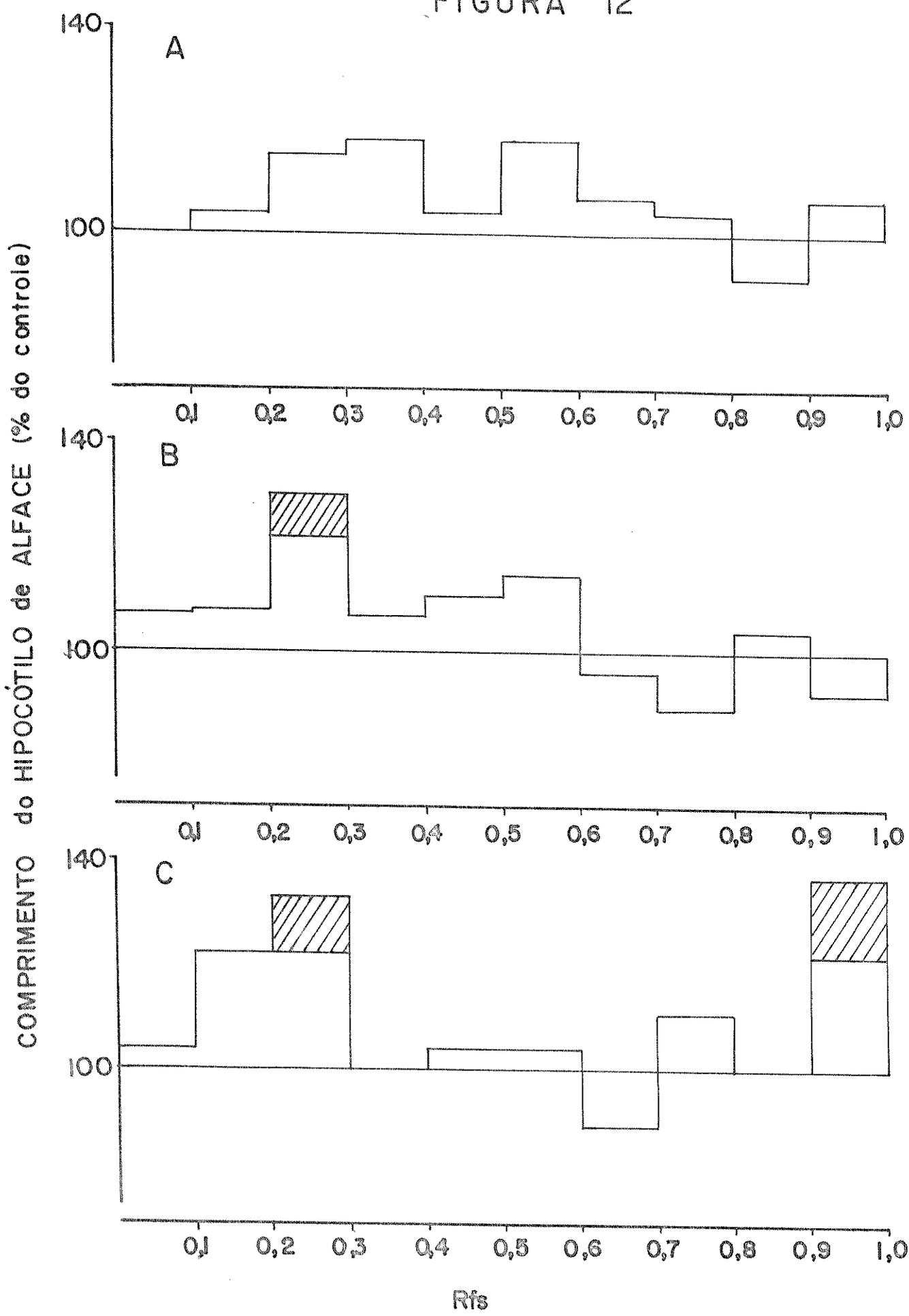


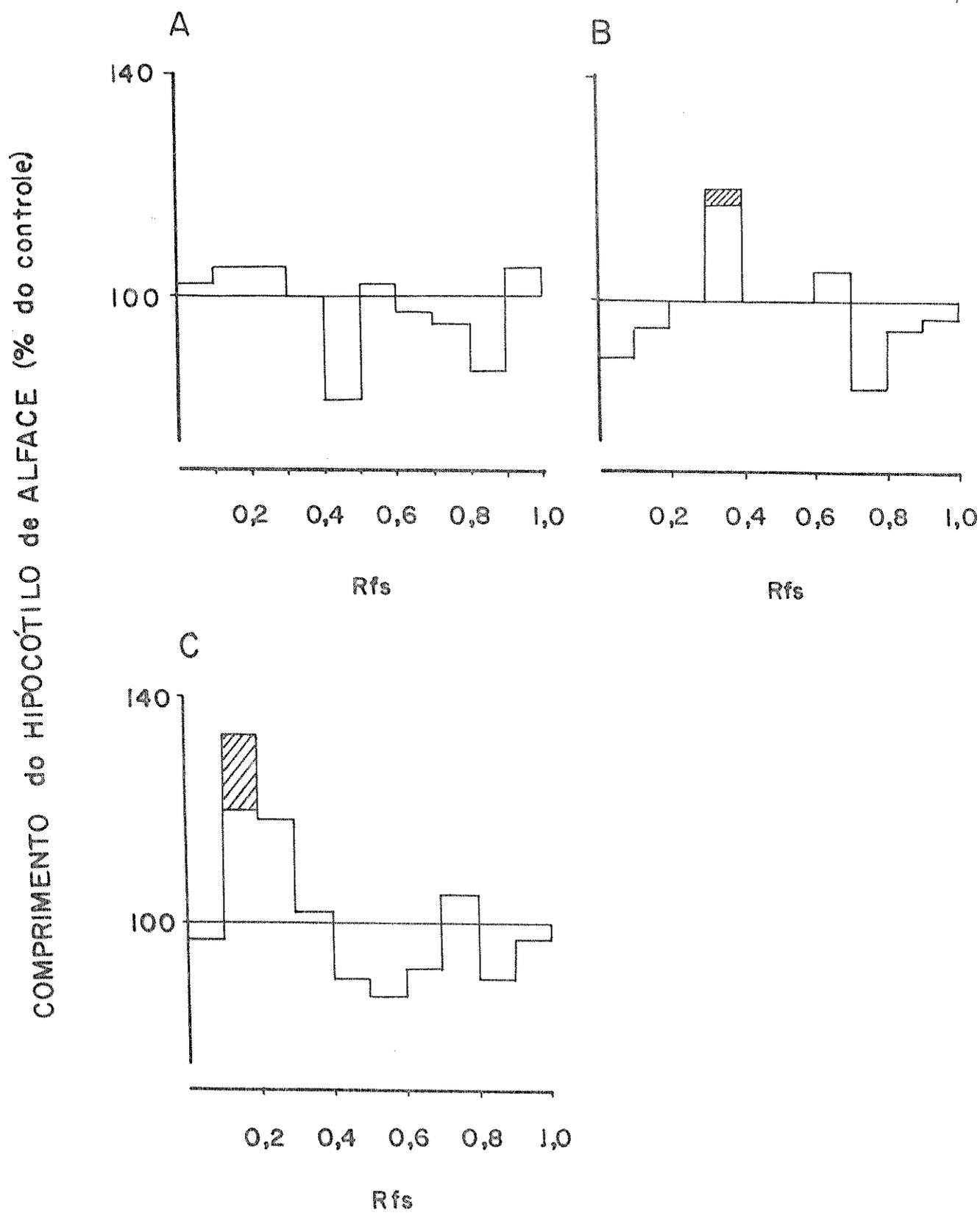
FIGURA 13 - Resultados dos biotestes para extratos, obtidos pelo método de Zeevaart (1966), de sementes de *Cucumis anguria* L.

A. Sementes não embebidas

B. Sementes embebidas por 72 horas sob luz branca

C. Sementes embebidas por 72 horas sob escuro

FIGURA 13



Rfs 0,1 e 0,3 com um pico promotor entre os Rfs 0,2 e 0,3, e um segundo pico entre os Rfs 0,9 e 1,0 para os extratos obtidos após 48 horas de embebição (Figura 12C); observou-se também um pico entre os Rfs 0,1 e 0,2 (Figura 13C) para os extratos obtidos após 72 horas de embebição, indicando atividade giberelínica. Os demais picos observados não foram confirmados estatisticamente.

2.2 - Extratos purificados

Sementes não embebidas e sementes embebidas sob luz branca ou escuro por 24 e 48 horas foram extraídas segundo o método de fracionamento (extração completa), já citado. As frações ácidas dos extratos foram cromatografadas e biotestadas, sendo os resultados apresentados na Figura 14.

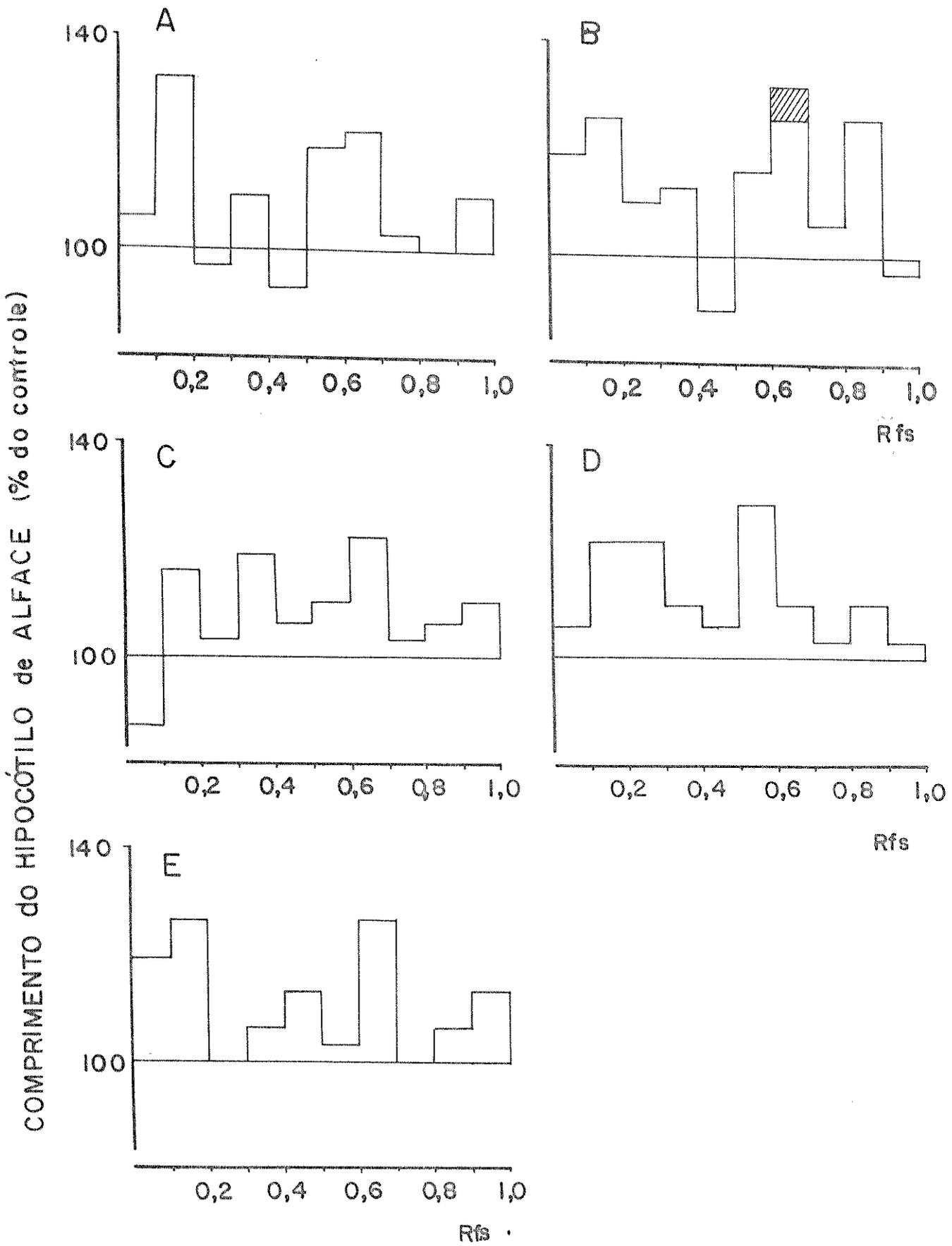
Em extratos de sementes não embebidas (Figura 14A) e de sementes embebidas por 24 horas sob luz branca (Figura 14B) e escuro (Figura 14C), ou embebidas por 48 horas sob luz branca (Figura 14D) e escuro (Figura 14E), o bioteste de alface mostrou pequenas diferenças entre os vários tratamentos, observando-se em todos eles picos de promoção. Entretanto, estatisticamente, somente no caso das sementes embebidas por 24 horas em luz branca (Figura 14B) houve um pico promotor entre os Rfs 0,6 e 0,7.

Houve portanto diferenças estatísticas entre os dois métodos utilizados (extratos purificados e não purificados), mas de qualquer maneira verificou-se a

FIGURA 14 - Resultados dos biotestes de frações ácidas dos extratos de sementes de *Cucumis anguria* L.

- A. Sementes não embebidas
- B. Sementes mantidas sob luz branca por 24 horas
- C. Sementes mantidas sob escuro por 24 horas
- D. Sementes mantidas sob luz branca por 48 horas
- E. Sementes mantidas sob escuro por 48 horas

FIGURA 14



presença de giberelinas tanto em sementes embebidas sob luz branca como sob escuro.

3. Etileno

3.1 - Uso do nitrato de prata (inibidor da ação do etileno)

3.1.1 - Germinação em condições de escuro em várias concentrações de nitrato de prata (AgNO_3)

Os resultados são apresentados na Figura 15. Observa-se que o nitrato de prata, nas concentrações de 5, 10 e 50 ppm (Figura 15A), não inibiu a germinação de *Cucumis anguria*, uma vez que as porcentagens de germinação desses três tratamentos foram semelhantes ao controle de escuro (F não significativo).

Em outro experimento, cujos resultados são apresentados na Figura 15B, foram testadas as concentrações de 50, 100, 150, 200 e 250 ppm. Observa-se que o nitrato de prata inibiu a germinação nas concentrações de 150, 250 e 200 ppm, sendo que, neste experimento, a concentração de 200 ppm revelou-se mais eficiente, apresentando uma taxa de inibição de aproximadamente 40 por cento. Não se verificou inibição nas concentrações de 50 e 100 ppm.

