

ESTUDO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE LIMÃO CRAVO
(Citrus reticulata var. austera Hib. - Swingle):
CONDIÇÕES DE UMIDADE E ARMAZENAMENTO E RELAÇÕES HORMONAIS.

ROBERTO USBERTI

Eng.^o-Agr.^o

Coordenadoria de Assistência Técnica Integral

Orientador: GIL MARTINS FELIPPE

Tese de mestrado apresentada ao Instituto de
Biologia - Departamento de Fisiologia Vegetal,
da Universidade Estadual de Campinas.

CAMPINAS
Estado de São Paulo
1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

HOMENAGEM

A meus pais

José Alfredo ("in memorian") e Antonieta
e a meus familiares

À minha esposa

Maria Helena

e ao meu filho Roberto,

com especial carinho

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. GIL MARTINS FELIPPE, pela amizade, dedicação e segura orientação durante todo o transcorrer deste trabalho.

Aos Drs. IVANY F.M. VALIO e JACQUES R. METIVIER, pelas valiosas colaborações.

Ao Dr. AQUILES E. PIEDRABUENA, pela colaboração na análise estatística.

Ao Engenheiro Agrônomo HUMBERTO BORTOLETTO DE ARRUDA, pelo fornecimento das sementes e da área de viveiro da Fazenda de Produção de Sementes e Mudanças de Tietê, da C.A.T.I..

Aos Engenheiros Agrônomos DIRCE BISSOLI ORTOLANI e NÉLIO JOSÉ DIAS XAVIER, pela colaboração nos trabalhos de laboratório e de campo.

Aos irmãos Professor FLÁVIO e Professora MARIA DINORAH, pelo incentivo constante para a concretização deste trabalho.

Ao irmão Dr. JOSÉ ALFREDO USBERTI FILHO, pelas sugestões e críticas oportunas.

À COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL (CATI), da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, pela autorização concedida para participar do Curso de Pós-Graduação de Biologia Vegetal.

Ao DEPARTAMENTO DE FISILOGIA VEGETAL, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pelo Curso de Pós Graduação em Biologia Vegetal.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, nossa gratidão.

Í N D I C E

| | Pág. |
|--|------|
| I - INTRODUÇÃO | 1 |
| II - MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| A - MATERIAL | 17 |
| B - MÉTODOS | 17 |
| 1 - Secagem e armazenamento | 17 |
| 2 - Germinação | 18 |
| 3 - Extração de substâncias endógenas | 25 |
| 4 - Análise estatística | 29 |
| III - RESULTADOS | 30 |
| A - GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE LIMÃO CRAVO | 30 |
| 1 - Efeito das condições de armazenamento | 30 |
| 1.1 - Testes de germinação | 30 |
| a) Condições de laboratório | 30 |
| b) Condições de campo | 33 |
| 1.2 - Determinação da viabilidade | 34 |
| 2 - Efeito da casca e da película na germinação. | 35 |
| 3 - Efeito da esterilização de sementes na ger - minação | 36 |
| 4 - Efeito da reidratação lenta na germinação .. | 38 |
| 5 - Efeito de luz na germinação | 40 |
| 6 - Efeito de temperatura na germinação | 41 |
| B - SUBSTÂNCIAS HORMONAIS ENDÓGENAS NAS SEMENTES DE LIMÃO CRAVO DURANTE O ARMAZENAMENTO | 43 |
| 1 - Eficiência do método de extração e do biotes te do hipocótilo de alface | 43 |

| | Pág. |
|---|------|
| 2 - Verificação da presença de substâncias hor - monais endógenas em sementes frescas armaze- nadas (tratamento B) e sementes secas (trata- mento A ₁) no início e fim do período de arma- zenamento de 12 meses e 32 meses | 43 |
| 2.1 - Substâncias giberelínicas e inibidores ... | 44 |
| 2.2 - Substâncias tipo citocininas | 48 |
| IV - DISCUSSÃO | 51 |
| V - RESUMO | 58 |
| VI - SUMMARY | 60 |
| VII - LITERATURA CITADA | 62 |

I - INTRODUÇÃO

A germinação da semente de uma planta superior pode ser considerada como uma sequência de eventos, que faz com que uma semente quiescente, com um baixo conteúdo de água, apresente um aumento na sua atividade metabólica geral e inicie a formação de uma plântula. O estágio exato, no qual termina a germinação e começa o crescimento, é extremamente difícil de definir, visto que a germinação é identificada pela protrusão de alguma parte do embrião através do tegumento da semente, o que, em si, já é um resultado de crescimento (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975).

Durante a germinação da semente o metabolismo aumenta rapidamente. O substrato para este metabolismo são as reservas armazenadas, geralmente encontradas no endosperma e cotilédones (embora outros órgãos também possam estar envolvidos). As concentrações das reservas variam consideravelmente entre as espécies. Durante a germinação estas reservas são hidrolizadas, sendo os produtos utilizados pelo eixo embrionário para a síntese de protoplasma, componentes estruturais e o crescimento subsequente. A energia inicial necessária aos processos metabólicos e ao crescimento provém dessas reservas (Ashton, 1976).

Para uma semente germinar, ela deve ser colocada em condições ambientais favoráveis, tais como temperatura, composição de gases na atmosfera e suprimento de água adequados, como também luz para certas sementes. Estes requisitos variam de acordo com as espécies e as variedades e são determinados pelas condições durante a formação da semente e também por fatores hereditários (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975).

Os efeitos diretos do meio ambiente durante a germina -

ção no comportamento germinativo tem sido muito estudados, mas ainda faltam explicações dos mecanismos de controle, como também o modo pelo qual a luz, a temperatura e os gases interagem para determinar o comportamento da semente durante a germinação (Mayer e Shain, 1974).

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

Quando ocorre a embebição, a atividade respiratória no embrião fornece energia para os processos metabólicos, sendo o suprimento de oxigênio um fator crítico no processo de germinação. O excesso de suprimento de água ou obstruções anatômicas tal como impermeabilidade dos tegumentos, podem limitar a entrada de oxigênio, diminuindo a respiração e causando uma queda de germinação (Maguire, 1973).

Os tegumentos da semente têm muita influência na germinação, podendo estabelecer uma barreira impermeável e interferindo nos seguintes processos: entrada de água necessária para a embebição; trocas gasosas e difusão de inibidores endógenos de germinação; podem também oferecer resistência mecânica ao crescimento do embrião (Mayer e Shain, 1974).

Barreiras de difusão, que podem controlar trocas gasosas e outros compostos, não necessitam estar localizadas no tegumento, podendo ocorrer no endosperma. Isto, por exemplo, acontece em alface, onde o endosperma é uma barreira para a aplicação exógena de leucina e cumarina (Klein et al, 1971; Anderson, 1973).

Outro fator que deve ser considerado é a força restritiva do tegumento à expansão do embrião e protrusão da radícula. Os efeitos do tegumento na fotossensibilidade de certas sementes são atribuídos à resistência mecânica do tegumento ao crescimento da radícula. A luz supostamente afetaria a habilidade da radícula em sobrepor esta resistência, enfraquecendo esta barreira ou aumentando a força de expansão do embrião (Ikuma e Thimann, 1963; Chen, 1970).

Diferentes sementes tem diferentes faixas de temperatura em que germinam. A germinação de todas as sementes é inibida em temperaturas muito altas ou muito baixas. Isto ocorre mesmo com espécies de regiões tropicais, como é o caso de Rapanea guianensis (Joly e Felipe, 1979) e Magonia pubescens (Salgado-Labouriau, 1973), ambas espécies dos cerrados brasileiros.

As sementes secas, sem embeber, resistem muito bem a temperaturas altas. Entretanto, o desenvolvimento posterior da plântula é afetado negativamente por essas temperaturas (Levitt, 1956).

Na faixa de temperaturas em que uma semente germina há geralmente uma temperatura ótima, acima ou abaixo da qual a germinação é retardada, mas não inibida. A temperatura ótima pode ser definida como a que causa a mais alta porcentagem de germinação no menor tempo. As temperaturas mínimas e máximas para germinação são, respectivamente, as temperaturas menores e maiores em que ocorre a germinação (Salgado-Labouriau, 1973).

Cohen (1958) estudou o efeito da alternância de temperaturas em alface, medindo a temperatura real alcançada pelos frutos, e chegou a conclusão de que o fator responsável pela germinação foi a mudança real de temperatura alcançada pelos mes

MOS.

Entre plantas cultivadas há muito pouca evidência de que a luz seja um fator que influencia a germinação. As sementes da maioria das plantas cultivadas geralmente germinam igualmente bem no escuro e na luz. Outras sementes tem comportamento diferente à luz. As sementes podem ser divididas naquelas que germinam somente no escuro, aquelas que germinam somente em luz, as que germinam após breve iluminação e as que são indiferentes à presença ou à ausência de luz. Iluminações diárias também afetam a germinação, com efeitos similares ao do fotoperiodismo no florescimento. Em algumas espécies a necessidade de luz existe imediatamente após a colheita, enquanto que em outras persiste pelo menos por um ano, e em outras desenvolve-se durante o armazenamento (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975; Noronha, Vicente e Felipe, 1976).

Diferentes zonas espectrais afetam diferentemente a germinação. No visível, entre 400 e 700 nm, mostrou-se que a luz entre 560 e 700 nm, e especialmente luz vermelha, geralmente promovem a germinação. A luz azul pode inibir a germinação, e em certas condições pode estimular, dependendo do período exato de iluminação relacionado ao início da embebição. A sensibilidade das sementes à luz aumenta com o tempo de embebição, sendo que a máxima sensibilidade não coincide com o término da embebição. O armazenamento de sementes em altas umidades relativas (UR) é, às vezes, suficiente para torná-las sensíveis à luz. Se for dado um estímulo de luz a sementes embebidas e estas a seguir forem secas, o efeito estimulatório da luz permanece retido (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975).

A partir dos estudos de Bortwick et al (1952), descobriu

se que a luz promove a germinação através de uma fotorreação em que a luz é absorvida pelo fitocromo, que existe em duas formas fotoconversíveis: fitocromo vermelho (Fv) e fitocromo vermelho extremo (Fve). Os espectros de ação quantitativos mostram que a máxima efetividade para germinação ocorre a 660 nm e 730 nm, respectivamente para promoção e inibição. Quando sementes embebidas são expostas à luz vermelha (660 nm), a forma inativa do fitocromo Fv é convertida para a forma ativa Fve e as sementes germinam. Quando a exposição à luz vermelha é seguida por exposição ao vermelho extremo (730 nm), o Fve é convertido para a forma inativa Fv, e a semente não germina. O número de sementes em uma população que germina em resposta à luz vermelha depende não somente da energia, mas também do estado de embebição e temperatura (Toole, 1973).

A estimulação de germinação por luz vermelha e sua inibição por vermelho extremo pode ser repetida várias vezes, e sempre a natureza da última iluminação decide a resposta de germinação. Como em todos os casos onde os efeitos de luz são observados, o efeito notado depende da intensidade de luz (energia) e a duração de iluminação (Kendrick e Spruit, 1974).

A promoção de germinação por luz em temperaturas constantes pode ser obtida para algumas sementes no escuro, através de alterações diárias de temperaturas. Já foi mostrado que o aumento de temperatura de 10 a 20°C, por somente alguns minutos, em ausência de luz, também dispara a germinação de algumas sementes (Felippe, 1978).

Em muitos casos já foi mostrado que os hormônios de crescimento promovem a germinação. Em alguns casos o ácido giberélico (GA₃) substitui a luz na germinação (Felippe et al, 1970).

Entretanto, em outros casos, tratamentos com GA_3 não foram efetivos em promover a germinação. Muitas sementes cuja germinação não é afetada pela luz têm sua germinação promovida por GA_3 . O efeito de ácido giberélico parece ser similar ao da luz na promoção de germinação. Há a hipótese de que GA_3 e luz vermelha atuariam de modo similar na germinação de sementes. Acredita-se, entretanto, que a fase da germinação induzida por GA_3 difere da induzida por luz vermelha, sendo que ambos atuariam parcialmente do mesmo modo, e que os seus modos de ação não seriam idênticos (Ikuma e Thimann, 1960).

A maioria das pesquisas com giberelinas no metabolismo durante a germinação concentra-se em cevada. A função exata das giberelinas na regulação da germinação da semente ainda está para ser elucidada (Mayer e Shain, 1974).

Muitas descobertas demonstram a influência de um fator, ligado ao embrião, no desenvolvimento de atividades enzimáticas nos cotilédones ou endosperma, e vice versa, o que leva a concluir que este controle é hormonal na natureza. O metabolismo protéico em cotilédones de sementes de ervilha é controlado por um componente axial (Chin, Poulson e Beevers, 1972).

O desenvolvimento de atividades proteolíticas em cotilédones é controlado por uma substância originada do tecido do embrião e transportada para os cotilédones (Wiley e Ashton, 1967). Em alguns casos a presença do eixo embrionário pode ser substituída por aplicação exógena de citocininas (Penner e Ashton, 1967), daí podendo-se concluir que o eixo embrionário secreta uma citocinina que regula a formação de enzimas proteolíticas no cotilédone. Citocininas que podem se originar no eixo embrionário parecem controlar a atividade de amilase em cotilédones de

feijão (Gepstain e Ilan, 1970). Citocininas fisiologicamente ativas estão ausentes em sementes secas de alface, aparecendo somente durante a germinação (Barzilai e Mayer, 1964; Staden, 1973).

A aplicação de cinetina promoveu a germinação de muitas espécies de sementes (Miller, 1958). Após o isolamento e caracterização da citocinina natural, zeatina (Letham, Shannon e McDonald, 1964), mostrou-se que esta atua do mesmo modo que a cinetina. As citocininas são ativamente metabolizadas em sementes em germinação. Muitos dos derivados de cinetina, como por exemplo, a benziladenina, também promovem a germinação. Entretanto, não promovem no caso de Rumex (Staden e Wareing, 1972). As citocininas diminuem a quantidade de luz necessária para a germinação, talvez porque o efeito da citocinina depende do desenvolvimento de algum fator na semente, imediatamente após a iluminação (Reynolds e Thompson, 1973).

O ácido abscísico existe em muitas sementes e tecidos envolvendo sementes, e muitas sementes não germinam na sua presença (Dörffling, 1970). Tem-se sugerido interações entre ácido giberélico e ácido abscísico no controle de germinação e quebra de dormência, como em Ambrosia (Willemsen e Rice, 1972). O ácido abscísico influencia nitidamente a dormência e o crescimento após a germinação. Entretanto, seu efeito após a liberação da dormência e antes da protrusão da radícula é incerto (Mayere Shain, 1974).

A regulação de várias atividades enzimáticas está sob a influência do eixo embrionário, e em muitos casos a aplicação exógena de hormônios substitue o eixo. Alguns autores consideram que o controle da germinação de sementes por aplicação exógena de hormônios pode refletir o controle natural de germinação (Khan,

1971).

O primeiro estudo para determinar o tempo de vida das sementes data de 1873. A partir daí, muitos outros experimentos mostraram que o período de viabilidade das sementes é determinado, podendo ser aumentado ou reduzido alterando-se a umidade relativa e a temperatura de armazenamento. Muitos autores têm descrito mudanças estruturais e bioquímicas em sementes secas, que associam com a perda da viabilidade, daí surgindo teorias para explicar o fenômeno de senescência das sementes. As mudanças que conduzem à perda da viabilidade representam um enfraquecimento dos processos na semente seca, vitais para a continuação do estado viável, ou um enfraquecimento dos componentes armazenados necessários para os processos sintéticos que ocorrem durante os primeiros estágios de germinação (Roberts e Osborne, 1973).

Em geral, baixo teor de umidade, baixa temperatura e baixa tensão de oxigênio aumentam a longevidade de sementes durante o armazenamento (Barton, 1961). No entanto, muitas sementes podem permanecer enterradas no solo, mas viáveis, talvez embebidas em água, num estado de dormência secundária ou induzida. No caso de sementes secas, os processos metabólicos estão muito reduzidos, tornando-as capazes de germinar após anos de armazenamento. Muitas sementes mantêm-se viáveis no solo por mais tempo do que quando em condições de armazenamento seco, fato considerado surpreendente por muitos autores. Talvez a possível explicação esteja na premissa de que o reparo ou substituição de macromoléculas ou organelas ocorre como uma atividade celular normal, dando deste modo uma explicação para esta diferença de longevidade, sendo que estas atividades de manutenção não ocorreriam em sementes secas (Villiers, 1973).

Segundo Curtis (1963), as teorias gerais de envelhecimento são: a) acúmulo de produtos deletéricos do metabolismo; b) com o aumento do uso, organelas, células e órgãos tornam-se ineficientes; c) aumento de mutações somáticas com o tempo, o que torna o organismo gradualmente menos eficiente.

A viabilidade de sementes pode ser determinada pelo teste de tetrazólio, que é um teste bastante rápido, utilizando uma solução salina incolor de cloreto de 2, 3, 5 trifenil tetrazolium que, reagindo com átomos de hidrogênio liberados por enzimas desidrogenases envolvidas nos processos de respiração de tecidos vivos, resulta na formação de um pigmento vermelho chamado formazan, que é lipossolúvel, mas insolúvel em água. Através das cores diferentes obtidas entre tecidos de embriões normal, fraco e morto, pode-se avaliar a presença, localização e natureza de distúrbios dentro dos tecidos do embrião, obtendo-se, deste modo, uma rápida estimativa da capacidade de germinação potencial e sanidade do embrião da semente. As sementes devem ser lenta e completamente umedecidas com água antes do teste, o que irá ativar as atividades metabólicas e condicionar os tecidos do embrião a uma absorção uniforme da solução de tetrazólio, minimizando a ocorrência de injúrias indesejáveis durante o preparo da semente para o teste (Delouche et al, 1962; Moore, 1973).

O armazenamento de sementes compreende um período que vai desde sua maturação na planta até o seu plantio. Durante este período todas as sementes se deterioram numa extensão maior ou menor, que depende das espécies e das condições a que as sementes estão sujeitas (Harrington, 1972 a).

É muito importante definir o momento em que a semente está madura, porque a partir daí começa o armazenamento. A medi-

da mais aceita para a maturidade da semente é quando esta atinge o máximo de peso seco, que é chamado ponto de maturidade fisiológica. A semente neste ponto apresenta alto teor de umidade (30% ou mais), e na maioria das espécies podem ser secas sem perda da viabilidade. No ponto de maturidade fisiológica a semente tem o máximo vigor, sendo que a partir deste ponto, começa a envelhecer e conseqüentemente a perder esta qualidade (Harrington, 1972 a, b).

A semente pode se deteriorar mesmo na planta mãe. Além disso, alta umidade, alta temperatura, luz solar, insetos e moléstias podem afetar negativamente as sementes antes da colheita. A colheita e o beneficiamento, se conduzidos inadequadamente, causam injúrias às sementes (Harrington, 1972 a).

O armazenamento de sementes é necessário porque nem sempre é possível a utilização das mesmas logo após a colheita. O uso de condições não adequadas conduzirá a quedas na qualidade de sementes. Além disso, pode-se através de técnicas adequadas de armazenamento manter estoques reguladores de sementes para atender possíveis variações na demanda e também para suprir deficiências advindas de safras de anos adversos.

A qualidade inicial das sementes a serem armazenadas é de importância fundamental, visto que o armazenamento não melhora a qualidade das sementes. Além disso, a deterioração é um processo irreversível, que não pode ser evitado, mas pode ser controlado. Quando ocorre a deterioração, a perda de germinação é apenas uma consequência mensurável, ocorrendo juntamente com outras mudanças detrimenais. A vida média de sementes varia com as diferentes famílias, gêneros e espécies. A vida máxima de uma semente, desde que esteja sadia, depende sobremaneira das condi

ções ambientais (Delouche, 1968).

Os dois fatores mais importantes que afetam a velocidade de envelhecimento de sementes são umidade relativa do ar (ligada ao teor de umidade das sementes) e temperatura, que afeta as taxas de processos bioquímicos nas sementes. Existem duas regras para se definir melhor o efeito da umidade e temperatura no armazenamento de sementes: a) a cada 1% de aumento na umidade de uma semente, a vida desta cai pela metade. Isto é aplicável entre 5 - 14% de umidade nas sementes, pois abaixo de 5% as sementes envelhecem rapidamente (talvez devido a autooxidação de lipídios) e, acima de 14% de umidade, a capacidade germinativa das sementes é destruída por fungos durante o armazenamento; b) para cada 5,6°C de aumento na temperatura da semente, o tempo de vida desta cai pela metade. Isto é válido de 0 a 50°C (Harrington, 1972 a, b).

Uma atmosfera controlada é essencial para o armazenamento seguro de sementes por um longo tempo. Em geral, para um armazenamento seguro, mesmo por poucos anos, o ambiente deve apresentar condições tais que a soma da temperatura em graus Fahrenheit (°F) com a umidade relativa em porcentagem deve ser inferior ou igual a 100, sendo que não mais do que a metade desta soma pode ser devido a temperatura. Em temperaturas acima de 5°C, a umidade das sementes deve ser cuidadosamente controlada, através de recipientes herméticos ou dentro de câmaras secas (Bass, 1973).

Existe grande variabilidade entre as espécies com relação à longevidade das sementes, mas na maioria delas o aumento do período de longevidade está ligado a condições ambientais de baixa temperatura e baixa umidade relativa. No entanto, existem alguns grupos de sementes, como noqueira, carvalho, algumas espé

cies de Citrus, cocos e várias espécies aquáticas que não podem ser secas. Outras sementes, como a de cacau, não podem ser secas e nem armazenadas a frio (10°C ou menos) sem sofrerem injúrias irreversíveis (Barton, 1961; Harrington, 1972 a).

Segundo Harrington (1972a), o problema de manter a germinação das sementes aumenta com o conteúdo de umidade destas, sendo que o conteúdo ideal de umidade na semente para máximo período de viabilidade no armazenamento parece ser de 5 - 6%.

Nakamura (1975), após experimentos de armazenamento durante dez anos, determinou o tempo de vida das sementes de acordo com o seu conteúdo de umidade, colocando as sementes de espécies de Citrus entre as que perdem rapidamente a viabilidade em condições secas.

Bacchi (1958) manteve a viabilidade de sementes de limão cravo e laranja caipira (Citrus sinensis L.Osb.) por quatorze meses, em temperaturas de 2 - 3°C e teor de umidade das sementes acima de 30%. Com o aumento da temperatura de armazenamento e diminuição do teor de umidade das sementes, a viabilidade foi prejudicada.

Montenegro e Salibe (1960), estudando a conservação de sementes de nove porta-enxertos para Citrus , verificaram que, para sementes de limão cravo, a melhor condição de armazenamento para manter a viabilidade foi obtida com temperatura ao redor de 8°C e com teor de umidade das sementes elevado, de cerca de 25%; a pior condição foi o armazenamento em condições ambientais. Propuseram, para todos os porta-enxertos analisados (exceto para Poncirus trifoliata) um limite crítico de 10% de umidade nas sementes, abaixo do qual a germinação seria reduzida. Mungomery, Agnew e Prodonoff (1966) verificaram que a viabilidade de

sementes de tangerina Imperador (Citrus reticulata Blanco) pode ser mantida em armazenamento por longos períodos, desde que mantenham alta porcentagem de umidade (acima de 40%), e sejam conservadas em temperaturas de 5 - 10°C.

Chacko e Singh (1970) armazenaram sementes de Citrus paradisi em diferentes condições, e verificaram que em nenhuma delas a viabilidade foi preservada por mais de 13 meses. A melhor condição para armazenamento foi manter as sementes com teor de umidade alto, em temperaturas de 5 - 8°C e a pior condição foi o armazenamento em condições ambientais.

Ferreira (1969) estudou a perda do poder germinativo de Poncirus trifoliata, laranja caipira e tangerina Cleópatra, notando que as sementes armazenadas em condições ambientais sofreram dessecação natural que afetou a germinação, sendo maior para as sementes de Poncirus trifoliata e menor para as sementes de tangerina Cleópatra.

Eshuys (1975), estudando o armazenamento de sementes de limão rugoso (Citrus limon L.Burm.), tangerina Imperatriz e Poncirus trifoliata, em várias combinações de U.R./ temperatura durante mais de 12 meses, verificou que os melhores resultados de germinação foram obtidos com temperatura de armazenamento de 4°C e 96% U.R..

Krishna e Shanker (1978) estudaram a longevidade de sementes de Citrus karna, C. jarbhiri, C. limonia e Citrange Rusk (Poncirus trifoliata x Citrus sinensis), armazenando-as sob temperaturas ambiente e de 8°C, em recipientes herméticos, em sacos plásticos ou de papel, com ou sem dessecantes, por cinco meses. Citrus karna e Citrange Rusk mostraram 100% de viabilidade das sementes, enquanto que C. jarbhiri e C. limonia mostraram, res-

pectivamente, viabilidade de 84 e 80%, quando armazenadas em sacos plásticos com CaCl_2 em baixas temperaturas.

São pontos comuns na literatura que: a) o armazenamento aberto de sementes de Citrus sob temperatura ambiente é a pior condição para armazenamento, ocorrendo rápida queda do poder germinativo; b) a melhor temperatura para o armazenamento de sementes de Citrus gira em torno de 4 - 8°C.

As sementes de Citrus além de serem injuriadas por secagem, deterioram-se rapidamente sob condições ambientais de armazenamento, existindo grandes dificuldades em manter o seu poder germinativo. A viabilidade de sementes da maioria destas espécies tem sido mantida conservando-as no suco do fruto original, em areia molhada ou em qualquer outro meio úmido (Barton, 1961).

Em relação a germinação, Cohen (1956), usando temperatura constante de 25°C, verificou que em sementes de laranja azeda (Citrus aurantium L.) a germinação foi acelerada com a remoção dos tegumentos, sendo que a remoção da testa (casca) e tegmen (película) foi muito mais eficiente do que somente com a remoção da testa. Os tegumentos da semente retardaram a entrada de água por vários dias e reduziram a produção de gás carbônico pelas sementes. Mungomery et al (1966) mostraram que o tegumento da semente de limão rugoso alterou a velocidade de germinação, sendo que os valores para semente intacta e sem casca foram respectivamente de 8 e 10 dias. Zabala e Guardiola (1976), verificaram que a germinação de sementes de Citrange Troyer foi inibida pelo tegumento interno, que é impermeável à água. Este problema foi superado perfurando este tegumento.

Burns e Coggins (1969) embeberam sementes de laranja doce (Citrus sinensis L.Osb.) em várias concentrações de GA_3 e em

água e verificaram que a germinação aumentou em todos os tratamentos, quando comparados com o controle embebido em água. Srivastava e Singh (1971) embeberam sementes de limão Colina e laranja Malta por 6 horas em diversas concentrações de GA₃ antes de serem semeadas. Todos os tratamentos aumentaram a porcentagem final de germinação e subsequente altura da planta em ambos os cultivares, comparado com os controles em água. Houve também redução de 8 - 12 meses no tempo geralmente necessário para a obtenção de muda.

Buttom, Bornman e Hackland (1973), usando sementes de Poncirus trifoliata e Citrange Troyer, verificaram os efeitos na germinação de tratamentos de sementes com GA₃ associados com condições de armazenamento. Os resultados mostraram que para sementes de Poncirus trifoliata, o tratamento com GA₃ teve pouco ou nenhum efeito em sementes secas mantidas a 4°C ou em temperatura ambiente; no entanto, em sementes mantidas úmidas a 4°C houve aumento na velocidade e porcentagem final de germinação, quando comparadas com sementes secas mantidas a 4°C, sendo que estas diferenças tornaram-se mais acentuadas com períodos mais longos de armazenamento. Para sementes de Citrange Troyer, os resultados foram similares, porém menos nítidos.

Shant e Rao (1975) verificaram o efeito de GA₃ na germinação de sementes de lima ácida (Citrus aurantifolia Swingle), notando que quando as sementes foram mergulhadas durante 12 horas em soluções de GA₃ de 100 a 600 ppm, a germinação foi máxima com 550 ppm de GA₃.

Eshuys (1976) manteve sementes dos porta-enxertos limão rugoso, Poncirus trifoliata e tangerina Imperatriz a 4°C e 96% U.R. por 4 meses, sendo que um dia antes da semeadura mergulhou-

as em soluções de giberelinas de 0 a 5000 ppm por 12 horas. Os resultados mostraram que a germinação das sementes após 17 semanas foi aumentada por giberelina, sendo que os melhores resultados foram obtidos com solução de giberelina a 10 ppm.

Como pode ser visto pelo exposto acima, os fatores que afetam a germinação e a manutenção de viabilidade de uma semente são vários e ainda hoje não está muito claro como estes fatores atuam. Com este trabalho pretende-se fornecer mais dados sobre a germinação e a manutenção da viabilidade de uma semente de interesse econômico.

A escolha do limão cravo (Citrus reticulata var. austera Hib.- Swingle) para este trabalho deveu-se ao fato de que é usado como um porta-enxerto, e é a base da quase totalidade da citricultura paulista (Cintra, Neves e Yamashiro, 1971).

O objetivo geral deste trabalho é o estudo da germinação de sementes de limão cravo. Um dos pontos a ser estudado é o efeito da secagem artificial na viabilidade das sementes e as condições ideais de armazenamento para manter a germinação. Pretende-se, além disso, mostrar quais as mudanças hormonais que podem estar relacionadas com a queda ou manutenção de germinação nos vários tipos de armazenamento. Um outro objetivo é mostrar qual o efeito de diferentes temperaturas, de luz e dos envoltórios da semente na germinação desta espécie.

