

PAULO SÉRGIO DE FIGUEIREDO

Este exemplar corresponde à redação final da
tese defendida por Paulo Sérgio de Figueiredo
e aprovada pela Comissão Julgadora.
M^{te} Fátima Aleixo Pereira
17/2/84

GERMINAÇÃO DE SEMENTES IMATURAS DE PHASEOLUS VULGARIS L. CV.
GOIANO PRECOCE

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

ORIENTADORA : Dra. Maria de Fátima Aleixo Pereira
CAMPINAS

1984

AGRADECIMENTOS

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

Aos Profs. Dr. Ivany F. M. Válio, Dr. Gil M. Felipe e Dr. Ladaslav Sodek, pelas sugestões dadas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho e ao Instituto Agronômico de Campinas pelo fornecimento de sementes.

A Maria Piedade pela valiosa ajuda e a todos os amigos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho

ABREVIATURAS

Ácido giberélico	GA3
6-Benzilaminopurina	6BA
Ácido abscísico	ABA

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	1
II- MATERIAL E MÉTODOS	10
1. Material biológico	10
2. Método geral de crescimento de plantas	10
3. Curvas de crescimento de frutos e sementes	10
4. Caracterização de classes de desenvolvimento de de sementes	10
4.1. Determinação da pigmentação	11
4.2. Determinação do teor de umidade	11
5. Método de dessecação de sementes	11
6. Método geral de germinação	13
7. Cálculo do tempo médio de germinação	13
8. Análise de substâncias de crescimento	14
8.1. Extração e fracionamento	14
8.2. Extração de ácido abscísico	14
8.3. Cromatografia de camada delgada	16
8.4. Cromatografia em papel	16
8.5. Biotestes	16
8.5.1. Alongamento do hipocótilo de alface.	18
8.5.2. Aumento do peso fresco de cotilédones de rabanete	19
8.5.3. Germinação de sementes de alface ...	19
8.6. Determinação química de citocininas	20
8.7. Determinação de ácido abscísico através da fluorescência em luz ultra-violeta	20

8.8. Determinação do ácido abscísico por espectroscopia	21
9. Efeito de reguladores de crescimento	21
9.1. Efeito de GA ₃	21
9.2. Efeito de 6BA	21
9.3. Efeito de ABA	22
10. Atividade amilolítica durante a embebição	22
11. Efeito de 6BA sobre a atividade amilolítica	23
12. Efeito da maturidade da semente na capacidade reprodutiva das plantas	23
13. Análise estatística	24
III - Resultados	26
1. Caracterização dos estádios de desenvolvimento de sementes	26
2. Curvas de crescimento de frutos e sementes	26
3. Germinação de sementes recém-colhidas ou secas artificialmente nos diferentes estádios de desenvolvimento	33
4. Análise de substâncias endógenas em sementes recém-colhidas ou secas artificialmente, em diferentes estádios de desenvolvimento	35
4.1. Substâncias promotoras e inibidoras detectadas na fração ácida	35
4.2. Atividade citocinínica	46
4.3. Substâncias de crescimento detectadas na fração neutra	50
4.4. Nível endógeno de giberelinas e citocininas	56

4.5. Nível endógeno de ABA	58
4.5.1. Determinação de ABA por espectrosco- pia em luz ultra-violeta	60
4.5.2. Determinação de ABA através do bio - teste da inibição da germinação de sementes de alface	60
5. Efeito de reguladores de crescimento na germina- ção de sementes imaturas	63
5.1. Efeito de GA ₃	63
5.2. Efeito de 6BA	67
5.3. Efeito de ABA	67
6. Atividade amilolítica em sementes, em diferentes estádios de desenvolvimento, durante a embebição	67
7. Efeito de 6BA sobre a atividade amilolítica	74
8. Capacidade reprodutiva de plantas provenientes de sementes imaturas	74
IV - DISCUSSÃO	82
V - RESUMO	94
VI - BIBLIOGRAFIA	96

I. INTRODUÇÃO

Normalmente a semente é o resultado da reprodução sexuada de plantas superiores e também um órgão de dispersão. O desenvolvimento da semente, portanto, pode ser visto como uma preparação para a sobrevivência da espécie através da dispersão e subsequente germinação. A semente é um propágulo mais complexo do que o equivalente esporo de plantas inferiores e um considerável desenvolvimento do óvulo fertilizado, garantido pela planta-mãe, deve ocorrer antes de sua separação (Boulter, 1981).

Funcionalmente, três fases podem ser identificadas no desenvolvimento das sementes. Inicialmente, divisões celulares aumentam o tecido vegetativo mas em lugar de continuar o desenvolvimento da plântula, ocorrem mudanças destinadas a assegurar a sobrevivência da semente como uma entidade autônoma. Isto se dá através do acúmulo de material de reserva nos cotilédones que, na maioria dos legumes, funcionam primariamente como um tecido de estocagem. Esta preparação para a subsequente germinação e crescimento durante a segunda fase de desenvolvimento, é fundamental uma vez que em sementes maduras a absorção de nitrogênio, minerais e a capacidade fotossintética são baixas. Na terceira fase há uma drástica redução na atividade metabólica acompanhada pela desidratação da semente. A maior parte do mecanismo metabólico geral das células deve sobreviver ao processo de desidratação desde que enzimas ativas têm sido extraídas de sementes maduras. No entanto, a extensão na qual sementes maduras contêm o mecanismo metabólico necessário para a mobilização das reservas e que parte dos componentes deste mecanismo é sintetizada durante a embebição não está ainda esclarecido (Boulter, 1981).

A germinação precoce deve ser dependente, em parte, da rápida incorporação de nutrientes durante a embriogênese. Contudo, relacionando reserva de nutrientes com germinação, deve-se considerar que a maioria das espécies estudadas são agronomicamente importantes e têm sido selecionadas artificialmente através dos anos. Então as reservas nutricionais de sementes nos dias atuais, pode não refletir a necessidade real para a germinação e estabelecimento da plântula na natureza, mas sim a pressão seletiva feita pelo homem na busca de sementes nutricionalmente mais benéficas.

Uma análise da literatura mostra que sementes de leguminosas como feijão e ervilha, apresentam um padrão diáuxico de crescimento que consiste de duas fases de crescimento rápido separadas por uma fase de crescimento lento (Bisson e Jones, 1932; Carr e Skene, 1960; Burrows e Carr, 1970; Walbot et al., 1972).

Na primeira fase o crescimento é exponencial e o peso fresco e seco aumentam aproximadamente na mesma taxa relativa. Na segunda fase, durando poucos dias, o crescimento quer em comprimento, peso fresco ou seco, é mais lento sendo que, na terceira fase o crescimento é inicialmente tão rápido como na primeira fase, mas rapidamente declina até zero (Carr e Skene, 1960).

A primeira fase de crescimento se caracteriza por intensa divisão celular, período no qual o embrião cresce mais rapidamente que as demais estruturas da semente. Quando o embrião ocupa todo o espaço no interior do saco embrionário, inicia-se a segunda fase de crescimento (fase de crescimento lento), sendo a terceira fase, o resultado do crescimento em expansão celular (Skene, 1970).

No início da fase lenta, profundas modificações são iniciadas no metabolismo de frutos e sementes conduzindo às mudanças associadas com a maturação, tal como a queda no nível de sacarose

em sementes de ervilha e do conteúdo de água em vagens de feijão (Carr e Skene, 1960). Durante o crescimento em expansão, observa-se a maior deposição de reservas como amido e proteínas (Dure, 1975). Este período de máxima síntese de reservas que é, provavelmente, o resultado da ativação de todo um mecanismo voltado para a síntese e deposição de material de reserva, em princípio, termina antes da maturação da semente e coincide com o início do processo de desidratação, sendo provável que este processo desempenhe uma função importante na parada de eventos de síntese e talvez na ativação de processos para a subsequente mobilização de reservas (Bewley e Black, 1978).

É geralmente aceito que o ponto de máximo peso de matéria seca, corresponde ao estágio de desenvolvimento no qual as sementes exibem o máximo poder germinativo sendo, por isso, denominado ponto de maturidade fisiológica (Obendorf et al., 1980).

As mudanças, estruturais e bioquímicas, necessárias para o embrião sobreviver como uma planta independente são estabelecidas durante o desenvolvimento, enquanto o embrião está ainda imaturo. Estas modificações, no entanto, não são expressas imediatamente na forma de germinação. Em vez disto, o embrião torna-se resistente à dessecação e entra num período de dormência no qual o conteúdo de água é reduzido de cerca de 80% para 10% (Walbot et al., 1972). No entanto, tem sido demonstrado que a desidratação, não é um pré-requisito para a germinação, dado que algumas espécies de embriões e sementes destacados da planta-mãe, em diferentes estádios de desenvolvimento, são capazes de germinar (Obendorf et al., 1980; Sanklla e Chawan, 1980; Adams e Rinne, 1980; Walbot et al., 1972; Onckelen et al., 1980). Aparentemente a capacidade e a velocidade de germinação aumentam à medida que a semente avan-

ça em direção à maturidade (Adams e Rinne, 1980; Obendorf et al., 1980).