FIGURA 15 - Efeito de nitrato de prata (AgNO_3) na germinação de *Cucumis anguria* L. mantidas em escuro constante.

A. AgNO_3 em concentrações inferiores a 50 ppm.
F a 5% não significativo (excluindo-se controle de luz branca)

○ = luz branca, água

● = escuro, água

△ = AgNO_3 a 5 ppm

□ = AgNO_3 a 10 ppm

■ = AgNO_3 a 50 ppm

B. AgNO_3 em concentrações superiores a 50 ppm.

○ = luz branca, água

■ = AgNO_3 a 50 ppm

□ = AgNO_3 a 100 ppm

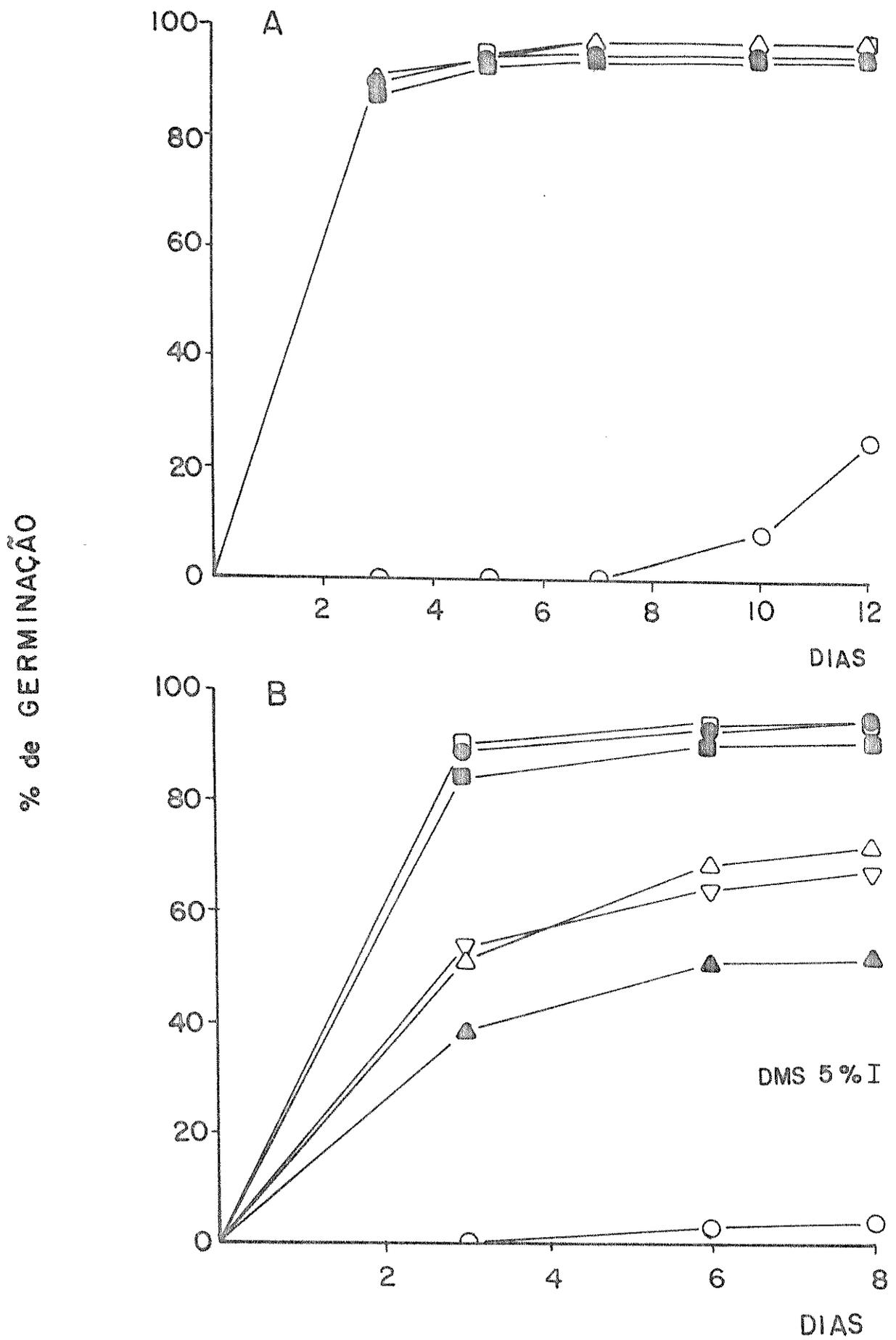
△ = AgNO_3 a 150 ppm

▲ = AgNO_3 a 200 ppm

▼ = AgNO_3 a 250 ppm

● = escuro, água

FIGURA 15



3.1.2 - Demonstração do efeito inibitório do AgNO_3

O primeiro experimento consistiu de duas partes, sendo os resultados apresentados na Figura 16. Na primeira parte do experimento, sementes de *Cucumis anguria* foram colocadas para embeber no escuro em soluções de AgNO_3 nas concentrações de 100, 150, 200, 250 e 500 ppm. Na Figura 16A observa-se que as soluções de 200, 250 e 500 ppm inibiram fortemente a germinação. A partir de 200 ppm, a taxa de inibição foi quase proporcional ao aumento da concentração do AgNO_3 . Na concentração de 500 ppm a inibição foi quase total, tendo alcançado uma taxa de germinação de apenas 1 por cento. A duração dessa primeira parte do experimento foi de 72 horas.

Para a segunda parte do experimento, as sementes que estiveram embebidas nas soluções de AgNO_3 a 200, 250 e 500 ppm foram lavadas e transferidas para placas de Petri com água destilada e mantidas em escuro constante. Foram feitas contagens de germinação no 4º e 10º dias, sendo os resultados apresentados na Figura 16B. As sementes pré-embebidas em AgNO_3 a 250 ppm apresentaram uma taxa de germinação de 94 por cento, enquanto que as sementes previamente embebidas em solução de 200 ppm apresentaram uma taxa de germinação de 86 por cento. As sementes que estiveram embebidas previamente em AgNO_3 a 500 ppm apresentaram taxa de germinação de 65 por cento ao final de 10º dia, o que correspondeu a cerca de 30 por cento de inibição em relação ao controle.

FIGURA 16 - Efeito do nitrato de prata na germinação de sementes de *Cucumis anguria* L. mantidas em escuro constante.

A. Sementes mantidas continuamente em várias concentrações de AgNO_3 durante 72 horas

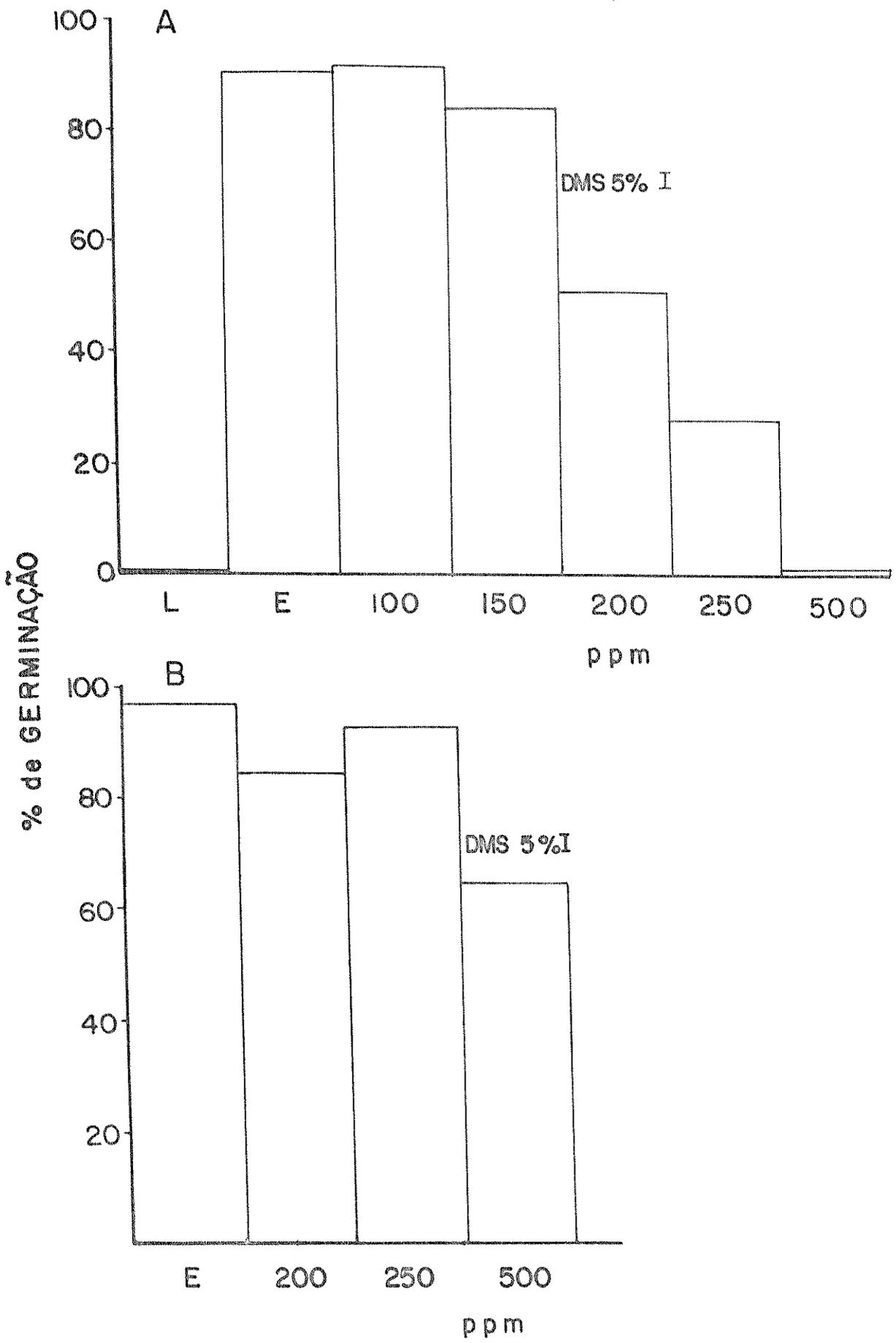
L = luz branca, água

E = escuro, água

B. Sementes previamente embebidas por 72 horas em várias concentrações de AgNO_3 e depois transferidas para água, onde permaneceram por 10 dias

E = escuro, água

FIGURA 16



Esses resultados mostraram que a reversão do efeito inibitório do nitrato de prata foi maior nas sementes previamente embebidas em soluções de 200 e 250 ppm do que em 500 ppm, e que AgNO_3 estava inibindo, e não matando as sementes.

Foi montado outro experimento para se demonstrar o efeito inibitório do AgNO_3 sobre sementes de *Cucumis anguria* (Figuras 17A e B). Esse experimento também apresentou duas etapas. Na primeira etapa, sementes de *Cucumis anguria* permaneceram embebidas em AgNO_3 durante 72 horas, tendo se observado uma forte inibição da germinação nas concentrações de 250 e 500 ppm (Figura 17A). Na segunda etapa do experimento, as sementes que não germinaram nos tratamentos de AgNO_3 durante a 1ª etapa foram lavadas com água destilada e transferidas para uma concentração promotora de etrel (25 ppm) ou para água destilada, onde permaneceram por 10 dias. As porcentagens finais de germinação nesse teste são mostradas na Figura 17B, em forma de histograma. Embora os resultados sugiram que o etrel foi mais eficiente do que a água em reverter o efeito do nitrato de prata, as diferenças observadas entre os tratamentos não foram estatisticamente significativas.

Os resultados desses experimentos mostraram que as baixas porcentagens de germinação verificadas em sementes de *Cucumis anguria* durante a embebição em nitrato de prata devem-se provavelmente à inibição da ação do etileno endógeno, e não à morte das sementes.

FIGURA 17 - Efeito de AgNO_3 sobre a germinação de sementes de *Cucumis anguria* L. mantidas em escuro constante.

A. Embebição em AgNO_3 durante 72 horas

L = luz branca, água

E = escuro, água

B. Sementes previamente embebidas em AgNO_3 durante 72 horas e transferidas para água e etrel a 25 ppm. Foi feita análise de variância, apresentando valor de F a 5% não significativo

-  = Sementes previamente mantidas em AgNO_3 a 250 ppm e transferidas para etrel
-  = Sementes previamente mantidas em AgNO_3 a 500 ppm e transferidas para etrel
-  = Sementes previamente mantidas em AgNO_3 a 250 ppm e transferidas para água
-  = Sementes previamente mantidas em AgNO_3 a 500 ppm e transferidas para água

C. Aplicação de AgNO_3 por 24 horas após diferentes períodos de embebição em água destilada. O experimento teve a duração de 72 horas

L = luz branca, água

E = escuro, água

00h = sementes não previamente embebidas

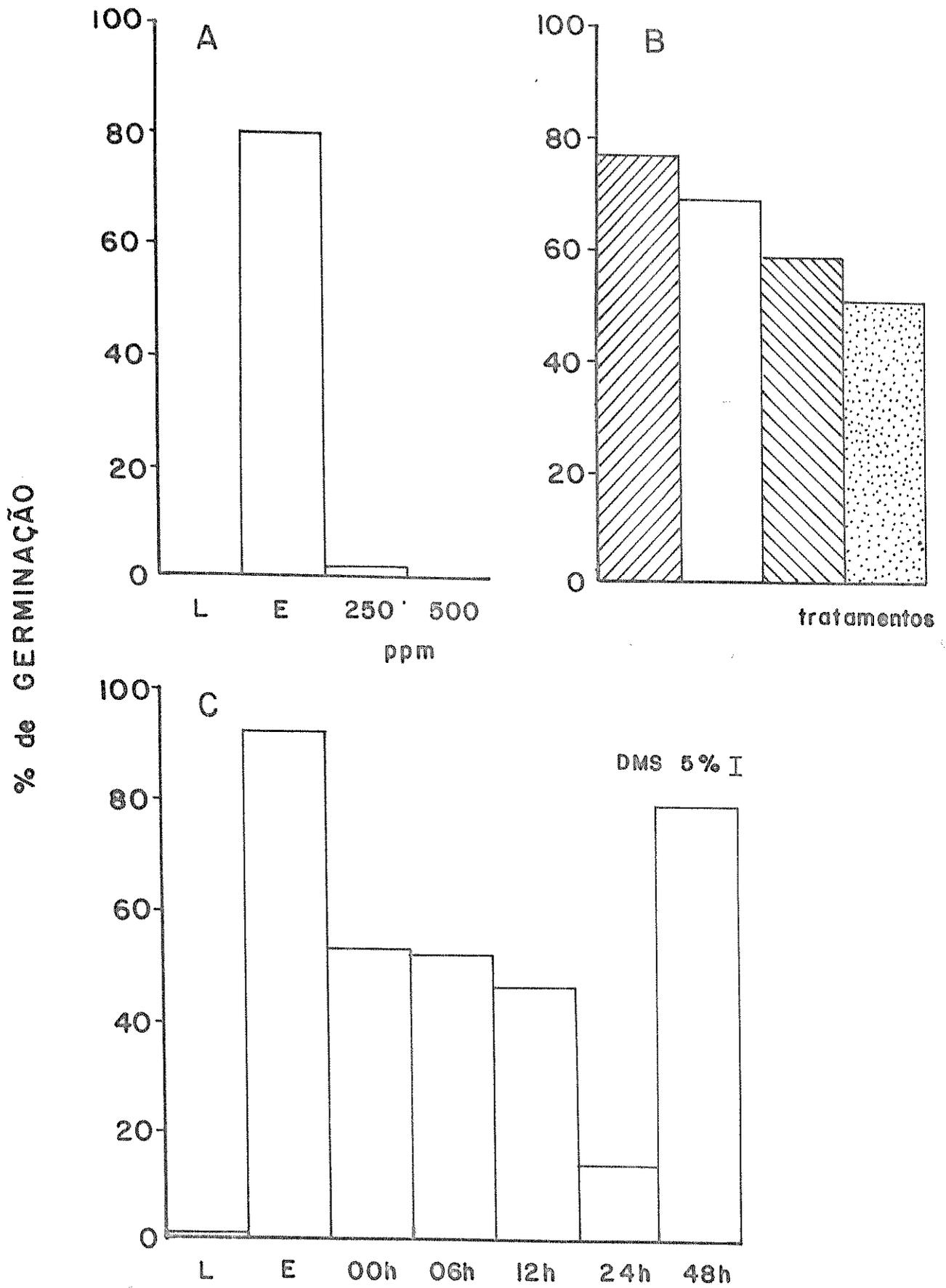
06h = sementes previamente embebidas por seis horas