II - MATERIAL E MÉTODOS

A- MATERIAL

Foram utilizadas sementes de limão cravo, Citrus reticulata var. austera Hib., classificação botânica segundo Swingle (Swingle e Reece, 1967), obtidas no pomar de plantas matrizes da Fazenda de Produção de Sementes e Mudas de Tietê - SP, da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (C.A.T.I.). As sementes usadas foram colhidas em 1975 e 1977.

B- MÉTODOS

1- Secagem e Armazenamento

Inicialmente as sementes foram lavadas para eliminar a mucilagem, e armazenadas em câmara fria a 85% U.R. (umidade relativa) e 18°C para homogeneização de umidade. As sementes foram então divididas em dois grupos: a) sementes secas artificialmente e b) sementes não tratadas (sementes frescas).

A secagem artificial das sementes (de acordo com modificações do método de Harrington, 1960) foi conduzida em um secador de sementes marca Fabbe, em duas etapas. A primeira etapa constituiu-se no abaixamento da umidade das sementes até cerca de 10%, sendo as sementes imediatamente retiradas do secador e colocadas em tambor hermeticamente fechado. O teor de umidade foi novamente determinado, e as sementes retornaram para o secador, para a segunda etapa da secagem, aí ficando até alcançarem uma umidade de cerca de 6%. Foram a seguir novamente colocadas em tambor hermeticamente fechado, aí permanecendo por dois dias

para homogeneização da umidade. As sementes foram, então, colocadas em latas de 250 g, espelhadas internamente, que foram hermeticamente fechadas através de recravadeira elétrica.

As temperaturas, inicial e final, para a secagem das sementes nas duas etapas foram respectivamente 35°C e 39°C. O controle da umidade das sementes durante a secagem artificial foi obtido através de determinações de perda de peso de uma quantidade determinada de sementes (cada amostra com peso inicial de cerca de 1500 g).

As sementes secas enlatadas da safra de 1975 sofreram três tipos de tratamentos: a) armazenamento a 4°C (tratamento A_1); b) armazenamento a 18°C (tratamento A_2); c) armazenamento em condições ambientais (tratamento A_3). As sementes secas enlatadas da safra de 1977 sofreram somente o tratamento A_1 , isto é, armazenamento a 4°C. A temperatura de 4°C foi obtida em geladeira e a de 18°C em câmara fria.

As sementes frescas (que não sofreram secagem) não foram enlatadas, mas mantidas em sacos de papel. As sementes frescas de 1975 sofreram dois tipos de tratamentos: a) armazenamento em condições ambientais (tratamento B) e b) armazenamento a 85% U.R. e 18°C (tratamento C). As sementes de 1977 sofreram somente o tratamento B, isto é, foram armazenadas em condição ambiental.

A variação de temperatura e umidade relativa do ar nos tratamentos em que as sementes estiveram sob condição ambiental é mostrada na figura 1a.

2- Germinação

O estudo da germinação foi realizado a cada dois meses,

F I G U R A - 1

Figura 1a

Condições ambientais: Variação quinzenal.

Temperatura do ar: ○

Umidade relativa do ar: ●

Figura 1b

Representação esquemática de canteiro de semeadura.

Nºs 1 a 12 - semente seca mantida a 4°C

(tratamento A₁)

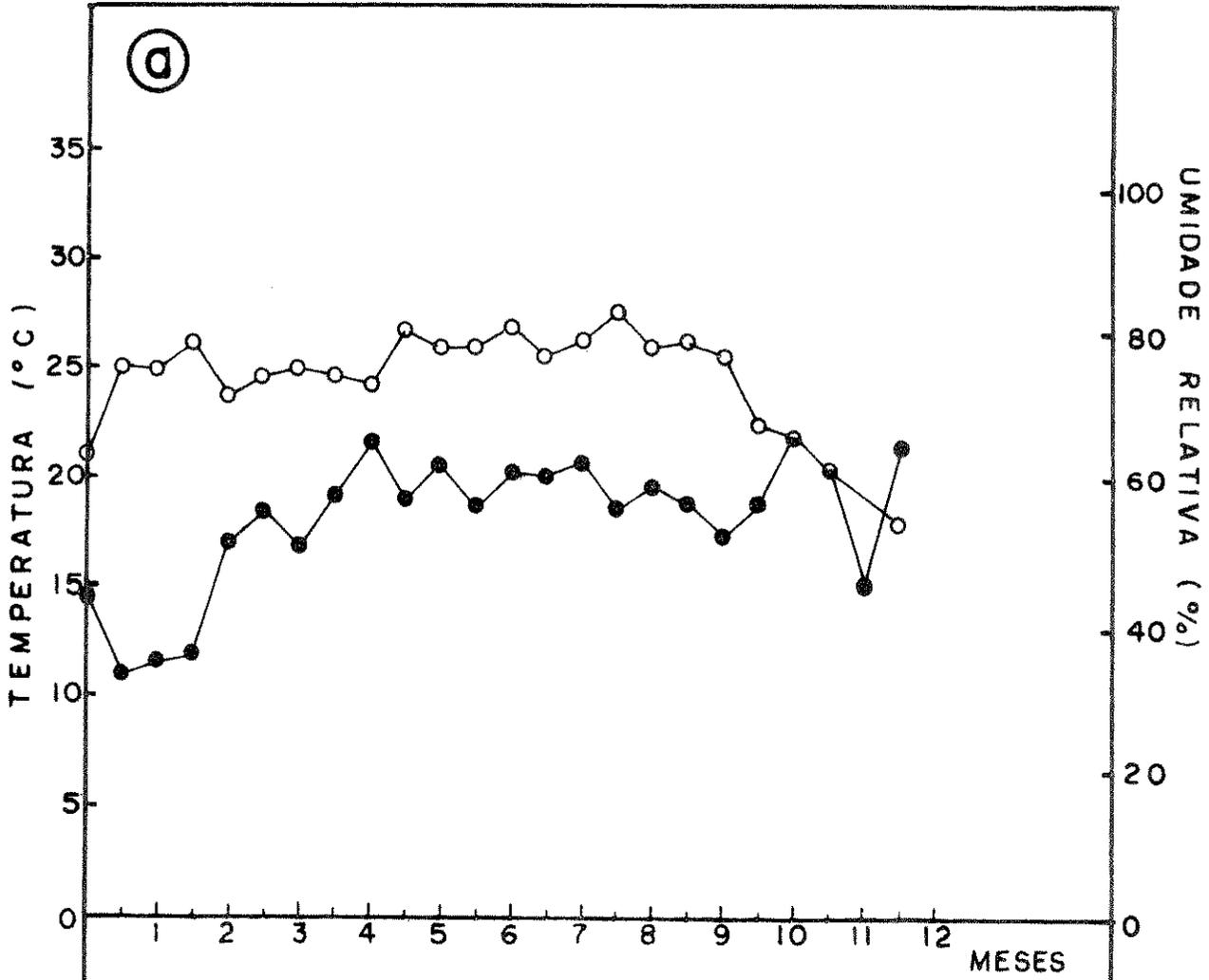
Nºs 13 a 24 - semente seca mantida a 18°C

(tratamento A₂)

Nºs 25 a 36 - semente seca mantida em condições ambientais

(tratamento A₃)

FIGURA 1



(b)

COLUNAS

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | <u>1</u> | <u>12</u> | <u>4</u> | <u>15</u> | <u>32</u> | <u>26</u> | <u>8</u> | <u>31</u> | <u>2</u> |
| 2 | <u>3</u> | <u>20</u> | <u>18</u> | <u>10</u> | <u>14</u> | <u>23</u> | <u>34</u> | <u>30</u> | <u>33</u> |
| 3 | <u>11</u> | <u>21</u> | <u>35</u> | <u>17</u> | <u>24</u> | <u>22</u> | <u>5</u> | <u>25</u> | <u>28</u> |
| 4 | <u>9</u> | <u>27</u> | <u>36</u> | <u>13</u> | <u>29</u> | <u>6</u> | <u>16</u> | <u>7</u> | <u>19</u> |

num período de 12 meses (e também 32 meses) após o início do experimento para as sementes de 1975, e de 10 meses para as sementes de 1977. Foram utilizadas 3 repetições de 50 sementes para cada teste, e temperaturas alternadas (cada 12 horas) de 20 - 30°C num ciclo de 24 horas, obtidas em câmaras de crescimento, durante 28 dias.

A unidade das sementes foi determinada a cada dois meses. Duas repetições de 50g para cada determinação foram colocadas em estufa seca a 105°C \pm 3 durante 24 horas, sendo a unidade calculada por diferença de peso, com base no peso úmido das sementes (Brasil, Ministério da Agricultura, 1976).

Nos experimentos de efeito de luz ou temperatura foram usadas sementes secas artificialmente, com teor de unidade de 6% (tratamento A_1 - safra de 1977). O teste de germinação foi conduzido em placa de Petri com uma folha de papel de filtro. A temperatura usada foi de 25°C, obtida em câmara de crecimento Forma Scientific Model 24, com temperatura controlada.

Em todos estes experimentos citados até aqui, considerou-se como germinação a protrusão da radícula.

A germinação das sementes dos tratamentos A_1 , A_2 e A_3 (secas e mantidas respectivamente a 4°C, 18°C e ambiente) foi também testada em condições de campo. O local para o teste foi a Fazenda de Produção de Sementes e Mudas de Tietê, da CATI, local de origem das sementes e tradicional produtora de mudas cítricas básicas da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo.

Os canteiros de seneadura usados tinham dimensões de 13m de comprimento por 1m de largura, apresentando 9 colunas de 4 linhas de 1m de comprimento cada. As colunas eram separa-

das entre si por um espaço de 0,5m, visando facilitar a identificação. O esquema usado pode ser verificado na figura 1b. A cada dois meses procedeu-se a instalação de um canteiro, utilizando-se para cada tratamento 12 repetições de 100 sementes. Para cada canteiro de semeadura foram feitas contagens de germinação das sementes aos 30, 60 e 90 dias a partir da instalação do mesmo. Foram consideradas como germinadas as sementes que produziram plântulas cujas folhas estivessem a mais de 2 cm acima do nível do solo. As plantas ("cavalinhos") foram então removidas para um viveiro, onde permaneceram para serem enxertadas, para verificar se a secagem artificial e as temperaturas de armazenamento teriam algum efeito no "pegamento" do enxerto e na obtenção da muda final.

A influência de luz branca (fluorescente, modelo 15 W-S15T12-CW, marca Westinghouse) e escuro na germinação (em condições de laboratório) foi verificada utilizando-se 4 repetições de 25 sementes para cada um destes tratamentos. O teste de germinação foi conduzido em placa de Petri com uma folha de papel de filtro. A temperatura usada foi de 25°C, obtida em câmara de crescimento com temperatura controlada, sendo que o escuro foi obtido colocando-se as placas de Petri dentro de três sacos de plástico preto. Isto foi feito para facilidade de trabalho, já que não houve diferença na porcentagem de germinação entre sementes mantidas nos sacos de plástico preto, ou em câmara de crescimento no escuro.

Em seguida testou-se o efeito de luzes azul, verde e vermelha na germinação, usando-se a luz branca e o escuro como controles.

Para a obtenção das luzes monocromáticas mencionadas,

utilizaram-se lâmpadas com papel celofane colorido, ajustando-se a intensidade para os 3 picos dos espectros ao redor de $1,2 \mu W/cm^2.nm$, através de um espectroradiômetro ISCO, modelo SR. O esquema usado foi: a) vermelho (pico a 650 nm): lâmpada fluorescente vermelha, marca Westinghouse, de 15 W; b) azul (pico a 450 nm): lâmpada fluorescente azul, marca Westinghouse de 15 W e filtro de uma folha de papel celofane azul; c) verde (pico a 525 nm): lâmpada fluorescente verde, marca Westinghouse de 20 W, e filtro de uma folha de papel celofane verde. Todos estes dados acham-se na figura 2.

Para as contagens de germinação de luz branca, verde, vermelha e azul, as mesmas foram feitas sem se retirar as placas de Petri das câmaras de crescimento. As contagens de germinação de sementes mantidas no escuro foram feitas sob uma luz verde de segurança, cujo espectro dá um pico, a 525 nm, de $0,02 \mu W/cm^2.nm$, conforme a figura 2.

Em relação ao efeito de temperatura, inicialmente foram testadas temperaturas constantes de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45°C, obtidas em câmaras de crescimento. Para cada uma destas temperaturas foram usadas 100 sementes em 4 repetições de 25 sementes. Na fase seguinte foram testadas alternâncias de temperaturas de 12 em 12 horas, obtidas também em câmaras de crescimento. As alternâncias de temperaturas testadas foram 15 - 35, 20 - 30, 20 - 35, 25 - 20, 25 - 30, 25 - 35, 25 - 10 e 25 - 15°C. A escolha destas temperaturas para as alternâncias teve como base os resultados dos testes com temperaturas constantes. Para cada uma destas alternâncias de temperaturas foram usadas 100 sementes, em 4 repetições de 25 sementes.

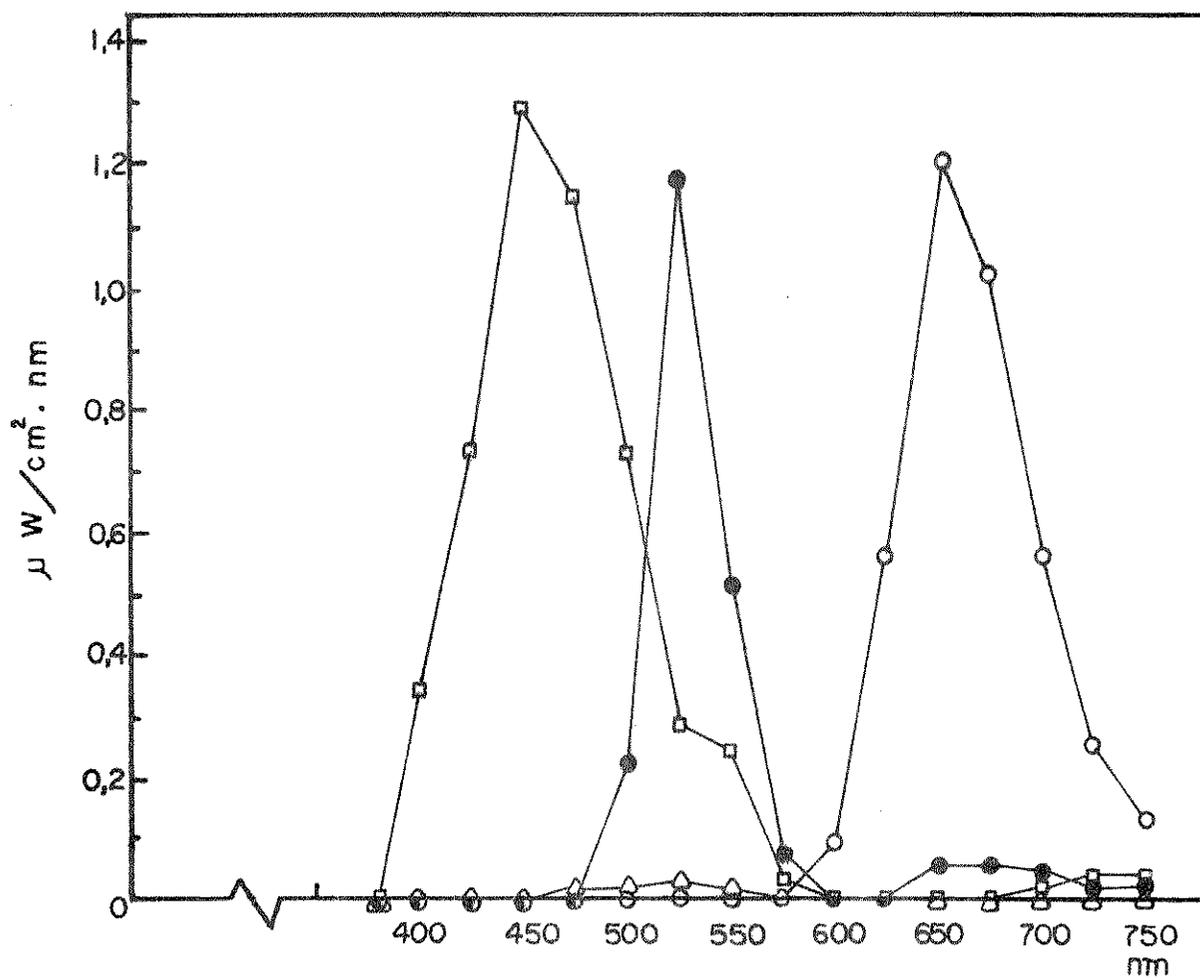
Com o auxílio de um termômetro digital modelo Digitec

F I G U R A - 2

Espectros das luzes monocromáticas utilizadas.

- luz vermelha
- ◻ luz azul
- luz verde
- △ luz verde de segurança

FIGURA 2



581-C, equipado com dois terminais, um colocado na câmara de crescimento e o outro dentro da placa de Petri, foram obtidos os tempos necessários para a alternância de temperatura na câmara de crescimento e na placa de Petri para cada uma das alternâncias de temperaturas usadas (Felippe, 1978). Os resultados para alternâncias de temperaturas na câmara de crescimento acham-se na figura 3 e para a placa de Petri acham-se na figura 4.

Comparando-se as figuras 3 e 4 pode-se verificar que a estabilização da temperatura dentro da placa de Petri demora muito mais tempo que na câmara de crescimento. Assim as sementes não estiveram em períodos exatos de 12 horas em cada temperatura, mas próximos de 12 horas.

Foram verificadas também as condições ideais para a remoção da casca (testa) e da película (tegmen) de sementes frescas e secas. Repetições de 100 sementes foram embebidas previamente em água por 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 14 horas. A seguir foi determinada para cada tempo de embebição, a maior ou menor facilidade para remoção da casca e da película. A remoção foi executada manualmente. Testou-se também uma embebição adicional por 14 horas em rolo de papel para germinação (constituindo-se de 2 folhas umedecidas de papel toalha específico para germinação, que foram enroladas após nelas terem sido colocadas as sementes).

Pelos resultados da tabela I verifica-se que para sementes frescas a remoção da casca é facilitada a partir de cinco horas de pré-embebição das sementes, enquanto que a remoção da película é conseguida com facilidade apenas com quatorze horas de pré-embebição. Com relação a sementes secas, verifica-se pela mesma tabela I que a remoção da casca é facilitada com quatorze horas de pré-embebição das sementes. No entanto, para remoção da

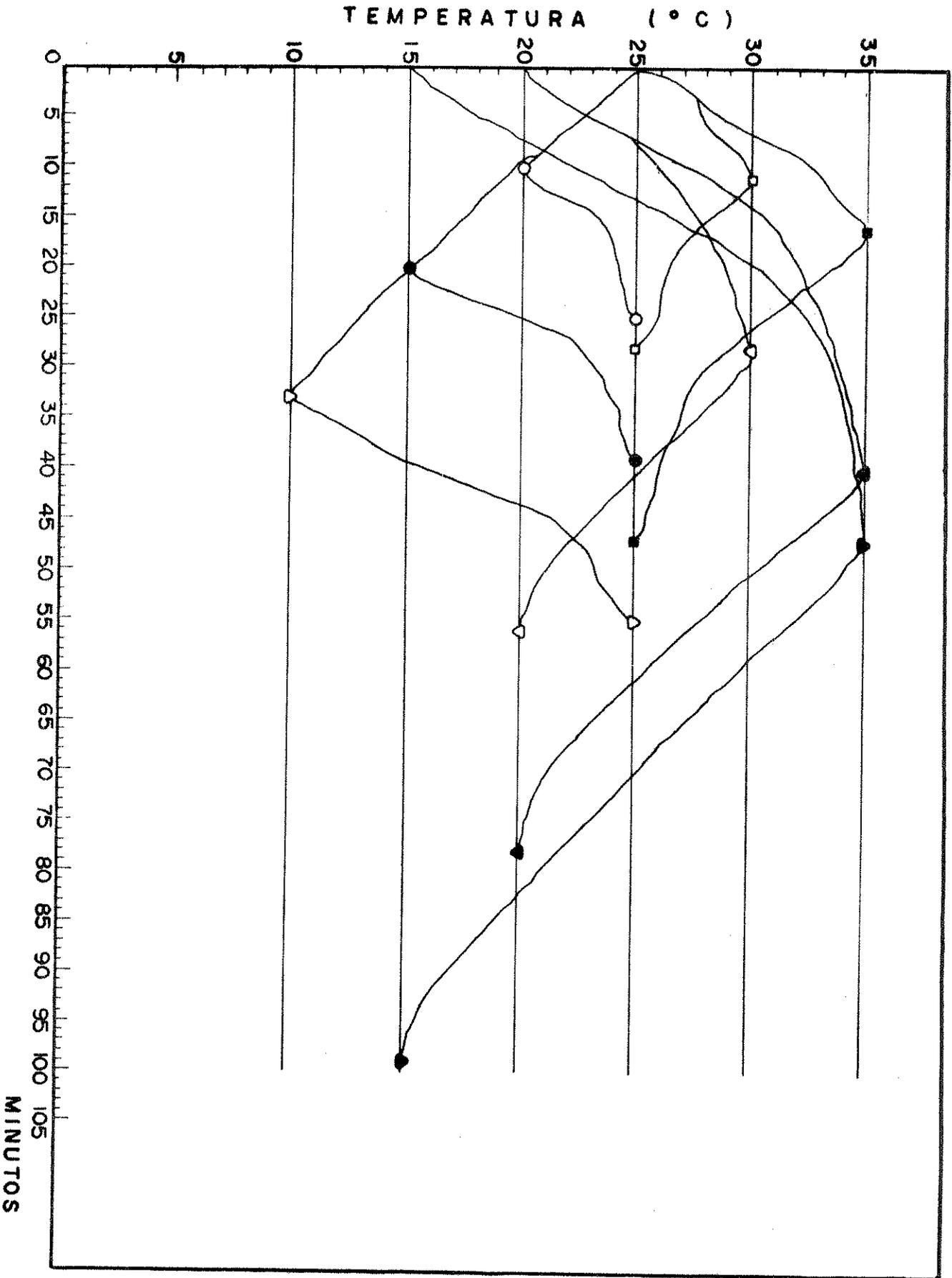
F I G U R A - 3

Tempo necessário para a alternância de duas temperaturas na câmara de crescimento.

Símbolos:

- Δ - 25-10°C
- - 25-15°C
- ∇ - 20-30°C
- ▲ - 15-35°C
- - 25-30°C
- ♥ - 20-35°C
- - 25-20°C
- - 25-35°C

FIGURA 3



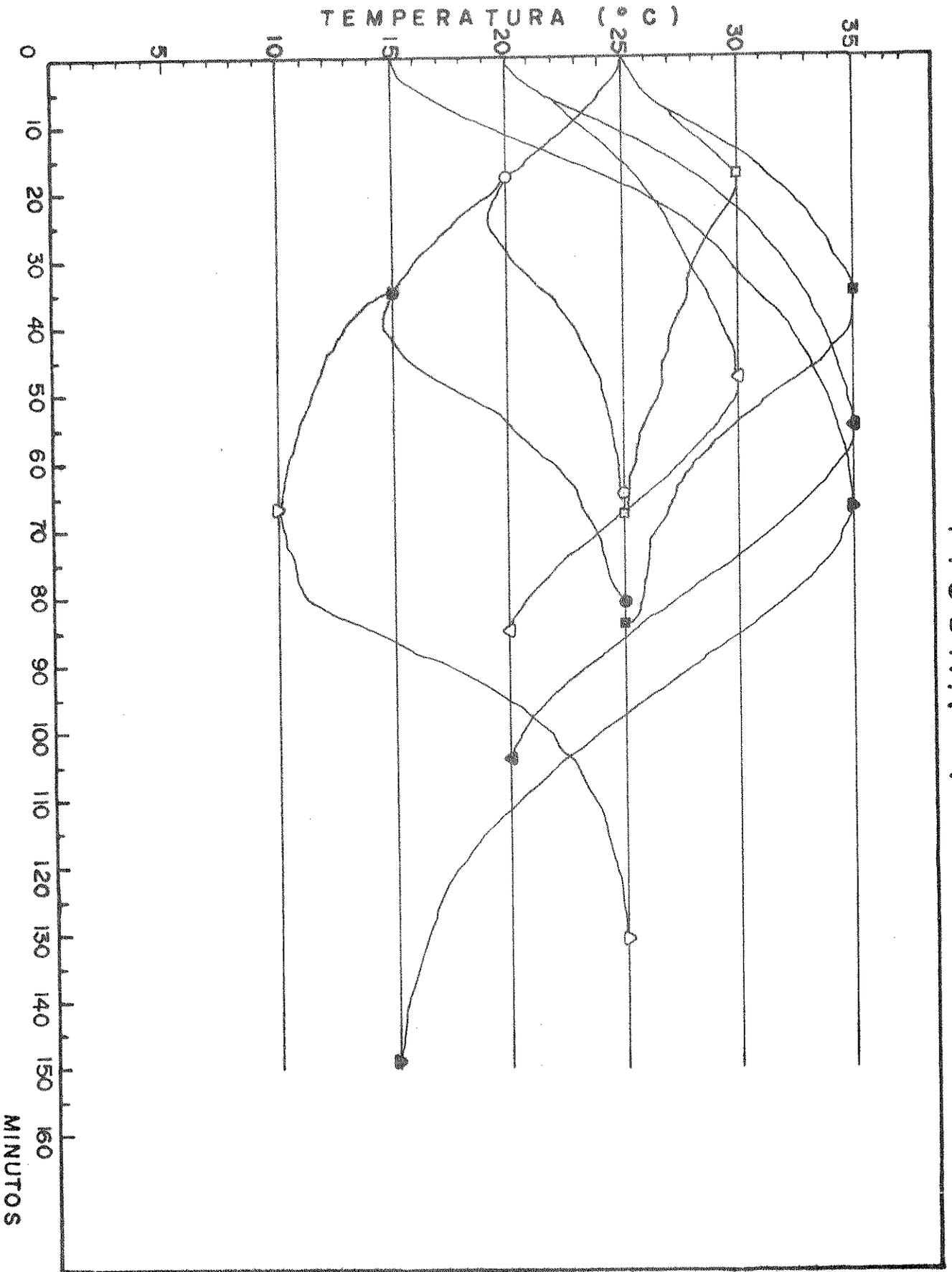
F I G U R A - 4

Tempo necessário para a alternância de duas temperaturas dentro da placa de Petri.

Símbolos:

- △ - 25-10°C
- - 25-15°C
- ▽ - 20-30°C
- ▲ - 15-35°C
- ▣ - 25-30°C
- ▼ - 20-35°C
- - 25-20°C
- - 25-35°C

FIGURA 4



T A B E L A - I

Tempo de embebição para remoção da casca e película.

| Tempo de embebição (horas) | Remoção da casca | | Remoção da película | |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Semente fresca (umid.12%) | Semente seca (umidade 6%) | Semente fresca (umid.12%) | Semente seca (umidade 6%) |
| 1 | + + | + + | + + | + + |
| 2 | + + | + + | + + | + + |
| 3 | + + | + + | + + | + + |
| 4 | + + | + + | + + | + + |
| 5 | + + + | + + | + + | + + |
| 6 | + + + | + + | + + | + + |
| 14 | + + + | + + + | + + + | + + + |
| 14* | - - | + + + | + + + | + + + |

*Embebição em rolo de papel para germinação. Maior número de sinais gráficos + significa maior facilidade na remoção da casca e da película.

película, verifica-se que mesmo com quatorze horas de pré-embebição, as sementes secas ainda apresentaram certa dificuldade para sua remoção. A partir daí, tentou-se, com sucesso, a pré-embebição por quatorze horas de sementes frescas e secas em rolos de papel saturados com água, o que permitiu a embebição mais lenta das sementes. A partir destes resultados, adotou-se a pré-embebição por quatorze horas em rolo de papel quando havia necessidade de remoção da casca e da película de sementes frescas e secas artificialmente.

A viabilidade das sementes foi verificada por testes de germinação, como também pelo teste de tetrazólio (Delouche et al, 1962). O sal de cloreto de 2, 3, 5 trifenil tetrazolium foi aplicado, em concentrações de 0,5 e 1,0%, em sementes intactas sem embebição e com pré-embebição por quatorze horas em água, utilizando-se repetições de 100 sementes. Tanto sementes secas artificialmente (tratamento A₁) como sementes frescas foram testadas inicialmente. Entretanto, não houve resultados positivos de coloração para as duas soluções testadas, mostrando que a pré-embebição não teve também nenhum efeito em sementes intactas.

Procedeu-se, a seguir, a determinação da concentração de tetrazólio e tempo de coloração ideais com sementes sem casca e nuas. Foram testadas duas concentrações de tetrazólio (0,5 e 1,0%) e quatro tempos de coloração (1, 3, 6 e 14 horas). A temperatura durante a coloração foi mantida constante a 35°C, usando-se uma câmara de crescimento. Foram usadas repetições de 100 sementes frescas, sementes secas e sementes nuas mortas (fervidas por 60 minutos). Uma coloração vermelha clara na semente, obtida pela formação do formazan, foi adotada como padrão para o teste.