Um dos aspectos mais interessantes e menos entendido da fisiologia de sementes é a extensa reversão no metabolismo que o corre em tecidos de reserva, durante a germinação e crescimento da plântula. Células que foram locais de síntese de carboidratos, lípidios e proteínas durante a embriogênese, tornam-se os sítios de degradação e mobilização destas reservas. O mecanismo de interrupção dos processos de síntese e início dos eventos relacionados com a germinação e crescimento, são ainda desconhecidos (Bewley e Black, 1978).

A flutuação nas concentrações endógenas de hormônios de plantas durante o desenvolvimento e maturação de sementes assim como durante a germinação, é uma indicação de que estas substâncias podem estar envolvidas com a regulação destes processos (Carr e Skene, 1960; Corcoran e Phynney, 1962; Skene, 1970); Burrows e Carr, 1970; Browning, 1980).

Fisiologicamente estes hormônios podem estar relacionados com o desenvolvimento das sementes ou podem, entre outras coisas, estar sendo acumulados para a sua subsequente participação no controle da germinação e crescimento da plântula (Bewley e Black, 1978).

Um número relativamente grande de trabalhos tem sido feito na tentativa de relacionar variações nos níveis hormonais endógenos com o controle do desenvolvimento das sementes. Em sementes de feijão, a atividade giberelínica máxima foi detectada durante as fases de taxa máxima de crescimento das sementes (Carr e Skene, 1960). Correlação positiva entre atividade giberelínica e crescimento de sementes, foi observada também por outros auto-

res em Lupinus succulentus, Echinocystes macrocarpa e Phaseolus vulgaris (Corcoran e Phynney, 1962).

Um papel importante foi atribuído às citocininas no desenvolvimento de embriões de ervilha, tendo sido encontrada uma correlação entre a atividade citocinínica e o máximo volume do endosperma. Níveis altos de citocininas coincidiram com o máximo volume do endosperma e com os dois períodos de crescimento rápido do embrião (Burrows e Carr, 1970; Browning, 1980).

O ácido abscísico, cuja presença em sementes em desenvolvimento também tem sido constatada (Onckelen et al., 1980; King, 1975; Quebedeaux, 1976; Browning, 1980; Mcwha, 1975), pode, da mesma forma, estar envolvido com a regulação do desenvolvimento da semente. Segundo Browning (1980), altos níveis de ABA em sementes de ervilha estão associados com uma inibição do crescimento da semente.

De um modo geral, altos níveis de hormônios livres estão presentes nos estádios iniciais de desenvolvimento, ocorrendo uma queda gradual durante a maturação atingindo níveis muitas vezes não detectáveis em sementes maduras (Durley et al., 1971; Morris, 1977; Onckelen, 1980; Burrows e Carr, 1970). Como estes hormônios estão presentes durante o desenvolvimento e sementes adquirem a capacidade de germinar durante este período, é possível que a presença destas substâncias esteja relacionada com a aquisição do poder germinativo.

O envolvimento de hormônios na germinação de sementes tem sido defendido por vários autores. Giberelinas, citocininas e ácido abscísico são substâncias conhecidas como capazes de controlar a dormência e, portanto, seus efeitos sobre o metabolismo durante a germinação têm sido estudados (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1978).

O possível envolvimento de giberelinas no processo da germinação na natureza é sugerido pela detecção, em sementes de feijão, alface e muitas outras espécies de substâncias giberelínicas (Phynney e West, 1960). Existem algumas evidências que indicam que os níveis destas substâncias mudam durante a germinação de sementes (Dale e Fellipe, 1967). Durante a maturação de frutos e sementes, algumas giberelinas passam da forma livre para a forma conjugada e este processo pode ser revertido durante a germinação (Lang, 1970).

Promoção da germinação decorrente da aplicação de GA₃ tem sido observada por exemplo em *Arabidopsis*, *Kalanchoe* e *Sal-sola volkensu* (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975).

Citocininas são também conhecidas por estimular a germinação em várias espécies (Miller, 1958; Reynolds e Thompson, 1973; Válio, 1976). As citocininas são ativamente metabolizadas durante a germinação de sementes. Um grande número de derivados de cinetina, como a 6-benziladenina, tem efeito promotor na germinação sendo que zeatina, uma citocinina natural, atua do mesmo modo que a cinetina (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975).

Em sementes maduras, níveis relativamente altos de ABA têm sido encontrados em algumas espécies e sua ocorrência tem sido relacionada com dormência e inibição de germinação (Addicott e Lyon, 1969; Dure, 1975; Milborrow e Robinson, 1973; Rudnicki, 1969; Webb e Wareing, 1972; Wilhans et al., 1973; Quebedeaux, 1976). King (1976), trabalhando com sementes de trigo, postulou que o acúmulo de ABA durante o desenvolvimento das sementes previne a germinação precoce. Sugestão idêntica sobre o papel do ABA foi feita para sementes de feijão (Onckelen et al., 1980), algodão (Ihle e Dure, 1972), e ervilha (Eeuwens e Schwabe, 1975).

Alguns autores têm ainda sugerido a hipótese de um balanço hormonal no controle da germinação. Khan (1971), propôs um modelo no qual giberelinas teriam um papel principal na germinação enquanto que citocininas e inibidores seriam essencialmente permissivos e preventivos. Neste modelo, a interação citocininas/inibidores teria um papel no controle dos efeitos de giberelinas.

Também para sementes imaturas têm sido propostos modelos que envolvem a hipótese de um balanço hormonal no controle da germinação. A capacidade de germinação de sementes imaturas de ervilha, estaria relacionada com os níveis endógenos de ABA, giberelinas e auxinas. Ocorre uma promoção da germinação de sementes em desenvolvimento, relacionada com a diminuição nos níveis endógenos de ABA, decréscimo na razão ABA/GA₃ e no nível de auxina (Eeuwens e Schwabe, 1975).

Durante a germinação das sementes, as reservas são hidrolizadas e os produtos translocados para o eixo embrionário. Uma das formas pela qual as substâncias hormonais poderiam estar envolvidas na germinação seria regulando a síntese ou a liberação de enzimas necessárias para a mobilização de reservas.

Os estudos feitos em relação à mobilização de reservas em sementes, que não de cereais, relacionam o papel do embrião com a hidrólise das reservas atuando no consumo dessas reservas, mantendo as concentrações abaixo de um nível crítico (Yomo e Varner, 1973), ou fornecendo hormônios que regulam a atividade hidrolítica. Muitas evidências sugerem que a atividade hidrolítica está sob controle hormonal (Young et al., 1960; Scala et al., 1969; Metivier e Paulilo, 1980; Onckelen et al., 1980).

A hidrólise do amido, um dos principais componentes do material de reserva de sementes, se dá principalmente através da ação de α -amilase (Swain e Dekker, 1966).

Em cereais, particularmente em cevada, o controle hormonal da degradação das reservas é bem conhecido, onde as gibberelinas produzidas no embrião e escutelo estimulam a síntese ou liberação de enzimas na camada da aleurona, as quais vão ao endosperma e hidrolizam as reservas. Entretanto em outros cereais como em trigo, parece haver uma ação conjunta entre gibberelinas e citocininas no controle da degradação das reservas do grão (Eastwood et al., 1969).

Para dicotiledôneas o volume de trabalho sobre o controle da degradação das reservas é bem menor e bem menos detalhado do que para cereais. Entretanto, existem algumas indicações de que citocininas estariam envolvidas na hidrólise do amido (Gepstain e Ilan, 1970; Locker e Ilan, 1975; Metivier e Paulilo, 1980).

Também para o ácido abscísico ao qual se tem atribuído a prevenção da germinação precoce, foi sugerida uma inibição da atividade da α -amilase prevenindo a hidrólise prematura do amido (King, 1976; Onckelen et al., 1980).

É razoável supor que sementes que ainda não adquiriram a quantidade máxima de reservas originem plântulas menos vigorosas do que plântulas provenientes de sementes maduras, e que esta deficiência inicial tenha influência sobre a capacidade reprodutiva. Adams e Rinne (1980), observaram que sementes de soja imaturas originaram plantas cujo desenvolvimento geral mostrou-se comparável ao de plantas provenientes de sementes maduras. Além disto, o peso seco e a capacidade de germinação de sementes provenientes destas plantas, não sofreram influência do grau de maturidade da semente de origem. No entanto, faltam avaliações mais precisas sobre a influência do grau de maturidade da semente na capacidade reprodutiva de plantas que elas originam.