12h = sementes previamente embebidas por doze horas

24h = sementes previamente embebidas por vinte e quatro horas

48h = sementes previamente embebidas por quarenta e oito horas

FIGURA 17



3.1.3 - Aplicação de AgNO_3 a 500 ppm após diferentes períodos de embebição em água destilada, em escuro constante

Esse teste foi feito para se verificar em que período de embebição o nitrato de prata era mais eficiente na inibição da germinação. O teste teve a duração de três dias, que é o tempo dentro do qual as sementes germinam no controle de água em escuro. As sementes previamente ficaram 0, 6, 12, 24 e 48 horas em água, sendo então transferidas por 24 horas para nitrato de prata. Os resultados são apresentados na Figura 17C, mostrando que o nitrato de prata inibiu a germinação em todos os tratamentos. A maior inibição ocorreu aplicando-se o AgNO_3 após 24 horas de embebição em água. A aplicação de AgNO_3 com 48 horas de embebição em água mostrou muito pouco efeito em relação ao controle, uma vez que a maioria das sementes já havia germinado no momento da transferência para a solução de AgNO_3 .

Os resultados desse experimento mostram que o nitrato de prata age mais efetivamente por volta de 24 horas após o início da embebição das sementes. Sendo o nitrato de prata um inibidor da ação do etileno endógeno, estes resultados sugerem que possa estar ocorrendo uma maior produção de etileno após um intervalo de aproximadamente 24 horas de embebição.

3.2 - Dosagem de etileno liberado pelas sementes

Sementes de *Cucumis anguria* foram colocadas para embeber em frascos, os quais foram em seguida hermeticamente fechados. Após intervalos de 24 e 48 horas de embebição foram feitas duas leituras, sendo uma para o número de sementes germinadas e outra para a liberação de etileno no interior dos frascos.

Os resultados do teste são apresentados na Figura 18. Na Fig. 18A observa-se que, em 48 horas de embebição, as sementes mantidas em escuro apresentaram 76 por cento de germinação, enquanto que as sementes mantidas em luz branca apresentaram uma taxa de germinação de 16 por cento. Com 24 horas de embebição as taxas de germinação em ambos os tratamentos foi zero.

As medidas da quantidade de etileno liberado pelas sementes são mostradas na Figura 18B, expressos em nmoles de etileno/volume da amostra injetada (0,5 ml)/30 sementes. Observa-se que, com 24 horas de embebição, já era detectada a presença de etileno tanto nos frascos mantidos em escuro como nos frascos mantidos em luz branca, em quantidades semelhantes. Após 48 horas de embebição houve um aumento na concentração de etileno nos dois tratamentos, sendo que a quantidade de etileno liberada no interior dos frascos mantidos no escuro foi significativamente maior do que nos frascos mantidos em luz branca.

Em um outro experimento, as sementes

FIGURA 18 - Germinação de *Cucumis anguria* L. e dosagem de etileno liberado pelas sementes.

A. Germinação

○ = luz branca

● = escuro

B. Concentração de etileno (nmoles/0,5 ml/30 sementes) *T* a 5% significativo para a diferença em etileno às 48 horas

○ = luz branca

● = escuro

FIGURA 18

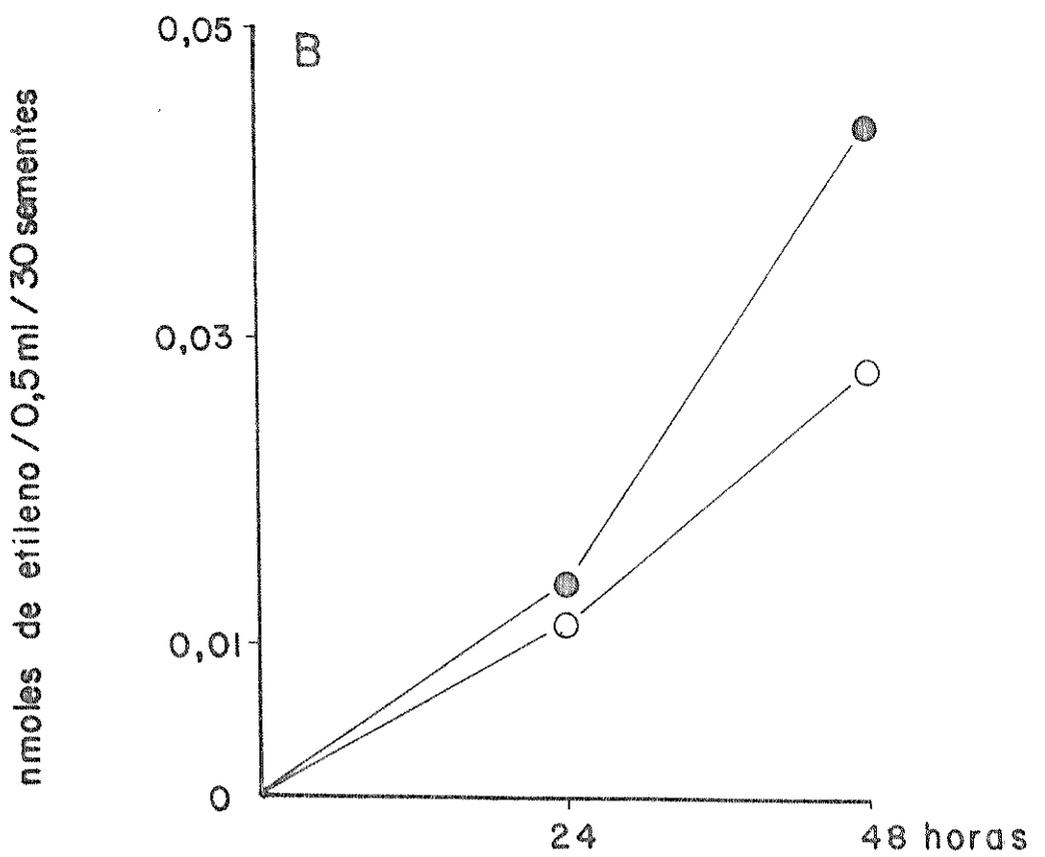
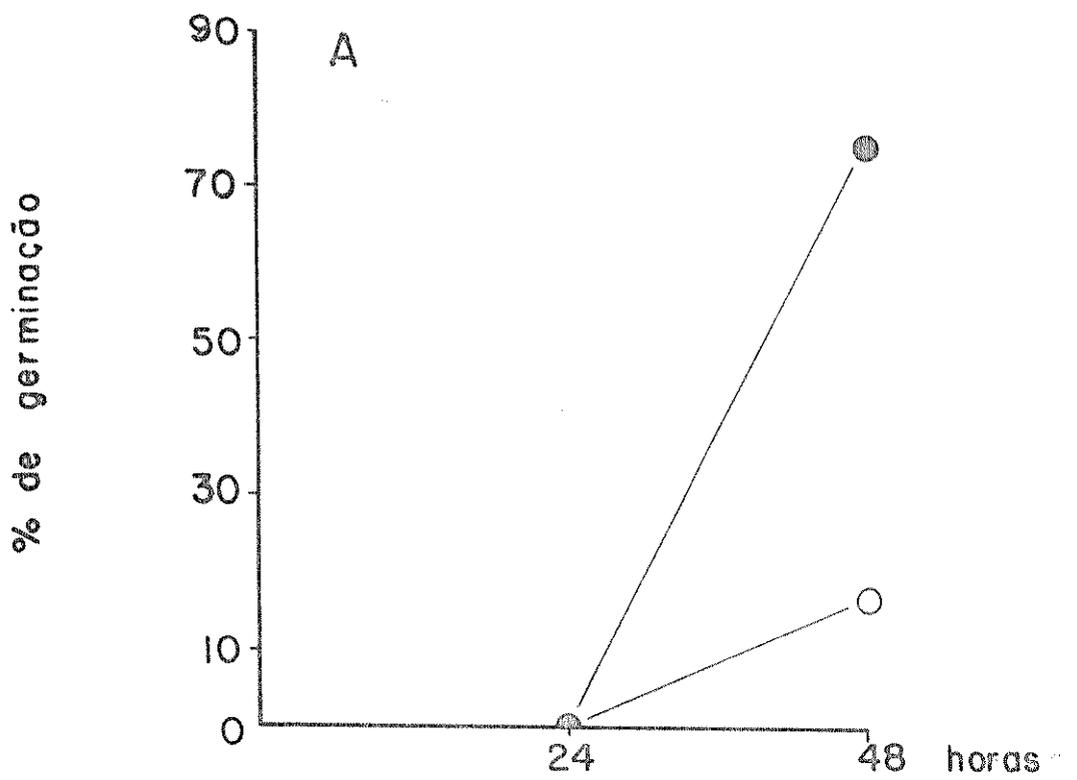


FIGURA 19 - Dosagem de etileno durante a germinação de *Cucumis anguria* L.

- = frasco aberto; escuro
- = frasco aberto; luz
- = frasco fechado; escuro
- = frasco fechado; luz

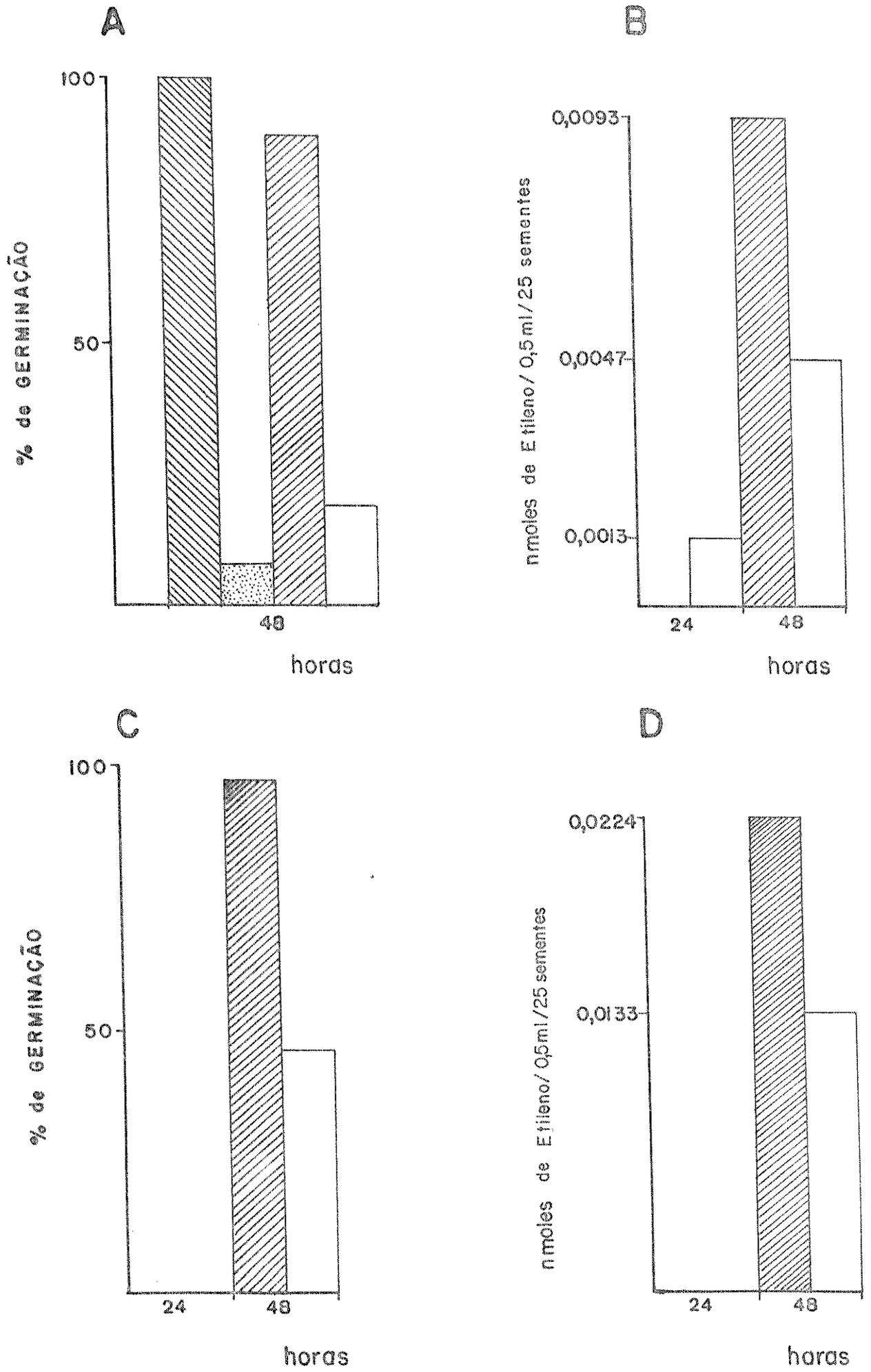
A. Germinação após 48 horas em frascos abertos e fechados

B. Dosagem de etileno (compare com A)

C. Germinação em frascos fechados

D. Dosagem de etileno (compare com C)

FIGURA 19



foram postas para germinar nos frascos, com ou sem tampa, em luz branca e no escuro. A germinação foi verificada 6, 12, 24 e 48 horas após o início do experimento. Os resultados são mostrados na Figura 19A. Não ocorreu germinação após 6, 12 e 24 horas do início do experimento. Depois de 48 horas, a germinação foi bem maior em escuro do que em luz, havendo muito pouca diferença nos valores entre frascos abertos e fechados. Nos frascos fechados em luz e escuro foi dosado o etileno após 6, 12, 24 e 48 horas do início do experimento. Os resultados estão na Figura 19B. O etileno não foi detectado após 6 e 12 horas. Com 24 horas houve aparecimento de etileno apenas nos frascos mantidos em luz. Etileno pode ser facilmente detectado 48 horas após o início do experimento em sementes mantidas no escuro, em uma quantidade que era o dobro da quantidade detectada em sementes no claro. Na repetição deste experimento, foram usados apenas frascos fechados (Figuras 19C e D). Não ocorreu germinação, nem etileno pode ser detectado, 6, 12 e 24 horas após o início do experimento. Após 48 horas a germinação foi praticamente o dobro nas sementes mantidas no escuro, em relação à luz branca (Figura 18C) e, novamente, muito mais etileno foi detectado nas sementes mantidas no escuro do que naquelas mantidas em luz.