Analisando-se os resultados da tabela II, nota-se que

T A B E L A - II

Concentração de tetrazólio e tempo de coloração.

| Concentração de tetrazólio | Tempo para coloração | Semente fresca (umidade 12%) | | Semente seca (umidade 6%) | | Semente fervida-60' |
|----------------------------|---|------------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|---------------------|
| | | Sem casca | Nua | Sem casca | Nua | Nua |
| 0,5 % | 1 | - | cor rosa (pálida) | - | cor rosa (pálida) | - |
| | 3 | - | boa coloração | - | boa coloração | - |
| | 6 | - | boa coloração | - | boa coloração | - |
| | 14 | - | excesso de coloração | - | excesso de coloração | - |
| 1,0 % | 1 | - | cor rosa (pálida) | - | cor rosa (pálida) | - |
| | 3 | - | boa coloração | - | boa coloração | - |
| | 6 | - | boa coloração | - | boa coloração | - |
| | 14 | - | excesso de coloração | - | excesso de coloração | - |
| Obs. | O sinal gráfico - representa resultado negativo para o teste de tetrazólio: falta de coloração. | | | | | |

as sementes sem casca (frescas ou secas) deram resposta negativa ao tetrazólio, mostrando, portanto, que a película é que era impermeável ao tetrazólio, pois as sementes sem película (isto é, sementes nuas) deram resultado positivo. Como era de se esperar, as sementes nuas (sem casca e sem película) fervidas por sessenta minutos deram também resultado negativo ao tetrazólio. Com relação às concentrações de tetrazólio usadas, foi verificado que as respostas a 0,5 e 1,0% foram semelhantes. As respostas aos tempos de coloração foram semelhantes para sementes frescas e secas e para as concentrações de 0,5 e 1,0%, notando-se, pela mesma tabela II, que o período de uma hora é insuficiente para coloração e o de quatorze horas é excessivo, sendo que os períodos de três e de seis horas são bons para coloração. A partir destes dados, adotou-se como padrão para o teste de tetrazólio em sementes frescas e secas de linão cravo, a pré-embrição das sementes em rolo de papel saturado de água por quatorze horas, remoção das cascas e das películas das mesmas, e uso de solução de tetrazólio a 0,5% por três horas. A temperatura usada para coloração foi sempre de 35°C.

A influência imediata da secagem artificial na viabilidade de sementes de linão cravo também foi verificada com o teste de tetrazólio. Usou-se sementes frescas e sementes secas, obtidas imediatamente após a secagem artificial (zero meses de armazenamento). Foram testadas repetições de 100 sementes, com embrição prévia de 14 horas em rolo de papel para germinação para retirada da casca e da película. A concentração de tetrazólio usada foi de 0,5%, e o tempo de coloração foi de 3 horas, a 35°C.

Para experimentos em que se estudava a influência da casca e da película na germinação, as sementes foram pré-embri-

das em água destilada por 14 horas em rolo de papel para germinação. A retirada da casca e da película foi feita manualmente.

As sementes intactas, em alguns experimentos, foram esterilizadas com hipoclorito de sódio a 7, 10 e 15%. As sementes ficaram imersas nas soluções por 3 horas. Após isto, as sementes foram lavadas por 5 minutos em água corrente, e depois imersas por uma hora em água destilada, para eliminar o hipoclorito de sódio. No caso de sementes nuas, as concentrações de hipoclorito usadas foram 4, 7, 10 e 15% por uma hora, sendo, a seguir, as sementes lavadas do mesmo modo que as sementes intactas.

Em alguns experimentos foi feita uma reidratação lenta das sementes secas artificialmente. As sementes foram colocadas em sacos de papel e deixadas em câmara fria com umidade relativa e temperatura médias respectivamente de 85% e 20°C. Durante a reidratação procedeu-se a determinações diárias do teor de umidade das sementes. Foram utilizadas duas repetições de 30g de sementes, secando-as em estufa seca a 105°C ± 3 durante 24 horas, sendo a umidade calculada por diferença de peso, com base no peso úmido das sementes. Na reidratação considerou-se que o teor de umidade das sementes estava em equilíbrio com a umidade relativa da câmara fria quando foram determinados três pontos com umidade constante. Para a remoção da casca e da película de sementes reidratadas, as mesmas sofreram enbebição por 14 horas em rolos de papel para germinação saturados de água.

3- Extração de Substâncias Endógenas

As substâncias endógenas que se tentou detectar foram gibberelinas, citocininas e inibidores. Foram extraídas sementes

frescas (tratamento B) e sementes secas (tratamento Λ_1), sendo que cada amostra constava de 200 sementes de peso conhecido (ao redor de 10g). Foram extraídas sementes com 0, 12 e 32 meses de armazenamento. Foram sempre utilizadas 4 repetições.

O esquema de extração foi o adotado por Valio (1969) e modificado por Gherardi (1974), e pode ser visto na página a seguir.

Inicialmente procedeu-se para cada repetição de 200 sementes a uma homogeneização durante 3 minutos em "Virtis", com cerca de 50 ml de metanol 80%, sendo o nível deste completado a seguir até 100 ml. Os extratos foram colocados em refrigerador por 24 horas.

Após este período a amostra foi filtrada a vácuo, sendo que o filtrado (Filtrado I) foi colocado em novo frasco e os resíduos colocados novamente em 100 ml de metanol 80% para nova extração. Os dois frascos voltaram para a geladeira por mais 24 horas.

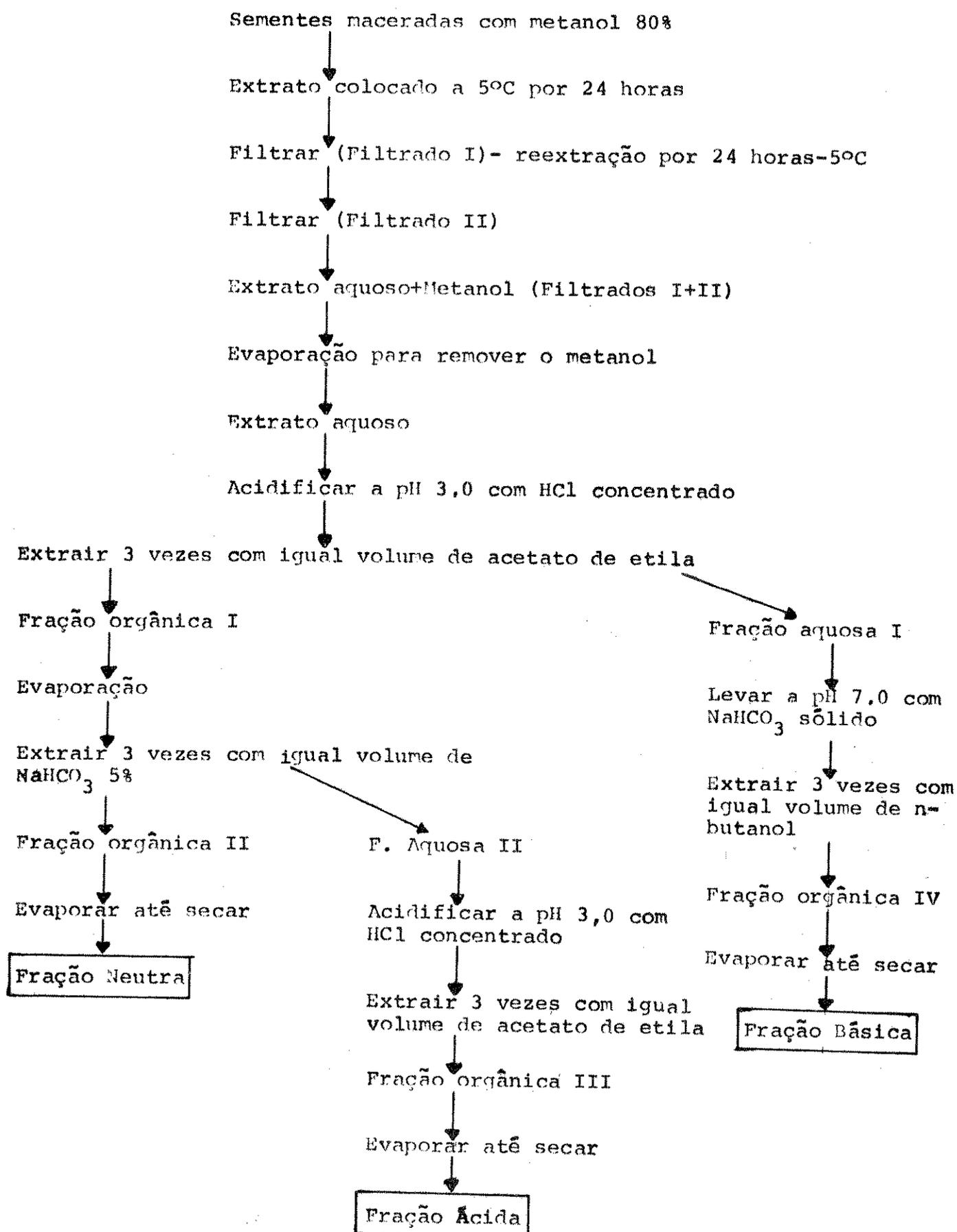
A seguir procedeu-se a nova filtração a vácuo, e o filtrado obtido (Filtrado II) foi juntado ao Filtrado I e colocado num congelador a -10°C , aí permanecendo até uso posterior.

O passo seguinte foi o fracionamento do extrato aquoso de cada repetição para a obtenção das frações ácida, básica e neutra, de acordo com o esquema já mencionado.

A eliminação do metanol do extrato aquoso foi conduzida num evaporador rotatório, sob pressão reduzida e temperatura de $35 - 40^{\circ}\text{C}$.

As frações obtidas foram cromatografadas em papel Whatman nº 3. O desenvolvimento foi descendente em um percurso de 40 cm, realizado em cubas cromatográficas previamente satura-

MÉTODO DE EXTRAÇÃO



das com o sistema solvente. Os cromatogramas foram secos sob corrente de ar e armazenados a 5°C até serem biotestados.

O sistema solvente empregado para frações ácidas e neutras foi n - butanol : ácido acético : água (4 : 1 : 1), que se mostrou muito eficiente para giberelinas (figura 5). Para as frações básicas o sistema solvente empregado foi isopropanol : amônia : água (10 : 1 : 1).

As citocininas foram detectadas por métodos químicos e biológicos, e as outras substâncias endógenas somente por testes biológicos.

Para se determinar as regiões com reações de substâncias tipo citocininas no cromatograma usou-se o reagente de Wood (AgNO_3 2% - bromofenol azul 0,4% em acetona v/v), que é específico para substâncias purínicas, desenvolvendo forte cor azul na presença de tais grupos (Wood, 1955). A técnica usada foi tirar uma faixa longitudinal de cerca de 1 cm do cromatograma e mergulhar esta faixa diretamente no reagente, determinando-se as regiões entre Rfs com reação positiva de coloração. Somente foram biotestadas as zonas que tiveram reação positiva de coloração. Nos biotestes foram também utilizadas soluções padrões de 6-BA, (6-Benziladenina) da SIGMA.

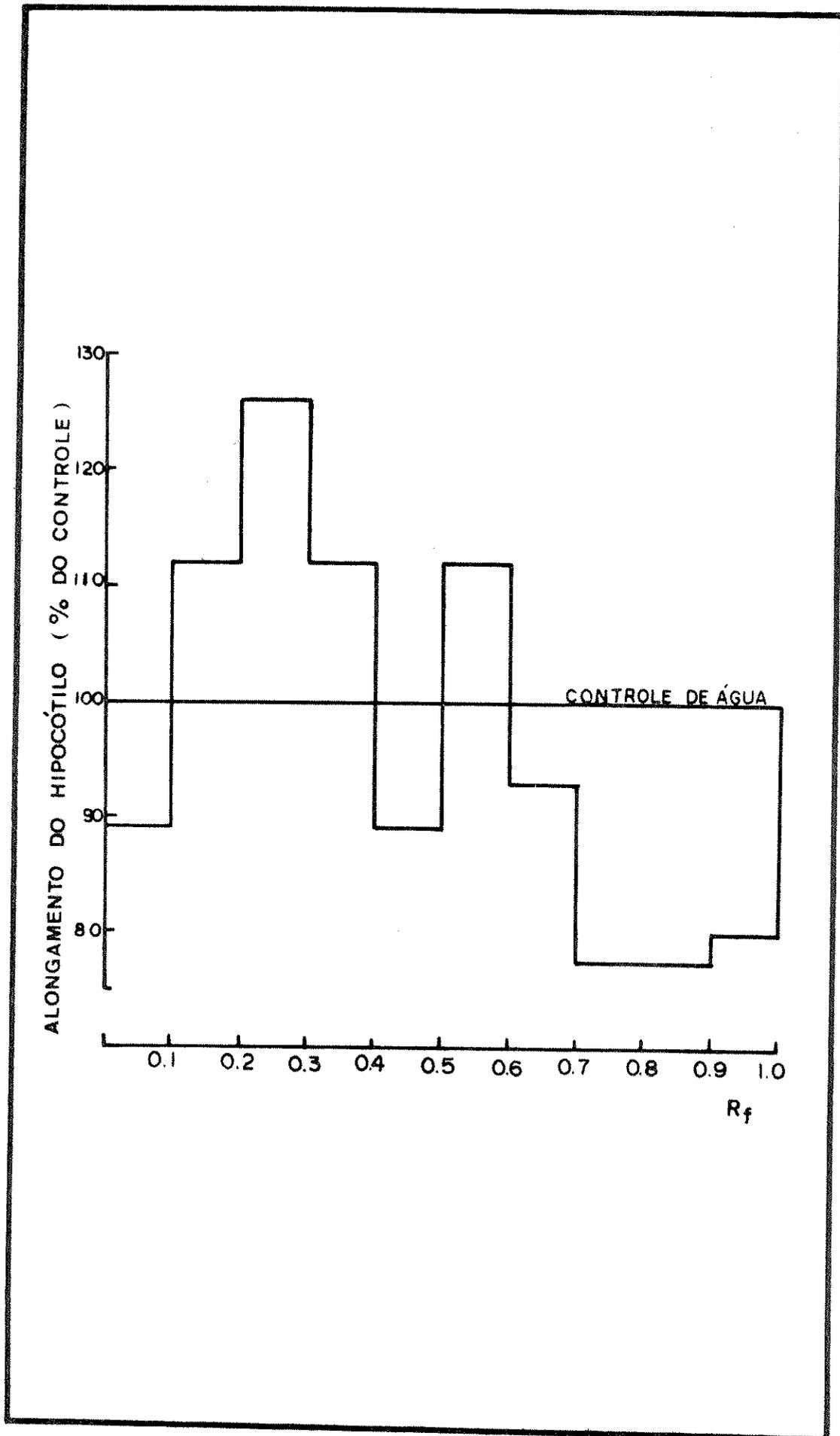
Os cromatogramas de frações ácidas e neutras a serem biotestados foram divididos em 10 faixas transversais, nas distâncias correspondentes entre o ponto de aplicação e o Rf 1.0, e as faixas, por sua vez, foram cortadas no sentido longitudinal, em três partes iguais. Cada uma das três repetições foi colocada ao acaso em cubetas de polietileno e umedecidas com água destilada. Como controle utilizou-se cromatograma onde só correu o sistema solvente. Também foram utilizadas soluções padrões de GA_3 (ácido giberélico) da EASTMAN.

F I G U R A - 5

Cromatografia de papel descendente com sistema solvente n - butanol : ácido acético : água (4 : 1 : 1).

Fração orgânica I extraída de 200 sementes frescas, da safra de 1977. O bioteste utilizado foi o do hipocótilo de alface.

FIGURA 5



As soluções padrões de GA_3 utilizadas foram de 0,0625 ; 0,125 ; 0,2 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1,0 ; 1,25 e 1,5 ppm , e as soluções padrões de 6-BA foram de 0,01 ; 0,1 ; 1,0 e 10,0 ppm, que davam uma relação linear entre a concentração e o aumento do tamanho medido no bioteste (ver a seguir).

Para giberelinas e inibidores foi utilizado o bioteste do hipocótilo de alface, segundo a técnica de Frankland e Wareing (1960). Substâncias com atividade giberelínica promovem o alongamento do hipocótilo de alface, enquanto substâncias inibidoras de crescimento inibem este alongamento. Foram utilizadas sementes de alface do cultivar "Grand Rapids", que foram colocadas para germinar em placa de Petri a 25°C por 24 horas, sob luz contínua. Após este período, as plântulas selecionadas por homogeneidade de tamanho foram transferidas para cubetas de polietileno em número de 4 plântulas por cubeta. Aí foram postas em contacto com um terço de cada uma das 10 faixas, correspondentes a uma faixa entre dois Rfs de um cromatograma em teste ou de controle, ou também com as soluções padrões de GA_3 . Previamente em cada cubeta foram adicionados 2 ml de água destilada ou de solução padrão. A seguir as cubetas foram transferidas para câmara de crescimento a 25°C sob luz contínua, onde permaneceram por três dias, sendo que após este período procedeu-se a medição dos hipocótilos das plântulas testadas.

Para citocininas foi utilizado o bioteste dos cotilédones de rabanete, segundo a técnica de Letham (1968). Substâncias com atividade citocinínica promovem o aumento do peso fresco de cotilédones de rabanete, devido principalmente a uma maior absorção de água. Sementes de rabanete do cultivar "vermelho redondo" foram colocadas para germinar em placas de Petri a 30°C durante

24 horas. Após este período foi retirado o cotilédone externo de cada plântula (os cotilédones externos são mais homogêneos), os quais, após serem lavados com água destilada, foram selecionados pelo mesmo tamanho e transferidos para as cubetas de polietileno. Foram utilizados quatro cotilédones por cubeta, aí ficando em contacto com um terço de uma faixa entre dois Rfs de um cromatograma em teste (reação positiva para Wood) ou de controle, ou também com as soluções padrões de 6-BA. Previamente foram adicionados 2 ml de água destilada ou de solução padrão por cubeta e, a seguir, as cubetas foram transferidas para 25°C sob luz contínua, onde permaneceram por 6 dias. Após este período procedeu-se a pesagem dos grupos de quatro cotilédones de cada cubeta.

4- Análise Estatística

O delineamento estatístico utilizado em todos os experimentos de germinação foi o completamente casualizado (Snedecor, 1962). Para a análise estatística dos valores de germinação dados em porcentagem, os mesmos foram transformados em $\text{arc sen}\sqrt{\%}$. Quando na análise de variância o teste F deu significativo a 5%, determinou-se a D.M.S. (Diferença Mínima Significativa) a 5%, que foi usada para análise das diferenças entre as médias dos tratamentos, através do teste de Tukey. Nos biotestes para detecção de substâncias endógenas, o delineamento estatístico usado foi o completamente casualizado. Na análise de variância foi utilizado o teste F para analisar as diferenças de cada faixa entre Rfs de cada cromatograma em relação ao controle de água, e também entre cada faixa entre Rfs de um cromatograma obtido a partir de sementes frescas com a faixa entre os Rfs correspondentes de outro cromatograma obtido a partir de sementes secas.

III - RESULTADOS

A- Germinação de Sementes de Linão Cravo

1- Efeito das condições de armazenamento

O efeito das condições em que foram armazenadas as sementes na viabilidade destas foi estudado através de testes de germinação e de coloração por tetrazólio.

1.1- Testes de germinação

a) Condições de laboratório

Várias condições de armazenamento foram estudadas em um experimento com sementes coletadas em 1975. As condições de armazenamento, já mencionadas em Material e Métodos, foram as seguintes:

A₁ - Sementes secas enlatadas - armazenadas a 4°C

A₂ - Sementes secas enlatadas - armazenadas a 18°C

A₃ - Sementes secas enlatadas - armazenadas em condições ambientais

B - Sementes frescas, não enlatadas, armazenadas em condições ambientais

C - Sementes frescas, não enlatadas, armazenadas em condições de 85%U.R. e de 18°C.

Os experimentos de germinação foram realizados a cada dois meses, durante um ano, e os resultados estão na figura 6.

Na figura 6a podem ser vistos os valores para umidade das sementes, enlatadas ou não, no início do experimento. Na verificação seguinte, feita dois meses após, pode ser visto que a umidade das sementes dos tratamentos A (sementes secas enlatadas) permaneceu constante (como era de se esperar), enquanto que hou-

F I G U R A - 6

Seementes da safra de 1975

| | | | |
|--|---|---------------------------|---|
| <u>Símbolos:</u> semente seca a 6% de umidade | { | 4°C - A ₁ | ○ |
| | | 18°C - A ₂ | △ |
| | | Ambiente - A ₃ | □ |
| Semente fresca | { | Ambiente - B | ▲ |
| | | 85% U.R. - C | ● |

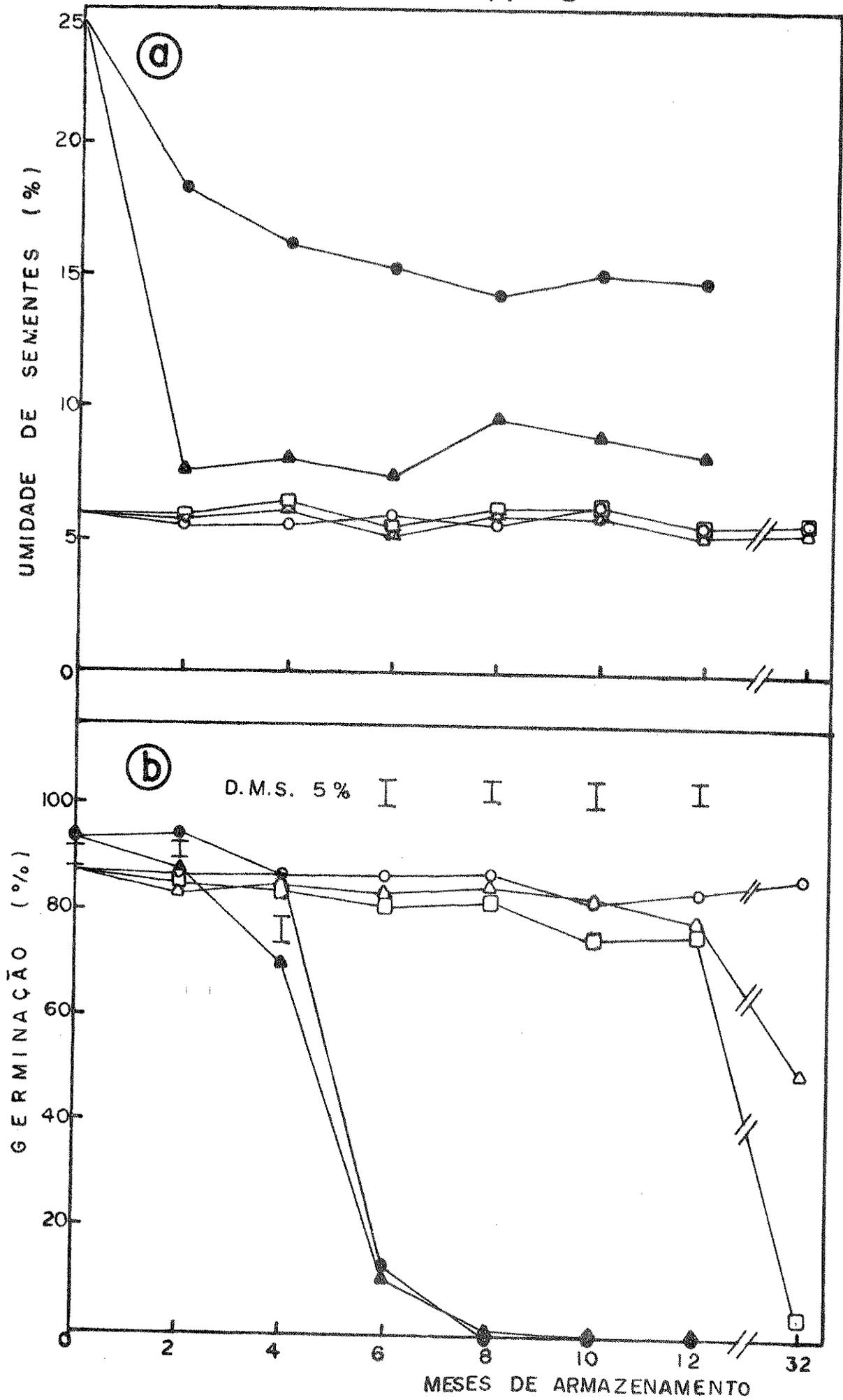
Figura 6a

Umidade das seementes em porcentagem medida a cada dois meses durante um ano.

Figura 6b

Germinação das seementes verificada a cada dois meses durante um ano e apresentada em porcentagem. A germinação 32 meses depois também é apresentada. DMG 5% é apresentada na figura.

FIGURA 6



ve uma queda nos tratamentos B e C (sementes frescas) . A queda foi maior no tratamento B (armazenada em condições ambientais), atingindo uma umidade de cerca de 8%, que daí em diante manteve-se relativamente constante. A umidade, entretanto, nunca atingiu o valor da umidade de sementes secas. No tratamento C (armazenamento a 85%U.R. e 18°C) a umidade caiu até cerca de 15-16%, mantendo-se constante ao redor deste valor.

Os resultados de germinação são apresentados na figura 6b. A secagem artificial das sementes causou uma pequena redução na porcentagem de germinação, que foi estatisticamente significativa. Dois meses depois não houve diferença significativa na germinação entre os tratamentos A_1 , A_2 e A_3 . Seis meses a partir do início do experimento houve uma pequena diminuição na germinação do tratamento A_3 (semente seca armazenada em ambiente) em relação aos tratamentos A_1 (semente seca armazenada a 4°C) e A_2 (semente seca armazenada a 18°C), e essa diferença aumentou daí para frente, sendo estatisticamente significativa. Doze meses após o início do experimento houve uma queda de germinação no tratamento A_2 . Os tratamentos A_1 , A_2 e A_3 foram, entretanto, no todo melhores que os tratamentos B e C. A germinação dos tratamentos A_1 , A_2 e A_3 foi também verificada após 32 meses do início do experimento, e a alta germinação ainda se obteve no tratamento A_1 , havendo uma queda de germinação no tratamento A_2 e uma germinação quase nula no tratamento A_3 .

A queda de germinação foi mais rápida no tratamento B do que no C, pois já é mostrada dois meses após o início, enquanto que em C é mostrada apenas quatro meses após o início do experimento. Seis meses após o início do experimento a germinação caiu a menos de 20% para estes dois tratamentos , e na amos-

tragem seguinte ela foi nula.

Pelos resultados apresentados até aqui parece que o melhor tratamento foi o A_1 (sementes secas armazenadas a 4°C).

Em vista dos resultados obtidos, resolveu-se verificar estes resultados usando sementes colhidas em 1977, porém diminuindo o número de tratamentos. Foram escolhidos o tratamento A_1 (sementes secas enlatadas, armazenadas a 4°C) e o tratamento B (sementes frescas, não enlatadas, armazenadas em condições ambientais). O experimento foi conduzido durante dez meses e os resultados estão na figura 7. Na figura 7a pode ser verificada novamente a queda de umidade do tratamento B, como também, pela figura 7b, a queda de germinação nesse tratamento após dois meses e germinação nula após oito meses do início do experimento. A umidade das sementes manteve-se constante e a germinação foi alta no tratamento A_1 (figura 7a e 7b), confirmando os dados obtidos no primeiro experimento.

Na figura 8 são comparados os tratamentos A_1 e B dos dois experimentos descritos, onde pode ser vista uma boa repetição para os valores de umidade de sementes (figura 8a) e para germinação (figura 8b).

Na figura 9a é mostrada a velocidade de germinação das sementes do tratamento A_1 a cada dois meses. Embora as curvas não se sobreponham na fase exponencial, as inclinações das curvas são semelhantes, e a orden não segue o período de armazenamento, já que a curva para quatro meses de armazenamento tem, por exemplo, maior velocidade que a curva para dois meses de armazenamento. Outra coisa a notar é que a germinação total é atingida entre 19 e 25 dias de enbebição, e o início apenas ocorre cerca de 10 dias após o início da enbebição.

F I G U R A - 7

Sementes da safra de 1977.