O objetivo deste trabalho foi o de verificar quando as sementes de Phaseolus vulgaris cultivar Goiano precoce, durante o desenvolvimento, adquirem a capacidade de germinar. Determinar a possível existência de barreiras fisiológicas para que o processo se complete, verificando o envolvimento de substâncias hormonais na aquisição do poder germinativo. Acompanhar o desenvolvimento de plantas provenientes de sementes imaturas em diferentes estádios de desenvolvimento, avaliando parâmetros indicativos da capacidade reprodutiva, na tentativa de estabelecer uma relação entre maturidade da semente e capacidade reprodutiva das plantas que elas originam.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Material biológico

Foram utilizadas sementes de Phaseolus vulgaris cultivar Goiano Precoce, cedidas pelo Instituto Agronômico de Campinas.

2. Método geral de crescimento de plantas

As plantas de Phaseolus vulgaris cresceram em vasos, com capacidade de 2 litros, com terra, em casa de vegetação ou em canteiros, em condições naturais de luz e temperatura. As flores foram marcadas no dia da ântese para conhecimento de sua idade cronológica.

3. Curvas de crescimento de frutos e sementes

A cada 3 dias, amostras de 20 vagens foram utilizadas para medidas de comprimento de vagens, comprimento de sementes, de cotilédones, peso fresco e peso seco de sementes.

O comprimento de sementes e cotilédones foi medido com auxílio de lupa.

Peso seco foi determinado após secagem das sementes por 48 horas em estufa a 80°C

4. Caracterização de classes de desenvolvimento de sementes

Para a determinação das classes de desenvolvimento foram retiradas amostras de 30 vagens em intervalos de 2 dias a partir da ântese. Nestas amostras foram observadas características como coloração de frutos e sementes, comprimento, estado de hidratação e presença de pigmentação nas sementes. Estes caracteres foram utilizados para agrupar as sementes em estádios de desenvolvimento fisiológico sucessivos desde a sua formação até a maturação.

4.1. Determinação da pigmentação

A pigmentação observada no halo das sementes (região ao redor do hilo) foi identificada pelo método de alteração de pH (Johansen, 1940).

4.2. Determinação do teor de umidade

O teor de umidade das sementes em cada estágio de desenvolvimento, foi determinado após a secagem das sementes em estufa a 80 °C por 48 horas. Foram usadas amostras de 30 sementes em cada estágio de desenvolvimento e as porcentagens de água determinadas em relação ao peso fresco.

5. Método de dessecação de sementes

Sementes imaturas foram colocadas para secar até que a -

tingissem o teor de umidade que se observou em sementes maduras (classe 9). Para isso, sementes recém-colhidas nos estádios de desenvolvimento correspondentes às classes de 1 a 8, foram colocadas para secar em dessecador com solução de ácido sulfúrico de densidade 1.57, que estabelece atmosfera ambiente de 10% de umidade relativa a 20°C (Bacci e Franco, 1959). As sementes permaneceram no dessecador de 48 a 72 horas para que atingissem o teor de umidade da classe considerada padrão. O peso médio a ser atingido por sementes de cada classe, correspondente ao teor de umidade da classe padrão, foi calculado de acordo com o método a seguir:

Determinação do teor de umidade de sementes na classe 9

$$Pf_p = 362,84$$

$$Psp = 299,60$$

$$Pap = 63,24$$

$$\frac{Pf_p - Psp}{Pf_p} \times 100 = 17,4\%$$

Determinação do peso a ser atingido pelas sementes de cada classe para se obter 17,4% de umidade

$$\frac{Psp}{Pap} = \frac{Psn}{Pa'n}$$

$$Pa'n = \frac{Psn \times Pap}{Psp}$$

$$\Delta P = Pa_n - Pa'n$$

$$P_n = Pf_n - P$$

onde:

- Pf - Peso fresco da semente
 Ps - Peso seco da semente
 p - classe padrão
 n - nº da classe
 Pa - Peso da água da semente
 Pa' - peso da água que deve ser mantida na semente para se obter 17,4% de U.R.
 ΔP - Peso da água que deve ser evaporada
 P - Peso da semente com 17,4% de U.R.

6. Método geral de germinação

As sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, com duas folhas de papel de filtro umedecidas com 4 ml de água destilada, ou com a solução a ser testada. As sementes foram mantidas em câmaras de crescimento a 25°C e luz contínua proveniente de lâmpadas fluorescentes (320 μW.cm²). Foram utilizadas 4 repetições de 20 sementes em cada tratamento. A contagem de sementes germinadas foi feita diariamente, considerando-se como germinação a protrusão da radícula.

7. Cálculo do tempo médio de germinação

A estimativa da velocidade de germinação de sementes foi feita através do cálculo do tempo médio de germinação (Labouriau, 1967), de acordo com a seguinte expressão:

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

onde:

t_1 = tempo de germinação

t_g = tempo máximo de germinação

t_0 = tempo mínimo de germinação

P_i = porcentagem de germinação no tempo t_i

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

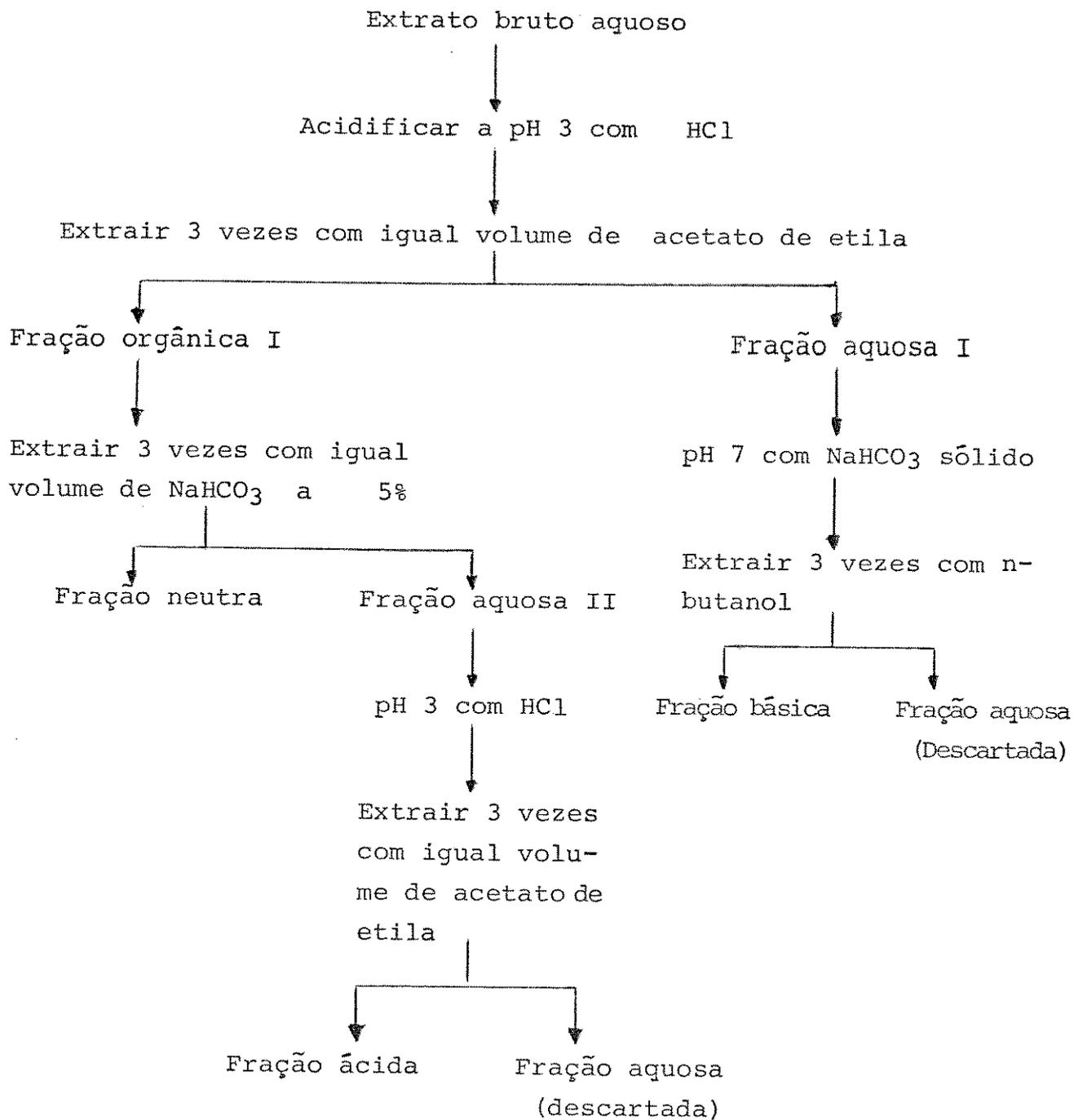
8. Análise de substâncias de crescimento

8.1. Extração e fracionamento

Para extração e fracionamento do extrato, utilizou-se o método descrito por Usberti (1979). Cinco gramas de sementes (peço fresco) recém-colhidas ou submetidas a dessecação artificial, foram trituradas em homogeneizador "Virtis 45" com 50 ml de metanol 80%. O extrato assim obtido foi mantido em refrigerador por 24 horas. Em seguida foi filtrado e ao resíduo foram acrescentados 50 ml de metanol 80%, voltando ao refrigerador por 24 horas. Após este período, o resíduo foi novamente filtrado e este juntado ao filtrado anterior. Após a remoção do metanol por evaporação, em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura de 36°C, procedeu-se ao fracionamento do extrato aquoso bruto, para a obtenção das frações ácida, básica e neutra, de acordo com o esquema 1.