DISCUSSÃO

As sementes de *Cucumis anguria* apresentaram cerca de 8% de água. Em geral, o conteúdo de água em sementes varia muito entre as diversas espécies, mas situa-se em geral ao redor de 10% do peso fresco da semente. Assim, *Coffea arabica* apresenta 12%, *Vicia faba* 14,3% e *Pisum sativum* 10,6% (PURSEGLOVE, 1968). Esse estado de pequena hidratação possibilita à semente sobreviver por longos períodos (METIVIER, 1979).

Verificou-se que a embebição de *Cucumis anguria* foi semelhante durante as primeiras 25 horas, tanto para sementes mantidas em luz branca como em escuro, mostrando que não há relação entre luz e embebição. O fotoblastismo negativo de *Cucumis anguria* não tem qualquer relação com a embebição.

Observando-se as curvas de embebição durante

as primeiras 24 horas pode-se notar que é durante as primeiras 4 horas que ocorre o aumento mais rápido. Esses resultados não diferem muito daqueles observados para sementes de *Amaranthus caudatus* em escuro, onde se verificou um rápido aumento de peso fresco nas primeiras 8 ou 10 horas de embebição, seguida de uma fase de latência e de um segundo aumento associado com a germinação que ocorre ao redor da 20ª hora (KENDRICK, SPRUIT e FRANKLAND, 1969). Para *Cucumis anguria* observou-se que esse segundo aumento ocorre ao redor de 27 horas. TAKAKI, KENDRICK e DIETRICH (no prelo) verificaram que as curvas de embebição de sementes de *Cucumis anguria* mantidas em escuro foram iguais para temperaturas de 25°C e 0°C. Portanto, o rápido aumento que ocorre nas primeiras horas de embebição não é função de alteração no metabolismo da semente, constituindo um processo meramente físico.

Após a rápida embebição inicial seguiu-se uma fase de latência até o momento em que se iniciou a germinação visível (protrusão da radícula). Essa fase de latência, onde os processos metabólicos são grandemente incrementados, apresenta uma certa variação quanto à sua duração. Essa variação foi verificada mesmo entre lotes diferentes de sementes de *Cucumis anguria* mantidos em condições semelhantes, o que pode muitas vezes estar relacionado às condições de maturação das sementes na planta mãe, criando-se assim um polimorfismo no comportamento germinativo da espécie (SMITH, 1973).

A primeira diferença visível quanto ao aumento

de peso fresco, entre sementes mantidas em luz branca e escuro, começou a se verificar por volta de 27 horas após o início da embebição, quando se verificou um grande aumento desse parâmetro nas sementes mantidas em escuro. Esse segundo aumento do peso fresco está associado ao início da protrusão da radícula. NORONHA et al. (1978) mostraram que a germinação de *Cucumis anguria* é controlada por fitocromo. KENDRICK et al. (1969) e TAKAKI et al. (no prelo) mostraram efetivamente que ocorre um aumento da quantidade de fitocromo detectável durante as fases iniciais da embebição de sementes de *Amaranthus caudatus* e *Cucumis anguria*, respectivamente. Segundo TAKAKI et al. (no prelo) é necessário que haja 33% de água na semente de *Cucumis anguria* para que o fitocromo total pré-existente seja totalmente fotoconversível, isto é, para que a semente se torne fotossensível. Por outro lado, observou-se que em sementes de *Rumex crispus* não há relação direta entre o conteúdo de água na semente e a sensibilidade à luz (DUKE, 1978). Portanto, em *Cucumis anguria*, o aumento de peso fresco em sementes mantidas no escuro está associada à germinação, a qual por sua vez está provavelmente relacionada à ação do pigmento fitocromo que é desencadeada pela hidratação das sementes.

O aumento da atividade metabólica em sementes embebidas, não dormentes, pode ser observado pelo aumento da taxa de respiração (CARVALHO e NAKAGAWA, 1980). Em muitos casos observa-se que as variações na taxa de consumo de oxigênio obedecem, em geral, à curva trifásica caracterís-

tica do processo de embebição (BEWLEY e BLACK, 1978). Em *Cucumis anguria* observa-se que durante a fase estacionária de embebição já ocorre uma diferença quanto ao consumo de oxigênio de sementes mantidas em luz e escuro, sendo que as sementes mantidas em escuro "respiram" mais do que aquelas mantidas em luz branca. Após 48 horas de embebição, no momento em que já ocorreu a protrusão da radícula através da casca no tratamento de escuro, a diferença na respiração entre os tratamentos de luz e escuro acentua-se ainda mais, evidentemente em função da diferença no comportamento germinativo. VÁLIO (comunicação pessoal) observou em soja que o crescimento menor do embrião em luz branca estava associada a uma maior taxa de respiração. Em sementes fotoblásticas positivas de alface observou-se que a luz vermelha, aplicada após algumas horas de embebição em escuro, provocou um aumento na taxa de consumo de oxigênio (WOODSTOCK e TOOLE, 1977; PECKETT e CHARCHARDI, 1979). Entretanto, em *Cucumis anguria* a luz branca não causou aumento no consumo de oxigênio, podendo descartar-se a hipótese de que a não germinação nesse tratamento seria devido a um aumento na concentração de CO_2 causada pelo aumento da respiração (embora tivesse sido medido apenas o consumo de oxigênio, poder-se-ia extrapolar que em luz branca não houve aumento de CO_2 , já que não ocorreu aumento do consumo de oxigênio nesse tratamento). Sabe-se que o CO_2 atua como antagonista do etileno (ABELES, 1973) e, sendo assim, o CO_2 estaria competindo com o etileno e inibindo a ação desse hormônio, que é um forte promotor da germinação de *Cucumis anguria* (FELIPPE e LITJENS, 1979). As sementes de maxixe mantidas

em escuro apresentaram maior consumo de oxigênio e, provavelmente maior liberação de CO_2 . Alguns trabalhos têm mostrado que a relação entre etileno e CO_2 não é tão simples. ESASHI et al. (1979), trabalhando com sementes de *Xanthium pensylvanicum*, mostraram que o etileno aplicado aumentava a respiração das sementes. ESASHI, HATA e KATOH (1975) mostraram inclusive interação promotora entre etileno, CO_2 e outras substâncias de crescimento sobre a germinação de *Xanthium pensylvanicum*. Em *Cucumis anguria* parece que a "respiração maior" das sementes mantidas em escuro é apenas consequência, e não causa, do caráter fotoblástico negativo, que induz uma maior atividade metabólica e o consequente desenvolvimento do eixo embrionário.

O fotoblastismo negativo de *Cucumis anguria* é claramente confirmado em outros experimentos com escuro contínuo ou com diferentes períodos de escuro. Por outro lado, os resultados deste trabalho mostraram que a luz vermelha promoveu acentuadamente a germinação de *Cucumis anguria*, confirmando os resultados obtidos por NORONHA et al. (1978). Em relação ao controle de escuro, a taxa de germinação de sementes mantidas em luz vermelha constante foi mais lenta, embora as porcentagens finais de germinação tenham sido similares. Em sementes de *Amaranthus caudatus* a 25°C , a luz vermelha também mostrou um ligeiro efeito retardatório na germinação em relação ao controle de escuro (KENDRICK e FRANKLAND, 1969). Por outro lado, ZOUAGHI, MALCOSTE e ROLLIN (1972), trabalhando com sementes fotoblásticas negativas de *Cucurbita pepo*, mostraram que as semen-

tes mantidas em luz vermelha contínua germinaram mais rapidamente do que as sementes mantidas em escuro contínuo, embora a porcentagem final de germinação tenha sido semelhante. Este resultado, portanto, foi o oposto daquele obtido para sementes de *Cucumis anguria*.

A germinação de sementes fotoblásticas negativas é controlada por fitocromo (MANCINELLI e BORTHWICK, 1964). A quantidade de fitocromo detectável parece aumentar em sementes germinadas em escuro, enquanto tal fato não se verifica em sementes germinadas em luz branca (MANCINELLI e TOLKOWSKY, 1968). YANIV, MANCINELLI e SMITH (1967) sugeriram que o controle da germinação é dependente da quantidade total de Fitocromo vermelho extremo (Fve), e não somente da quantidade relativa desse pigmento. A importância da quantidade de Fve foi mostrada em alguns trabalhos feitos com sementes fotoblásticas negativas: em alface var. Mary Queen, 40% do fitocromo total está sob a forma Fve (BOISARD, SPRUIT e ROLLIN, 1968) e em pepino, 75% do fitocromo é Fve (SPRUIT e MANCINELLI, 1969). Em sementes de *Cucumis anguria* o fitocromo na forma Fve também foi detectado nas sementes em quantidades muito baixas, possivelmente acima do valor limiar requerido para a germinação no escuro, sem necessidade da irradiação com vermelho (TAKAKI, et al., no prelo). Diversos autores (YANIV, MANCINELLI e SMITH, 1967; ROLLIN, MALCOSTE e EUDE, 1970) mostraram o aparecimento de fitocromo na forma Fve em sementes mantidas em escuro após irradiação com vermelho extremo. O aparecimento de Fve no escuro também parece ocorrer em sementes de *Amaranthus*

(KENDRICK e FRANKLAND, 1981), enquanto que em *Cucumis anguria*, o fitocromo total de sementes embebidas por 2 horas corresponde a uma mistura de fitocromo vermelho (Fv) e intermediários entre Fv e Fve, os quais em escuro reverteriam a Fve (TAKAKI et al., no prelo). Desse modo, a quantidade de fitocromo na forma Fve já existente nas sementes não embebidas ou o aparecimento de Fve durante o período de embebição são provavelmente responsáveis pela rápida germinação no escuro de *Cucumis anguria*. Para tentar explicar o efeito da luz vermelha em *Cucumis anguria* deve-se recorrer aos trabalhos de alguns autores citados em literatura. O aparecimento de fitocromo em sementes postas para embeber obedece a uma curva trifásica semelhante à verificada no processo de embebição. A primeira fase corresponde à hidratação do fitocromo pré-existente; a segunda fase a um período de latência, ("lag phase"), e a terceira fase à síntese "de novo" de fitocromo. Esta terceira fase está sujeita à ação de inibidores metabólicos (KENDRICK e FRANKLAND, 1981). KENDRICK, SPRUIT e FRANKLAND (1969), trabalhando com sementes de *Amaranthus caudatus*, observaram que sob luz vermelha a síntese de fitocromo total nas sementes foi menor do que nas sementes mantidas em escuro, embora a primeira fase do aumento do fitocromo (hidratação do fitocromo pré-existente) tenha sido semelhante em vermelho e escuro constantes. Em sementes de *Cucurbita pepo* observou-se também que o fitocromo, que é sintetizado durante a 2ª fase, desaparece quando as sementes são irradiadas com luz vermelha; enquanto isso, a quantidade de Fve detectável diminuiu gradativamente em todos os tratamentos (escu-

ro, vermelho e vermelho extremo) (ZOUAGHI et al., 1972). KENDRICK e FRANKLAND (1968) mostraram também que havia uma queda no conteúdo de Fve em plantinhas de *Amaranthus caudatus* após 10 minutos de luz vermelha. Em *Cucumis anguria*, o vermelho contínuo poderia acarretar uma queda do nível de Fve pré-existente nas sementes, provavelmente por destruição, de modo que, antes que o balanço entre produção e destruição de fitocromo fosse atingido, haveria um ligeiro retardamento na germinação em relação às sementes mantidas no escuro, as quais já apresentariam o Fve numa quantidade acima do valor limiar capaz de induzir a germinação.