Símbolos: Semente seca a 6% de umidade - 4°C - A₁ ○

Semente fresca - ambiente - B ●

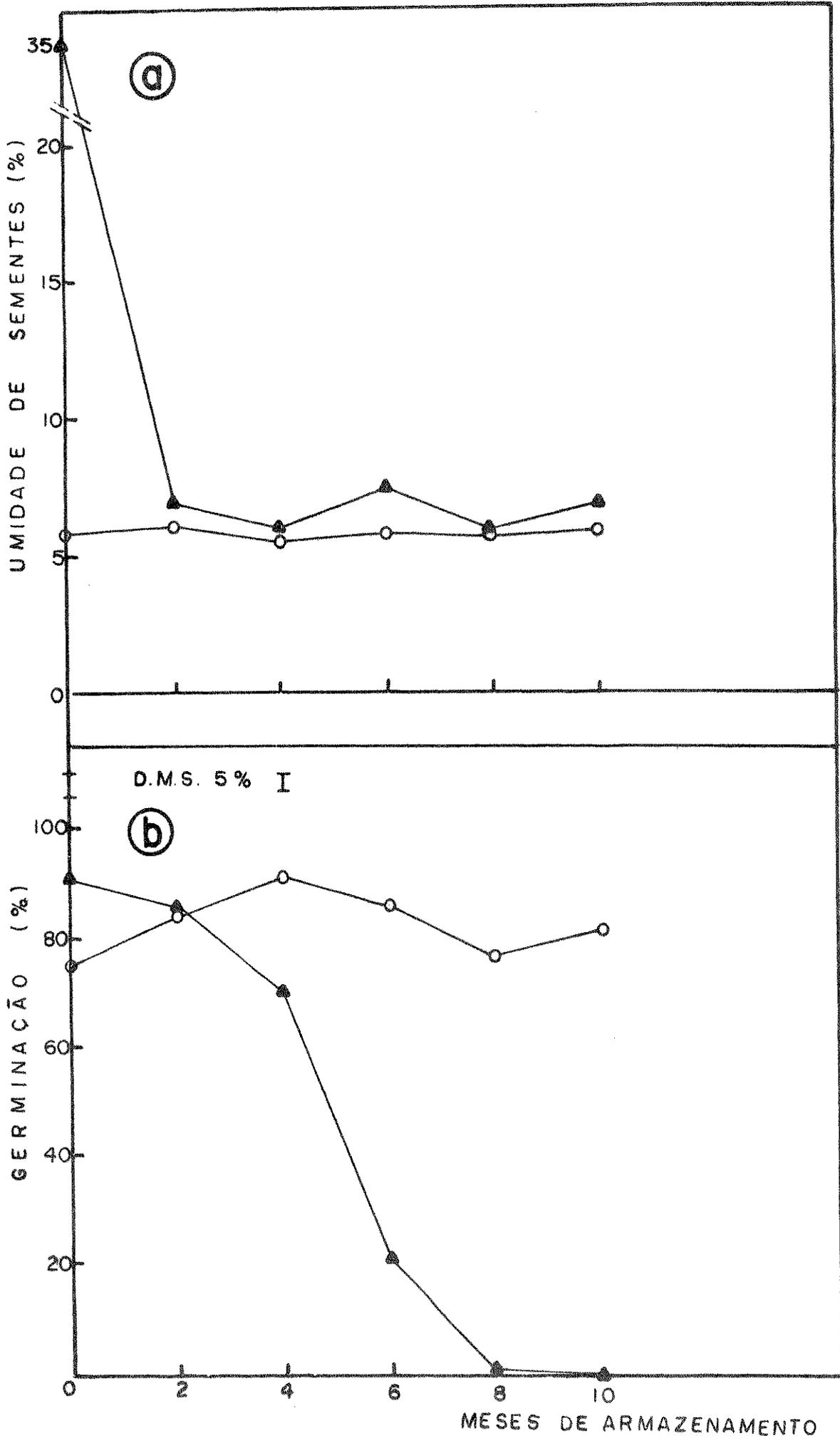
Figura 7a

Umidade das sementes em porcentagem medida a cada dois meses.

Figura 7b

Germinação em porcentagem medida a cada dois meses.
DMS 5% é apresentada na figura.

FIGURA 7



F I G U R A - 8

Sementes das safras de 1975 e 1977.

| | | |
|------------------|-------------------------------|----------------|
| <u>Símbolos:</u> | Semente fresca - ambiente - B | { Safra 1975 ○ |
| | | { Safra 1977 ● |
| | Semente seca a 6% de umidade | { Safra 1975 △ |
| | 4°C - A ₁ | { Safra 1977 ▲ |

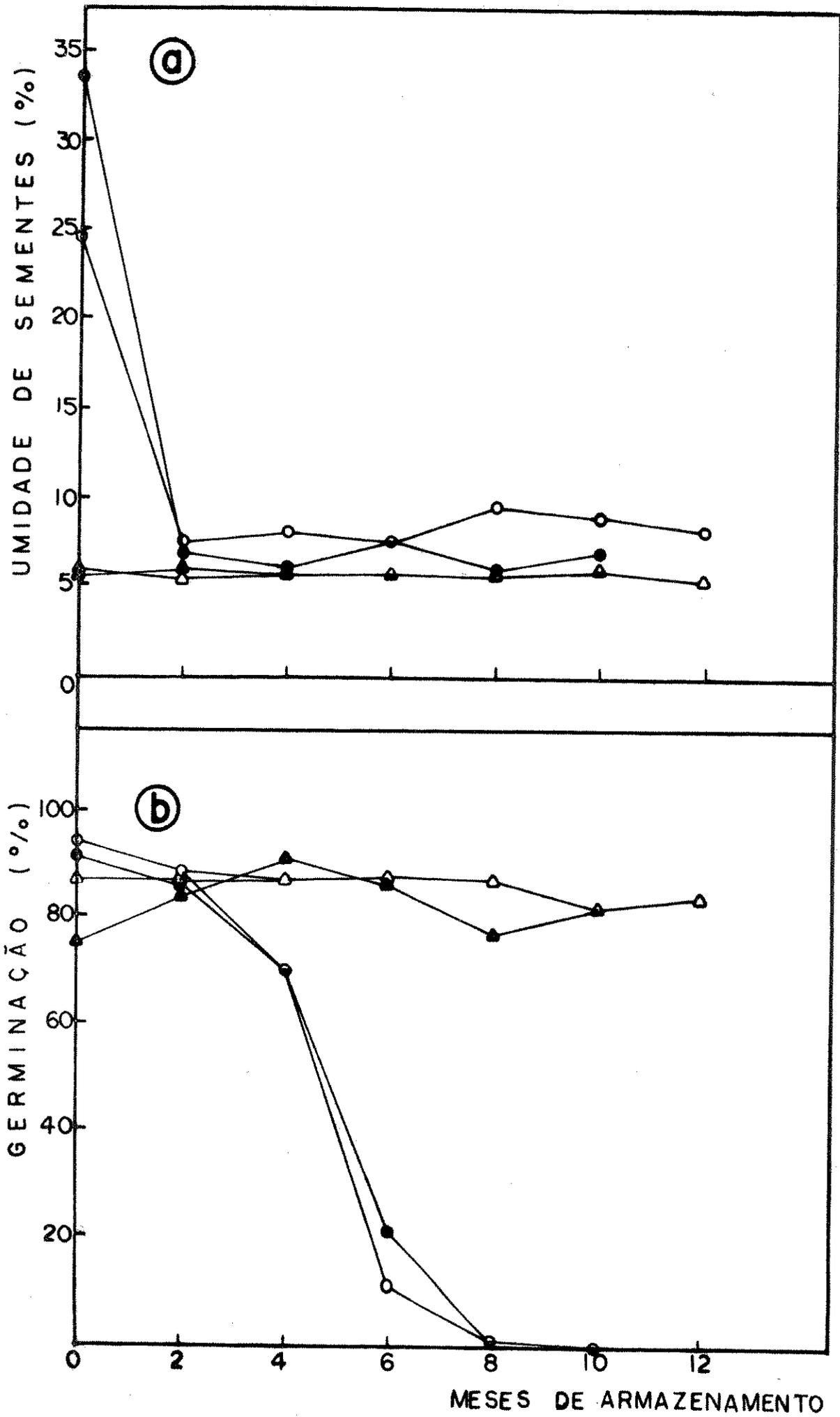
Figura 8a

Unidade das sementes em porcentagem medida a cada dois meses.

Figura 8b

Germinação em porcentagem medida a cada dois meses.

FIGURA 8



F I G U R A - 9

Figura 9a

Velocidade de germinação de sementes secas mantidas a 4°C - Λ_1 - safra 1977.

Velocidade de germinação em porcentagem medida a cada dois meses.

| | | |
|------------------|------------|------------------|
| <u>Símbolos:</u> | 0 meses : | Δ |
| | 2 meses : | \blacktriangle |
| | 4 meses : | \circ |
| Período | 6 meses : | \bullet |
| de | 8 meses : | \square |
| armazenamento | 10 meses : | \blacksquare |
| | 32 meses : | ∇ |

Figura 9b

Germinação de sementes secas armazenadas a 4°C, 18°C e ambiente, em condições de campo.

Germinação em porcentagem medida a cada dois meses. DMS a 5% é apresentada na figura.

| | | |
|------------------|---------------------------------------|------------------|
| <u>Símbolos:</u> | Semente seca - 4°C - Λ_1 | \bullet |
| | Semente seca - 18°C - Λ_2 | \blacksquare |
| | Semente seca - ambiente - Λ_3 | \blacktriangle |

Concluindo, a melhor condição de armazenamento para manter a germinação de sementes de limão cravo é o tratamento A_1 (sementes secas artificialmente, enlatadas e armazenadas a 4°C).

b) Condições de campo

As sementes dos tratamentos A_1 , A_2 e A_3 também foram postas para germinar em condições de campo (ver Material e Métodos). Os resultados deste experimento são apresentados na figura 9b. Pela figura pode ser visto que até seis meses a partir da secagem artificial, a temperatura de armazenamento não exerceu influência estatisticamente significativa na germinação das sementes nos canteiros de semeadura (F não significativo). Aos oito meses houve uma pequena diminuição de germinação no tratamento A_3 (semente seca armazenada em condições ambientais) com relação aos tratamentos A_1 e A_2 , diferença esta que aumenta daí para frente, sendo estatisticamente significativa.

Comparando-se os resultados de germinação obtidos em condições de laboratório e de campo, através das figuras 6b e 9b, notam-se ligeiras variações aos seis e doze meses após o início do experimento. Aos seis meses, em condições de campo, os tratamentos A_1 , A_2 e A_3 não diferem estatisticamente entre si, mas em condições de laboratório o tratamento A_1 não difere de A_2 , mas é superior a A_3 . Aos doze meses, em condições de laboratório, A_1 (semente seca armazenada a 4°C) é superior a A_2 e A_3 , mas em condições de campo A_1 não difere de A_2 , sendo ambos superiores a A_3 . No entanto, verifica-se nos dois experimentos uma tendência para diminuição de germinação com o aumento da temperatura de armazenamento das sementes, ou seja, tratamento A_1 (semente seca -4°C) superior ao tratamento A_2 (semente seca - 18°C) e este superior ao tratamento A_3 (semente seca - ambiente).

A porcentagem de germinação nunca foi tão alta no campo como foi no laboratório. É bom lembrar que o critério do que se considera germinação é diferente nos dois casos: protrusão da radícula em um caso, e aparecimento das folhas acima do solo em condições de campo. Assim, muitas sementes consideradas germinadas em laboratório poderiam não ter um desenvolvimento posterior, e, além disso, as sementes no campo estão sujeitas a condições climáticas adversas, ataque de microorganismos, predadores, etc.

Outra observação em relação ao experimento de campo é que, com relação ao efeito da secagem artificial e das temperaturas de armazenamento das sementes no transplante dos "cavalinhos" para o viveiro, "pegamento" do enxerto e obtenção da muda, observou-se no viveiro que os resultados foram totalmente normais, não diferindo dos resultados com mudas provenientes de sementes frescas.

1.2- Determinação da viabilidade

Na determinação, pelo teste de tetrazólio, da influência da secagem artificial na viabilidade de sementes de limão cravo recém colhidas (antes do armazenamento) nota-se, pelos resultados na tabela III, que a secagem artificial provocou ligeira queda na viabilidade das sementes, comprovando assim dados anteriores obtidos através de teste de germinação (figuras 6b e 7b).

A determinação, pelo teste de tetrazólio, da influência do tipo de armazenamento na viabilidade de sementes frescas e secas de limão cravo é apresentada na tabela IV. Os resultados da tabela IV mostram que o armazenamento por dez meses afetou drasticamente a viabilidade de sementes frescas mantidas em condições ambientais (tratamento B), porém não afetou a viabilidade de sementes secas mantidas a 4°C em recipientes hermeticamente

T A B E L A - III

Teste de tetrazólio em sementes com zero meses
de armazenamento (recém colhidas).

| Sementes nuas | Número de sementes testadas | Número de sementes viáveis | % de germinação |
|---|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| Semente fresca (B) (umidade: 24%) | 100 | 92 | 92 |
| Semente seca (A ₁) (umidade: 6%) | 100 | 83 | 83 |

T A B E L A - IV

Teste de tetrazólio em sementes armazenadas
por 10 meses.

| Sementes nuas | Número de sementes testadas | Número de sementes viáveis | % de germinação |
|---|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| Semente fresca (B) (umidade: 7%) | 60 | 05 | 8,3 |
| Semente seca (A ₁) (umidade: 6%) | 60 | 50 | 83,3 |

fechados (tratamento A_1), comprovando assim os resultados anteriores obtidos através de testes de germinação (figuras 6b e 7b).

Assim, tanto por testes de germinação como pela reação com tetrazólio, mostrou-se que o tratamento A_1 (sementes secas artificialmente até cerca de 6% de umidade, enlatadas e armazenadas a 4°C) é um excelente método para a conservação da viabilidade de sementes de limão cravo.

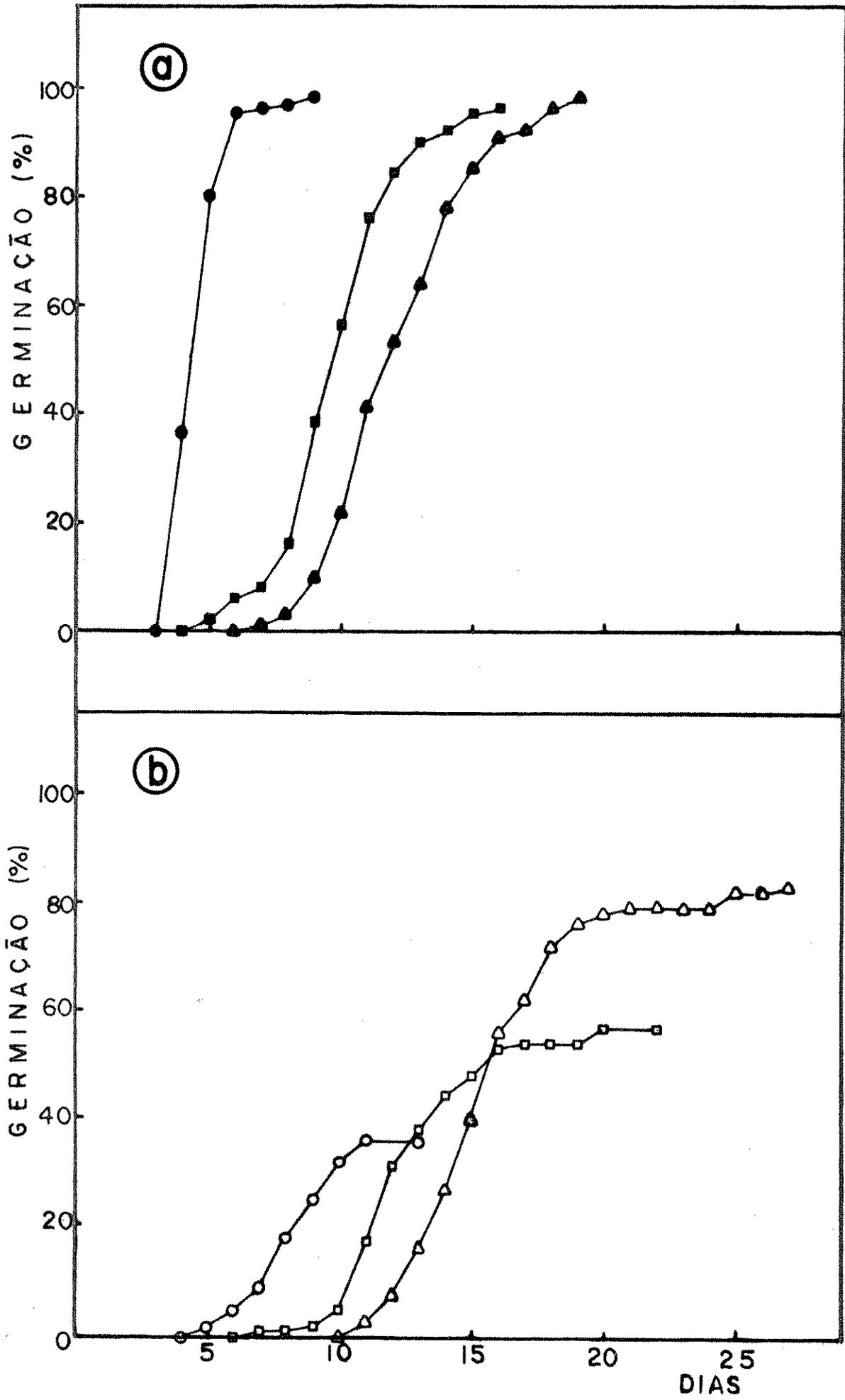
2- Efeito da Casca e da Película na Germinação

Neste experimento foram utilizadas sementes intactas, sem casca e nuas (sem casca e sem película). O comportamento de sementes frescas (imediatamente após a colheita) e de sementes secas artificialmente (tratamento A_1) foi comparado.

Analisando-se os resultados obtidos para sementes frescas nota-se, pela figura 10a, que a casca e a película das sementes retardaram a velocidade de germinação, sendo que a maior influência parece ter sido devida à película da semente (a menor velocidade de germinação foi da semente intacta). Além disso, nota-se que o início da germinação ocorreu aos 4, 5 e 7 dias, e que a germinação máxima foi alcançada aos 9, 16 e 19 dias, respectivamente para sementes nuas, sem casca e intactas.

Pelos resultados apresentados na figura 10b, verifica-se que as sementes secas intactas tiveram início de germinação aos 11 dias, ocorrendo germinação máxima aos 27 dias. As sementes nuas e sem casca apresentaram, respectivamente, início de germinação aos 5 e 7 dias e germinação máxima aos 11 e 20 dias. Nota-se, entretanto, que apresentaram queda brusca de germinação em comparação com as sementes intactas, devido a grande incidên-

FIGURA 10



cia de fungos e de sementes apodrecidas (que foi maior em sementes nuas do que nas sem casca).

Analisando-se conjuntamente os resultados apresentados nas figuras 10a e 10b, verifica-se inicialmente que as sementes frescas intactas, sem casca e nuas apresentaram velocidade de germinação mais alta do que as sementes secas artificialmente, intactas, sem casca e nuas, talvez devido ao fato de que o teor inicial de umidade das sementes frescas (24%) tenha sido muito mais elevado que o de sementes secas (6%), necessitando estas de um período mais longo de embebição para o início de germinação.

As sementes secas sem casca e nuas apresentaram alta contaminação por fungos e apodrecimento nas repetições do teste de germinação, contribuindo para uma drástica queda no total de germinação, contrastando deste modo com os resultados obtidos para sementes frescas sem casca e nuas. A razão da maior incidência de fungos nas sementes secas (quando a casca ou película são removidas) permaneceu desconhecida.

As sementes frescas intactas apresentaram total de germinação superior ao obtido para sementes secas intactas, comprovando assim resultados anteriormente obtidos (figuras 6b e 7b), que mostraram que a secagem artificial afeta ligeiramente, no início, a germinação de sementes de limão cravo.

O passo seguinte foi tentar esterilizar as sementes a fim de se evitar o problema da incidência de fungos aparecido neste experimento.

3- Efeito da Esterilização de Sementes na Germinação

Foram novamente usadas sementes frescas intactas, ime -

diatamente após a colheita e sementes secas artificialmente (tratamento A₁) sem casca e sem película (sementes nuas). As sementes foram previamente tratadas com diferentes soluções de hipoclorito de sódio. No caso de sementes frescas intactas o tratamento de hipoclorito foi de três horas. No caso de sementes secas nuas foi de apenas uma hora (ver Material e Métodos).

Analisando-se os resultados obtidos com sementes frescas intactas, nota-se, pela figura 11a, que não houve diferença significativa entre os totais de germinação dos tratamentos com hipoclorito e água destilada. No entanto, a imersão das sementes por três horas em hipoclorito de sódio a 15% foi o tratamento que apresentou o maior total de germinação, e, além disso, a ausência de fungos nas sementes. As sementes que foram tratadas por três horas com hipoclorito de sódio a 7% e 10% apresentaram ligeiras incidências de fungos, enquanto que as sementes que foram imersas por três horas em água destilada apresentaram alguma contaminação por fungos nas várias repetições.

A partir destes dados adotou-se, como metodologia para esterilização de sementes frescas intactas, a imersão das sementes por três horas em solução de hipoclorito de sódio a 15%.

Com relação a sementes secas nuas, nota-se, pelos resultados apresentados na figura 11b, que não houve diferenças significativas entre os totais de germinação dos tratamentos. Além disso pode ser visto que a maior germinação foi alcançada com sementes que foram imersas por uma hora em água destilada, cujo baixo valor comprovou a baixa germinação que ocorreu com sementes secas nuas, mostrada na figura 10b.

A imersão de sementes secas nuas em soluções de hipoclorito de sódio a 4%, 7%, 10% e 15% durante uma hora reduziu dras-

F I G U R A - 11

Esterilização das sementes com hipoclorito de sódio.

Figura 11a

Sementes frescas intactas (imediatamente após a colheita).

Germinação dada em porcentagem. Teste F deu não significativo na análise de variância dos tratamentos.

Símbolos: hipoclorito de sódio 7% - 3 horas ○
hipoclorito de sódio 10% - 3 horas ●
hipoclorito de sódio 15% - 3 horas △
água destilada - 3 horas ▲

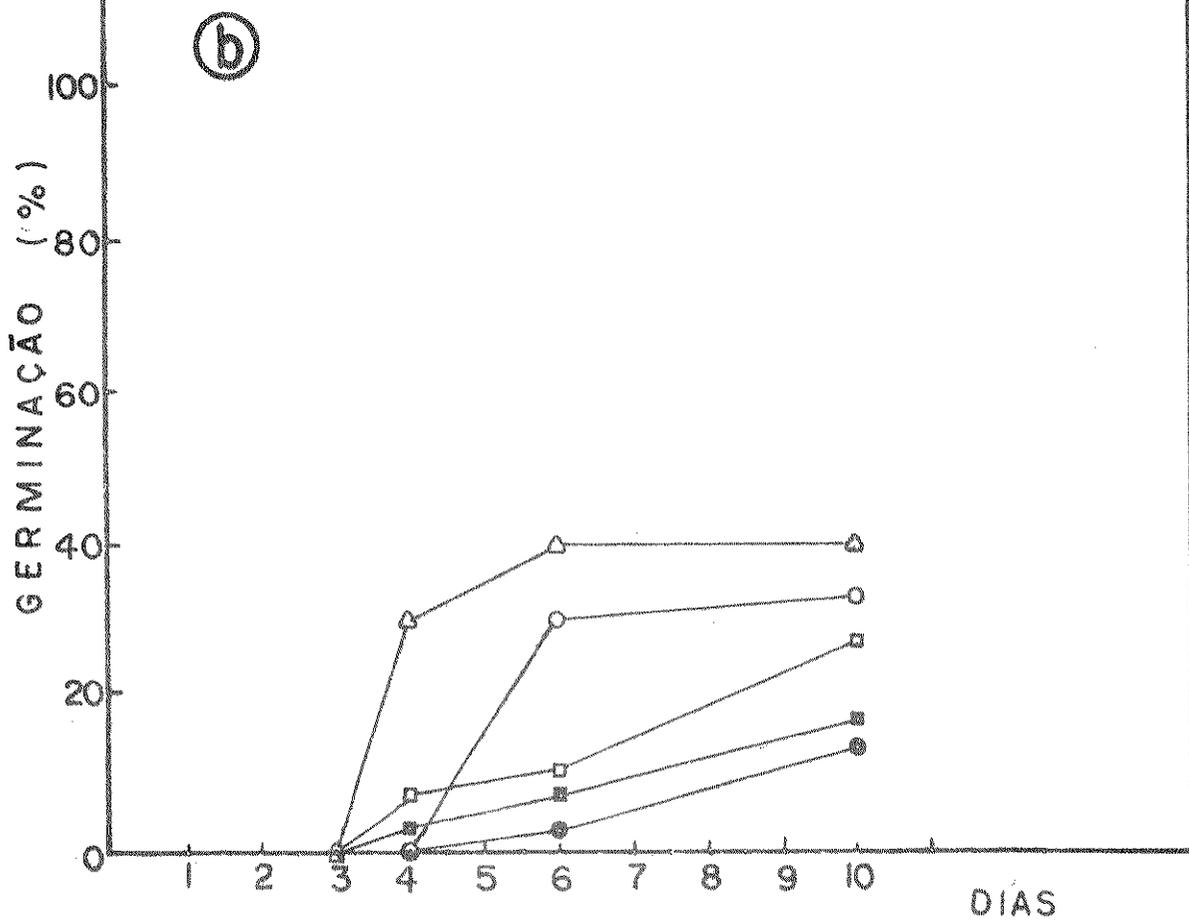
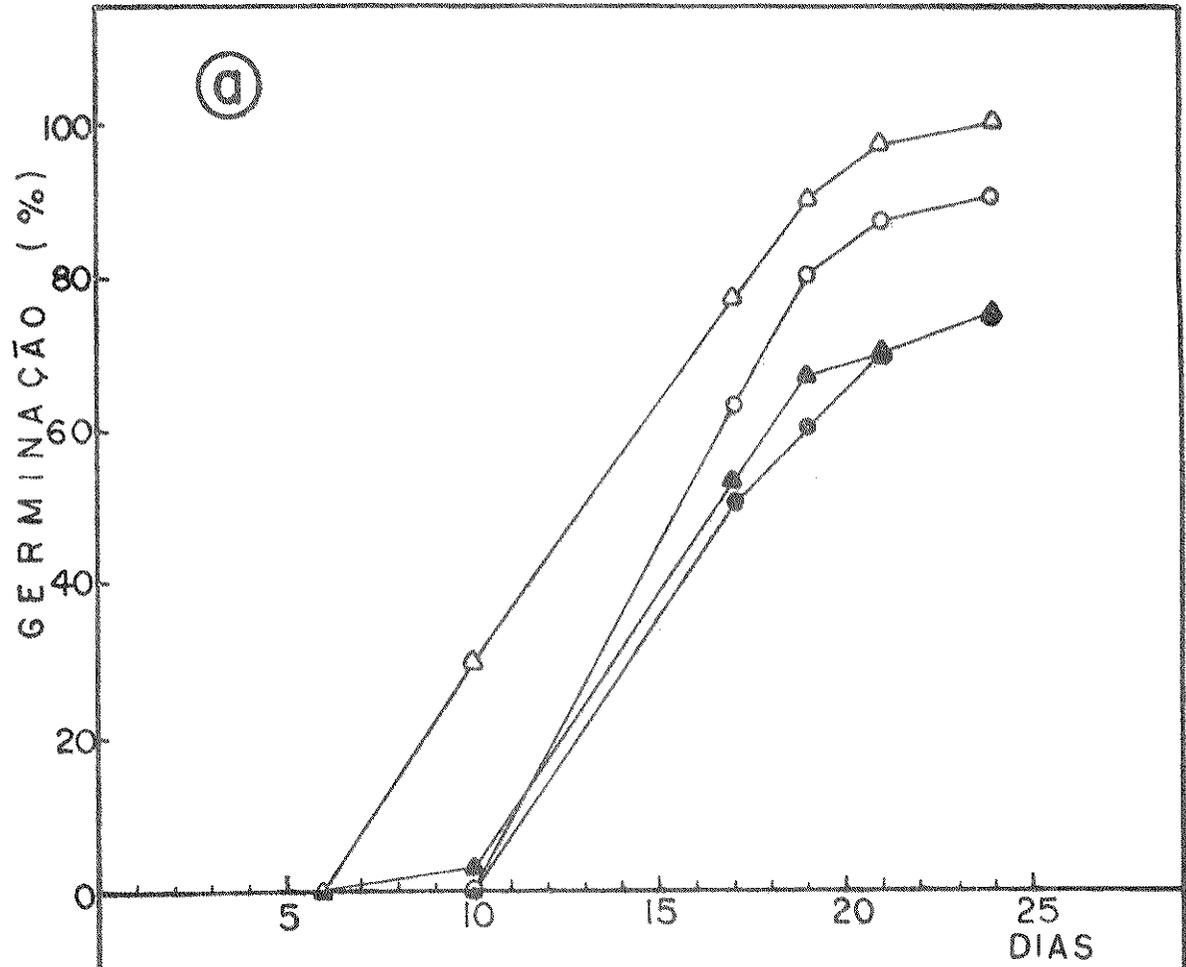
Figura 11b

Sementes secas nuas (A_1) da mesma idade das sementes da figura 11a.

Germinação dada em porcentagem. Teste F deu não significativo na análise de variância dos tratamentos.

Símbolos: hipoclorito de sódio 4% - 1 hora ○
hipoclorito de sódio 7% - 1 hora ●
hipoclorito de sódio 10% - 1 hora □
hipoclorito de sódio 15% - 1 hora ■
água destilada - 1 hora △

FIGURA II



ticamente o aparecimento de fungos nas sementes, porém houve um aumento no número de sementes apodrecidas.

Em resumo temos que, para sementes secas nuas, o tratamento das sementes com soluções de hipoclorito de sódio a 4%, 7%, 10% e 15% durante uma hora reduz a incidência de fungos, mas não aumenta a germinação das sementes.

Uma possível explicação para a baixa germinação das sementes secas nuas seria a reidratação rápida que sofrem as sementes para que a casca e a película sejam removidas. A reidratação rápida causaria danos à estrutura do embrião. Nos experimentos a seguir, foi verificado o efeito da reidratação lenta de sementes antes da remoção da casca e da película.