8.2. Extração de ácido abscísico

Esquema 1 - Extração e fracionamento de substâncias promotoras e inibidoras



O método de extração utilizado para o ácido abscísico seguiu o citado por Kefeli (1978). Dez gramas de sementes (peso fresco) recém colhidas ou secas artificialmente, foram maceradas em homogeneizador "Virtis 45" com 100 ml de metanol 80%. O método utilizado para a obtenção do extrato bruto aquoso seguiu o citado no item 8.1. Após a obtenção este extrato procedeu-se ao fracionamento de acordo com o esquema 2.

8.3. Cromatografia de camada delgada

As frações ácidas, básicas e neutras obtidas pelo método descrito no esquema 1, foram cromatografadas sobre placas de vidro de 20x20 cm, com uma camada de 0,5 mm de suspensão de silicagel G e água na proporção de 1:2 (g de sílica/ml de água destilada), com ativação por 1 hora à 100 C. Os cromatogramas foram desenvolvidos, num percurso de 15 cm, com isopropanol-amônia-água 10:1:1 v/v/v, que foi o sistema de solventes utilizado.

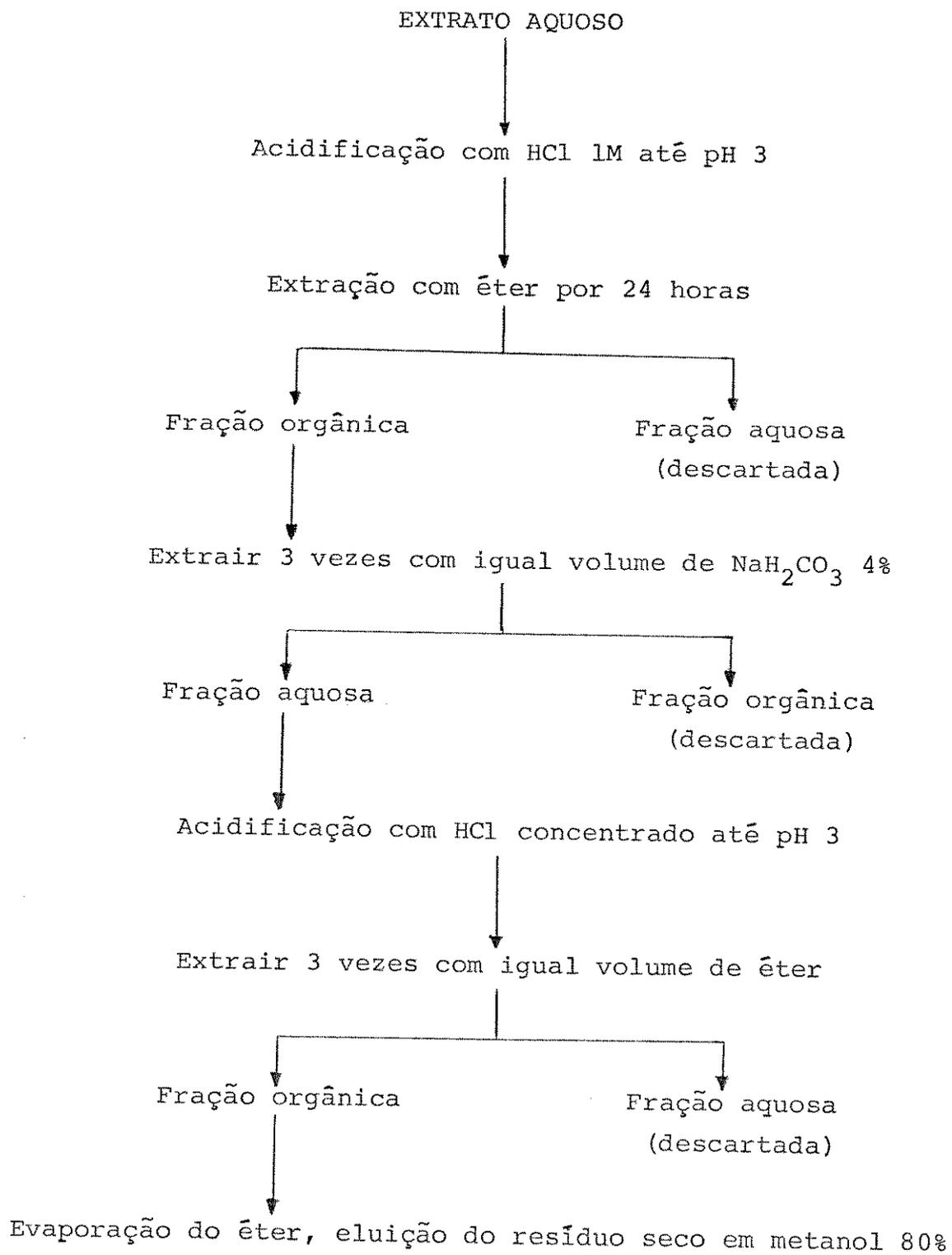
8.4. Cromatografia em papel

A fração em metanol 80% (vide esquema 2) do extrato feito para detectar ácido abscísico foi cromatografada em papel de cromatografia Wattman 3 MM. Os cromatogramas foram desenvolvidos em cubas de vidro. A cromatografia foi descendente num percurso de 15 cm. O solvente usado foi isopropanol-amônia-água na proporção de 10:1:1 v/v/v.

8.5. Biotestes

Para a execução dos biotestes os cromatogramas foram di-

Esquema 2 - Extração e fracionamento de ABA



vididos em 10 faixas transversais, correspondentes a 10 faixas de Rf, entre o ponto de aplicação e a frente. Estas faixas foram divididas em quatro partes correspondentes a quatro repetições para cada faixa entre Rfs. No caso de cromatografia de camada delgada, de cada uma das repetições foi removida a sílica e colocada ao acaso em cubetas de forma de plástico para gelo. Em cada cubeta foram colocadas duas folhas de papel de filtro umedecidas com 1,5 ml de água destilada. Como controle utilizou-se quantidade de sílica correspondente à usada nos tratamentos provenientes de placas percorridas só pelo solvente.

No caso de cromatografia em papel, cada uma das repetições foi recortada e distribuída de forma homogênea em placas de Petri de 5 cm de diâmetro cobertas posteriormente com uma folha de papel de filtro umedecida com 2 ml de água destilada. Como controle utilizou-se papel recortado proveniente de cromatograma percorrido só pelo solvente.

8.5.1. Alongamento do hipocótilo de alface

Este bioteste foi realizado de acordo com a descrição de Frankland e Wareing (1960), para detecção de substâncias gibberelínicas. Foram utilizadas sementes de alface da cultivar "Grand Rapids", postas para germinar em placas de Petri a 25 °C por 24 horas, sob luz contínua. Após este período, foram selecionadas as plântulas pela homogeneidade do comprimento da radícula e colocadas em grupos de 4 em cubetas de gelo.

Como padrão foram usadas soluções de GA₃ nas concentrações de 10⁻⁵M, 10⁻⁶M e 10⁻⁷M. As formas de gelo foram colocadas em bandejas com água, tampadas herméticamente com vidro transparente. Este sistema foi mantido em câmaras de crescimento a 25°C

e luz contínua por 72 horas. Após este período, foram medidos os hipocótilos das plântulas. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

8.5.2. Aumento do peso fresco de cotilédones de rabanete

As frações básicas foram biotestadas segundo o método de Letham (1968), para detecção de substâncias citocinínicas. Sementes de rabanete cv. Redondo Escarlata Precoce (IAC 3271), foram colocadas para germinar em escuro a 25 C durante 30 horas. Após este período foi retirado o cotilédone interno de cada plântula. Os cotilédones mais uniformes foram transferidos para as cubetas das formas de gelo, sendo 3 cotilédones por cubeta. As formas de gelo foram colocadas em bandejas com água, tampadas com vidro transparente e matidas em câmaras de crescimento a 25 C e luz contínua por 72 horas.