Além dos resultados dos experimentos com escuro e luz vermelha contínuos, outros experimentos sugerem que esses dois tratamentos atuam de maneira diferente na germinação de *Cucumis anguria*. Foram observadas diferenças entre os efeitos de luz vermelha e escuro tanto em função da aplicação desses tratamentos após diferentes períodos de embebição prévia em luz branca, como em função da duração dos tratamentos. Em *Cucumis anguria*, o período prévio de embebição parece afetar a velocidade inicial da resposta das sementes à luz vermelha. Aparentemente, dentre os períodos de embebição prévia testados, as sementes se mostraram mais sensíveis à luz vermelha após 12 horas de embebição, quando a porcentagem de aumento de peso fresco foi de cerca de 39% (Figura 1). De acordo com TAKAKI et al. (no prelo), após esse período de embebição já está ocorrendo o segundo aumento na quantidade de fitocromo detectável em *Cucumis anguria*, provavelmente devido à síntese

"de novo". Ainda segundo estes autores, esse aumento começa por volta de 4 a 6 horas após o início da embebição. Diversos trabalhos têm mostrado a influência do período de embebição prévia, antes do tratamento luminoso. Em *Stevia rebaudiana* o período de embebição prévia não alterou a porcentagem, mas acelerou a velocidade inicial de germinação dos aquênios (FELIPPE et al., 1971). Para sementes de alface, fotoblásticas positivas, o melhor efeito promotor da luz vermelha, numa dada intensidade luminosa, é obtido após o período de 8 a 20 horas de embebição no escuro (BORTHWICK et al., 1954; TOOLE, 1973). Em esporos de *Matteucia struthiopteris* verificou-se ser necessário um período prévio de embebição para que a resposta à luz vermelha ocorresse, sendo que para períodos de vermelho de até 3 dias a germinação aumentava em função do aumento do período prévio de escuro (JARVIS e WILKINS, 1973). Em *Cucumis anguria*, períodos de embebição prévia em luz branca variando de 1 a 7 dias não afetaram a resposta das sementes aos diferentes períodos de escuro (Figura 3). Por outro lado, observou-se um ligeiro decréscimo no efeito da luz vermelha em função do aumento do período de embebição prévia em luz branca, a partir de 24 horas. Esse decréscimo ocorreu principalmente quanto às porcentagens finais de germinação, enquanto que em sementes fotoblásticas positivas de alface o aumento do período de embebição prévia provocou um decréscimo na velocidade de germinação, e não na porcentagem final (LEWAK e KHAN, 1977). Não se observou na literatura muitos dados a respeito da influência do período de embebição prévia em luz branca na germinação de sementes fotoblás

ticas negativas, todavia será levantada aqui uma hipótese a respeito da diferença de comportamento das sementes submetidas a períodos de luz vermelha e escuro após embebição em luz branca. Argumenta-se que a luz branca, além de provocar uma queda no conteúdo de fitocromo total (KENDRICK e FRANKLAND, 1981), manteria um equilíbrio fotoestacionário do fitocromo em que haveria predominância de compostos intermediários na fotoconversão de Fv a Fve e vice-versa. No momento em que as sementes são colocadas para embeber em luz branca ocorre um aumento no conteúdo de fitocromo detectável. Esse aumento é, no início da embebição, decorrente da reidratação do fitocromo pré-existente, mas depois ocorre devido à síntese "de novo" de fitocromo na forma Fv (KENDRICK, 1976). Esse aumento cessaria após algum tempo de embebição. Em sementes de *Amaranthus* mantidas em escuro verificou-se que um segundo aumento (devido à síntese "de novo") ocorreu 10 horas antes do primeiro sinal visível de germinação e continuou por 72 horas, permanecendo então constante (KENDRICK et al., 1969). Em *Cucumis anguria*, o aumento no conteúdo de fitocromo total cessou após cerca de 40 horas de embebição no escuro (TAKAKI, et al., no prelo). Portanto, nas primeiras horas de embebição haveria uma maior disponibilidade de Fv, sendo que as sementes seriam relativamente mais sensíveis à luz vermelha. Gradativamente, com o decorrer do tempo de embebição, haveria um decréscimo no nível de Fv em sementes mantidas sob luz branca, o que iria acarretar uma menor taxa de resposta da semente à luz vermelha à medida em que se aumentasse o tempo de embebição prévia. A luz branca causaria dois efeitos princi-

país nas sementes de *Cucumis anguria*: a) manutenção de um nível de Fve abaixo do valor limiar capaz de causar germinação e b) provocaria uma diminuição no conteúdo de Fv, que seria acompanhada de um aumento na quantidade de intermediários nas reações de conversão de Fv a Fve. Se o período de luz branca fosse seguido pelo escuro, ocorreria uma diminuição da velocidade de desaparecimento do Fve, de modo que predominariam as reações que levariam à formação de Fve a partir dos compostos intermediários. Dessa forma haveria um aumento na quantidade de Fve até o valor limiar capaz de induzir germinação (KENDRICK, 1976; TAKAKI et al., no prelo).

A luz vermelha e o escuro quando aplicados por períodos limitados, após embebição em luz branca, tiveram efeitos similares àqueles obtidos com a aplicação contínua desses tratamentos na germinação de *Cucumis anguria*. Observou-se aqui que o período de 24 horas de vermelho foi menos efetivo que igual período de escuro, após 24 horas de embebição em luz branca (Compare as Figuras 3A e 4B).

Tem-se observado uma variação quanto ao período de luz vermelha necessário para causar germinação de sementes. Em sementes de *Rumex obtusifolius*, um período de 15 minutos de vermelho já é suficiente para induzir a germinação máxima (VICENTE et al., 1962; TAKAKI, KENDRICK e DIETRICH, 1981). Em aquênios de *Stevia rebaudiana* verificou-se que períodos de 60 minutos de vermelho promoviam a germinação em relação ao controle de escuro (RANDI e FELIPPE, 1981). Em certos cultivares de alface, 1 a 2 mi-

nutos de luz causam altas porcentagens de germinação, enquanto que em sementes de fumo um choque de luz de 0,01 segundo já é suficiente para causar germinação (CARVALHO e NAKAGAWA, 1980). Verificou-se neste trabalho, por outro lado, que para a indução da germinação de *Cucumis anguria* pela luz vermelha há necessidade de exposição entre 6 e 12 horas, já que houve promoção com 12 horas de vermelho, enquanto que o período de 6 horas mostrou-se inefetivo. A diferença que em geral se observa entre o comportamento de sementes fotoblásticas positivas e negativas, quanto à necessidade de períodos diferentes de luz vermelha, deve-se provavelmente ao estado do fitocromo nas sementes. Sementes fotoblásticas positivas, como *Rumex*, apresentariam a maior parte de seu fitocromo pré-existente sob a forma Fv, de modo que elas são muito sensíveis à luz vermelha. Já as sementes fotoblásticas negativas, como *Cucumis anguria*, apresentariam uma quantidade muito menor de Fv quando do final do período de maturação, o que as tornaria menos sensíveis à luz vermelha. Dessa forma, essas sementes necessitariam de períodos de luz vermelha mais longos do que as sementes fotoblásticas positivas (KENDRICK, 1976). Alguns autores mostraram, por outro lado, que sementes fotoblásticas negativas tornavam-se sensíveis a curtos períodos de luz vermelha quando eram pré-irradiadas com vermelho extremo constante, que provocaria um aumento na quantidade de Fv (MANCINELLI e BORTHWICK, 1964; MANCINELLI, BORTHWICK e HENDRICKS, 1966; YANIV et al., 1967).

Em tratamentos em que as sementes de *Cucumis anguria* eram embebidas em etrel, as placas de Petri eram

vedadas com fita adesiva para evitar o máximo possível que o etileno liberado se perdesse. O efeito da vedação das placas foi testado em sementes embebidas em água para se verificar se a concentração de gases liberados pelas sementes, como o etileno e o CO_2 , não estaria afetando a germinação em luz branca. KEYS et al. (1975) mostraram que em sementes de alface germinadas no interior de recipientes hermeticamente vedados havia concentração de etileno e CO_2 endógenos, os quais interferiam na germinação. Os resultados aqui apresentados indicam que a vedação das placas "per se" não afetou a germinação de *Cucumis anguria*. Por estes resultados, todavia, não se pode concluir que não esteja havendo concentração de gases endógenos no interior das placas vedadas, ou que estes gases não estejam interferindo na germinação das sementes. Provavelmente o que ocorreu foi que a fita adesiva utilizada representou uma barreira muito precária contra o escape dos gases endógenos eventualmente liberados, devido principalmente à sua porosidade. Isso ficou parcialmente demonstrado em alguns testes feitos, nos quais injetou-se etileno puro em placas de Petri de plástico vedadas com fita adesiva. Nestes testes verificou-se uma taxa relativamente rápida de desaparecimento do etileno do interior das placas testadas.

O efeito de reguladores de crescimento como o GA_3 , etileno e cinetina sobre a germinação de sementes de várias espécies tem sido muito comprovado (OLATOYE e HALL, 1972; WAREING, STADEN e WEBB, 1972; KUMAR e RANGASWAMY, 1977). Em geral tem-se admitido que o efeito da

aplicação de um regulador de crescimento serve como parâmetro para indicar se a substância endógena análoga (hormônio vegetal) é responsável ou não, na planta, por um determinado efeito - no caso a germinação de sementes (FELIPPE, 1979).

Neste trabalho foram testados GA_3 , 6-BA e etrel na germinação de *Cucumis anguria*. Os resultados obtidos vieram confirmar dados anteriores sobre o efeito dessas substâncias de crescimento em sementes dessa espécie (FELIPPE e LITJENS, 1979 e 1980). Observou-se que 6-BA promoveu a germinação, embora o seu efeito tenha sido muito menor do que aquele observado para sementes mantidas em GA_3 e etrel. IKUMA e THIMANN (1963) testaram cinetina na germinação de alface, mostrando que essa substância promoveu muito fracamente a germinação no escuro, ao contrário do GA_3 que foi altamente promotor. Cinetina também se revelou inefetiva na germinação de *Erica junonia* (SMALL e GARNER, 1980). RANDI e FELIPPE (1981) mostraram que 6-BA não promove a germinação de aquênios de *Stevia rebaudiana* mantidos no escuro, mesmo após 11 dias de experimento. Por outro lado, VÁLIO, KIRSZENZAFT e ROCHA (1972) demonstraram que 6-BA promove a germinação de aquênios de *Bidens pilosa*, embora menos efetivamente do que a luz vermelha. Comparando-se os resultados obtidos com GA_3 e etrel na germinação de *Cucumis anguria*, observa-se que, embora ambas as substâncias tenham causado porcentagens de germinação similares ao final dos experimentos, o etrel claramente acelerou a germinação de *Cucumis anguria* em relação ao GA_3 .

Portanto, dentre as substâncias de crescimentos testadas, o etrel revelou-se mais efetivo na promoção da germinação. Comparando-se o efeito do etrel com a luz vermelha observou-se que as curvas de germinação foram semelhantes em termos de velocidade de promoção, embora a luz vermelha pareça ser ligeiramente mais efetiva do que o etrel. Em sementes de alface, fotoblásticas positivas, a luz vermelha promoveu mais rapidamente a germinação do que o GA_3 (LEWAK e KHAN, 1977), enquanto que em sementes em dormência secundária a luz vermelha também foi o agente mais efetivo na quebra da dormência, vindo a seguir o etileno (SPEER, HSIAO e VIDAVER, 1974). Em aquênios de *Stevia rebaudiana* a luz vermelha também revelou-se muito mais efetiva que o GA_3 na quebra da dormência (RANDI e FELIPPE, 1981). Deve-se ressaltar, entretanto, que dentre todos os fatores testados na germinação de *Cucumis anguria* nenhum se revelou tão efetivo como o tratamento de escuro constante.

Levando-se em conta que o efeito relativamente lento de 6-BA e GA_3 pudesse ser devido a algum tipo de impermeabilidade da casca da semente a essas substâncias, foram feitos experimentos para se verificar se 6-BA e GA_3 realmente penetravam nas sementes durante as primeiras 24 horas de embebição. Os resultados indicaram que tanto 6-BA como GA_3 foram detectados nos extratos das sementes embebidas durante 24 horas. Alguns trabalhos tem mostrado a importância do envoltório da semente na expressão do efeito de reguladores de crescimento como o GA_3 ; por exemplo, em sementes de *Avena fatua* mostrou-se que a casca era uma

das principais barreiras à entrada de GA_3 (HSIAO, 1979). São também citados casos em que a escarificação das sementes fez com que a resposta ao GA_3 fosse aumentada (TAYLORSON, 1976; TAYLORSON e HENDRICKS, 1976). TAYLORSON (1976), trabalhando com sementes de *Barbarea vulgaris*, observou que em sementes embebidas em solução de GA_3 a captação máxima dessa substância foi completada dentro de 24 horas, embora a germinação tenha sido relativamente baixa (25%) após 7 dias em escuro. Esse autor também mostra que a máxima captação de GA_3 ocorre depois que a captação máxima de água foi atingida, indicando que a entrada de GA_3 não está totalmente relacionada à de água. Embora não tenham sido feitas curvas para captação de GA_3 e 6-BA em função do tempo, ficou demonstrado que em sementes de *Cucumis anguria* o efeito do GA_3 e 6-BA na germinação, em princípio, não pode ser relacionada à impermeabilidade de casca ou à penetração lenta das substâncias no interior das sementes. Não foi feita neste trabalho uma avaliação da quantidade relativa das substâncias de crescimento que realmente penetraram nas sementes. TAYLORSON (1976) mostrou que, em *Barbarea vulgaris*, a captação máxima de GA_3 pelas sementes correspondeu a 2% da concentração externa.

Para as sementes embebidas em etrel não foi feito um teste específico para se verificar se essa substância havia penetrado nas sementes, uma vez que o próprio efeito do etrel é uma indicação segura de que as sementes absorveram essa substância. Ao que tudo indica, a casca de sementes de *Cucumis anguria* não constitui uma barreira drásti-

ca à penetração de substâncias de crescimento, já que a própria morfologia da semente contribui nesse sentido, apresentando a casca uma solução de continuidade na região da micrópila por onde as substâncias poderiam penetrar sem obstáculos. Entretanto essa é apenas uma hipótese. Para se verificar o verdadeiro papel da micrópila na penetração de substâncias no interior das sementes, seria necessária a realização de novos experimentos em que a micrópila fosse obstruída à entrada de substâncias, mas de modo que não fosse prejudicada a protrusão da radícula. Desse modo ficaria definitivamente demonstrada a permeabilidade ou não da testa ao 6-BA ou ao GA_3 . Os experimentos aqui realizados simplesmente demonstraram que essas substâncias de crescimento penetraram com relativa rapidez no interior das sementes.