4- Efeito da Reidratação Lenta na Germinação

Sementes secas artificialmente (tratamento A₁) foram reidratadas lentamente antes da remoção da casca e da película (sementes nuas).

Analisando-se os resultados obtidos com a reidratação lenta de sementes verifica-se, pela figura 12a, que a absorção de água pelas sementes em duas reidratações realizadas foi semelhante, ocorrendo o equilíbrio entre o teor de umidade das sementes e a umidade relativa da câmara fria (85%) aos 11 dias após o início do experimento. Deve-se lembrar que a reidratação rápida consiste em mergulhar a semente, em água ou em rolo de papel umedecido, por 14 horas.

Os resultados de germinação de sementes de uma das reidratações lentas mostram, pela figura 12b, que as sementes intactas apresentaram baixa germinação, enquanto as sementes sem cas-

F I G U R A - 12

Reidratação lenta de sementes secas da safra de 1977.

Figura 12a

Unidade, em porcentagem, medida diariamente.

Símbolos: 1ª reidratação ○

2ª reidratação ●

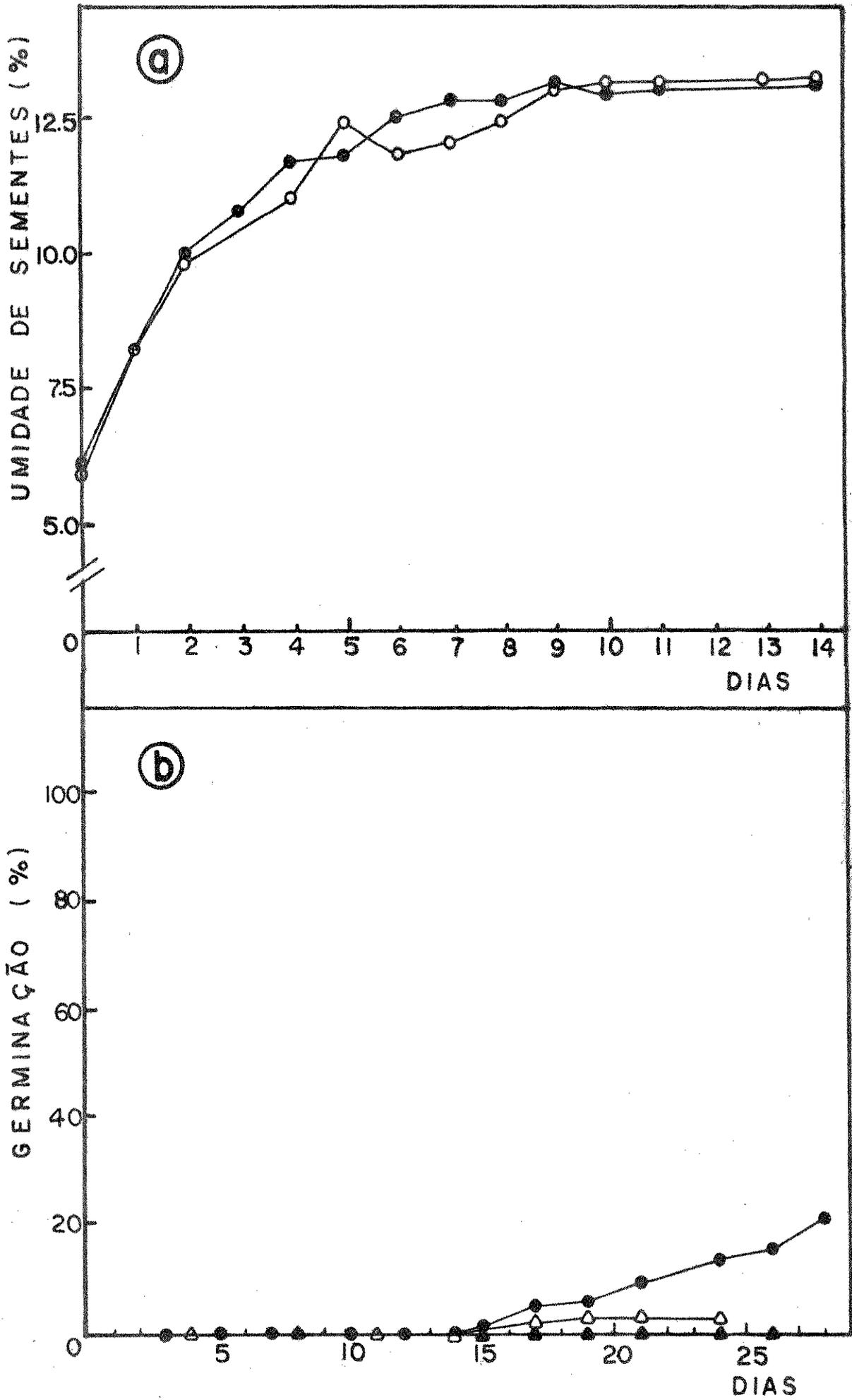
Figura 12b

Germinação de sementes secas reidratadas na 1ª reidratação lenta. Germinação dada em porcentagem.

Símbolos:

| | | | | |
|-----------------------|---|-------------------------------------|---|---|
| Semente reidratada | [| Intacta - hipoclorito 15% - 3 horas | ● | |
| | | Sem casca - hipoclorito 4% - 1 hora | △ | |
| | | Sem casca - água destilada - 1 hora |] | |
| | | Nua - hipoclorito 4% - 1 hora | | ▲ |
| | | Nua - água destilada - 1 hora | | |

FIGURA 12



ca tratadas com hipoclorito de sódio a 4% durante uma hora tiveram germinação praticamente nula. Em todos os outros tratamentos a porcentagem de germinação foi zero.

Comparando-se os resultados obtidos com sementes reidratadas lentamente (figuras 12a e 12b) e sementes secas (figura 11b), nota-se que os vários tratamentos para a esterilização de sementes secas nuas apresentaram germinação baixa, enquanto que todos os tratamentos com sementes nuas provenientes de sementes reidratadas apresentaram germinação zero. Temos, portanto, que a reidratação lenta mostrou efeito negativo na germinação.

Analisando-se os resultados obtidos com a reidratação lenta e a reidratação rápida de sementes secas nota-se, pela figura 13a, que as sementes reidratadas lentamente mostraram germinação baixa para sementes intactas, quase nula para sementes sem casca e zero para sementes nuas, comprovando resultados anteriores, conforme figura 12b. As sementes secas que não foram reidratadas lentamente (reidratação rápida) apresentaram germinação normal para sementes intactas, média para sementes sem casca e baixa para sementes nuas (figura 13b), comprovando resultados anteriores, conforme figura 10b.

Comparando-se os resultados das figuras 13a e 13b, nota-se que a reidratação lenta das sementes secas fez cair drasticamente a germinação não só de sementes nuas, como também de sementes intactas e sem casca. Disto se conclui que a hipótese levantada de que a não germinação de sementes secas nuas seria devido à reidratação rápida das mesmas não é válida, pois a reidratação lenta de sementes secas afetou drasticamente a germinação. Além disso temos que, colocando-se sementes intactas com 6% de umidade diretamente para germinar em placas de Petri com água, obte -

F I G U R A - 13

Comparação entre reidratação lenta e rápida de sementes.

Figura 13a

Germinação de sementes secas, reidratadas lentamente

Germinação dada em porcentagem.

| | | | |
|------------------|---|-----------|---|
| <u>Símbolos:</u> | } | intacta | ○ |
| Semente rei- | | sem casca | △ |
| dratada lenta | | nua | □ |

mente

Figura 13b

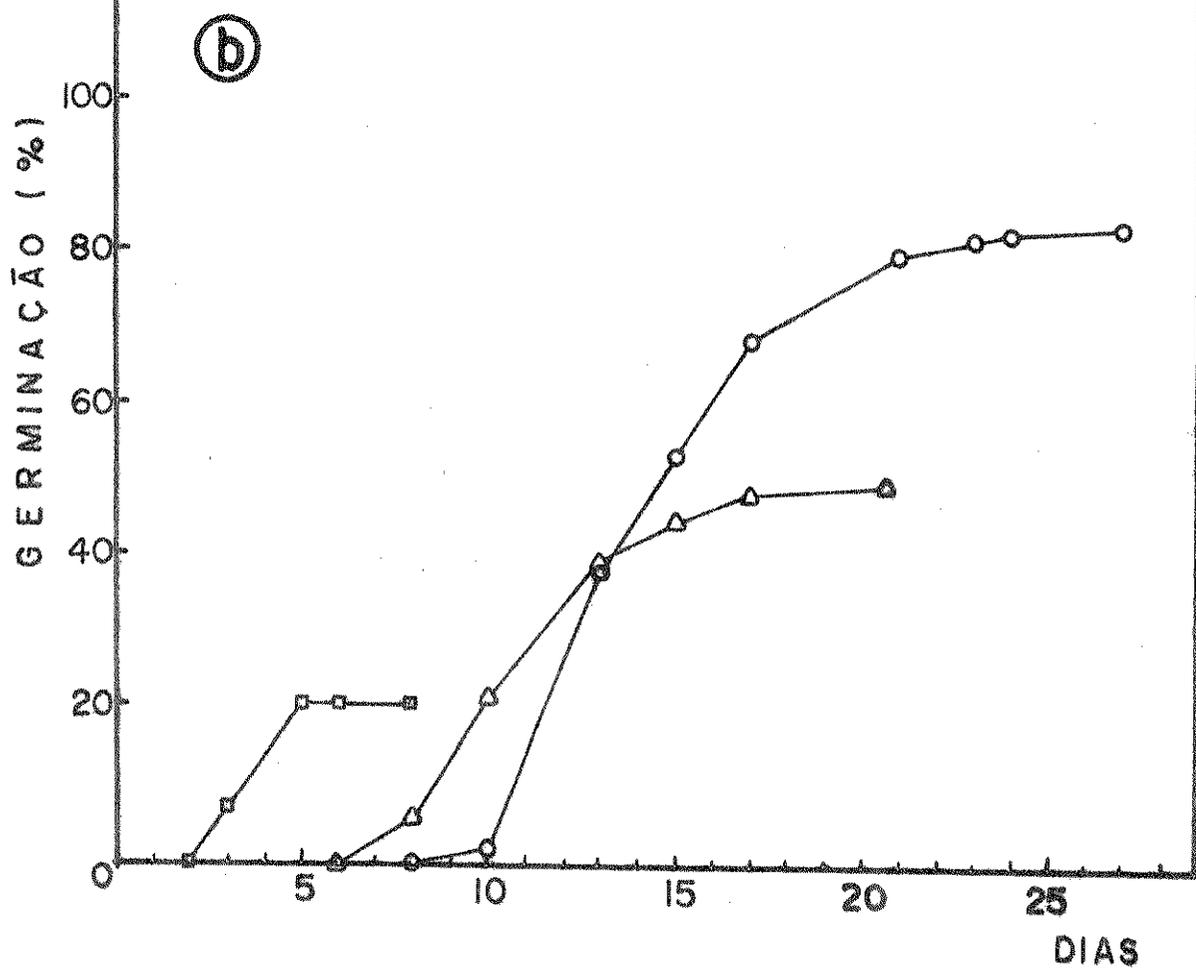
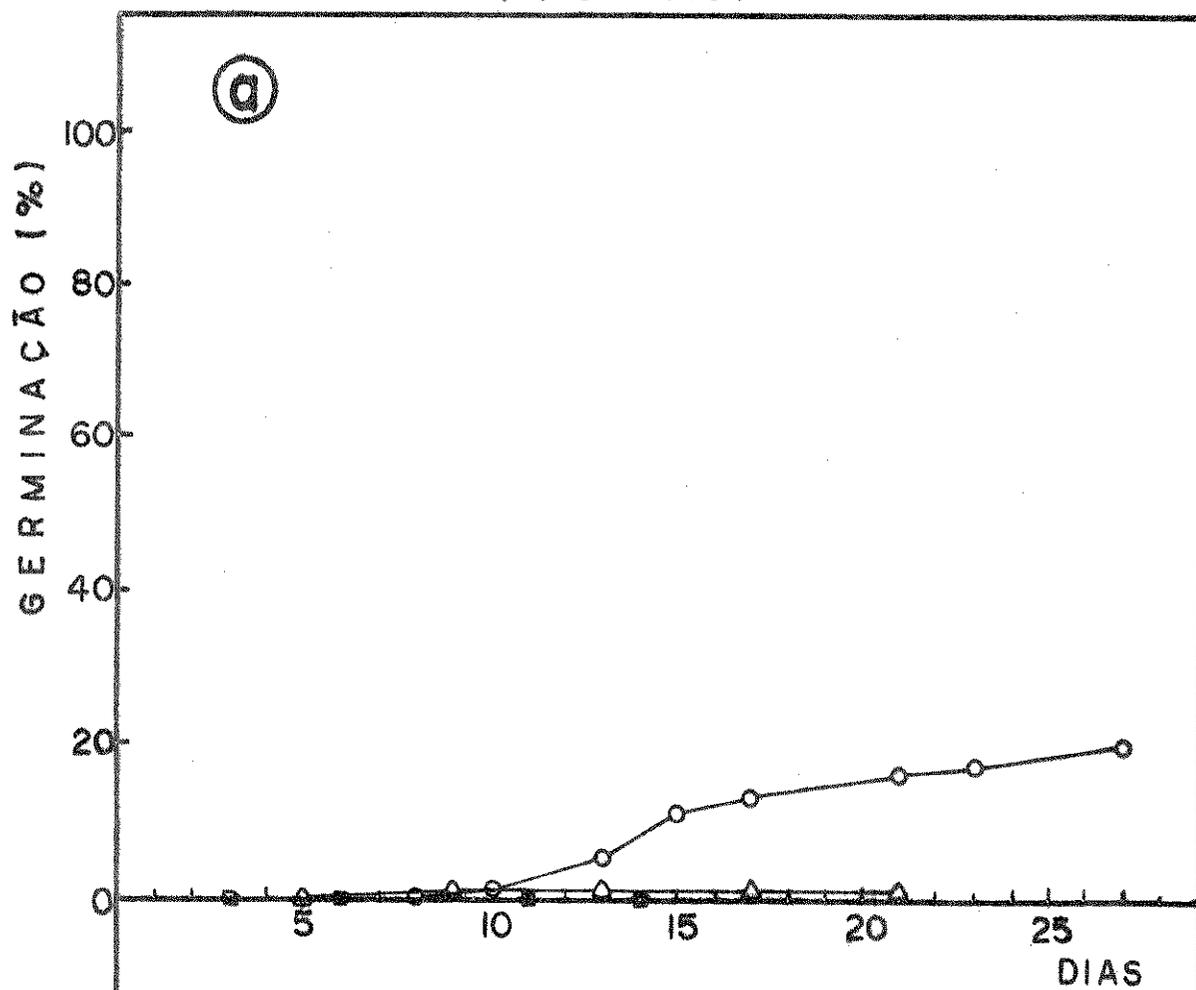
Germinação de sementes secas com reidratação rápida. Ger

minação dada em porcentagem.

| | | | |
|------------------|---|-----------|---|
| <u>Símbolos:</u> | } | intacta | ○ |
| Semente com | | sem casca | △ |
| reidratação | | nua | □ |

rápida

FIGURA 13



mos um alto resultado de germinação, enquanto que reidratando-se lentamente estas sementes até 12,2% de umidade e colocando-as para germinar, temos uma queda brusca no total de germinação.

5- Efeito de Luz na Germinação

Sementes secas artificialmente, safra 1977 (tratamento A₁) foram utilizadas nesta série de experimentos. Apenas sementes intactas foram utilizadas.

Pelos resultados apresentados na figura 14a, nota-se que as sementes de limão cravo germinam indiferentemente sob luz branca ou escuro, sendo que não houve diferença significativa entre os totais de germinação alcançados nos dois tratamentos, embora a velocidade de germinação seja inicialmente maior nas sementes sob escuro. É, portanto, uma semente não fotoblástica.

Com relação ao efeito de luzes monocromáticas (azul , verde ou vermelho), luz branca e escuro na germinação, nota-se, pela figura 14b, que as sementes de limão cravo germinam indiferentemente bem sob qualquer um destes tratamentos, pois não houve diferenças significativas entre os totais de germinação alcançados. No entanto, a luz monocromática de 525 nm (verde) acelerou ligeiramente a velocidade inicial de germinação, sem no entanto apresentar um total de germinação mais elevado que os demais tratamentos. Este efeito, entretanto, não apareceu nas repetições do experimento. Neste experimento não se repetiu a diferença na velocidade de germinação sob luz branca e sob escuro.

Em resumo, conclui-se que a luz parece não ter efeito na germinação de sementes de limão cravo.

F I G U R A - 14

Efeitos de luz na germinação.

Figura 14a

Efeito de luz branca e escuro na germinação. Germinação dada em porcentagem. Teste F deu não significativo na análise de variância dos tratamentos.

Sementes secas intactas, safra 1977.

Símbolos: luz branca Δ
 escuro O

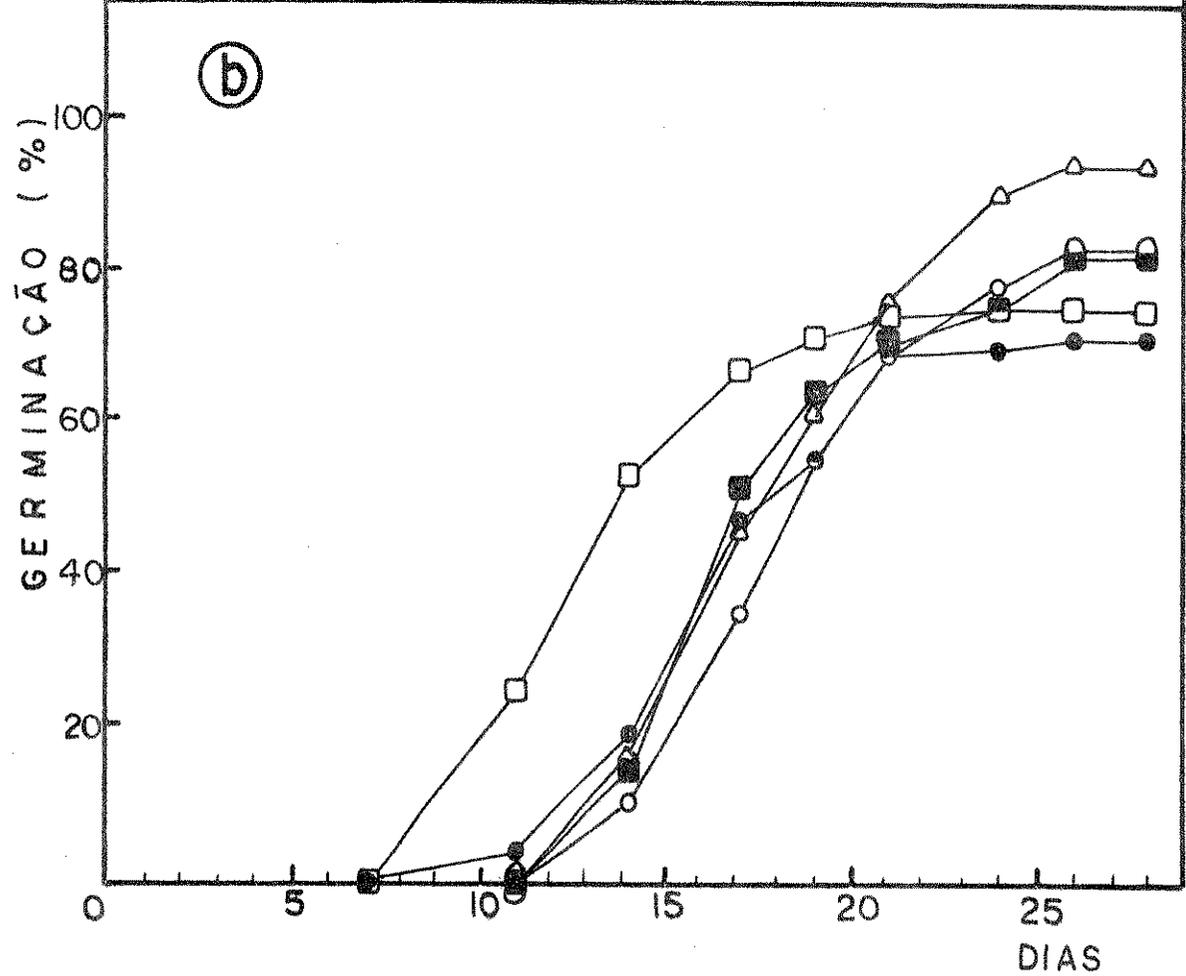
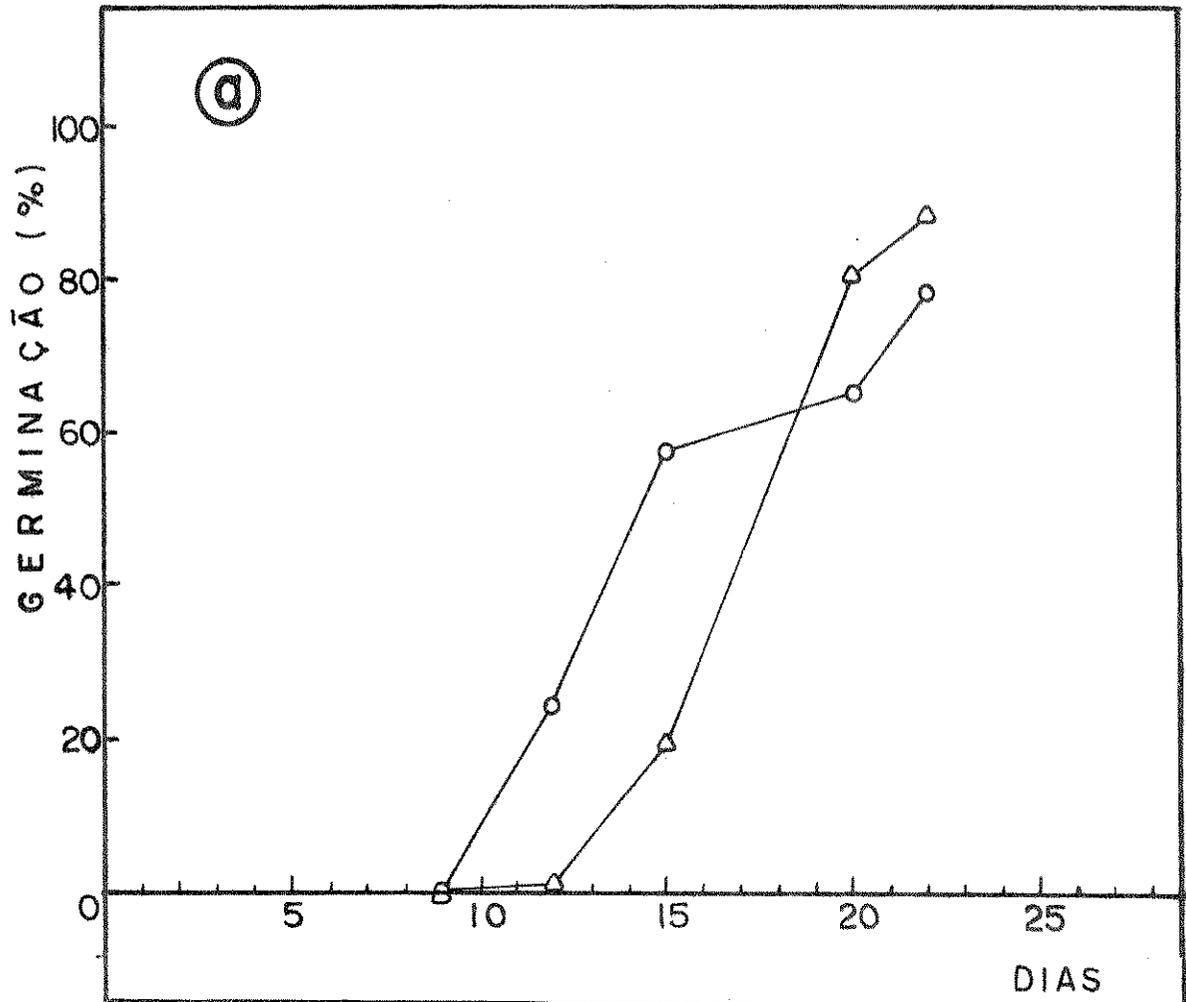
Figura 14b

Efeito de luz monocromática na germinação. Germinação dada em porcentagem. Teste F deu não significativo na análise de variância dos tratamentos.

Sementes secas intactas, safra 1977.

Símbolos: luz branca Δ
 escuro O
 luz azul (450nm) ●
 luz verde (525nm) □
 luz vermelha (650nm) ■

FIGURA 14



6- Efeito de Temperatura na Germinação

Nos experimentos em que o efeito de temperaturas constantes ou alternadas foi estudado foram sempre utilizadas sementes secas artificialmente, safra 1977 (tratamento Λ_1).

A figura 15a mostra germinação nula às temperaturas de 5, 10, 40 e 45°C. Às temperaturas de 25, 30 e 35°C a germinação de sementes de limão cravo teve início ao redor do dia 7, e atingiu porcentagens máximas de 90, 84 e 73%, respectivamente, ao redor do dia 20 após a sementeira, sendo não significativas as diferenças encontradas entre estes tratamentos. A germinação de sementes mantidas a 20 e 15°C foi iniciada mais tarde, nos dias 20 e 25, respectivamente. À temperatura de 20°C a porcentagem máxima de germinação foi semelhante àquelas obtidas a 25, 30 e 35°C, mas à temperatura de 15°C aqueles valores não foram obtidos até o dia 60.

Com relação a alternância de temperaturas, nota-se, pela figura 15b, que a alternância de 10 - 25°C foi a única que afetou drasticamente tanto a velocidade quanto o total de germinação, reduzindo ambos. A alternância de temperaturas não alterou o total de germinação, mas acelerou ligeiramente o início de germinação. Nos resultados de germinação deste experimento com as outras alternâncias de temperatura, nota-se que a alternância de 20 - 30°C foi a que apresentou a mais alta germinação, e a de 15 - 35°C a que apresentou a mais baixa; entretanto, a análise estatística dos resultados finais de germinação não mostrou diferença significativa entre as várias alternâncias (excluindo-se a de 10 - 25°C).

Dos dados apresentados até agora pode-se tirar as se-

F I G U R A - 15

Efeito de temperatura na germinação.

Figura 15a

Efeito de temperatura constante na germinação. Sementes secas safra 1977 (tratamento Λ_1). Germinação dada em porcentagem. Teste F não deu significativo na análise de variância dos tratamentos a 25, 30 e 35°C.