Como padrão utilizou-se 6BA nas concentrações de 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

8.5.3. Germinação de sementes de alface

O extrato obtido para a detecção e quantificação de ácido abscísico foi biotestado pelo bioteste da inibição da germinação de sementes de alface (Webb e Wareing, 1972).

Sementes da cultivar "Grand Rapids" foram colocadas para germinar em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo o papel de cromatograma correspondente a 1 repetição de cada faixa entre Rfs, com uma folha de papel de filtro umedecida com 2 ml de água destilada. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes. As placas foram colocadas em bandejas com água, tampadas com vidro transpa-

rente e transferidas para câmaras de germinação a 25 C e luz contínua, por 24 horas. Após este período foi contado o número de sementes germinadas.

Como padrão utilizou-se ABA nas concentrações de 0, 2,5. 10^6 , 5.10^6 , $7,5.10^6$ e 10^5 M. Os resultados foram expressos em equivalentes de ABA ($\mu\text{g}/\text{ml}^1 \cdot \text{semente}^{-1}$).

8.6. Determinação química de citocininas

Para detecção química de citocininas nas frações básicas, usou-se o reagente de Wood que desenvolve cor azul em presença de substâncias purínicas (Wood, 1955).

A técnica usada foi nebulizar com o reagente de Wood um cromatograma correspondente, tanto no tamanho da faixa de aplicação como no volume de extrato aplicado e no sistema de solventes usado, a uma repetição de cada faixa entre Rfs utilizada no bioteste. Somente as faixas com reação positiva (cor azul) foram biotestadas.

8.7. Determinação de ácido abscísico através da fluorescência em luz ultra-violeta

Os cromatogramas obtidos de acordo com o Ítem 8.4., foram observados sob luz ultra-violeta. Nesta condição, ABA apresenta fluorescência (Kefeli, 1978). Somente a faixa de cromatograma que apresentou fluorescência foi biotestada ou submetida a análise espectrofotométrica.

8.8. Determinação do ácido abscísico por espectroscopia

Para a quantificação de ABA por espectroscopia (Kefeli, 1978), dos cromatogramas obtidos de acordo com o ítem 8.4., as faixas que apresentaram fluorescência foram divididas em 4 partes correspondentes a 4 repetições. Três repetições de cada faixa foram eluídas em solução metanólica de ácido acético a 1% durante 24 horas em refrigerador a 5 C.

A absorbância das soluções foi lida em espectrofotômetro "Varian" a 230 nm, comprimento de onda no qual se observou o pico de absorbância da solução padrão de ABA. Os valores obtidos foram comparados com uma curva padrão de ABA nas concentrações de 0, 10^{-6} , 2.10^{-6} , 4.10^{-6} , 6.10^{-6} , 8.10^{-6} e 10^{-5} M de ABA. Os resultados foram expressos em equivalentes de ABA ($\text{ug/ml}^{-1} \cdot \text{semente}^{-1}$).

9. Efeito de reguladores de crescimento

9.1. Efeito de GA_3

Sementes recém-colhidas ou submetidas à dessecação artificial nos estádios de desenvolvimento correspondentes às classes 3,4 e 5, foram colocadas para germinar na presença de soluções de GA_3 nas concentrações de 10^{-4} , 3.10^{-4} e 6.10^{-4} M, de acordo com o método geral de germinação.

9.2. Efeito de 6BA

Sementes recém-colhidas ou secas artificialmente nos es-

tádios de desenvolvimento correspondentes às classes 3,4 e 5 foram colocadas para germinar de acordo com o método geral de germinação, na presença de soluções de 6BA nas concentrações de $10^{-3}M$ e $10^{-4}M$.

9.3. Efeito de ABA

Sementes recém-colhidas ou secas artificialmente nos estádios de desenvolvimento correspondentes às classes 5 e 6, foram colocadas para germinar, de acordo com o método geral de germinação, na presença de soluções de ABA nas concentrações de 10^{-4} , 3.10^{-4} e $6.10^{-4}M$.

10. Atividade amilolítica durante a embebição

A determinação da atividade amilolítica foi feita medindo-se o aparecimento de maltose em função do tempo de embebição, segundo o método de Bernfeld (1955). Sementes recém-colhidas nos estádios de desenvolvimento correspondentes às classes 3,4,5 e 9 depois de divididas em grupos de 5 sementes e obtidas as medidas de peso fresco, foram colocadas para embeber em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, com duas folhas de papel de filtro umedecidas com 4 ml de água destilada, em câmaras de germinação a $25^{\circ}C$ e luz contínua. A intervalos de tempo previamente determinados, amostras de 5 sementes foram maceradas em solução tampão fosfato de potássio a 0.02M de pH 5.5 (2 ml de tampão/semente), a temperatura ambiente.

O extrato obtido foi centrifugado por 10 minutos a 2500

g e 0,5 ml do sobrenadante foi incubado em tubo de ensaio con - tendo 1 ml de amido (9g de fécula de mandioca e amido de milho - ARROZINA da IDISA - em 100 ml de tampão fosfato de potássio de pH 5,5) à temperatura de 30 C, em banho-maria por 20 minutos. A reação foi terminada com 2 ml de solução de ácido 3,5- dini trossalicílico (1 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em 20 ml de NaOH 2M; 30 g de tartarato de potássio e sódio em 50 ml de água destilada). Após o término da reação, os tubos de ensaio foram aquecidos a temperatura de 100 C, em banho-maria por 10 minutos.

A absorbância da solução depois de diluída em água destilada (0,4 ml de solução em 9,6 ml de água destilada) foi lida em espectrofotômetro "Varian" a 490 nm, e os valores comparados com os de uma curva padrão de maltose em concentrações de 0 a 4,5 $\mu\text{g/ml}$.

11. Efeito de 6BA sobre a atividade amilolítica

Sementes recém-colhidas nos estádios de desenvolvimento correspondentes às classes 3 e 4 foram colocadas para germinar, segundo o método geral de germinação, na presença de solução de 6BA (10^{-3} , 10^{-4} M). Uma amostra de 5 sementes foi retirada a intervalos de tempo pré-determinados durante a embebição, sendo medida a atividade amilolítica de acordo com o método descrito anteriormente (item 10).

12. Efeito da maturidade da semente na capacidade reprodutiva das plantas

Sementes nos estádios de desenvolvimento correspondentes às classes 5,6,7,8 e 9, após a germinação, foram colocadas em vasos (2 sementes/vaso) com terra, em casa de vegetação, em condições naturais de luz e temperatura. Foram usadas 20 plantas oriundas de sementes em cada estágio de desenvolvimento. Nestas plantas foram avaliados parâmetros como: nº de dias para a floração, nº de flores por planta, nº de vagens maduras por planta, nº de sementes/vagem, nº total de sementes por planta e peso fresco médio de sementes produzidas por plantas provenientes de sementes imaturas em cada estágio de desenvolvimento.

13. Análise estatística

Nos biotestes para detecção de substâncias endógenas, o delineamento estatístico usado foi o teste F, para analisar as diferenças entre cada faixa entre Rfs de cada cromatograma. Na dosagem de ABA por espectroscopia, bioteste de germinação de sementes de alface e germinação de sementes nos diferentes estádios de desenvolvimento, utilizou-se uma análise de variância factorial.

Quando se analisaram, por análise de variância, experimentos com mais de um tratamento, em seguida ao teste de F calculou-se a DMS (diferença mínima significativa) a 5% pelo teste de Tukey (Snedecor, 1962), sendo representada por barras verticais

Os dados de germinação foram transformados em valor angular = $\arcsin \sqrt{p}$, onde p corresponde a proporção de sementes germinadas, e esses valores foram utilizados para a análise esta

tística subsequente.

Para melhor interpretação dos resultados obtidos com relação à capacidade reprodutiva de plantas provenientes de sementes em diferentes estádios de desenvolvimento, foi feita a análise de variância considerando-se a curva de regressão linear ajustada de acordo com Gomes (1960), nos sub-ítem nº de flores e nº de vagens/planta

III. RESULTADOS

1. Caracterização dos estádios de desenvolvimento de sementes

Para se estudar o comportamento de sementes imaturas com relação à capacidade de germinação, foi necessário agrupar as sementes em classes de desenvolvimento, de acordo com índices de idade fisiológica, que caracterizassem o maior número possível de fases pelas quais passam as sementes durante o desenvolvimento.

Foram distinguidas nove classes, ou nove diferentes estádios de desenvolvimento, sendo que as primeiras quatro foram caracterizadas principalmente pelo comprimento das sementes e as posteriores por outras características morfológicas (tabela 1).

O pigmento presente no halo das sementes, a partir da classe 6, foi identificado como antocianina.