Muitos trabalhos tem mostrado a interação entre luz e substâncias de crescimento, quando da sua aplicação conjunta, na germinação de várias sementes (LEFF, 1964; SPEER et al., 1974; KEYS et al., 1975; RAO, SANKHLA e KHAN, 1975; BEWLEY, 1980; OOTA e KOJIMA, 1980). Neste trabalho em que foram testadas doses subpromotoras ou ligeiramente promotoras de luz vermelha, 6-BA, etrel e GA_3 , não foi observada qualquer tipo de interação entre esses tratamentos. SMALL e GARNER (1980), trabalhando com sementes de *Erica junonia*, também não observaram interação entre cinetina e GA_3 . GA_3 não apresentou nenhum efeito quando aplicado juntamente com cinetina ou etrel na germinação de sementes de alface, enquanto que etrel mais cinetina reve-

laram-se efetivos em quebrar a dormência (RAO et al., 1975). Neste trabalho, etrel e luz vermelha apresentaram efeito promotor na germinação de *Cucumis anguria*, embora não tenha sido observada interação entre eles. Esse efeito isolado do etrel ou da luz vermelha manifestou-se também nos outros tratamentos em que eles foram aplicados juntamente com 6-BA e(ou) GA_3 . De qualquer maneira, devido ao fato de terem sido utilizadas doses baixas de etrel e luz vermelha, o efeito desses tratamentos foi muito pequeno em relação ao controle de água em escuro constante. Alguns desses resultados parecem sugerir que luz vermelha, giberelinas, citocininas e etileno devem atuar por caminhos diferentes na indução da germinação de sementes de *Cucumis anguria*. Em *Xanthium pensylvanicum* mostrou-se que o efeito do GA_3 na germinação não ocorre por intermédio da produção de etileno. Por outro lado, observou-se um efeito positivo do 6-BA sobre a evolução do etileno endógeno nessas sementes (ESASHI et al., 1975). Em *Cucumis anguria* existe uma grande defasagem entre a porcentagem e a taxa de germinação de sementes embebidas em 6-BA e etrel, de modo que provavelmente o efeito de 6-benziladenina não seja mediado pelo etileno. A não interação entre 6-BA e GA_3 na germinação de *Cucumis anguria* parece indicar também que as duas substâncias atuam por caminhos diferentes, confirmando resultados obtidos por BEWLEY (1980), com sementes de alface. Diversos trabalhos deverão ainda ser realizados para que se possa conhecer melhor o modo de ação do GA_3 em *Cucumis anguria*, todavia, da mesma maneira que foi observado para 6-BA, essa ação provavelmente não é por in-

termédio da síntese de etileno, uma vez que não se verificou nenhum tipo de interação entre essas substâncias. Conclusão semelhante foi levantada por BURDETT e VIDAVER (1971) e DUNLAP e MORGAN (1977), em experimentos realizados com sementes de alface. Com relação à interação entre luz vermelha e GA_3 , as observações ainda não são inteiramente conclusivas. Os resultados indicam que, em sementes de *Cucumis anguria*, o efeito da luz vermelha não deve ocorrer devido ao aparecimento de giberelinas. Em outras palavras, o Fve formado não causaria inicialmente produção de giberelinas. Em sementes de alface, LEWAK e KHAN (1977) observaram que a aplicação de um inibidor da síntese de giberelina (AMO-1618) não afetava a estimulação da germinação pela luz vermelha. BEWLEY, NEGBI e BLACK (1968) mostraram que a presença de Fve não induzia a produção de giberelina em sementes de alface, pelo menos durante os primeiros 30 minutos de ação. A relação entre a luz e GA_3 ainda não está muito bem definida quanto à germinação de sementes. Em *Cucumis anguria*, o efeito do ácido giberélico comparado com o efeito da luz vermelha, ou o resultado de aplicação conjunta de ambos os tratamentos, parecem sugerir que o GA_3 não induz o aparecimento de Fve, sendo que a promoção da germinação por um ou outro tratamento deva seguir vias diferentes. FELIPPE e LITJENS (1979) mostraram que em sementes de *Cucumis anguria* o GA_3 foi inefetivo em reverter o efeito inibitório do vermelho extremo na germinação. Da mesma maneira, em sementes de alface, IKUMA e THIMANN (1963) determinaram que o GA_3 pode substituir a luz vermelha, embora seu efeito não seja revertido por vermelho extremo. TAYLORSON e HENDRICKS

(1976), trabalhando com sementes fotoblásticas negativas de *Lamium amplexicaule*, sugeriram que deva ocorrer participação do Fve na expressão da ação do GA₃, o que provavelmente não é o caso de *Cucumis anguria*. Quanto à possível interação entre luz e etileno, a única conclusão a que se pode chegar é que ambos os tratamentos são quase que igualmente efetivos na promoção da germinação de *Cucumis anguria*. Nos experimentos em que etrel e luz vermelha foram aplicados conjuntamente não foi observada nenhuma interação entre os dois tratamentos, enquanto que a promoção da germinação pela luz vermelha, que se verifica na presença ou ausência de etileno (e vice-versa), parece mostrar que não há um relacionamento estreito entre esses dois fatores na indução da germinação. Esses resultados de certa forma concordam com alguns trabalhos feitos com sementes e plântulas de alface, que sugerem que o efeito da luz vermelha não deve ocorrer por intermédio do aumento da síntese de etileno, sendo que ambos os fatores devem agir independentemente (BURDETT e VIDAVER, 1971; JONES, LOERCHER e FRENKEL, 1976). Resultados aqui apresentados parece levar à conclusão de que a luz vermelha, ou em outras palavras a presença de Fve, e(ou) o etileno estão envolvidos nas etapas iniciais da indução da germinação de *Cucumis anguria*. SPIESS e KROUK (1977), trabalhando com esporos de *Polypodium aureum*, concluíram que os processos de germinação são desencadeados pelo fitocromo, sendo então ativados pelas substâncias de crescimento, o que resulta na protrusão do rizóide. Em *Cucumis anguria* o fitocromo presente nas sementes, quando estas são colocadas para embeber no escuro, deve desencadear

dear toda uma seqüência de processos metabólicos que conduzirão à protrusão da radícula. O grande problema seria descobrir qual o hormônio que atuaria como principal efetuador ou que mediaría a ação do fitocromo durante as etapas iniciais da germinação no escuro. Para se tentar ampliar as conclusões obtidas com os experimentos de germinação foram feitos testes para se verificar a presença de gibberelinas, citocininas e etileno em sementes de *Cucumis anguria* secas ou mantidas em condições de luz branca e escuro durante a embebição. Não foram feitos testes específicos para auxinas, uma vez que FELIPPE e LITJENS (1979) mostraram que estas substâncias não promovem a germinação de *Cucumis anguria* em luz branca, podendo-se inferir portanto que auxinas não participam da indução da germinação.

Diversos trabalhos têm mostrado que a aplicação de tratamentos promotores da germinação (por ex., períodos de baixa temperatura) podem provocar um aumento no conteúdo de citocininas em sementes, as quais iriam induzir a germinação (WEBB e DUMBROFF, 1969; STADEN e WAREING, 1972; GREGOROVÁ, 1977). STADEN e WAREING (1972) observaram em sementes de *Rumex obtusifolius* que a aplicação de um período de luz vermelha provocava um rápido aumento no conteúdo de citocininas endógenas. Verificaram também que este aumento podia ser revertido se o tratamento com luz vermelha fosse seguido por irradiação com vermelho extremo, indicando participação do fitocromo no processo. Citocininas também foram detectadas durante a germinação de sementes de café, estando sua presença associada com a indução da germinação.

nação dessas sementes (VÁLIO, 1976). Em plântulas de *Amaranthus caudatus* - cujas sementes mostram fotoblastismo negativo - mantidas por 24 horas em luz branca e escuro, observou-se uma maior atividade citocinínica nas plântulas mantidas em luz; em plântulas mantidas em escuro, a atividade citocinínica foi muito baixa (KOHLEK, DORFLER e GORING, 1980). De acordo com os resultados aqui obtidos, não foi mostrada atividade citocinínica nos extratos das sementes embebidas em luz e escuro. A ausência desse hormônio nas sementes embebidas em escuro, tanto após 24 horas, quando as sementes ainda não haviam germinado, como após 48 horas, quando já se observava a protrusão da radícula, parece que as citocininas não devem estar envolvidas na indução da germinação. Ressalvas em relação à metodologia devem ser feitas. A primeira é que um inibidor poderia estar mascarando o efeito das citocininas. Além disso, o bioteste utilizado não é dos mais sensíveis, sendo bem menos sensível que o do calo de tabaco, como foi mostrado em FAZIO (no prelo). Quanto à interação com outros hormônios, as pesquisas sobre esse assunto ainda não são definitivas. MICHNIEWICZ e KAMIENSKA (1967), trabalhando com sementes de espécies diversas, não detectaram giberelinas em sementes tratadas com cinetina, exceto em *Cichorium intybus*. Por outro lado, ESASHI et al. (1975) mostraram que benziladenina apresentou efeito positivo na evolução de etileno endógeno em sementes de *Xanthium pensylvanicum*.

O papel das giberelinas na germinação de sementes tem sido muito estudado. GA_3 foi encontrado tanto em

sementes maduras como imaturas, como por exemplo em sementes de cevada (MAYER e SHAIN, 1974). Giberelinas também foram observadas em extratos de aquênios férteis de *Stevia rebaudiana*, não tendo sido detectadas em aquênios estéreis (RANDI, 1980). A exposição dos resultados de diversos trabalhos tem mostrado a relação entre giberelinas e fitocromo (STODDART, 1976). Por exemplo, observou-se que luz vermelha induz o aparecimento de giberelinas em folhas de plantinhas estioladas de milho, sendo que o vermelho extremo revertia parcialmente esse efeito, sugerindo ser o fitocromo o receptor envolvido (COOKE e SAUNDERS, 1975; COOKE, SAUNDERS e KENDRICK, 1975). Os resultados indicam que giberelinas parecem não ocorrer em sementes de *Cucumis anguria* não embebidas. Após a embebição das sementes observou-se o aparecimento de atividade giberelínica principalmente nos extratos não purificados de sementes embebidas em luz branca e escuro. Os resultados obtidos foram insuficientes para se poder relacionar a promoção da germinação no escuro com o aparecimento de giberelinas nas sementes. Portanto, a germinação de *Cucumis anguria* não deve ocorrer devido a um aumento no conteúdo desse hormônio. Do mesmo modo, VÁLIO (1976) observou uma relação inversa entre condições boas de germinação e conteúdo de giberelinas. Em *Cucumis anguria*, a ação do fitocromo não parece estar, pelo menos em princípio, relacionada ao caminho de ação de giberelinas, confirmando conclusões de BEWLEY et al. (1968) e LEWAK e KHAN (1977).

Os resultados dos experimentos com nitrato de

prata mostraram que essa substância inibiu a germinação de *Cucumis anguria*. Essa inibição não foi devida a algum efeito tóxico do AgNO_3 sobre as sementes, mas provavelmente devido à inibição da ação do etileno endógeno (BEYER Jr, 1976). Em alguns trabalhos tem sido apresentado que o efeito do nitrato de prata irá depender também da concentração do etileno endógeno, isto é, concentrações altas de etileno reverterão em graus diferentes a inibição pelo ion Ag^+ , sugerindo competição ou interação entre etileno e AgNO_3 (BEYER Jr, 1979; LIEBERMAN, 1979). Enquanto em plântulas de ervilha, que são sensíveis a concentrações muito baixas de etileno, AgNO_3 a 100 ppm provocou a máxima inibição (LIEBERMAN, 1979), em sementes de *Cucumis anguria* a concentração mais efetiva do AgNO_3 testada foi a de 500 ppm. Portanto, a quantidade de etileno produzida pelas sementes pode contrabalançar o efeito do nitrato de prata em concentrações de até cerca de 100 ppm; soluções mais concentradas de AgNO_3 já são suficientes para iniciar a inibição da ação do etileno endógeno, inibindo assim a germinação de maxixe. Em *Cucumis anguria*, a maior inibição da germinação ocorreu quando o AgNO_3 esteve presente entre 36 e 48 horas após o início do experimento. Nessas sementes tem-se observado que esse é um período em que geralmente se inicia a protrusão das radículas, isto é, a fase visível da germinação. Considerando-se o efeito do AgNO_3 no metabolismo do etileno (BEYER Jr, 1976, 1979) pode-se supor que o etileno esteja envolvido na germinação de *Cucumis anguria* e que sua ação seja crítica no período imediatamente anterior ao início da protrusão da radícula. A pre-

sença do AgNO_3 dentro das primeiras 36 horas de embebição inibiria apenas parte do metabolismo e (ou) ação do etileno, de modo que a semente recuperaria parte de sua capacidade de germinação até o final do experimento (após 72 horas). A aplicação do AgNO_3 após 48 horas do início da embebição apresentou muito pouco efeito na germinação, já que após esse período o processo germinativo estava praticamente concluído para a maioria das sementes tratadas.

Etileno é um agente regulador de crescimento produzido por sementes em germinação, embora ainda não se saiba exatamente seu papel (MAYER e SHAIN, 1974). Diversos trabalhos têm mostrado a ocorrência de liberação de etileno durante a germinação de sementes de diversas espécies (ESASHI e LEOPOLD, 1969; KEYS et al., 1975; ADKINS e ROSS, 1981). Em *Cucumis anguria* foi mostrada a presença de etileno após 24 e 48 horas do início da embebição. Nas condições utilizadas para as leituras de evolução do etileno endógeno, os resultados sugerem que deva ocorrer uma maior produção de etileno dentro do período situado entre 24 e 48 horas de embebição, que é o período dentro do qual geralmente se verifica a protrusão das radículas na maioria das sementes. ADKINS e ROSS (1981), trabalhando com sementes de *Avena fatua*, observaram que durante a germinação de sementes não dormentes ocorre um pico de liberação de etileno antes da protrusão da radícula. Esses autores observaram também que ocorria um pico maior de liberação de etileno durante as primeiras horas de embebição. Em *Cucumis anguria* não se observou a presença de etileno nos fras

cos após 6 e 12 horas de embebição, indicando que durante esse período a produção de etileno deve ser baixa, sendo que o aumento de produção deve iniciar-se por volta de 24 horas de embebição e atingir um máximo longo antes do início da germinação visível. Em pepino observou-se que a produção máxima de etileno ocorreu em plântulas com 48 horas de idade, mantidas em luz branca ou escuro (SALTVEIT Jr. e PHARR, 1980). DUNLAP e MORGAN (1977) observaram também que em sementes de alface a produção de etileno foi baixa durante as primeiras horas de embebição, aumentando simultaneamente com os primeiros sinais visíveis de germinação. Segundo esses autores, a produção de etileno esteve correlacionada com a presença de sementes germinadas no interior dos frascos. Em *Cucumis anguria* também houve uma certa relação entre a presença de etileno e o número de sementes germinadas nos frascos. Essa correlação foi visível nos frascos mantidos em luz branca, onde as porcentagens de germinação foram incomumente altas. Duas hipóteses principais foram levantadas para se tentar explicar esse fato. A primeira hipótese foi de que o componente vermelho extremo da luz branca estivesse sendo absorvido ou desviado pelas paredes dos frascos, de modo que houvesse uma predominância do comprimento de onda vermelho incidindo sobre as sementes. Frascos contendo sementes de *Cucumis anguria* foram colocados sob luz vermelho extremo, tendo-se observado nesses frascos uma grande inibição da germinação. Esse teste mostrou, dessa maneira, que a primeira hipótese não devia estar ocorrendo. A segunda hipótese considerou que haveria um acúmulo gradativo de etileno no interior dos

frascos, o qual seria proveniente de algumas sementes que, dado o polimorfismo germinativo na população de sementes, tem a capacidade de germinar em luz branca. Esse etileno seria responsável, em maior ou menor grau, pela germinação das sementes em luz branca. KEYS et al. (1975), por exemplo, verificaram que em frascos vedados onde foram germinadas sementes de alface havia um acúmulo de $3,5 \mu\text{l/l}$ de etileno após 5 dias. Levando-se em conta a segunda hipótese, no caso da germinação de *Cucumis anguria*, deve-se considerar que, como foi mencionado, uma determinada quantidade de etileno esteja sendo produzida por sementes mantidas em luz branca. A quantidade de etileno produzida por essas sementes deve ser relativamente baixa durante as primeiras horas, insuficiente para causar germinação (no caso de não estar havendo acúmulo de etileno na atmosfera circunvizinha). A diferença entre as sementes mantidas em diferentes tratamentos luminosos ocorre provavelmente no período que antecede a protrusão da radícula, quando deve ocorrer um grande aumento na produção de etileno nas sementes mantidas em escuro. Esse aumento não ocorreria em sementes embebidas em luz branca, o que explicaria a menor porcentagem de germinação de *Cucumis anguria* nesse tratamento. De qualquer maneira, parece que em maxixe a luz apresenta um efeito inibitório na produção de etileno, um efeito já documentado em vários sistemas biológicos (OLATOYE e HALL, 1972). Em sementes de *Spergula arvensis* observou-se também que a luz branca inibe a produção de etileno, e que a germinação é bem menor em luz do que em escuro (OLATOYE e HALL, 1972). Caso essa hipótese seja considerada no caso de