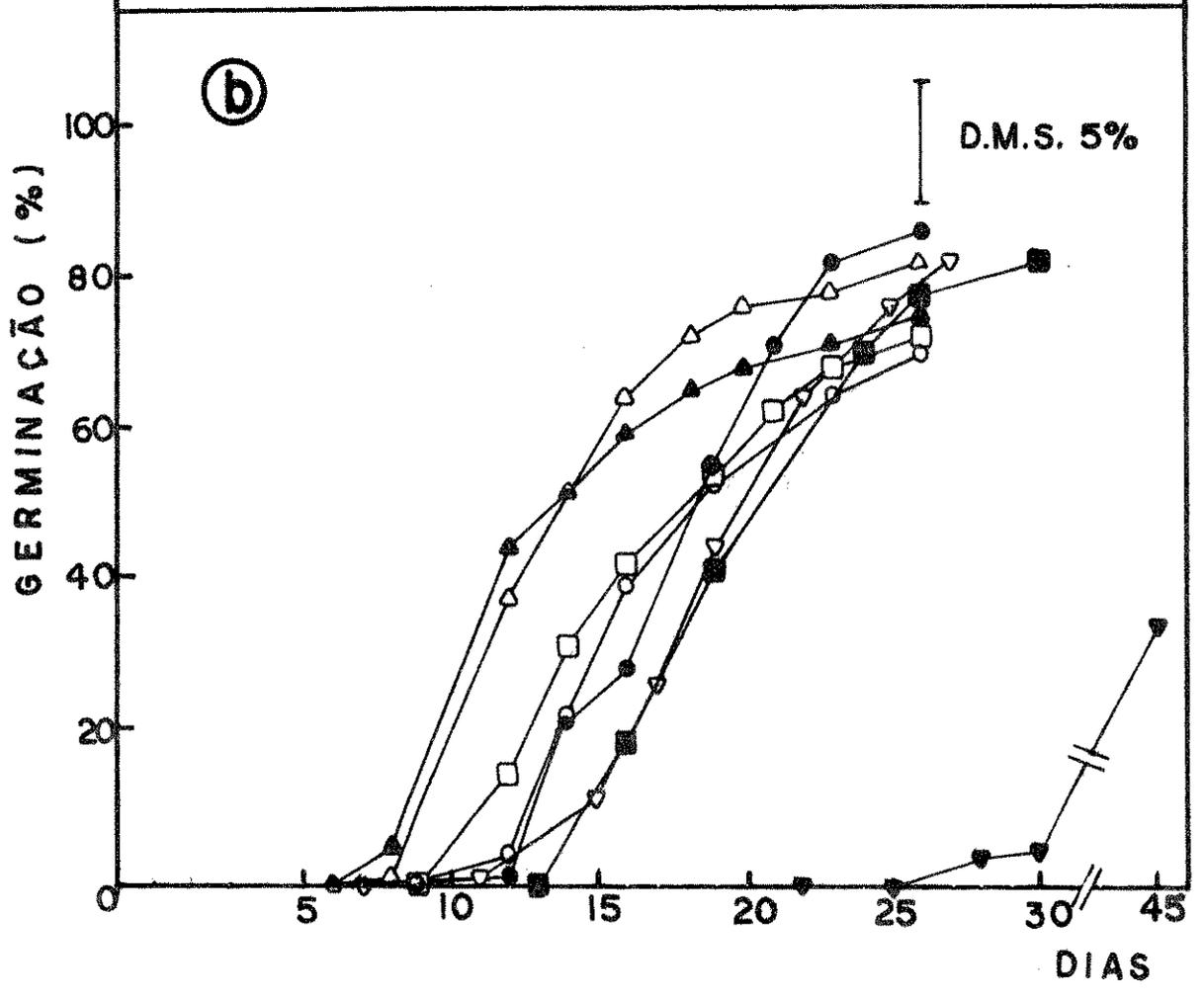
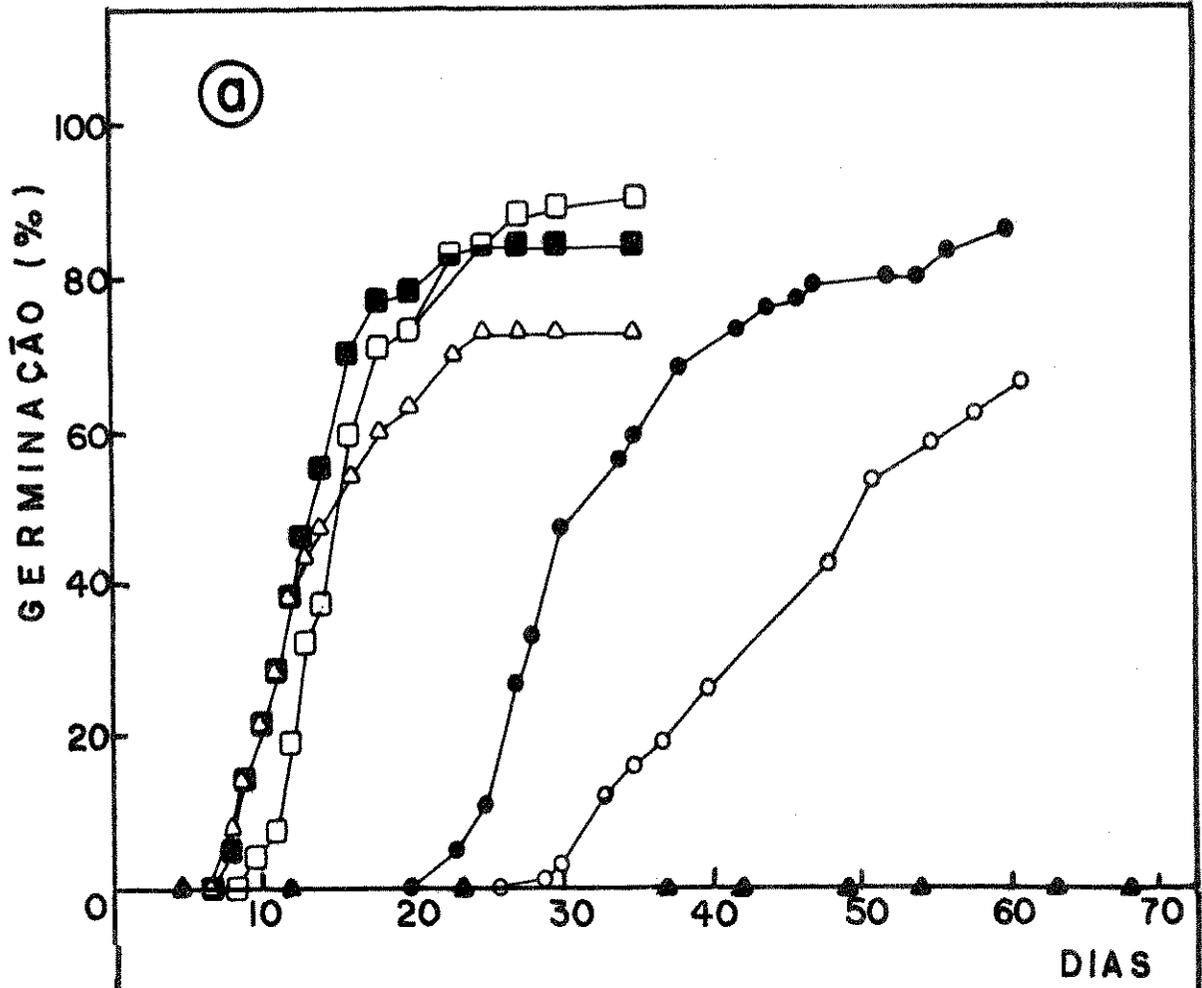
| | | | | | | |
|------------------|---|------|---|------|---|---|
| <u>Símbolos:</u> | { | 15°C | ○ | 40°C | { | |
| | | 20°C | ● | 45°C | | |
| Temperaturas | | 25°C | □ | 5°C | | ● |
| constant | | 30°C | ■ | 10°C | | |
| | | 35°C | △ | | | |
| | | | | | | |

Figura 15b

Efeito de alternância de temperatura na germinação. Sementes secas safra 1977 (tratamento Λ_1). Germinação dada em porcentagem. DMS 5% é apresentada (excluindo 10-25°C). Alternância de temperatura 12-12 horas.

| | | | | | |
|------------------|---|-----------|---|-----------|---|
| <u>Símbolos:</u> | { | 15 - 35°C | ○ | 25 - 30°C | △ |
| Alternância | | 20 - 30°C | ● | 25 - 35°C | ▲ |
| de | | 20 - 35°C | □ | 15 - 25°C | ▽ |
| temperaturas | | 20 - 25°C | ■ | 10 - 25°C | ▼ |
| | | | | | |

FIGURA 15



guintes conclusões:

1- A secagem artificial de sementes de limão cravo causa um decréscimo inicial na porcentagem de germinação. A melhor condição para manter a germinação é secar as sementes artificialmente até 6% de umidade, enlatá-las hermeticamente e armazená-las a 4°C (tratamento A₁). A pior condição para manter a germinação é o armazenamento de sementes frescas em condições ambientais (tratamento B). Os experimentos de campo confirmaram os resultados obtidos em laboratório para o tratamento A₁.

2- O teste de tetrazólio apresentou, para os tratamentos A₁ e B, resultados de viabilidade semelhantes aos obtidos por testes de germinação.

3- A casca e a película atrasaram a germinação de sementes de limão cravo. A remoção da casca e da película inibe a germinação da semente seca, mas não da semente fresca. A esterilização de sementes com hipoclorito de sódio não melhora a germinação de sementes secas nuas.

4- A reidratação lenta das sementes secas artificialmente prejudica a germinação (inclusive de sementes intactas).

5- A semente de limão cravo é indiferente à luz para a germinação.

6- Não há germinação às temperaturas constantes de 5, 10, 40 e 45°C. A alternância de temperatura de 10 - 25°C retardou e inibiu a germinação. Nas outras alternâncias de temperaturas utilizadas, a porcentagem de germinação final foi sempre alta.

B- Substâncias Hormonais Endógenas nas Sementes de Limão Cravo durante o Armazenamento

1- Eficiência do método de extração e do bioteste do hipocótilo de alface

Neste experimento 200 sementes secas foram extraídas , juntamente com 6 ml de ácido giberélico a 1 ppm, de acordo com o método apresentado em Material e Métodos. A extração e a purificação dos extratos foi a realizada normalmente até a feitura do bioteste do hipocótilo de alface. O resultado do bioteste para a fração ácida é apresentado na figura 16, onde pode ser visto que o método de extração foi bastante eficiente, e o GA₃ aplicado inicialmente foi claramente detectado no bioteste utilizado (recuperação em torno de 90% do GA₃ inicial).

Em um experimento a fração ácida foi tratada com ficina para se verificar se havia giberelinas ligadas. Não houve aumento do nível de giberelinas ou do número de picos de giberelinas com o uso de ficina. Portanto, não parecem existir giberelinas ligadas na fração ácida em sementes de limão cravo.

2- Verificação da Presença de Substâncias Hormonais Endógenas em Sementes Frescas Armazenadas (Tratamento B) e Sementes Secas (Tratamento A₁) no Início e Fim do Período de Armazenamento de 12 Meses e 32 Meses

As substâncias de crescimento foram examinadas por biotestes nas frações ácida, básica e neutra, obtidas pelo método de extração descrito em Material e Métodos.

F I G U R A - 16

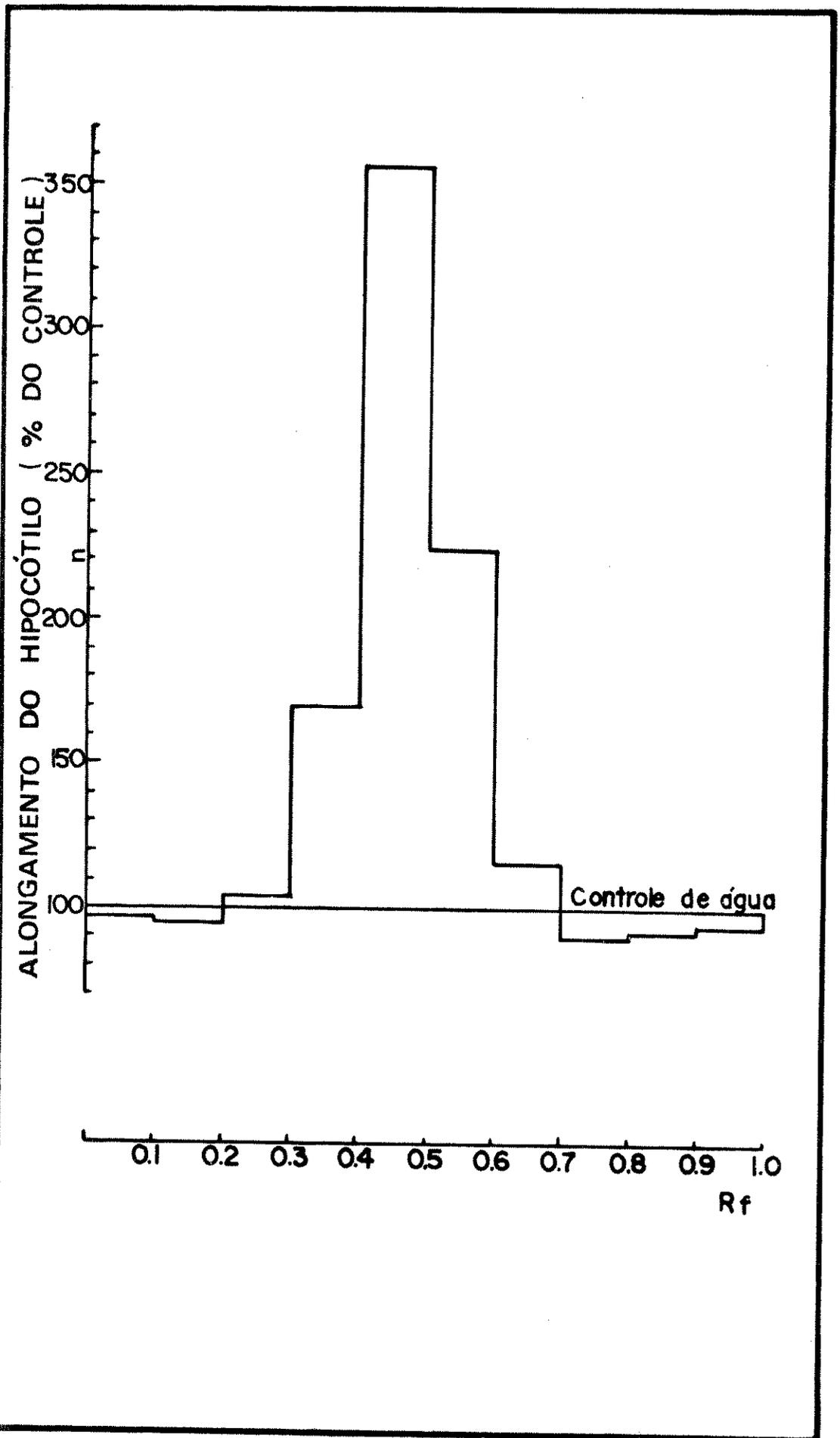
Eficiência do método de extração e do bioteste do alongamento de hipocótilo de alface.

Foram extraídas 200 sementes, conforme Material e Métodos, adicionando-se 6 ml de ácido giberélico a 1 ppm. Foi utilizada somente a fração ácida.

Solvente usado: isopropanol : amônia : água (10:1:1). Neste sistema de solvente o Rf do GA₃ é o Rf 0.5.

Resultados apresentados como porcentagem do controle de água (controle = 100%).

FIGURA 16



2.1- Substâncias giberelínicas e inibidores

Na figura 17 são mostrados os resultados para as frações ácidas de sementes sem armazenamento (zero meses de armazenamento). O bioteste é o do alongamento do hipocótilo de alface.

Os resultados para as sementes frescas estão na figura 17a, onde pode ser vista uma região onde foi detectada atividade giberelínica, estatisticamente significativa, entre os Rfs 0,2 e 0,3. A região entre os Rfs 0,3 e 0,6 não foi estatisticamente significativa. Há uma zona de inibição estatisticamente significativa entre o Rf 0,6 e o Rf 1,0, e uma não significativa entre o ponto de aplicação e o Rf 0,1. Na figura 17b estão os resultados para as sementes após a secagem (tratamento A₁). A região de atividade giberelínica está entre os Rfs 0,1 e 0,5, sendo estatisticamente significativa entre os Rfs 0,1 e 0,4. A zona de inibição é estatisticamente significativa entre os Rfs 0,6 e 1,0.

Comparando-se os resultados obtidos com sementes frescas e secas, verifica-se pela figura 17c que houve diferenças significativas entre o ponto de aplicação e o Rf 0,1 como inibição, e de promoção entre os Rfs 0,1 e 0,2. As sementes secas tiveram níveis superiores de promoção, em relação às sementes frescas, entre o Rf 0,1 e 0,2. A menor germinação inicial (ponto zero) observada (figuras 6b e 7b) entre sementes frescas e sementes secas (menor em sementes secas) não pode ser explicada por estes resultados, já que detectou-se maior nível de giberelinas em sementes secas. Entretanto, também foi detectado maior nível de inibidores nas sementes secas, mas é difícil imaginar que esta pequena diferença no nível de inibidores seria a responsável pela queda de germinação nas sementes secas.

Na figura 18 são mostrados os resultados (fração ácida)

F I G U R A - 17

Fração ácida de sementes com zero meses de armazenamento. Bioensaio do alongamento do hipocótilo de alface. Resultados apresentados como porcentagem do controle (100%).

Figura 17a

Semente fresca (tratamento B). O sinal * mostra teste F significativo a 5% entre o Rf e o controle de água.

Figura 17b

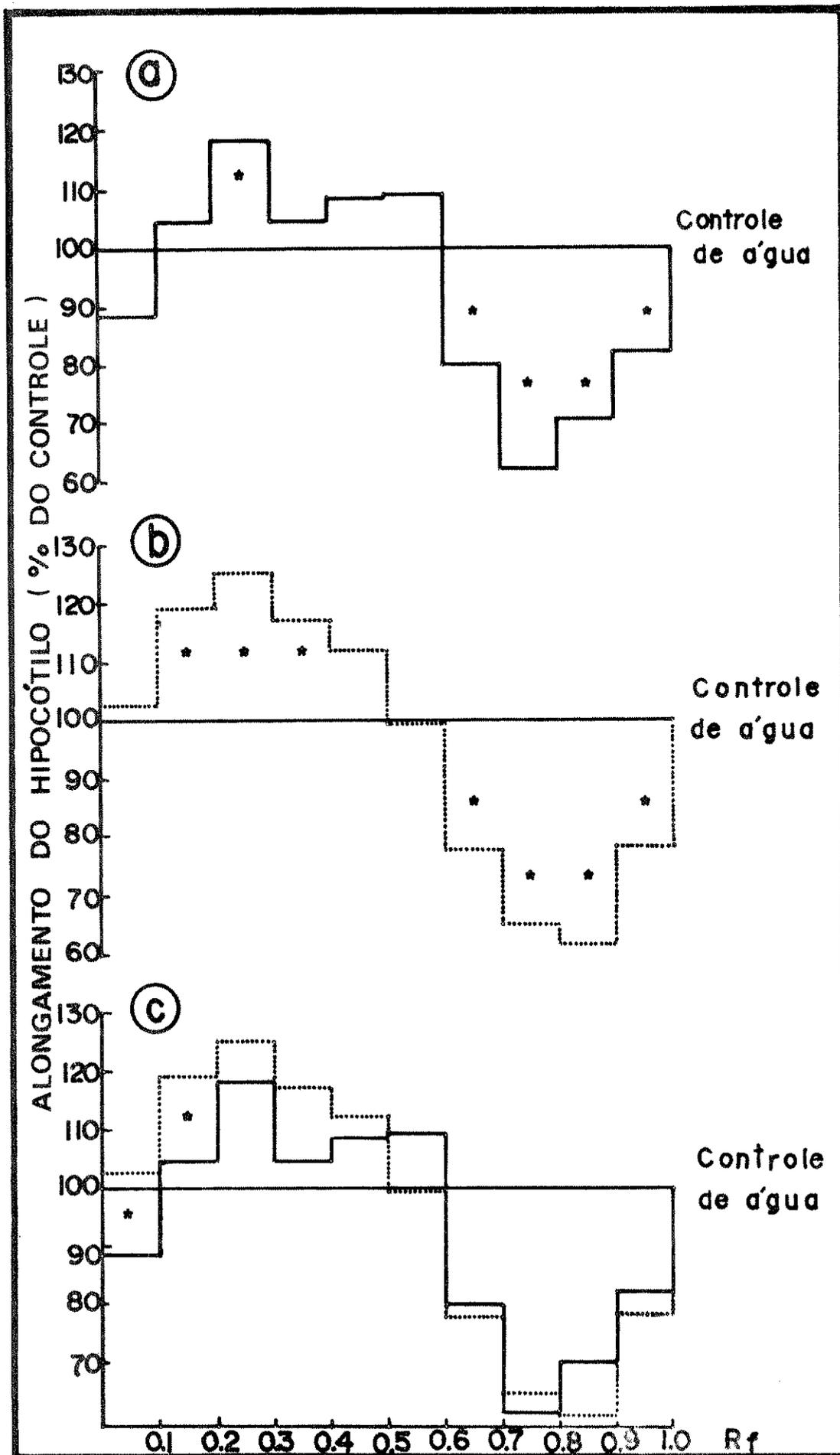
Semente seca (tratamento A₁). O sinal * mostra teste F significativo a 5% entre o Rf e o controle de água.

Figura 17c

Semente fresca (tratamento B) e semente seca (tratamento A₁). O sinal * mostra teste F significativo a 5% entre as faixas de Rf correspondentes dos tratamentos B e A₁.

Símbolos: ————— Semente fresca (tratamento B)
 Semente seca (tratamento A₁)

FIGURA 17



F I G U R A - 18

Fração ácida de sementes com doze meses de armazenamento. Bioensaio do alongamento do hipocótilo de alface. Resultados apresentados como porcentagem do controle de água (100%).

Figura 18a

Semente fresca (tratamento B). O sinal * mostra teste F significativo a 5% entre o Rf e o controle de água.

figura 18b

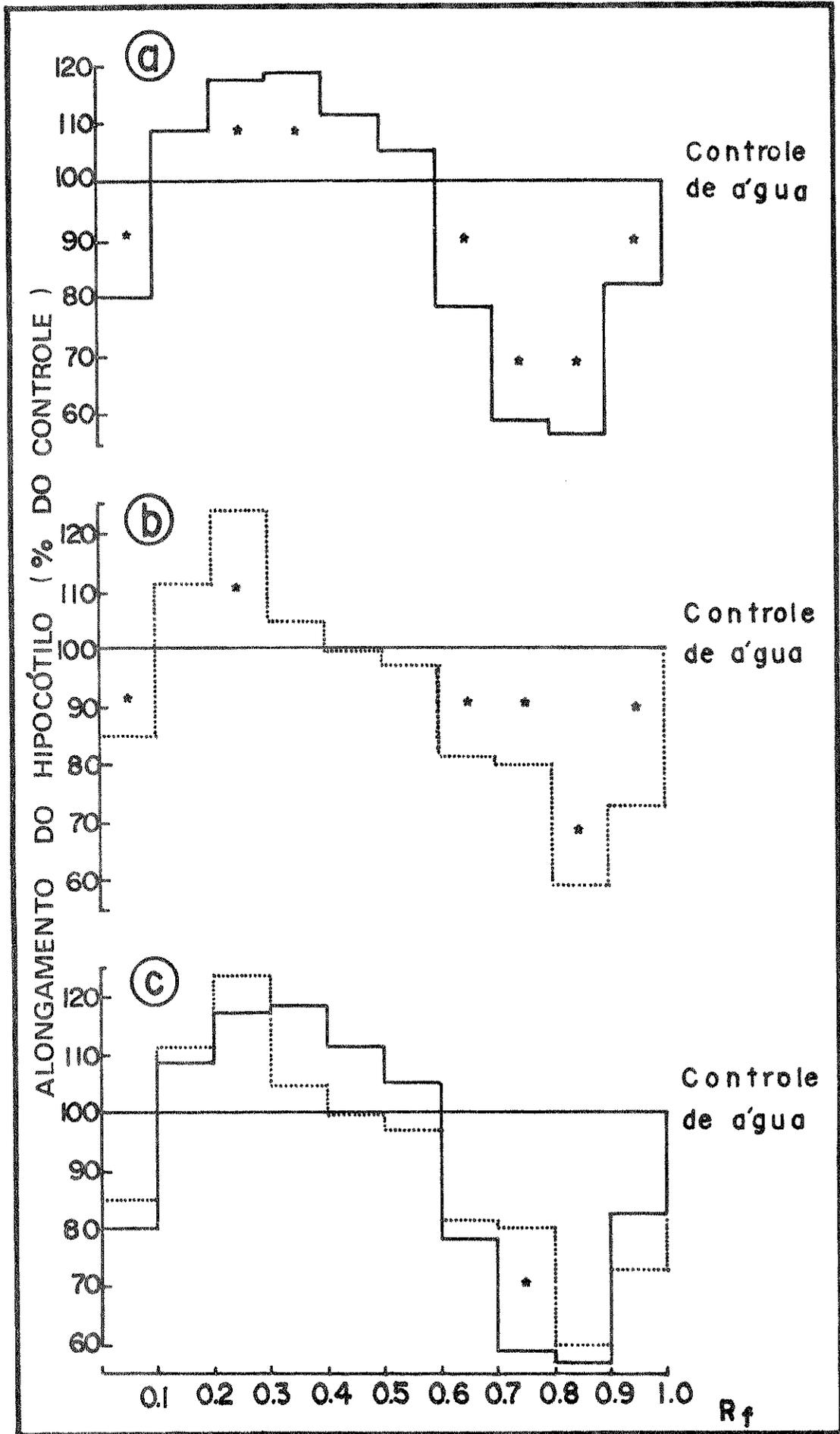
Semente seca (tratamento A_1). O sinal * mostra teste F significativo a 5% entre o Rf e o controle de água.

Figura 18c

Semente fresca (tratamento B) e semente seca (tratamento A_1). O sinal * mostra teste F significativo a 5% entre as faixas de Rf correspondentes dos tratamentos B e A_1 .

Símbolos: ————— Semente fresca (tratamento B)
 Sementes seca (tratamento A_1)

FIGURA 18



para sementes armazenadas por 12 meses (sementes frescas - tratamento B ; sementes secas - tratamento A_1).

As sementes do tratamento B (figura 18a) mostram uma inibição estatisticamente significativa entre o ponto de aplicação e o Rf 0,1, e entre os Rfs 0,6 e 1,0. Há promoção entre os Rfs 0,1 e 0,6, mas estatisticamente significativa entre os Rfs 0,2 e 0,4.

Na figura 18b verifica-se que as sementes secas apresentaram inibição entre o ponto de aplicação e o Rf 0,1, e entre os Rfs 0,6 e 1,0, e promoção apareceu entre Rfs 0,2 e 0,3, todos estatisticamente significativos.

Analisando-se conjuntamente os resultados, nota-se na figura 18c que houve diferença significativa entre os Rfs 0,7 e 0,8, mostrando que sementes frescas tem um nível de inibidores ácidos maior do que as sementes secas. Lembrando que aos 12 meses de armazenamento as sementes frescas (tratamento B) não mais germinam, enquanto que as sementes secas germinam em torno de 80% (figura 6b), poderia ser sugerido que uma das causas da queda de germinação de sementes frescas durante o armazenamento tenha sido o aumento do nível de inibidores ácidos entre os Rfs 0,7 e 1,0. As giberelinas, detectadas na fração ácida, não parecem estar envolvidas na queda de germinação.

Os resultados para a fração neutra de sementes sem armazenamento (zero meses de armazenamento) dos tratamentos B (sementes frescas) e A_1 (sementes secas) estão na figura 19.

Há promoção nas sementes frescas (figura 19a) entre o ponto de aplicação e o Rf 0,6, estatisticamente significativa entre o ponto de aplicação e o Rf 0,1, e entre o Rf 0,2 e o Rf 0,6. Há inibição entre os Rfs 0,6 e 1,0, estatisticamente significatiu

FIGURA - 19

Fração neutra de sementes com zero meses de armazenamento. Bioensaio do alongamento do hipocótilo de alface. Resultados apresentados como porcentagem do controle de água (100%).

Figura 19a

Semente fresca (tratamento B). O sinal * mostra teste F significativo a 5% entre o Rf e o controle de água.

Figura 19b

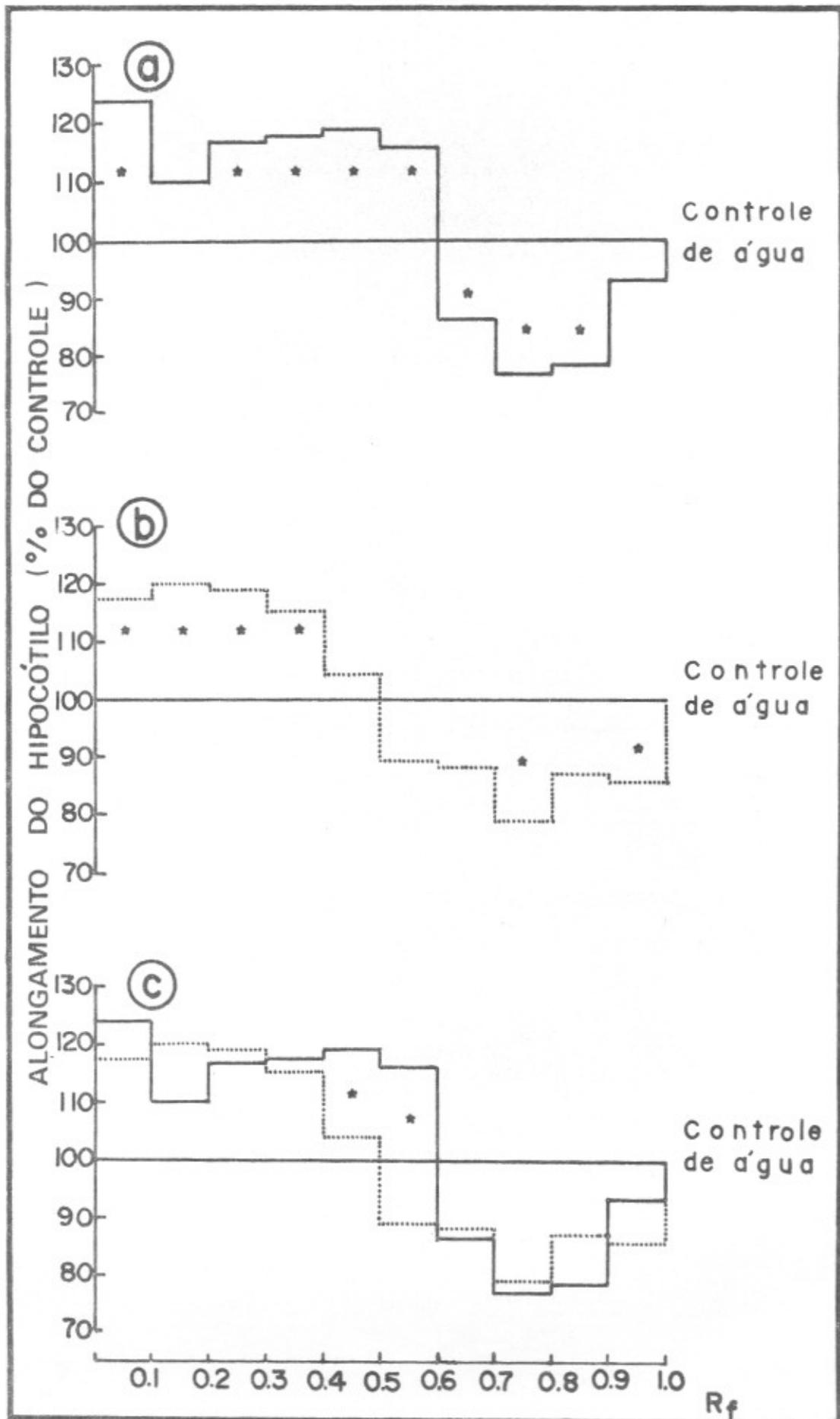
Semente seca (tratamento A₁). O sinal * mostra teste F significativo a 5% entre o Rf e o controle de água.