As sementes nas quatro primeiras classes de desenvolvimento apresentam os mais altos teores de umidade sendo observado aparentemente, a partir destas, uma redução gradativa até a classe 7. Nas classes 8 e 9, que correspondem à fase final de desenvolvimento, o teor de umidade das sementes é reduzido drasticamente atingindo 17,4% em sementes maduras na classe 9 (tabela 2).

2. Curvas de crescimento de frutos e sementes

Foram elaboradas as curvas de crescimento de sementes e frutos, nas quais pode-se relacionar os diferentes estádios de desenvolvimento com as fases de crescimento pelas quais passam as sementes, até atingir a maturidade.

TABELA 1 - Caracterização das classes de desenvolvimento de sementes de Phaseolus vulgaris

CLASSES	COMPRIMENTO DE SEMENTES (mm)	VAGENS	SEMENTES
1	0 — 3	verdes e frescas	verdes e frescas, brilhantes
2	3 — 6	verdes e frescas	verdes e frescas, brilhantes
3	6 — 9	verdes e frescas	verdes e frescas, brilhantes
4	9 — 13	verde-pálidas (esbranquiçadas)	verde-pálidas, brilhantes Coloração verde acentuada assemelhando-se a listras
5	13 — 16	verde-pálidas notando-se saliências provocadas pelas sementes.	Mais esbranquiçadas, sem brilho, coloração homogênea verde-pálida.
6	13 — 16	verde-pálidas, algumas ligeiramente amareladas.	A maioria totalmente esbranquiçada, lisas, sem brilho. Halo com pigmentação (antocianina) roxa clara
7	12 — 16	A maioria completamente amarelada. Início de dessecação	Branças com início de amarelecimento, lisas, brilhantes, início de dessecação. Halo com pigmentação (antocianina) roxa escura
8	10 — 13	Secas, quebradiças, amareladas.	Amareladas, dessecação evidente, mais lisas, Halo com pigmentação amarela e antocianina adjacente.
9	9 — 12	Amarelas, secas e quebradiças	Amareladas, lisas, secas, brilhantes, Halo com pigmentação amarela mais forte e antocianina adjacente acinzentada.

TABELA 2 - Peso e teor de umidade das sementes de Phaseolus vulgaris
cv. Goiano Precoce

CLASSES	PESO FRESCO (mg)	I.C.	PESO SECO (mg)	I.C.	TEOR DE UMIDADE (%)
1	1,24	0,80	0,27	0,12	78
2	8,12	3,26	1,13	0,51	86
3	91,40	17,8	15,49	4,80	83
4	240,30	12,70	62,32	10,0	74
5	576,00	21,3	186,30	14,3	68
6	685,50	39,0	280,30	28,1	59
7	712,54	38,2	328,45	26,2	53,9
8	438,54	41,4	330,96	24,6	24,5
9	362,84	24,7	299,60	17,9	17,4

I.C. - Intervalo de confiança

A curva de crescimento em comprimento de vagens é sigmóide. O comprimento aumenta exponencialmente do dia 4 até o dia 14, atingindo seu máximo ao redor de 15 dias após a ântese. A partir daí, o comprimento permanece constante até o final do processo de desenvolvimento (figura 1).

Na figura 2 observa-se que o crescimento de sementes e cotilédones, em comprimento, apresenta um padrão nitidamente diauxico, com duas fases de crescimento rápido separadas por uma fase de crescimento lento. No início da primeira fase, o crescimento de cotilédones é mais rápido que o da semente como um todo, ocupando, a partir do 18º dia, todo o espaço no interior da testa. As sementes nos estádios de desenvolvimento correspondentes às classes 1, 2, 3 e 4 se encontram nesta 1ª fase de crescimento.

Na segunda fase, entre 24 e 27 dias, observa-se uma queda na taxa de crescimento de sementes e cotilédones que corresponde à fase lenta de crescimento. Na terceira fase, que se inicia 27 dias após a ântese, o crescimento é rápido, sendo que sementes e cotilédones atingem com 30 dias seu máximo comprimento. Sementes no estádio de desenvolvimento correspondente à classe 5 se encontram nestas fases de crescimento.

A partir daí, observa-se uma redução no comprimento que corresponde ao período de desidratação das sementes. Esta redução no comprimento é lenta no início (classe 6) e mais intensa, a partir do dia 36 (classe 7). Sementes nos estádios de desenvolvimento a partir da classe 6 já atingiram, portanto, seu máximo comprimento.

Na figura 3 observa-se que as mudanças em peso fresco das sementes durante o seu desenvolvimento, exibem o mesmo mode

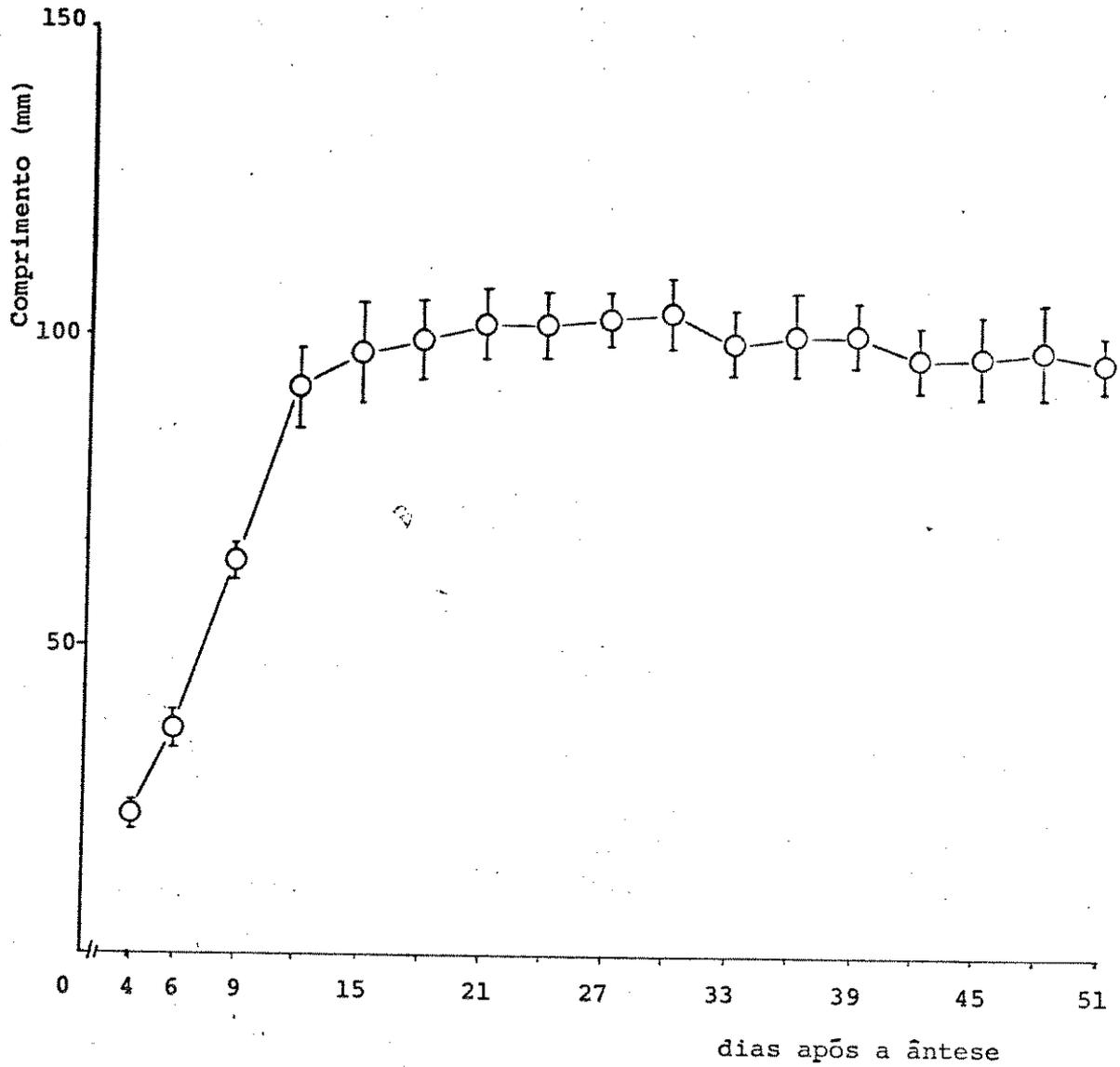


Figura 1 - Crescimento de vagens de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce em comprimento
Barras verticais representam o intervalo de confiança da média