Cucumis anguria, e considerando-se que o metabolismo e(ou) a ação do etileno esteja ligado ao estado do fitocromo nas sementes, o comprimento de onda relacionado com a inibição seria o vermelho extremo. A luz vermelha provavelmente não causaria inibição do etileno, como no caso do gancho plumular (FELIPPE, 1979), já que o vermelho promove a germinação de *Cucumis anguria* (NORONHA et al., 1978). Ainda assim deve-se ter cautela em se afirmar que o etileno é o efetuator do fitocromo em sementes de *Cucumis anguria*. Os trabalhos realizados nessa área ainda não são definitivos. DRENNAN et al. (1978) postularam que em sementes de *Ambrosia artemisifolia* o etileno aparentemente inicia os processos metabólicos que conduzirão à quebra da dormência. DUNLAP e MORGAN (1977), por outro lado, acreditam que o aumento da produção de etileno, verificado durante a germinação de alface, apenas reflita processos de crescimento relativos à germinação, e não seja responsável pelo início da germinação. Alguns trabalhos um pouco mais recentes, como o do HALL (1979), sugerem que a liberação do etileno pela semente não esteja relacionada à produção de etileno "de novo", mas sim à liberação de etileno produzido endogenamente e que foi armazenado nos tecidos da semente. Dessa maneira, a emanação de etileno não estaria relacionada à síntese desse gás, assim como a concentração no espaço aéreo não refletiria a concentração celular. Essa hipótese de que as sementes apresentem uma quantidade de etileno armazenada e que é liberada quando o tecido sofre hidratação não explica satisfatoriamente o fato das sementes de *Cucumis anguria* apresentarem maior liberação de etileno em escuro do

que em luz branca. Dessa maneira fica excluída a possibilidade de que a luz branca estaria inibindo a ação do etileno endógeno, uma vez que nesse caso a quantidade de etileno liberado deveria ser aproximadamente igual em ambos os tratamentos. De qualquer maneira, duas hipóteses principais podem ser levantadas para o papel do etileno na germinação de *Cucumis anguria*: a) a luz branca estaria inibindo a produção de etileno; b) a maior liberação de etileno em escuro seria apenas reflexo de uma maior atividade metabólica desencadeada nessas condições.

RESUMO

Sementes de *Cucumis anguria* são fotoblásticas negativas à temperatura de 25°C. O fotoblastismo não está relacionado a maior ou menor embebição das sementes em luz branca e escuro, ou a diferenças quanto à taxa de respiração de ambos os tratamentos.

A germinação é promovida pela luz vermelha, embora a taxa seja menor do que o controle de escuro constante. A resposta das sementes a diferentes períodos de escuro independe do período de embebição prévia em luz branca. Por outro lado, a luz vermelha é mais efetiva quando aplicada num período entre 6 e 24 horas de embebição prévia em luz branca.

O período mínimo de escuro capaz de causar germinação situa-se entre 12 e 24 horas, enquanto que o período mínimo de vermelho encontra-se entre 6 e 12 horas.

6-BA, GA₃ e etrel promovem a germinação em luz branca, sendo que o etrel foi a substância mais efetiva na promoção. 6-BA foi a substância que menor efeito causou na germinação.

O efeito relativamente lento de 6-BA ou GA₃ não está relacionado a algum mecanismo de impermeabilidade da casca a essas substâncias, já que elas penetraram nas sementes durante as primeiras 24 horas de embebição.

Não há interação entre doses subpromotoras de luz vermelha, GA₃, 6-BA e etrel na germinação de sementes de *Cucumis anguria*; quando há promoção, mesmo pequena, esta é causada por efeito isolado ou do etrel ou da luz vermelha.

Não foi mostrada a presença de citocininas durante a germinação das sementes após 24 e 48 horas do início da embebição.

Foi mostrada a presença de giberelinas em extratos de sementes embebidas em luz branca e escuro após 24, 48 e 72 horas de embebição. Houve diferenças estatísticas entre os dois métodos de extração utilizados (extratos purificados e não purificados). Esses resultados mostraram que a germinação de *Cucumis anguria* não pode também ser explicada em função do aumento do conteúdo de giberelinas nas sementes embebidas em escuro.

A germinação de *Cucumis anguria* é inibida pelo nitrato de prata, em concentrações acima de 100 ppm. A

inibição não é devida a algum efeito tóxico do ion Ag^+ , mas provavelmente devido à inibição da ação do etileno endógeno.

O nitrato de prata agiu mais efetivamente quando aplicado por volta de 24 horas após o início da embebição das sementes. Esses resultados sugerem que a ação do etileno seja mais efetiva após um intervalo de aproximadamente 24 horas de embebição.

Foi mostrada a presença de etileno em frascos vedados contendo sementes embebidas de *Cucumis anguria*. A liberação de etileno endógeno esteve correlacionada com a taxa de germinação. Sementes embebidas em escuro apresentaram maior porcentagem de germinação e maior liberação de etileno do que sementes embebidas em luz branca. O etileno só pode ser detectado a partir de 24 horas de embebição.

Estes resultados sugerem que o etileno pode estar envolvido na indução da germinação de *Cucumis anguria*.

SUMMARY

Seeds of *Cucumis anguria* exhibit a positive photoblastic reaction at 25°C. This photoblastism is not related to the greater or smaller imbibition rate of the seeds under white light and dark, or to the different respiration rate in both the treatments.

The germination is promoted by red light, although the germination rate was smaller than the dark control. The seed response to different dark periods is not affected by a preceeding exposure to white light. On the other hand, red light was more effotive when applied after a period between 6 and 24 hours of prior imbibition under white light.

The shortest dark period capable of initiating germination is between 12 and 24 hours, while the shortest red period is between 6 and 12 hours.

6-BA, GA₃ and ethrel promote germination under white light. Ethrel was the most effective substance to overcome the light inhibition while 6-BA was the least effective.

The slow relative effect of 6-BA or GA₃ is not related to any restriction imposed by seed coat on the uptake of these substances.

No interactions could be found between subthreshold amounts of red light, GA₃, 6-BA and ethrel; when there was promotion, even if small, this was caused by the isolated effect of both ethrel or red light.

It was not possible to detect cytokinin in the extracts of seeds imbibed for 24 and 48 hours.

Gibberellin was detected in the extracts of the seeds imbibed under white light and dark after 24, 48 and 72 hours of imbibition. There were statistical differences between the two methods employed (purified and non-purified extracts). This result showed that the germination of *Cucumis anguria* cannot be explained by the increase of the gibberellin content in the dark imbibed seeds.

The germination of *Cucumis anguria* seeds is inhibited by silver nitrate, at amounts above 100 ppm. This effects is not due to any toxic action of the Ag⁺ ion, but probably due to the inhibition of the action of endogenous ethylene.

Silver nitrate was more effective when it was applied around 24 hours after the start of seed imbibition.

This result suggests that the ethylene action is more effective after an interval of approximately 24 hours of imbibition.

Ethylene could be detected in a sealed flask containing imbibed *Cucumis anguria* seeds. The ethylene liberation was related to the germination rate. Dark imbibed seeds presented a higher germination rate and ethylene liberation than seeds imbibed under white light. Ethylene could be detected only after 24 hours of imbibition.

These results suggest that ethylene could be related to the induction of germination of *Cucumis anguria* seeds.

BIBLIOGRAFIA

- ABELES, F.B., 1973. *Ethylene in Plant Biology*. Academic Press, London.
- ADKINS, S.W. e ROSS, J.D., 1981. Studies in wild cat seed dormancy. *Plant Physiol.* 67, 358-362.
- BEWLEY, J.D., 1980. Secondary dormancy (skotodormancy) in seeds of lettuce (*Lactuca sativa* cv. Grand Rapids), and its release by light, gibberellic acid and benzyladenine. *Plant Physiol.* 49, 277-280.
- BEWLEY, J.D. e BLACK, M., 1978. *Physiology and Biochemistry of Seeds*, 1ª Vol. Springer-Verlag, Berlin.
- BEWLEY, J.D., NEGBI, M. e BLACK, M., 1968. Immediate phytochrome action in lettuce seeds and its interaction with gibberellins and other germination promoters. *Planta* 78, 351-357.
- BEYER Jr, E.M., 1976. A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiol.* 58, 268-271.
- BEYER Jr, E.M., 1979. Effect of silver ion, carbon dioxide and oxygen on ethylene action and metabolism. *Plant Physiol.* 63, 169-173.
- BOISARD, J., SPRUIT, C.J.P. e ROLLIN, P., 1968. Phytochrome in seeds and an apparent dark reversion of *Pr* to *Pfr*,

Meded.: andbHoogesh, Wageningen, 68, Nº 17.

- BORTHWICK, H.A., HENDRICKS, S.B., PARKER, M.W., TOOLE, E.H. e TOOLE, V.K., 1952. A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 38, 662-666.
- BORTHWICK, H.A., HENDRICKS, S.B., TOOLE, E.H. e TOOLE, V.K., 1954. Action of light on lettuce seed germination. *Bot. Gaz.* 115(3), 205-225.
- BURDETT, A.N. e VIDAVER, W.E., 1971. Synergistic action of ethylene with gibberellin or red light in germinating lettuce seeds. *Plant Physiol.* 48, 656-657.
- BUTLER, W.L., MORRIS, K.H., SIEGELMAN, H.W. e HENDRICKS, S. B., 1959. Detection, assay and preliminary purification of the pigment controlling photo-responsive development in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 45, 1703-1708.
- CARVALHO, N.M. e NAKAGAWA, J., 1980. *Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção*. Fundação Cargill, Campinas.
- COOKE, R.J. e SAUNDERS, P.F., 1975. Photocontrol of gibberellin levels as related to the unrolling of etiolated wheat leaves. *Planta*, 126, 151-160.
- COOKE, R.J., SAUNDERS, P.F. e KENDRICK, R.E., 1975. Red light induced production of gibberellin-like substances in homogenates of etiolated wheat leaves and in suspensions

- of intact etioplasts. *Planta*, 124, 319-328.
- DOWNS, R.J., 1964. Photocontrol of germination of seeds. *Phyton*, 21, 1-16.
- DRENNAN, J., WILLESEN, R., RUDD, T. e FRENKEL, C., 1978. Interaction of oxygen and ethylene in the release of ragweed seed from dormancy. *Bot. Gaz.*, 139(1), 46-49.
- DUKE, S.O., 1978. Interactions of seed water content with phytochrome- initiated germination of *Rumex crispus* L. seeds. *Plant and Cell Physiol.*, 19(6), 1043-1049.
- DUNLAP, J.R. e MORGAN, P.W., 1977. Characterization of ethylene gibberellic acid control of germination in *Lactuca sativa* L. *Plant and Cell Physiol.* 18, 561-568.
- ESASHI, Y., HATA, Y. e KATOH, H., 1975. Germination of cocklebur seeds: interaction between gibberellic acid, benziladenine, thiourea, KNO_3 and gaseous factors. *Aust. J. Plant Physiol.* 2, 569-579.
- ESASHI, Y. e LEOPOLD, C.A., 1969. Dormancy regulation in subterranean clover seeds by ethylene. *Plant Physiol.* 44, 1470-1472.
- ESASHI, Y., WAKABAYASHI, S., TSUKADA, Y. e SATOH, S., 1979. Possible involviment of the alternative respiration system in the ethylene-stimulated germination of cocklebur seeds. *Plant Physiol.* 63, 1039-1043.

- EVENARI, M., 1965. Light and seed dormancy. In: "Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. Ed. Ruhland, Springer-Verlag, Berlin.
- FAZIO, G. De. Cytokinin levels in healthy and bean golden mosaic virus (BGMV) infected bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revta. Brasil. Bot.*, 4 (no prelo).
- FELIPPE, G.M., 1978. Effects of temperature on germination of *Rumex obtusifolius*. *Revta. do Museu Paulista*, 25, 173-181.
- FELIPPE, G.M., 1979. Desenvolvimento. In: *Fisiologia Vegetal 2*. Coord. M.G. Ferri. EPU-EDUSP, São Paulo.
- FELIPPE, G.M., 1979. Etileno. In: *Fisiologia Vegetal 2*. Coord. M.G. Ferri. EPU-EDUSP, São Paulo.
- FELIPPE, G.M., 1980. Germination of light-sensitive seeds of *Cucumis anguria* and *Rumex obtusifolius*: effects of temperature. *New Phytol.* 84: 439-448.
- FELIPPE, G.M., GHERARDI, E., PENTEADO, L.B.K., ANNES, V.C.S. e SENE, C.M., 1970. Detecção de giberelinas durante a germinação de *Rumex obtusifolius* L., *Arq. Inst. Biol. S. Paulo*, 37: 177-187.
- FELIPPE, G.M. e LITJENS, M.H.M., 1979. Effect of growth regulators on overcoming the light inhibition on germination of *Cucumis anguria* L., *Biol. Plant.*, 21: 407-411.