Figura 19c

Semente fresca (tratamento B) e semente seca (tratamento A₁). O sinal * mostra teste F significativo a 5% entre as faixas de Rf correspondentes dos tratamentos B e A₁.

Símbolos: ————— Semente fresca (tratamento B)
 Semente seca (tratamento A₁)

FIGURA 19



va entre os Rfs 0,6 e 0,9.

Na figura 19b estão os resultados para as sementes secas (tratamento A_1). Há promoção estatisticamente significativa entre o ponto de aplicação e o Rf 0,4, e inibição entre os Rfs 0,5 e 1,0, mas estatisticamente significativa entre os Rfs 0,7 e 0,8, e entre os Rfs 0,9 e 1,0.

A figura 19c mostra a comparação entre sementes frescas e secas, onde pode ser verificado que houve uma queda estatisticamente significativa de promoção para as sementes secas entre os Rfs 0,4 e 0,6. Não foi mostrada diferença significativa no nível de inibidores neutros.

Retornando às figuras 6b e 7b, que mostram a queda de germinação devido a secagem artificial, pode-se sugerir a hipótese de que esta queda foi acompanhada por um decréscimo significativo no nível de promotores neutros (possivelmente ésteres de giberelinas) entre os Rfs 0,4 e 0,6 de sementes secas (tratamento A_1) quando comparadas com sementes frescas (tratamento B).

Os resultados para as frações neutras de sementes armazenadas por 12 meses são mostrados na figura 20.

Em sementes frescas (tratamento B) houve promoção entre o ponto de aplicação e o Rf 0,6, sendo estatisticamente significativa entre os Rfs 0,1 e 0,6. Houve inibição não significativa entre os Rfs 0,6 e 1,0 (figura 20a).

Em sementes secas (tratamento A_1) houve promoção entre o ponto de aplicação e o Rf 0,6, sendo estatisticamente significativa entre o ponto de aplicação e o Rf 0,3, e entre o Rf 0,4 e o Rf 0,5. A inibição foi detectada entre os Rfs 0,8 e 1,0, sendo estatisticamente significativa entre os Rfs 0,8 e 1,0 (figura 20b).

Comparando-se conjuntamente os resultados, nota-se, pe-

F I G U R A - 20

Fração neutra de sementes com doze meses de armazenamento. Bioensaio do alongamento do hipocótilo de alface. Resultados apresentados como porcentagem do controle de água (100%).

Figura 20a

Semente fresca (tratamento B). O sinal * mostra teste F significativo a 5% entre o Rf e o controle de água.

Figura 20b

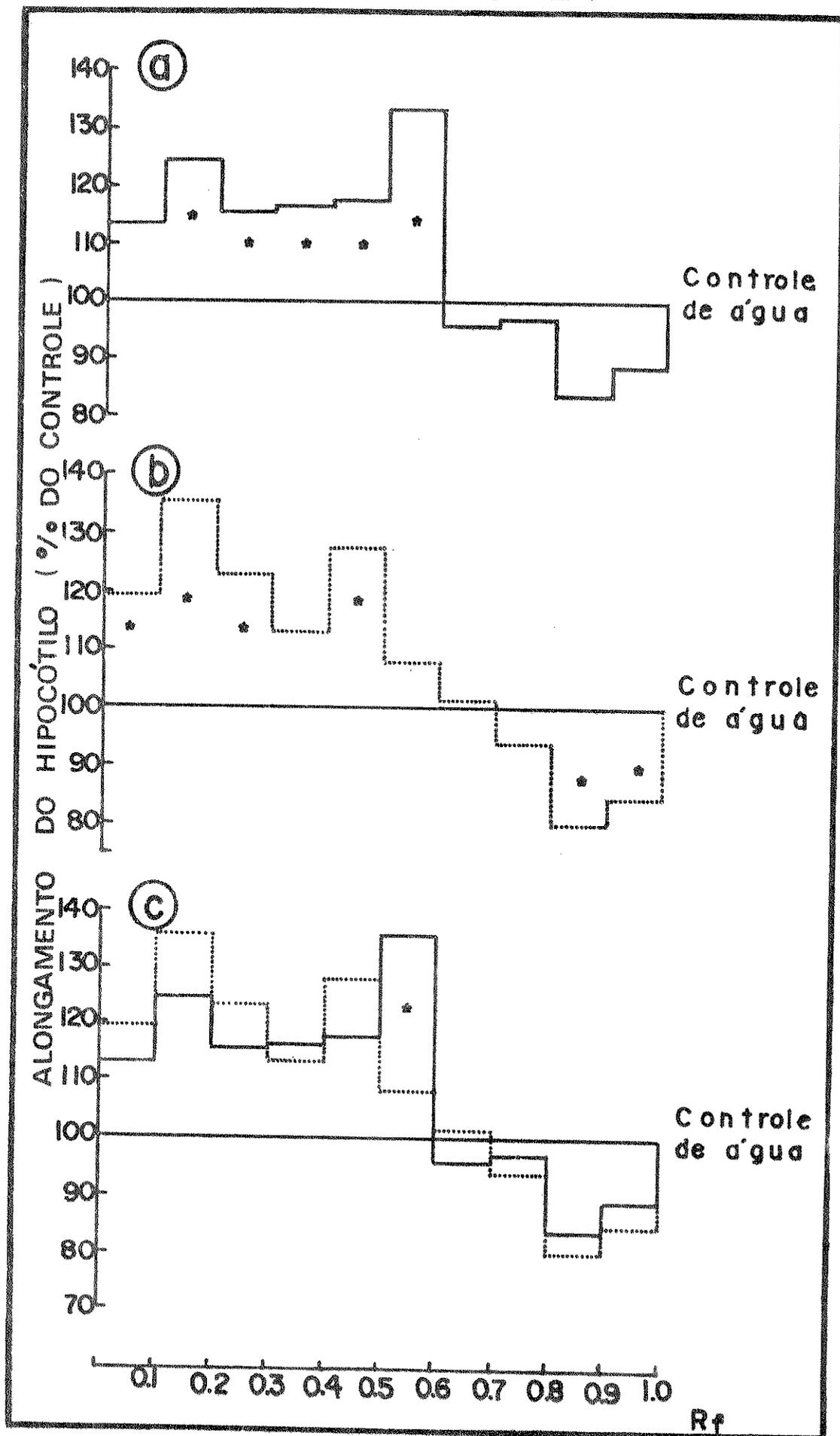
Semente seca (tratamento A₁). O sinal * mostra teste F significativo a 5% entre o Rf e o controle de água.

Figura 20c

Semente fresca (tratamento B) e semente seca (tratamento A₁). O sinal * mostra teste F significativo a 5% entre as faixas de Rf correspondentes dos tratamentos B e A₁.

Símbolos: ————— Semente fresca (tratamento B)
 Semente seca (tratamento A₁)

FIGURA 20



la figura 20c, que há apenas uma diferença significativa entre o Rf 0,5 e o Rf 0,6, verificando-se um maior nível de promotores neutros em sementes frescas, que de acordo com a figura 7b não mais germinam. Parece, pois, que esta promoção nada tem a ver com a germinação.

Na figura 21 são mostrados os resultados para as frações ácidas (figura 21a) e neutras (figura 21b) para sementes secas (tratamento A_1) armazenadas por 32 meses, e que continuaram a germinar bem (figura 6b).

Na figura 21a (fração ácida) nota-se que há promoção entre os Rfs 0,1 e 0,3, e entre os Rfs 0,4 e 0,6, mas estatisticamente significativa apenas entre os Rfs 0,4 e 0,5. Há inibição estatisticamente significativa entre os Rfs 0,6 e 1,0 e entre o ponto de aplicação e o Rf 0,1. Pela figura 21b (fração neutra) verifica-se que há promoção entre Rfs 0,1 e 0,6, mas estatisticamente significativa entre os Rfs 0,4 e 0,6. Há inibição entre a origem e o Rf 0,1, e entre os Rfs 0,6 e 1,0, mas estatisticamente significativa apenas entre os Rfs 0,7 e 0,9. De um modo geral há uma similaridade entre as figuras 18b e 21a (fração ácida, 12 e 32 meses de armazenamento) e entre as figuras 20b e 21b (fração neutra, 12 e 32 meses de armazenamento).

Resumindo, para frações ácidas e neutras, vários pontos podem ser considerados.

Para as frações ácidas, com relação a sementes frescas, temos pelos resultados das figuras 17a e 18a que, conforme aumenta o período de armazenamento, há um aumento no nível de inibidores ácidos, permanecendo o nível de promotores praticamente constante.

Para sementes secas, temos pela análise conjunta dos re

F I G U R A - 21

Sementes secas (tratamento Λ_1) com 32 meses de armazenamento. Bioensaio do alongamento do hypocótilo de alface. Resultados apresentados como porcentagem do controle de água (100%).

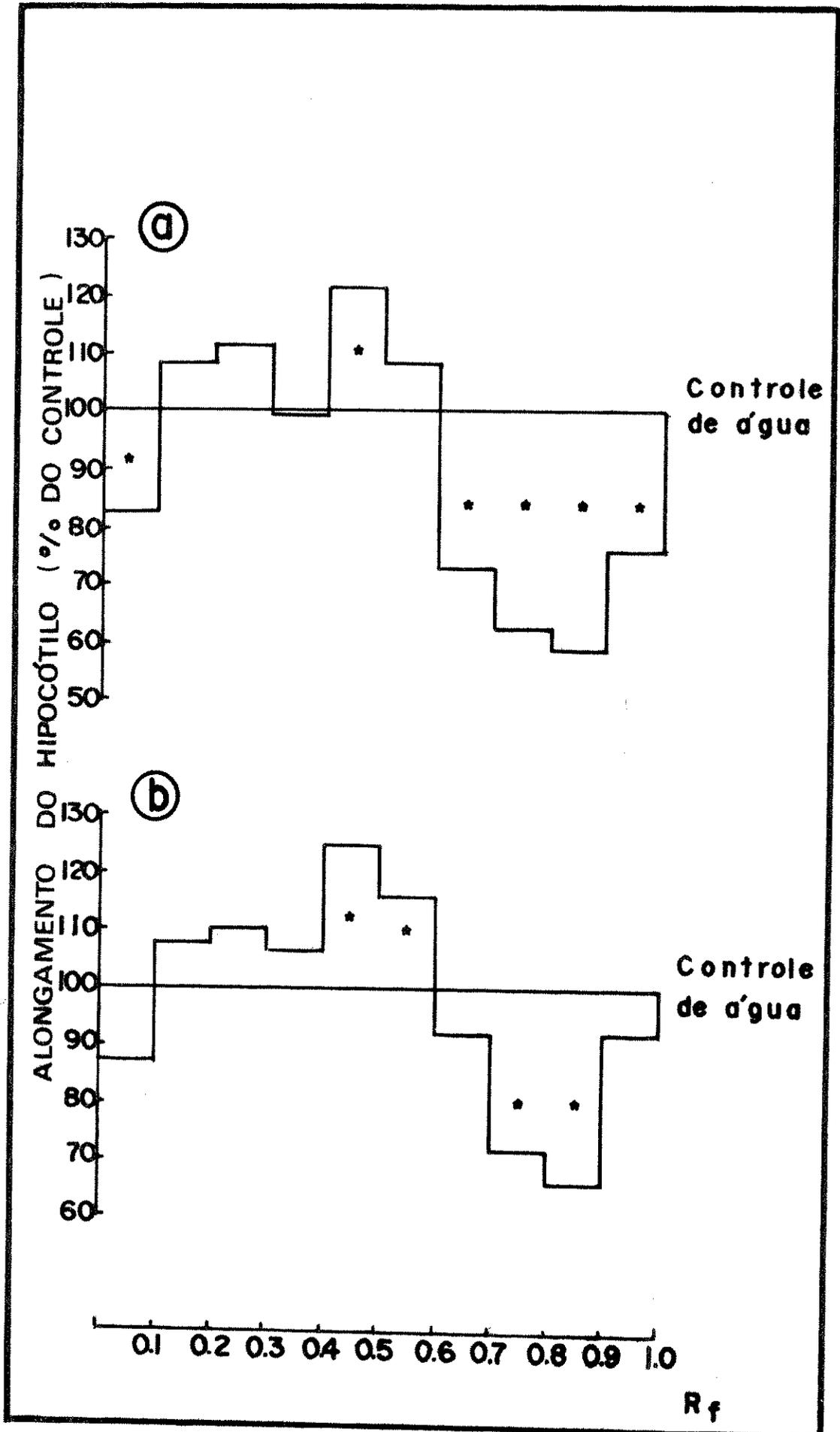
Figura 21a

Pração ácida de sementes secas. O sinal * mostra teste F significativo a 5% entre o Rf e o controle de água.

Figura 21b

Pração neutra de sementes secas. O sinal * mostra teste F significativo a 5% entre o Rf e o controle de água.

FIGURA 21



sultados das figuras 17b, 18b e 21a, que com o aumento do período de armazenamento houve ligeira variação no nível de inibidores ácidos.

Para as frações neutras, com relação às sementes frescas, os resultados das figuras 19a e 20a mostram níveis de promotores praticamente inalterados e níveis de inibidores diminuídos (o que parece não concordar com os resultados de germinação).

Com relação às sementes secas, verifica-se pelas figuras 19b, 20b e 21b, que os resultados obtidos mostram que até aos 12 meses de armazenamento não ocorreram grandes variações nos níveis de promotores e inibidores, sendo que aos 32 meses ocorreu um decréscimo no nível de promotores e um aumento no nível de inibidores.

2.2- Substâncias tipo citocininas

A fração básica (ver Material e Métodos) foi testada pelo bioteste para citocininas, nas faixas dos cromatogramas que deram reação positiva para o reagente de Wood (específico para purinas e, portanto, também para citocininas). A reação positiva ao teste de Wood ficou estabelecida entre o ponto de aplicação e o Rf 0,4. Portanto, esta região foi dividida em quatro zonas, e utilizadas para o bioteste de citocininas.

Os resultados para sementes frescas (tratamento B) e sementes secas (tratamento A₁) sem armazenamento são mostrados, respectivamente, nas figuras 22a e 22b. Houve promoção (para citocininas) entre o ponto de aplicação e o Rf 0,2, porém a promoção não foi estatisticamente significativa nem para sementes secas e nem para sementes frescas. A comparação entre estes dois tratamentos está na figura 22c, que mostra que parece haver um

F I G U R A - 22

Fração básica de sementes com zero meses de armazenam^{en}to. Bioensaio do aumento do peso fresco de cotilêdones de raban^ete. Resultados apresentados como porcentagem do controle de água (100%).

Figura 22a

Semente fresca (tratamento B). Teste F deu não significat^{iv}o entre Rfs e controle de água.

Figura 22b

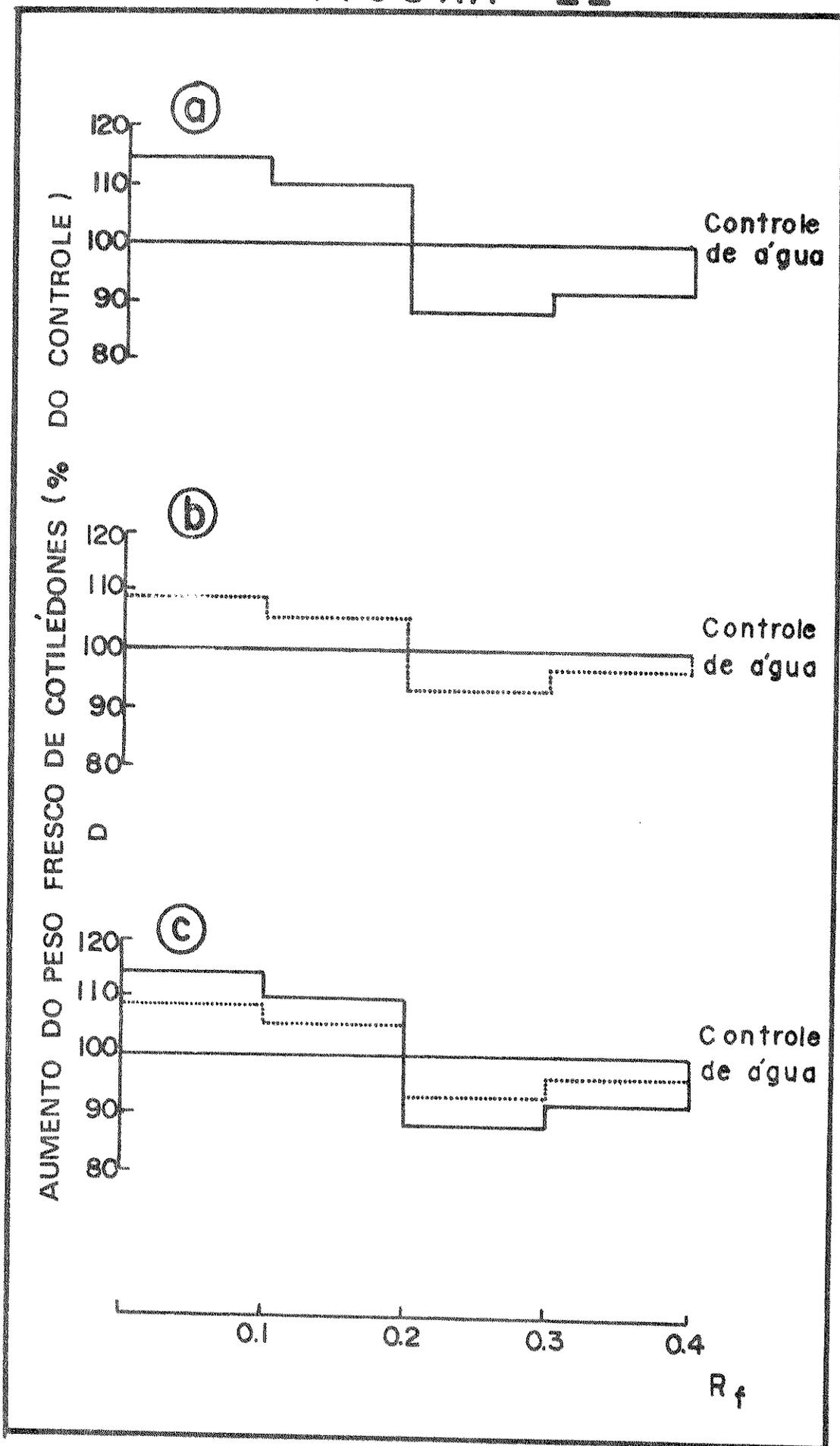
Semente seca (tratamento A₁). Teste F deu não significat^{iv}o entre Rfs e controle de água.

Figura 22c

Sementes frescas (tratamento B) e sementes secas (tratam^{en}to A₁). Teste F deu não significativo entre as faixas de Rf correspondentes dos tratamentos B e A₁.

Símbolos: ————— Semente frescas (tratamento B)
 Semente seca (tratamento A₁)

FIGURA 22



nível maior de citocininas nas sementes frescas (embora esta diferença não seja estatisticamente significativa). Do Rf 0,2 até o Rf 0,4 foi encontrada pequena inibição nos dois extratos, porém estatisticamente não significativa.

Pelas figuras 23a e 23b nota-se que tanto as sementes frescas como as sementes secas mostraram picos para citocininas entre o ponto de aplicação e o Rf 0,2, estatisticamente significativos. A análise conjunta dos resultados de sementes frescas e sementes secas (figura 23c) mostra que, entre o ponto de aplicação e o Rf 0,1, as sementes secas apresentaram promoção estatisticamente superior a das sementes frescas, de acordo com os resultados de germinação (figuras 6b e 7b). Entretanto, nas sementes armazenadas por 32 meses (tratamento A₁), houve apenas ligeira promoção entre o ponto de aplicação e o Rf 0,1 (como na figura 23b), porém não estatisticamente significativa (figura 24).

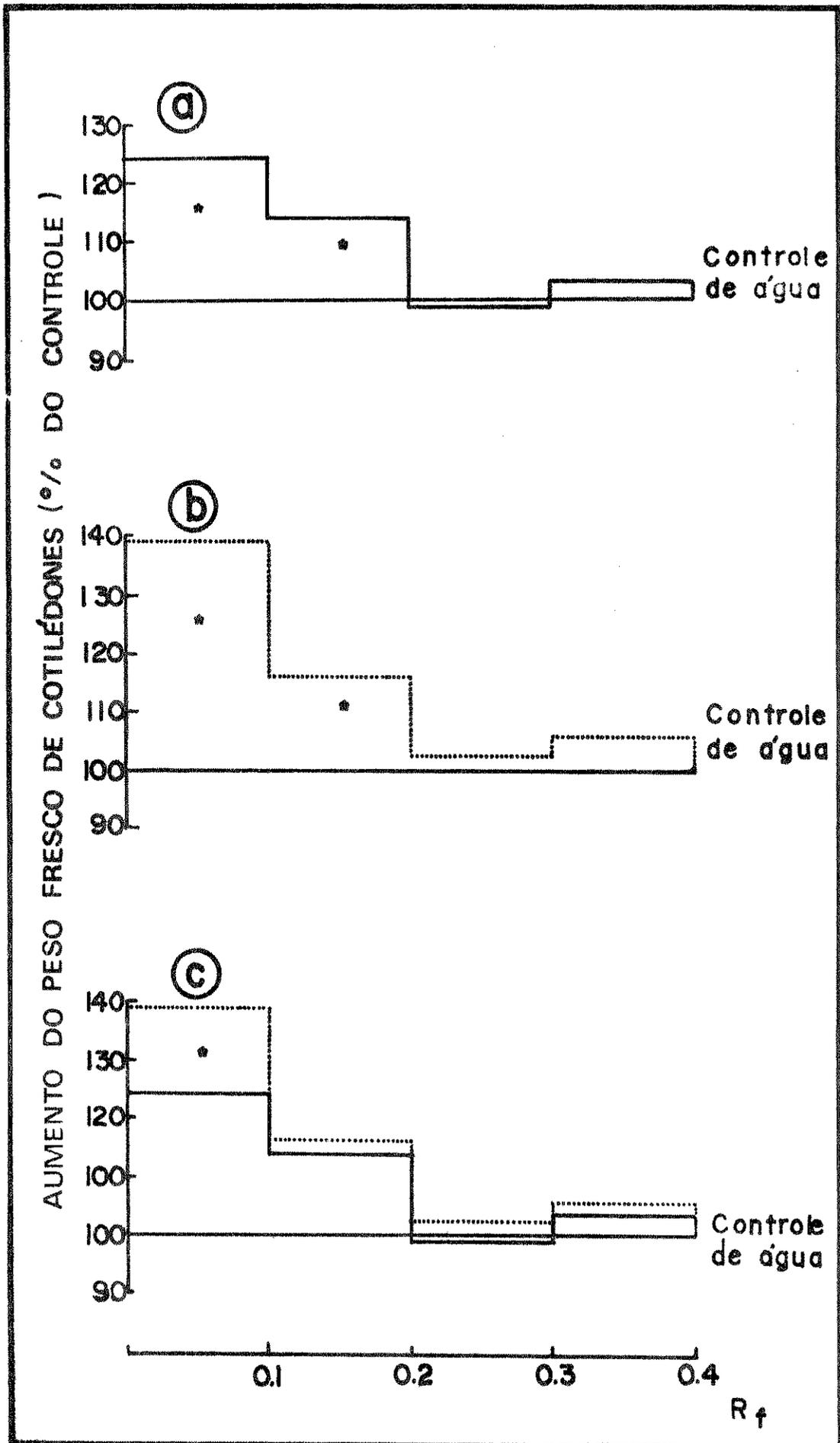
Resumindo para citocininas, alguns pontos podem também ser considerados.

Com relação a sementes frescas, nota-se pelos resultados das figuras 22a e 23a que houve um aumento nos níveis de citocininas durante os 12 meses de armazenamento.

Com relação a sementes secas, nota-se pelos resultados das figuras 22b, 23b e 24, que houve um aumento nos níveis de citocininas até aos 12 meses de armazenamento, sendo que aos 32 meses parece ter havido uma queda nestes níveis.

As citocininas parecem ter um papel importante na manutenção da viabilidade de sementes de limão cravo, mas elas sozinhas não a explicam. Talvez a perda da viabilidade esteja, em parte, relacionada com uma diminuição no nível de citocininas e um certo aumento no nível de inibidores ácidos nas sementes fres

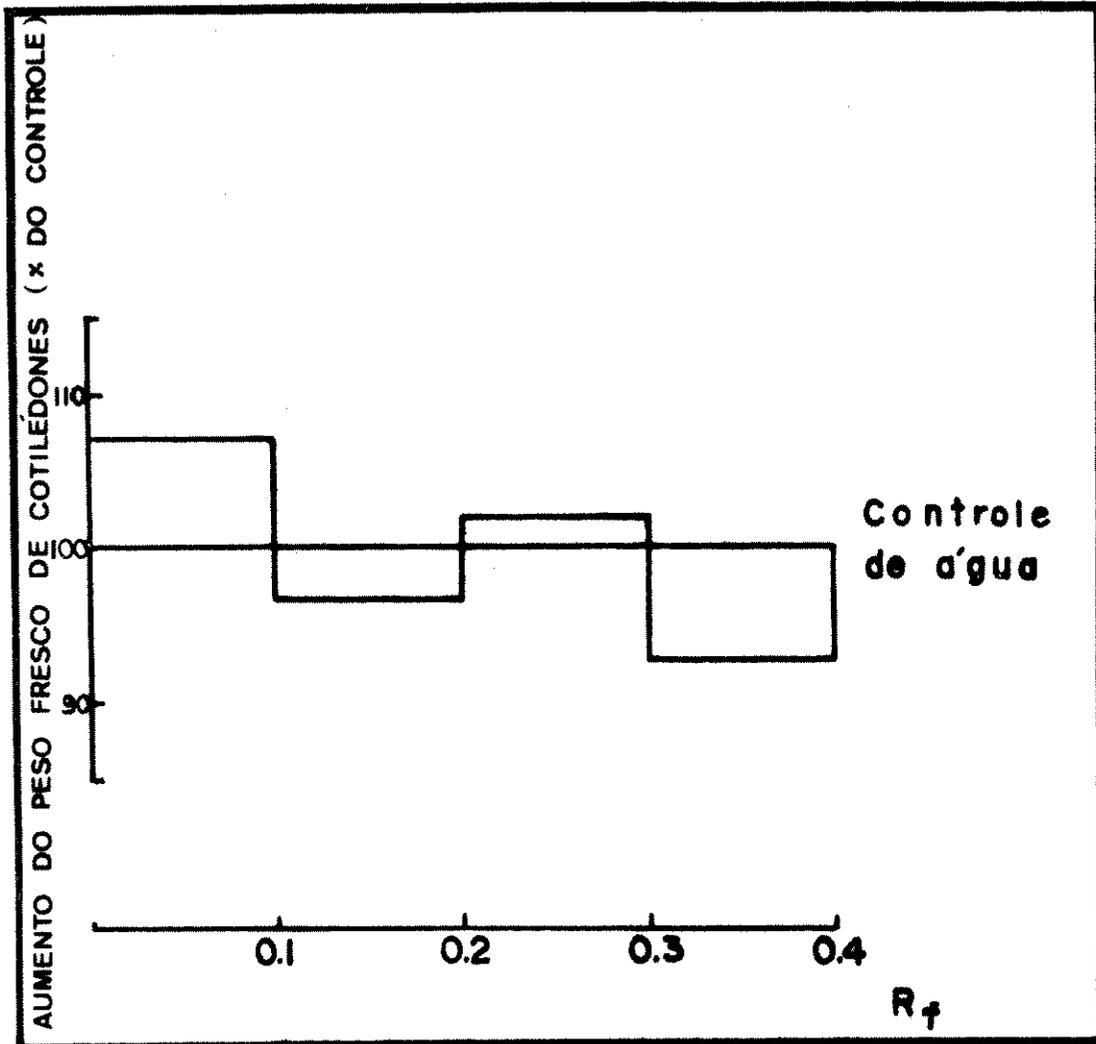
FIGURA 23



F I G U R A - 24

Fração básica de sementes (tratamento A₁) com 32 meses de armazenamento. Bioensaio do aumento do peso fresco de cotilédones de rabanete. Resultados apresentados como porcentagem do controle de água (100%). O teste F deu não significativo entre as faixas de Rf e o controle de água.

FIGURA 24



cas mantidas em condições ambientais (tratamento B).

Em relação a substâncias hormonais endógenas pode-se tirar as seguintes conclusões:

1- Na fração ácida com zero meses de armazenamento há maior atividade giberelínica no extrato de sementes secas. Um inibidor de pequena mobilidade no sistema solvente usado (presente entre a origem e o Rf 0,1 do cromatograma) foi encontrado somente no extrato de sementes frescas.

2- Na fração neutra com zero meses de armazenamento há pouca variação no nível de inibidores neutros entre sementes secas e frescas. Houve queda de nível de giberelinas (ésteres) nas sementes secas.