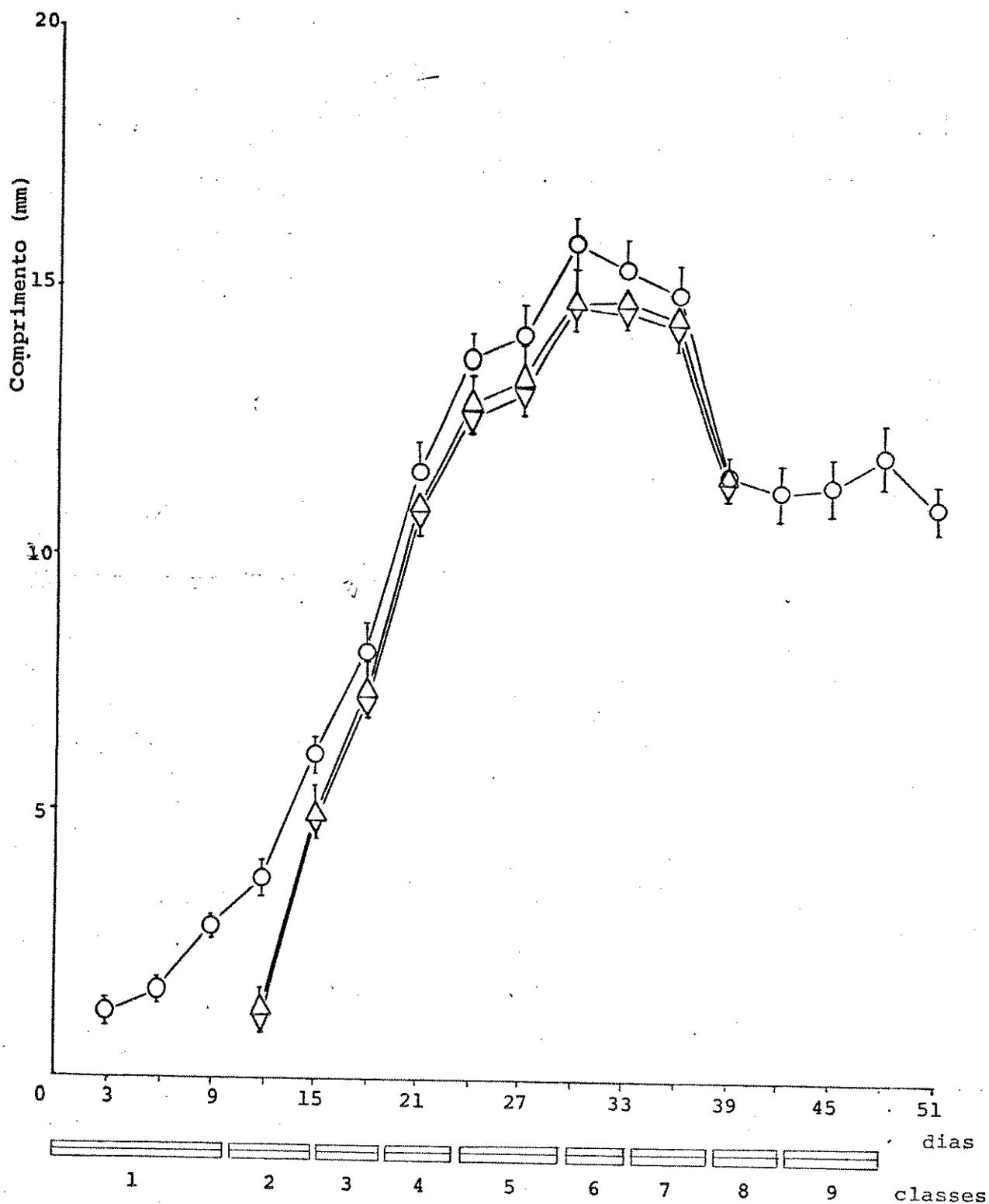


Figura 2 - Crescimento de sementes e cotilédones de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce em comprimento

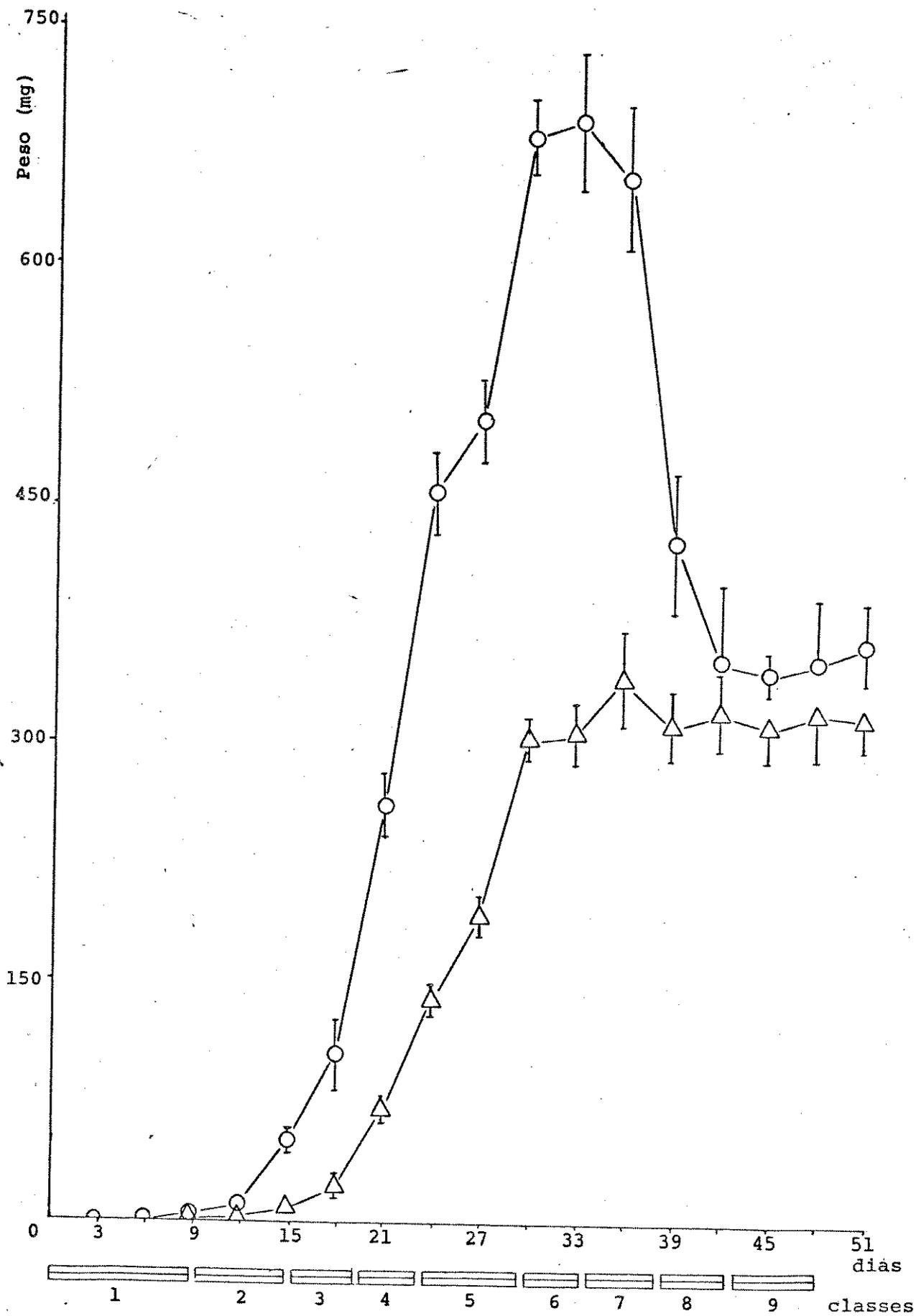
○ sementes △ cotilédone maior ▽ cotilédone menor

Barras verticais representam o intervalo de confiança das médias de comprimento da semente e do cotilédone maior

Figura 3 - Curvas de crescimento de sementes de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce em peso

○ peso fresco △ peso seco

Barras verticais representam o intervalo de
confiança da média



lo diáuxico observado para o crescimento em comprimento. Este padrão não se repete na curva de crescimento em peso seco, onde o padrão de crescimento é sigmóide.

Os máximos pesos fresco e seco são atingidos com 30 dias após a ântese, significando que somente a partir da classe 6 as sementes atingem seu máximo peso seco. A partir daí, as sementes entram num processo de desidratação gradativo que se completa no final do processo de desenvolvimento ao redor de 40 dias. Sementes aí, se encontram no estágio de desenvolvimento correspondente à classe 9.

3. Germinação de sementes recém-colhidas ou secas artificialmente nos diferentes estádios de desenvolvimento

A tabela 3 mostra que sementes recém-colhidas ou submetidas à dessecação artificial, não germinam nas três primeiras classes de desenvolvimento. Sementes recém-colhidas começam a germinar a partir da classe 5, sendo que o poder germinativo, nesta classe, é estatisticamente inferior ao de sementes maduras. Aparentemente, a capacidade de germinação de sementes recém-colhidas aumenta à medida que a semente avança em direção à maturidade.