- FELIPPE, G.M. e LITJENS, M.H.M., 1980. Effects of growth regulators on germination of *Cucumis anguria* L., *Cien. e Cult.* 32(7): 875-877.
- FELIPPE, G.M., LUCAS, N.M.C., BEHAR, L. e OLIVEIRA, M.A.C., 1971. Observações a respeito da germinação de *Stevia rebaudiana* Bert. . *Hoehnea*, 1: 81-93.
- FLINT, L.H. e McALISTER, E.D., 1935. Wavelength of radiation in the visible spectrum inhibition the germination of light sensitive lettuce seed. *Smithsonian Inst. Misc. Coll.*, 94: 1-11.
- FLINT, L.H. e McALISTER, E.D., 1937. Wavelength of radiation in the visible spectrum promoting the germination of light sensitive lettuce seed. *Smithsonian Inst. Misc. Coll.*, 96: 1-8.
- FRANKLAND, B. e WAREING, P.F., 1960. Effect of gibberellic acid on hypocotyl growth of lettuce seedlings. *Nature, Lond.*, 185: 255-256.
- GHERARDI, E., 1974. Promotores e inibidores de crescimento em sementes de *Carica papaya* L. Dissertação de Mestrado. Escola Paulista de Medicina.
- GREGOROVÁ, B., 1977. The fluctuations in the level of endogenous growth regulators in seeds of *Acer pseudoplatanus* L. in the course of stratification. *Biol. Plant.* 19(5): 321-330.

- HALL, M.A., ACASTER, M.A., BENGOCHEA, T., DODDS, J.H., EVANS, D.E., JONES, J.F., JERIE, P.H., MUTUMBA, G.C., NIEPEL, B. e SHAARI, A.R., 1979. Ethylene and seeds. In: *Plant Growth Substances, 1979*. Ed. F. Skoog. Springer-Verlag, Berlin.
- HSIAO, A.I., 1979. The effect of sodium hypochlorite and gibberellic acid on seed dormancy and germination of wild oats (*Avena fatua*). *Can. J. Bot.* 57, 1729-1734.
- IKUMA, H. e THIMANN, K.V., 1960. Action of gibberellic acid on lettuce seed germination. *Pl. Physiol., Lancaster* 35: 557-566.
- IKUMA, H. e THIMANN, K.V., 1963. Action of kinetin on photo-sensitive germination of lettuce seeds as compared with that of gibberellic acid. *Plant and Cell Physiol.* 4: 113-128.
- ISIKAWA, S. e FUJII, T., 1961. Photocontrol and temperature dependence of germination of *Rumex* seeds. *Plant and Cell Physiol.* 2: 51.
- JARVIS, S.J. e WILKINS, M.B., 1973. Photoresponse of *Matteucia struthiopteris* L. Todaro. *Journal of Exp. Bot.* 24(83): 1149-57.
- JONES, H. W., LOERCHER, L. e FRENKEL, C., 1976. Effects of red light and ethylene on growth of etiolated lettuce seedlings. *Plant Physiol.*, 57, 420-423.

- KENDRICK, R.E., 1976. Photocontrol of seed germination. *Sci. Prog., Oxf.* 63, 347-367.
- KENDRICK, R.E. e FRANKLAND, B., 1968. Kinetics of phytochrome decay in *Amaranthus* seedlings. *Planta*, 82: 317-320.
- KENDRICK, R.E. e FRANKLAND, B., 1969. Photocontrol of seed germination in *Amaranthus caudatus*. *Planta* 85: 326-339.
- KENDRICK, R.E. e FRANKLAND, B., 1981. *Fitocromo e Crescimento Vegetal*, trad. G.M. Felipe. EPU-EDUSP, São Paulo.
- KENDRICK, R.E., SPRUIT, C.J.P. e FRANKLAND, B., 1969. Phytochrome in seeds of *Amaranthus caudatus*. *Plant Physiol.*, 56: 332-334.
- KEYS, R.D., SMITH, O.E., KUMAMOTO, J. e LYON, L., 1975. Effect of gibberellic acid, kinetin and ethylene plus carbon dioxide on the thermodormancy of lettuce seed (*Lactuca sativa* L. cv. Mesa 659). *Plant Physiol.*, 56, 826-829.
- KHAN, A., GOSS, J.A. e SMITH, D.E., 1957. Effect of gibberellin on germination of lettuce seeds. *Science*, 125, 645.
- KOHLER, K.H., DORFLER, M. e GORING, H., 1980. The influence of light on the cytokinin content of *Amaranthus* seedlings. *Biol. Plant.*, 22(3): 128-134.

- KUMAR, U. e RANGASWAMY, N.S., 1977. Regulation of seed germination and polarity in seedling development in *Orobanche aegyptiaca* by growth substances. *Biol. Plant.*, 19(5): 353-359.
- LEFF, J., 1964. Interaction between kinetin and light on germination of Grand Rapids lettuce seeds. *Plant Physiol.*, 39: 299-303.
- LETHAM, D.S., 1968. A new cytokinin bioassay and the naturally occurring cytokinin complex. In: "Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances". Ed. F. Wightman e G. Setterfield. The Range Press Ltd., Ottawa.
- LEWAK, S. e KHAN, A.A., 1977. Mode of action of gibberellic acid and light on lettuce seed germination. *Plant Physiol.*, 60: 575-577.
- LIEBERMAN, M., 1979. Biosynthesis and action of ethylene. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 30: 533-591.
- MANCINELLI, A.L. e BORTHWICK, H.A., 1964. *Ann. Bot. Rome*, 28: 9.
- MANCINELLI, A.L., BORTHWICK, H.A. e HENDRICKS, S.B., 1966. Phytochrome action in tomato seed germination. *Bot. Gaz.* 127: 1-5.
- MANCINELLI, A.L. e TOLKOWSKY, A., 1968. Phytochrome and seed germination. V. Changes of phytochrome content during the germination of cucumber seeds. *Plant Physiol.*, 43: 489-494.

- MAYER, A.M. e POLJAKOFF-MAYBER, A., 1975. *The germination of seeds*. Pergamon Press Ltd., Oxford.
- MAYER, A.M. e SHAIN, Y., 1974. Hormones and growth substances *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 1-26.
- McMILLAN, J. e SUTER, P.J., 1963. Thin layer chromatography of the gibberellins. *Nature*, 197: 790.
- METIVIER, J.R., 1979. Dormência e Germinação. In: *Fisiologia Vegetal 2*, Coord. M.G. Ferri. EPU-EDUSP, São Paulo.
- MICHNIEWICZ, M. e KAMIENSKA, A., 1967. Effect of kinetin on the content of endogenous gibberellins in germinating seeds of some plant species. *Naturwissenschaften*, 14(372).
- MILLER, C.O., 1956. Similarity of some kinetin and red light effects. *Plant Physiol.*, 31: 318-319.
- MILLER, C.O., 1958. The relationship of the kinetin and red light promotions of lettuce seed germination. *Plant Physiol.*, 33: 115-117.
- MOHR, H., 1972. *Lectures on Photomorfogenesis*. Springer-Verlag, Berlin.
- NOGGLE, G.R. e FRITZ, G.J., 1976. *Introductory plant Physiology*. Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- NORONHA, A., VICENTE, M. e FELIPPE, G.M., 1976. Effect of storage and growth conditions on photoblasticity of seeds

- of *Cucumis anguria* L. *Hoehnea*, 6: 7-10.
- NORONHA, A., VICENTE, M. e FELIPPE, G. M., 1978. Photocontrol of germination of *Cucumis anguria* L. *Biol. Plant.* 20: 281-286.
- NORONHA, A., VICENTE, M. e SILBERSCHMIDT, K., 1971. Observações sobre a germinação de sementes de *Cucumis anguria* L. *Ciênc. e Cult.* 23: 321-322.
- OLATOYE, S.T. e HALL, M.A., 1972. Interaction of ethylene and light on dormant weed seeds. In: *Seed Ecology*. Ed. W. Heydecker, Butterworths, London.
- OTA, Y. e KOJIMA, H., 1980. Promotion by gibberellin of lettuce seed germination as a function of presoaking. *Plant and Cell Physiol.*, 21(4): 561-569.
- PECKET, R.C. e CHARCHARDI, F., 1979. The photocontrol of respiration in light sensitive lettuce seeds. *Journal of Exp. Bot.*, 30(117): 839-842.
- PURSEGLOVE, J. W., 1968. *Tropical Crops - Dicotyledons*. Longman, London.
- RANDI, A.M., 1980. Germinação de *Stevia rebaudiana* Bert. Tese de Mestrado, UNICAMP.
- RANDI, A.M. e FELIPPE, G.M., 1981. Efeito de temperatura, luz e reguladores de crescimento na germinação de *Stevia*

- rebaudiana* Bert., *Ciênc. e Cult.*, 33(3): 404-411.
- RAO, V.S., SANKHLA, N. e KHAN, A.A., 1975. Additive and synergistic effects of kinetin and ethrel on germination, thermodormancy and polyribosome formation in lettuce seeds. *Plant Physiol.*, 56: 263-266.
- REID, D.M., CLEMENTS, J.B. e CARR, D.J., 1968. Red light induction of gibberellin synthesis in leaves. *Nature (Lond)*, 217: 580-582.
- REYNOLDS, T. e THOMPSON, P.A., 1973. Effects of kinetin, gibberellins and abscisic acid on the germination of lettuce. *Physiol. Plant.* 28: 516-522.
- ROLLIN, P., 1975. Le phytochrome et le rôle de la lumière dans la germination. In: "*La Germination des Sementes*". ed. Chaussat e Le Deunff, Gauthier - Villars, Paris.
- ROLLIN, P., MALCOSTE, R. e EUDE, D., 1970. Le rôle du phytochrome dans la germination des graines de *Nemophila insignis* L. *Planta*, 91: 227-234.
- SALTVEIT, M.E. e PHARR, D.M., 1980. Light-stimulated ethylene production by germinating cucumber seeds. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 105(3): 364-367.
- SMALL, J.G.C. e GARNER, C.J., 1980. Gibberellin and stratification required for the germination of *Erica*

- junonia*, and endangered species. *Z. Pflanzphysiol.*, 99: 179-182.
- SMITH, H., 1973. Light quality and germination: ecological implications. In: "*Seed Ecology*", Ed. W. Heydecker. Butterworths, London.
- SMITH, H., 1975. *Phytochrome and Photomorphogenesis*. McGraw Hill, London.
- SNEDECOR, G.W. e COCHRAN, W.G., 1967. *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Ames., Iowa.
- SPEER, H.L., HSIAO, A.I. e VIDAVER, W., 1974. Effects of germination-promoting substances given in conjunction with red light on the phytochrome-mediated germination of dormant lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.). *Plant Physiol.*, 54: 852-854.
- SPIESS, L.D. e KROUK, M.G., 1977. Photocontrol of germination of spores of the fern *Polypodium aureum*. *Bot. Gaz.* 138(4): 428-433.
- SPRUIT, C.J.P. e MANCINELLI, A.L., 1969. Phytochrome in cucumber seeds. *Planta*, 88: 303-310.
- STADEN, J. van e VAREING, P.F., 1972. The effect of light on endogenous cytokinin levels in seeds of *Rumex obtusifolius*. *Planta*, 104: 126-133.
- STODDART, J.L., 1976. Phytochrome and gibberellins. *Nature*, 261: 454-455.

- TAKAKI, M., KENDRICK, R. E. e DIETRICH, S. M. C., 1981.
Interaction of light and temperature on the germination
of *Rumex obtusifolius* L.. *Planta*, 152: 209-214.
- TAKAKI, M., KENDRICK, R. E. e DIETRICH, S. M. C.. Phytochrome
in *Cucumis anguria* seeds. *Revta. Bras. de Bot.* no prelo.
- TAYLORSON, R. B., 1976. Uptake of gibberellic acid in intact
and scarified seeds of *Barbarea vulgaris*. *Physiol. Plant.*
38, 201-207.
- TAYLORSON, R. B. e HENDRICKS, S. B., 1976. Interactions of
phytochrome and exogenous gibberellic acid on germination
of *Lamium amplexicaule* L. seeds. *Planta*, 132, 65-70.
- TOOLE, V. K., 1973. Effects of light, temperature and their
interactions on the germination of seeds. *Seed. Sci. and
Technol.* 1, 339-396.
- UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H. e STAUFFER, J. F., 1964.
Manometric Techniques. 4a. Edition, Burges Publishing Co.,
Minneapolis.
- VÁLIO, I. F. M., 1969. Promotion and inhibition of growth
in *Lunularia cruciata* L. DUM. Ph.D. Thesis, University of
London.
- VÁLIO, I. F. M., 1976. Germination of Coffee seeds (*Coffea
arabica* L. cv. Mundo Novo). *Journ. of Exp. Bot.* 27 (100):
983-991.

- VÁLIO, I. F. M., KIRSZENZAFT, S. L. e ROCHA, R. F., 1972.
Germination of achenes of *Bidens pilosa* L. *New Phytol.*
71: 677-682.
- VICENTE, M., ENGELHARDT, M. e SILBERSCHMIDT, K., 1962. The
influence of temperature on the germination response to
light of seeds of *Rumex obtusifolius* L. *Phyton.* 19: 163-
167.
- VILLIERS, T. A., 1975. *Dormancy and the Survival of Plants.*
Edward Arnold (Publishers) Limited, London.
- WAREING, P. F. e PHILLIPS, I. D. J., 1973. Dormancy. *In:*
"The Control of Growth and Differentiation in Plants".
Cap. 11, p. 223-254. Pergamon Press, Oxford.
- WAREING, P, F., STADEN, J. VAN e WEBB, D. P., 1972.
Endogenous hormones in the control of seed dormancy. *In:*
"Seed Ecology". Ed. W. Heydecker. Butterworths, London.
- WEBB, D. P. e DUMBROFF, E. B., 1969. Factors influencing the
stratification process in seeds of *Acer saccharum*. *Can. J.*
Bot. 47, 1555-1563.
- WOOD, T., 1955. A reagent for the detection of chloride and
certain purines and pyrimidines on paper chromatograms.
Nature 176: 175.
- WOODSTOCK, L. W. e TOOLE, V. K., 1977. Respiration of Grand
Rapids lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds in relation to

- chemical and photocontrol of germination. *Plant and Cell Physiol.* 18: 1-8.
- YANIV, Z., MANCINELLI, A. L. e SMITH, P., 1967. Phytochrome and seed germination. III. Action of prolonged far red irradiation on the germination of tomato and cucumber seeds. *Plant Physiol.* 42, 1479-1482.
- ZEEVAART, J. A. D., 1966. Reduction of the gibberellin content of *Pharbitis* seeds by CCC and after effects on the progeny. *Plant Physiol.* 41: 856-862.
- ZOUAGHI, M., MALCOSTE, R. e ROLLIN, P., 1972. Étude du phytochrome detectable *in vivo* dans les graines de *Cucurbita pepo* L. au cours des différents phases de la germination. *Planta* 106: 30-43.