3- Com 12 meses de armazenamento há maior nível de inibidores na fração ácida de sementes frescas (que não mais germinam). Pouca variação no nível de giberelinas.

4- Com 12 meses de armazenamento há pouca variação no nível de inibidores na fração neutra de sementes frescas (que não mais germinam), mas há um aumento no nível de giberelinas (ésteres).

5- Sementes frescas ou sementes secas sem armazenamento apresentam baixo nível de citocininas.

6- Em sementes armazenadas por 12 meses há maior nível de citocininas nas sementes secas do que nas sementes frescas (e estas não mais germinam).

7- Com 32 meses de armazenamento há citocininas em menor nível do que com 12 meses de armazenamento, no extrato de sementes secas, embora estas continuem a germinar.

IV- DISCUSSÃO

Apesar da técnica usada para a secagem de sementes ter sido baseada na de Harrington (1960), com modificações que visavam abrandar as condições por ele utilizadas, a secagem artificial de sementes de limão cravo acarretou uma ligeira redução na porcentagem final de germinação. O autor citado recomenda, para a maioria das espécies, temperatura de até 38°C para a secagem segura de sementes com teor de umidade entre 10 e 18%, e de 43°C para sementes com teor de umidade abaixo de 10%. A nossa técnica envolveu a secagem em duas etapas: a) secagem até 10% de umidade com a temperatura de 35°C e b) secagem até 6% de umidade com a temperatura de 39°C. É difícil explicar, com a metodologia utilizada, a ocorrência de queda inicial de germinação em sementes de limão cravo após a secagem artificial. Resultados semelhantes foram obtidos por Mungomery et al (1966), após a secagem de sementes de tangerina Imperador (Citrus reticulata Blanco) a 40°C por 24 horas, obtendo uma queda de germinação de 91,5% para 70,5%. No entanto, Barton (1961) e Harrington (1972 a), estudando a longevidade de sementes de várias espécies, incluíram as sementes de algumas espécies de Citrus entre as que não podem ser secas, sendo injuriadas pela secagem. Os dados obtidos no presente trabalho sobre secagem artificial de sementes de limão cravo não concordam com os dados para Citrus de Barton (1961) e Harrington (1972 a), mas concordam em parte com os dados de Mungomery et al (1966).

Segundo Bacchi (1958), Montenegro e Salibe(1960), Barton (1961), Ferreira (1969), Chacko e Singh(1970) e Krishna e Shanker (1978), o armazenamento aberto de sementes de Citrus sob temperatura ambiente é a pior condição para armazenamento, ocorrendo rã

pida queda do poder germinativo, o que concorda com os nossos da
dos apresentados.

A melhor condição de armazenamento para manutenção da
viabilidade de sementes de linão cravo foi mante-las a 6% de umi
dade sob temperatura de 4°C. Resultados semelhantes foram obti-
dos por Krishna e Shanker (1978). Entretanto, outros autores (Ba-
cchi, 1958, Montenegro e Salibe, 1960, Mungomery et al , 1966 ,
Chacko e Singh, 1970 e Eshuys, 1975) afirmam que a melhor condi-
ção de armazenamento para sementes de Citrus é mante-las com al-
to teor de umidade sob temperatura de 4 - 8°C.

Através de experimento de germinação em canteiros de se
meadura, com sementes dos tratamentos A₁, A₂ e A₃, mostrou-se
que os resultados obtidos em condições de laboratório foram ple-
namente válidos também nestas condições. Com relação ao fato de
que a porcentagem de germinação nos canteiros ter sido sempre me
nor do que em condições ótimas de laboratório, consideramos ,
em consonância com Hegart (1973), que o solo não é um ambiente
ideal para a germinação e para a emergência, podendo ser conside-
rado mais ou menos adverso em diferentes épocas. Os fatores do
solo que afetariam a germinação seriam a temperatura, a umidade,
a aeração, patógenos, além das propriedades estruturais, tais co
mo resistência à penetração da semente e possibilidade de endure-
cimento.

Chacko e Singh (1970) obtiveram, para sementes de
Citrus karna, resultados de viabilidade, através de teste de te-
trazólio, que foram 11% mais altos que os obtidos por teste de
germinação. No entanto, Roistacher e Naver (1961) obtiveram, com
sementes de Citrus, boa correlação entre os resultados de teste
de germinação com os obtidos por teste de tetrazólio. Pelos nos-

os resultados conseguimos boa similaridade entre o teste de tetrazólio e o teste de germinação; além disso, foram determinados, pelo teste de tetrazólio, os efeitos da secagem artificial e das condições de armazenamento na viabilidade de sementes de limão cravo, resultados estes que foram quase idênticos aos obtidos por testes de germinação.

A casca e a película de sementes de limão cravo atrasaram a germinação, sendo que a remoção da casca induziu aumento na velocidade de germinação, aumento este que foi muito maior com a remoção conjunta da casca e da película. Resultados semelhantes foram obtidos por Cohen (1956) com sementes de laranja azeda (Citrus aurantium L.), por Mungomery et al (1966) com sementes de limão rugoso (Citrus limon L.Burm.) e por Zabala e Guardiola (1976), com sementes de Citrange Troyer (Poncirus trifoliata X Citrus sinensis).

A secagem artificial de sementes de limão cravo conduziu a um atraso na germinação, em comparação com as sementes não tratadas (sementes frescas), talvez devido à necessidade de um tempo maior para a embebição. Resultados semelhantes foram obtidos por Mungomery et al (1966) com sementes de tangerina Imperador, nas quais a secagem a 40°C por 24 horas e o tratamento com fungicida aumentaram o tempo necessário para a obtenção da porcentagem máxima de germinação de 12 para 15 dias.

Com relação a sementes secas, a remoção da casca e da película conduziu a quedas drásticas na germinação, apesar de um relativo aumento na velocidade inicial. Devido a grande contaminação por fungos e sementes apodrecidas nos testes de germinação com sementes sem casca e nuas, tentou-se, com a esterilização de sementes nuas com soluções de hipoclorito de sódio, a eliminação

da incidência de fungos, o que foi conseguido, porém sem eliminar o problema de sementes apodrecidas e queda de germinação. Pensou-se, a seguir, que este problema seria devido a reidratação rápida de sementes secas na germinação. Baseado nisto tentou-se a reidratação lenta destas sementes, porém os resultados foram negativos, e agravados pelo fato de que também as sementes secas intactas tiveram a sua germinação final drasticamente afetada. Todos estes problemas ficaram sem solução até o fim do presente trabalho, e também sem explicações através da literatura.

O ácido giberélico pode ser de importância na determinação da germinação de sementes na natureza, devido a sua presença e também de outras giberelinas em sementes de Phaseolus, alface e outras (Phinney e West, 1960). Há alguma evidência indicando que o nível de giberelinas muda durante os diferentes estágios de germinação, e durante a maturação e pós maturação de sementes (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975). No entanto, em qualquer discussão sobre a implicação de giberelina na germinação, deve ser feita uma distinção nítida entre os efeitos de compostos aplicados e a influência da variação dos níveis endógenos do hormônio. Os efeitos de giberelinas aplicadas exogenamente em sementes podem não estar relacionados com os processos de desenvolvimento normal (Jones e Stoddart, 1977).

Os níveis de giberelinas em sementes maduras são baixos quando comparados com os primeiros estágios de desenvolvimento da semente. Corcoran e Phinney (1962) verificaram que, em sementes maduras de Phaseolus vulgaris e Lupinus succulentus, a atividade de giberelina não é detectável, enquanto que na metade do processo de maturação a atividade é muito alta. No entanto, esta aparente perda em atividade com a maturação progressiva pode não

ser tão drástica. Durley, Mac Millan e Pryce (1971) mostraram, em sementes de Phaseolus multiflorus, que os primeiros estágios da maturação são caracterizados pela predominância de estruturas moleculares altamente ativas, tais como GA₁, enquanto que sementes maduras contêm principalmente GA₈, que é biologicamente inativo. Logo, a aparente ausência de atividade tipo giberelina, medida em bioteste, em sementes maduras pode ser consequência da acumulação de moléculas biologicamente inativas. Comportamento semelhante foi mostrado para sementes de ervilha em maturação (Frydman, Gaskin e MacMillan, 1974), para sementes de cevada (Groat e Briggs, 1969) e para sementes de outras gramíneas (Stoddart, 1965). Parece evidente, portanto, que sementes completamente formadas geralmente contêm quantidades muito baixas de giberelinas livres e, quando estes compostos ocorrem, acham-se presentes em moléculas biologicamente inativas (Jones e Stoddart, 1977).

Pelos resultados obtidos neste trabalho através das frações ácidas e neutras, parece que as giberelinas não estão envolvidas com a germinação de sementes de limão cravo, visto que os níveis determinados em sementes frescas e secas artificialmente, durante o período de armazenamento, não apresentaram variações conclusivas entre as sementes que germinavam e as que não mais germinavam.

Baseado nos dados de Corcoran e Phinney (1962), poder-se-ia concluir que o fato de que giberelinas biologicamente ativas não parecem estar envolvidas na germinação de sementes de limão cravo pode estar restrito somente aos eventos iniciais de germinação, devido a metodologia de extração e detecção utilizada neste trabalho. Talvez as sementes maduras de limão cravo apresentem formas biologicamente inativas de giberelinas e que,

durante a germinação, sejam convertidas em formas biologicamente ativas, mas não podemos comparar os nossos dados com a literatura existente.

Pela literatura verificamos que os estudos sobre efeitos de giberelinas em sementes de Citrus foram desenvolvidos a partir de aplicações exógenas do hormônio, de acordo com os experimentos de Burns e Coggins (1969), Button et al (1973) , Srivastava e Singh (1971), Shant e Rao (1975) e Eshuys (1976) , não havendo, portanto, dados referentes a mudanças nos níveis endógenos de giberelinas em comparação com os resultados de germinação após diversas condições de armazenamento.

Pelos resultados obtidos de biotestes usando as frações ácidas, básicas e neutras de sementes frescas e secas de limão cravo, poder-se-ia dizer que a germinação parece estar relacionada com os níveis endógenos de inibidores ácidos e de citocininas.

Em geral, a atividade citocinínica é alta em frutos e sementes em desenvolvimento, mas com a maturação os níveis caem, tornando-se difícil detectá-la (Gazit e Blumenfeld , 1970 ; Sandstedt, 1971). Este decréscimo em atividade pode ser devido à quebra das citocininas ou aumento do nível de inibidores, que vão afetar a sensibilidade do bioteste utilizado. Por outro lado, a perda de atividade detectável pode ser devida à conversão de ribonucleosídeos e bases ativas de citocininas em ribonucleotídeos biologicamente inativos. Isto ocorre em frutos de tomate durante a maturação, onde a maioria da atividade citocinínica ocorre em sementes (Abdel Rahman, Doss e Howell, 1975). Logo, parece possível que durante o desenvolvimento, as citocininas ativas convertam-se em ribonucleotídeos inativos, que são armazenados até os primeiros estágios da germinação (Thomas, 1977).

Khan (1971), após análise do envolvimento de hormônios na germinação de sementes, propôs um modelo em que giberelinas tem um papel principal na germinação, enquanto que citocininas e inibidores são essencialmente permissivos e preventivos. Deste modo, processos germinativos mediados por giberelinas podem não ocorrer na presença de inibidores de germinação, a menos que haja citocinina suficiente para se sobrepor aos efeitos inibitórios daqueles. Neste modelo proposto esta interação citocininas/inibidores tem um importante papel em controlar os efeitos das giberelinas.

Baseado na literatura, pode-se dizer que a nossa conclusão de que a germinação de sementes de limão cravo pode estar relacionada com os níveis endógenos de citocininas e inibidores ácidos parece ser bem coerente. Além disso este fato poderia explicar também a possível não participação das giberelinas no processo de germinação, talvez porque estas dependam da interação citocininas/inibidores ácidos, de tal modo que para ocorrer a germinação, as citocininas devem sobrepujar os efeitos dos inibidores ácidos, para que as giberelinas possam atuar efetivamente.

Com relação aos efeitos do armazenamento de sementes na germinação, talvez o principal efeito seja de que, com baixas temperaturas e baixa umidade nas sementes, a quebra das citocininas seja retardada, prolongando a germinação devido a manutenção da interação citocininas/inibidores ácidos no sentido da promoção de germinação.

V- RESUMO

Foram estudados os efeitos da secagem artificial e de diversas condições de armazenamento na germinação e manutenção de viabilidade de sementes de limão cravo (Citrus reticulata var. austera Hib. - Swingle), respectivamente. A influência de fatores ambientais (temperatura e luz) e dos tegumentos das sementes na germinação foi analisada, bem como as relações entre as mudanças de níveis hormonais endógenos nas diferentes fases do armazenamento com a manutenção ou a queda da viabilidade das sementes.

A secagem artificial de sementes causou um pequeno decréscimo inicial de germinação, mas estatisticamente diferente quando comparado com as sementes frescas. Entretanto, com a evolução do período de armazenamento, as sementes secas mantiveram a mesma porcentagem de germinação (em torno de 80%), enquanto que as sementes frescas perderam rapidamente o poder germinativo, que atingiu zero aos 8 meses. Estes resultados foram corroborados por testes de tetrazólio.

Através de testes de germinação em condições de laboratório mostrou-se que a secagem das sementes até 6% de umidade, seguida de enlatamento hermético e conservação sob temperatura de 4°C foi a melhor das condições de armazenamento testadas, resultado este confirmado posteriormente em condições de campo e em testes de tetrazólio.

Sob temperaturas constantes de 5, 10, 40 e 45°C não ocorreu a germinação de sementes. Temperaturas constantes de 15 e de 20°C atrasaram o processo germinativo, enquanto que temperaturas de 25, 30 e 35°C induziram elevadas porcentagens de germinação. A alternância de temperaturas aparentemente não produziu melho-

res resultados do que as temperaturas constantes, com exceção da alternância de 10-25°C, que retardou e inibiu a germinação.

As sementes de limão cravo mostraram-se indiferentes à luz branca, luzes monocromáticas e ausência de luz para a germinação.

A remoção da casca e da película acelerou a germinação de sementes frescas, e inibiu a de sementes secas. A reidratação lenta das sementes secas antes da embebição provocou uma maior redução na porcentagem de germinação de sementes sem casca e nuas, e afetou também a germinação de sementes intactas.

Finalmente, os resultados mostraram que a queda ou a manutenção de viabilidade das sementes durante o armazenamento aparentemente não estão relacionadas com os níveis endógenos de gibberelinas. Propõe-se uma possível interação entre citocininas e inibidores ácidos como responsável pelo controle da germinação após os períodos de armazenamento.

VI- SUMMARY

Germination and viability maintenance of limão cravo (Citrus reticulata var. austera Hib. - Swingle) seeds under artificial drying and several storage conditions, respectively, were studied. Environmental factors as temperature and light, and presence / absence of seed coats (testa and tegmen) were analysed as to their influences on seed germination as well as the relationships between hormonal level changes throughout the several storage periods studied and seed viability losses.

Artificial drying induced a slight but significant initial drop in germinability as compared with fresh seeds. However, dried seeds were able to maintain high germination percentages (about 80%) throughout the storage period while fresh seeds had their germination percentages drastically reduced, reaching zero after 8 months storage. These results have been corroborated by tetrazolium tests.

The best storage conditions were found to be those in which seed were dried to 6% moisture content, hermetically sealed in cans and subsequently stored at 4°C. These findings were later confirmed by tetrazolium tests and field trials.

No seed germination at constant temperatures of 5, 10, 40 and 45°C was observed. On the other hand constant temperatures of 25, 30 and 35°C induced high germination percentages while seed germination was delayed at constant temperatures of 15 and 20°C. Alternating temperatures have not apparently produced better germination results than constant temperatures, however seed germination was delayed and inhibited at 10 - 25 °C alternation.

Limão cravo seed germination was unresponsive to white or monochromatic light, as well as to darkness.

Testa and / or tegmen removal enhanced and inhibited fresh and dry seed germination, respectively. Slow rehydration of dried seeds prior to imbibition further reduced germination percentage, both in intact seeds or in those where the testa and / or tegmen were subsequently removed.

Finally, the results have apparently demonstrated the absence of relationship between seed viability loss or maintenance with gibberellin endogenous levels. A possible interation between cytokinins and acidic inhibitors has been proposed to account for germination control after several storage conditions.

VII- LITERATURA CITADA

- ABDEL RAHMAN, T.M., DOSS, G.J. e HOWELL, L., 1975. Changes in endogenous plant hormones in cherry tomato fruits during development and maturation. *Physiologia Pl.* 34: 39-43.
- ANDERSON, J.D., 1973. Dichloromethane and lettuce seed germination. *Science, N.Y.* 179: 94-95.
- ASHTON, F.M., 1976. Mobilization of storage proteins of seeds. *A. Rev. Pl. Physiol.* 27: 95-117.
- BACCHI, O., 1958. Estudos sobre a conservação de sementes. II- Citrus. *Bragantia* 17: 157-166.
- BARTON, L.V., 1961. Seed Preservation and Longevity. Interscience Publishers, Inc.. New York. 216 pg.
- BARZILAI, E. e MAYER, A.M., 1964. Kinins in germinating lettuce seeds. *Aust. J. biol. Sci.* 17: 798-800.
- BASS, L.N., 1973. Controlled atmosphere and seed storage. *Proc. int. Seed Test. Ass.* 1, nº 2: 463-492.
- BORTWICK, 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. U.S.A.* 38: 662-666.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, 1976. Regras para Análise de Sementes. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Brasília. 188 pg.
- BURNS, R.M. e COGGINS, C.W., Jr., 1969. Sweet orange germination and growth aided by water and gibberellic acid soak. *Calif. Agric.* 23(12): 18-19.

- BUTOM, J., BORNMAN, C.H. e HACKLAND, B.A., 1973. Effect of some pre-sowing treatments on the germination of Poncirus trifoliata and Troyer citrange seeds. Hort. Abstr. 43: 156.
- CHACKO, E.K. e SINGH, R.N., 1970. Studies on the germination and longevity of fruit-tree-seeds: Citrus spp. Biol. Abstr. 51: 6198.
- CHEN, S.S.C., 1970. Action of light and gibberellic acid on the growth of excised embryos from Phacelia tanacetifolia seeds. Planta 95: 336-340.
- CHIN, T.Y., POULSON, R. e BEEVERS, L., 1972. The influence of axis removal on protein metabolism in cotyledons of Pisum sativum L.. Pl. Physiol., Lancaster, 49: 482-489.
- CINTRA, A.F., NEVES, H.S. e YAMASHIRO, T., 1971. Produção comparada de mudas cítricas no Estado de São Paulo. In Anais do I Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2v: 51-55.
- COHEN, A., 1956. Studies on the viability of Citrus seeds and certain properties of their coats. Bull. Res. Counc. Israel 5: 200-209.
- COHEN, D., 1958. The mechanism of germination stimulation by alternating temperatures. Bull. Res. Counc. Israel 6D:111-117.
- CORCORAN, M.R. e PHINNEY, B.O., 1962. Changes in amounts of gibberellin-like substances in developing seed of Echynocystis, Lupinus and Phaseolus. Physiologia Pl. 15: 252-262.
- CURTIS, H.J., 1963. Biological mechanisms underlying the aging process. Science, N.Y. 141: 686.

- DELOUCHE, J.C., STILL, T.W., RASPET, M. e LIENHARD, M., 1962. The Tetrazolium Test for Seed Viability. Miss. agric. exp. Stn. tech. Bull. 51: 1-63.
- DELOUCHE, J.C., 1968. Physiology of Seed Storage. Mississippi State University, State College, Mississippi. 8 pg.
- DÖRFFLING, K., 1970. Abscisinsäure und Keimungshemmung in der Tomatenfrucht. Planta 93: 243-256.
- DURLEY, R.C., MAC MILLAN, J. e PRYCE, R.J., 1971. Investigation of gibberellins and other growth substances in the seed of Phaseolus multiflorus and of Phaseolus vulgaris by gas chromatography and by gas chromatography-mass spectrometry. Phytochemistry 10: 1891-1908.
- ESHUYS, W.A., 1975. Loss of viability of Citrus and Poncirus trifoliata seeds during storage. Hort. Abstr. 45: 298.
- ESHUYS, W.A., 1976. The effect of GA on the germination of Citrus seed. Hort. Abstr. 46: 226.
- FELIPPE, G.M., 1978. Effects of temperature on germination of Rumex obtusifolius. Rev. Mus. Paul. M.S. 25: 167-181.
- 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., 37: 177 - 187 São Paulo.
- FERREIRA, J.J., 1969. Loss of germinative power in storage seeds of Citrus species. Revta Fac. Agron. Vet. Univ. B. Aires 17 (2): 51-55.

- FRANKLAND, B. e WAREING, P.F., 1960. Effect of gibberellic acid on hypocotyl growth of lettuce seedlings. *Nature*, Lond. 185: 255-256.
- FRYDMAN, V.M., GASKIN, P. e MAC MILLAN, J., 1974. Qualitative and quantitative analyses of gibberellins throughout seed maturation in Pisum sativum cv. Progress nº 9. *Planta* 118: 123-132.
- GAZIT, S. e BLUMENFELD, A., 1970. Citokinin and inhibitor activities in the avocado fruit mesocarp. *Pl. Physiol.*, Lancaster, 46: 334-336.
- GEPSTAIN, S. e ILAN, I., 1970. A promotive action of kinetin on amylase activity in cotyledons of Phaseolus vulgaris. *Pl. Cell Physiol.*, Tokyo. 11: 819-822.
- GHERARDI, E., 1974. Promotores e Inibidores de Crescimento em Sementes de Carica papaya L.. Dissertação de Mestrado. Escola Paulista de Medicina.
- GROAT, J.I. e BRIGGS, D.E., 1969. Gibberellins and α -amylase formation in germinating barley. *Phytochemistry* 8: 1615-1627.
- HARRINGTON, J.F., 1960. Drying, storing and packaging seeds to maintain germination and vigor. In *Seed Drying and Storage*. Seed Technology Laboratory. State College. Mississippi.
- HARRINGTON, J.F., 1972 a. Seed storage and longevity. In *Seed Biology*, 2 (ed. T.T. Kozlowsky). Academic Press. New York.
- HARRINGTON, J.F., 1972 b. Problems of seed storage. In *Seed Ecology* (ed. W. Heydecker). Butterworths. London.

- HEGART, T.W., 1973. Temperature relations of germination in the field. In Seed Ecology (ed. W. Heydecker). Butterworths. London
- 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. The role of the seed-coats in germination of photosensitive lettuce seeds. Pl. Cell Physiol, Tokyo. 4: 169-185.
- JOLY, C.A. e FELIPPE, G.M., 1979. Dormência das sementes de Rapanea guianensis Aubl.. Revta bras. Bot. (no prelo).
- JONES, R.L. e ARMSTRONG, J.E., 1971. Evidence for the osmotic regulation of hidrolytic enzyme production in germinating barley seeds. Pl. Physiol., Lancaster, 48: 137-142.
- JONES, R.L. e STODDART, J.L., 1977. Gibberellins and seed germination. In The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination (ed. A.A. Khan). North - Holland Publishing Company. New York.
- KENDRICK, R.E. e SPRUIT, C.J.P., 1974. Inverse dark reversion of phytochrome: an explanation. Planta 120: 265-272.
- KHAN, A.A., 1971. Cytokinins: Permissive role in seed germination. Science, N.Y. 171: 853-859.
- KLEIN, S., NEGBI, M., WITZTUM, A. e ROTHBERG, L., 1971. The role of the endosperm in uptake and distribution of exogenous leucine in germinating lettuce seeds. New Phytol. 70:143-147.
- KRISHNA, M., P.R. e SHANKER, G., 1978. Studies on the longevity of Citrus seed under various storage conditions. Hort. Abstr. 48: 429.

- LETHAM, D.S., 1968. A new cytokinin bioassay and the naturally occurring cytokinin complex. In Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances (ed. F. Wishtman e G. Setterfield). The Range Press Ltd. Ottawa.
- LETHAM, D.S., SHANNON, J.S. e MC DONALD , I. R. , 1964. The structure of zeatin, a factor inducing cell division . Proc. chem. Soc. 230-231.
- LEVITT, J., 1956. The Hardiness of Plants . Academic Press . New York.
- MAGUIRE, J.D., 1973. Physiological disorders in germinating seeds induced by the environment. In Seed Ecology (ed. W.Heydecker). Butterworths. London.
- MAYER, A.M. e POLJAKOFF-MAYBER, A., 1975 . The Germination of Seeds. Pergamon Press. Oxford.
- MAYER, A.M. e SHAIN, Y., 1974. The control of seed germination. A. Rev. Pl. Physiol. 25: 167-193.
- MILLER, C.O., 1958. The relationship of the kinetin and red-light promotions of lettuce seed germination. Pl. Physiol., Lancaster, 33: 115-117.
- MONTENEGRO, H.W.S. e SALIBE, A.A., 1960. Conservação de sementes de porta-enxertos para Citrus. Revta Agric., Piracicaba 35(2): 109-135.
- MOORE, R.P., 1973. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In Seed Ecology (ed. W. Heydecker). Butterworths. London.

- MUNGOMERY, W.V., AGNEW, G.W.J. e PRODONOFF, E.T., 1966. Maintenance of Citrus seed viability. Qd. J. agric. Sci. 23: 103-120.
- NAKAMURA, S., 1975. The most appropriate moisture content of seeds for their long life span. Proc. int. Seed Test. Ass. 3: 747-759.
- NORONHA, A., VICENTE, M. e FELIPPE, G.M., 1976. Effect of storage and growth conditions on photoblasticity of seeds of Cucumis anguria. Hoehnea 6: 7-10.
- PENNER, D. e ASHTON, F.M., 1967. Hormonal control of proteinase activity in squash cotyledons. Pl. Physiol., Lancaster, 42: 791-796.
- PHYNNEY, B.O. e WEST, C.A., 1960. Gibberellins as native plant growth regulators. A. Rev. Pl. Physiol. 11: 411-436.
- REYNOLDS, T. e THOMPSON, P.A., 1973. Effects of kinetin, gibberellins and (\pm) abscisic acid on the germination of lettuce (Lactuca sativa). Physiologia Pl. 28: 516-522.
- ROBERTS, B.E. e OSBORNE, D.J., 1973. Protein synthesis and viability in rye grains. In Seed Ecology (ed. W. Heydecker). Butterworths. London.
- ROISTACHER, C.N. e NAVER, E.M., 1961. Quick tests predicts Citrus seed viability. Calif. Citrogr. 46(9): 300-302.
- SALGADO-LABOURIAU, M.L., 1973. A semente de Magonia pubescens St. Hil.- Morfologia e germinação. Anais Acad. bras. Ciênc. 45(3/4): 501-537.
- SANDSTEDT, R., 1971. Cytokinin activity during development of cotton fruit. Physiologia Pl. 24: 408-410.

- SHANT, P.S. e RAO, S.N., 1975. Note on the effect of gibberellic acid on seed germination and seedling growth of acid lime (Citrus aurantifolia Swingle). Hort. Abstr. 45: 464.
- SNEDECOR, G.W., 1962. Statistical Methods . The Iowa State University Press. 5ª ed. U.S.A..
- SRIVASTAVA, R.P. e SINGH, L., 1971. The influence of presowing treatment with gibberellic acid on the germination and growth of fruit plants. 1. Hill lemon and Malta. Hort. Abstr. 41: 1163.
- STADEN van, J., 1973. Changes in endogenous cytokinins of lettuce seed during germination. Physiologia Pl. 28: 222-227.
- STADEN van, J. e WAREING, P.F., 1972. The effect of light on endogenous cytokinins levels in seeds of Rumex obtusifolius. Planta 104: 126-133.
- STODDART, J.L., 1965. Changes in gibberellin content during seed ripening in grasses. Ann. Bot. N.S. 29: 741-749.
- SWINGLE, W.T. e REECE, P.C., 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. In Citrus Industry 1: 190-430.
- THOMAS, T.H., 1977. Cytokinins, cytokinins-active compounds and seed germination. In The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination (ed. A. A. Khan). North-Holland Publishing Company. New York.
- TOOLE, V.K., 1973. Effects of light, temperature and their interations on the germination of seeds. Proc. int. Seed Test Ass. 1: nº 2, 339-396.

- VALIO, I.F.M., 1969. Promotion and Inhibition of Growth in Lunularia Crucjata (L.) DUM. Ph. D. Thesis. University of London.
- VILLIERS, T. A. , 1973. Ageing and longevity of seeds. In Seed Ecology (ed. W. Heydecker). Butterworths. London.
- WILEY, L. e ASHTON, F.M., 1967. Influence of the embrionic axis on protein hydrolysis in cotiledons of Cucurbita maxima . Physiologia Pl. 20: 688-696.
- WILLEMSSEN, R.W. e RICE, E.L., 1972. Mechanism of seed dormancy in Ambrosia artemisiifolia. Am. J. Bot. 59(3): 248-257.
- WOOD, T., 1955. A reagent for the deteccion of chloride and certain purines and pyrimidines on paper chromatograms. Nature, Lond. 176: 175.
- ZABALA, G. e GUARDIOLA, J.L., 1976. The effect of seed coat on Troyer citrange seed germination. Hort. Abstr. 46: 338.