Sementes secas começam a germinar, embora com capacidade de germinação bastante reduzida, a partir da classe 4. A partir da classe 5 e até o final do processo de desenvolvimento, a capacidade de germinação destas sementes é máxima (tabela 3)

Comparando-se a capacidade de germinação entre sementes recém-colhidas e secas artificialmente, pode-se observar que sementes secas tem capacidade de germinação estatisticamente supe-

Tabela 3 - Porcentagem de germinação de sementes de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce

Classes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sementes recém-colhidas	0 ^d	0 ^d	0 ^d	1,3 ^d	71,3 ^b	81,3 ^b	85 ^{ab}	93,8 ^{ab}	100 ^a
Sementes secas	0 ^d	0 ^d	0 ^d	16,3 ^c	99 ^a	99 ^a	99 ^a	99 ^a	100 ^a

Valores acompanhados pela mesma letra não são significativos pelo teste de Tukey com $p \leq 5\%$.

rior à de sementes recém-colhidas nas classes 4 e 5, atingindo, já na classe 5, a capacidade máxima de germinação (tabela 3).

Na figura 4 pode-se observar que sementes imaturas secas artificialmente germinam mais rapidamente do que sementes imaturas recém-colhidas, embora a porcentagem final de germinação atingida seja diferente apenas até a classe 5.

A determinação do tempo médio de germinação mostra que a velocidade de germinação de sementes imaturas secas é maior, que a de sementes recém-colhidas, em todos os estádios de desenvolvimento. Em sementes recém-colhidas, observam-se 3 faixas de tempo médio de germinação. Sementes nas classes 4 e 5, germinam mais lentamente. A velocidade de germinação aumenta sensivelmente em sementes nas classes 6, 7 e 8, observando-se ainda um ligeiro aumento em sementes na classe 9. Em sementes secas, a germinação é inicialmente lenta na classe 4, aumentando drasticamente e permanecendo constante nas demais classes (tabela 4).

4. Análise de substâncias endógenas em sementes recém-colhidas ou secas artificialmente, em diferentes estádios de desenvolvimento

4.1. Substâncias promotoras e inibidoras detectadas na fração ácida

Foram analisadas sementes nos estádios de desenvolvimento onde se supôs um possível envolvimento de reguladores de crescimento no controle da germinação e nos quais foram observadas diferenças com relação a capacidade e/ou velocidade de germinação das sementes.

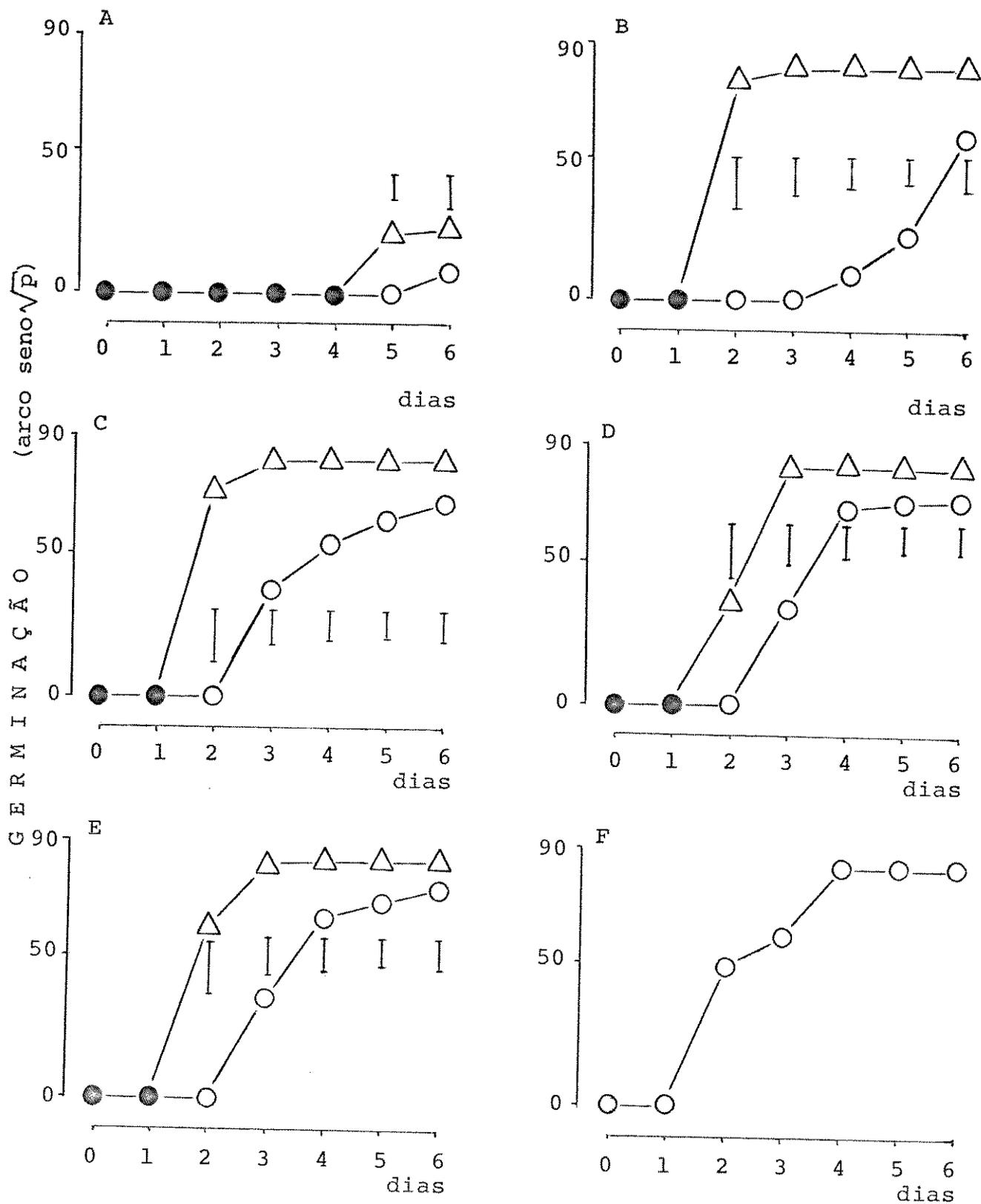


Figura 4 - Germinação de sementes imaturas de *Phaseolus vulgaris* cv. Goiano Precoce

A - classe 4 C - classe 6 E - classe 8
 B - classe 5 D - classe 7 F - classe 9

○ - sementes recém-colhidas △ - sementes secas artificialmente
 ● - valores coincidentes

Barras verticais representam a DMS Tukey $p \leq 5\%$

Tabela 4 - Tempo médio de germinação de sementes de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce nos diferentes estádios de desenvolvimento

Classes	4	5	6	7	8	9
Sementes recém-colhidas	3,0	2,7	1,7	1,6	1,6	1,0
Sementes secas	2,3	0,9	0,9	1,1	0,9	1,0

Nas figuras 5,6,7,8 e 9, são mostrados os resultados do bioteste do hipocótilo de alface para as frações ácidas de sementes recém-colhidas imaturas, nas classes de desenvolvimento, 3,4,5,6 e 7 respectivamente, assim como as correspondentes curvas padrão.

Na classe 3 observam-se duas regiões onde foi detectada atividade giberelínica estatisticamente significativa. Uma na faixa entre os Rfs 0,2 e 0,3 e outra na faixa entre os Rfs 0,4 e 0,7 (figura 5). Na classe 4 detectou-se uma única faixa de atividade giberelínica entre os Rfs 0,4 e 0,6. Observa-se uma inibição do crescimento do hipocótilo de alface, estatisticamente significativa, na faixa entre os Rfs 0,7 e 0,8 (figura 6). Na classe 5, observa-se igualmente apenas uma região com atividade giberelínica estatisticamente significativa, localizada na faixa entre os Rfs 0,4 e 0,7 (figura 7). Na classe 6, não se observa promoção do alongamento do hipocótilo de alface significativa, sendo notadas duas regiões com atividade inibidora, localizadas respectivamente nas faixas entre os Rfs 0,1 e 0,5 e Rfs 0,6 e 0,7 (figura 8). Finalmente na classe 7, são detectadas duas regiões com atividade estatisticamente significativa. Uma com atividade inibidora na faixa entre os Rfs 0,2 e 0,5 e outra com atividade giberelínica na faixa entre os Rfs 0,6 e 0,8 (figura 9).

Os resultados dos biotestes das frações ácidas com extratos provenientes de sementes secas artificialmente nas classes 3,4 e 5 assim como as correspondentes curvas padrão, estão apresentadas nas figuras 10,11 e 12 respectivamente.

Na classe 3 observa-se uma região com atividade giberelínica, estatisticamente significativa, na faixa entre os Rfs 0,4 e 0,6 (figura 10). Na classe 4 nota-se que a atividade gi-

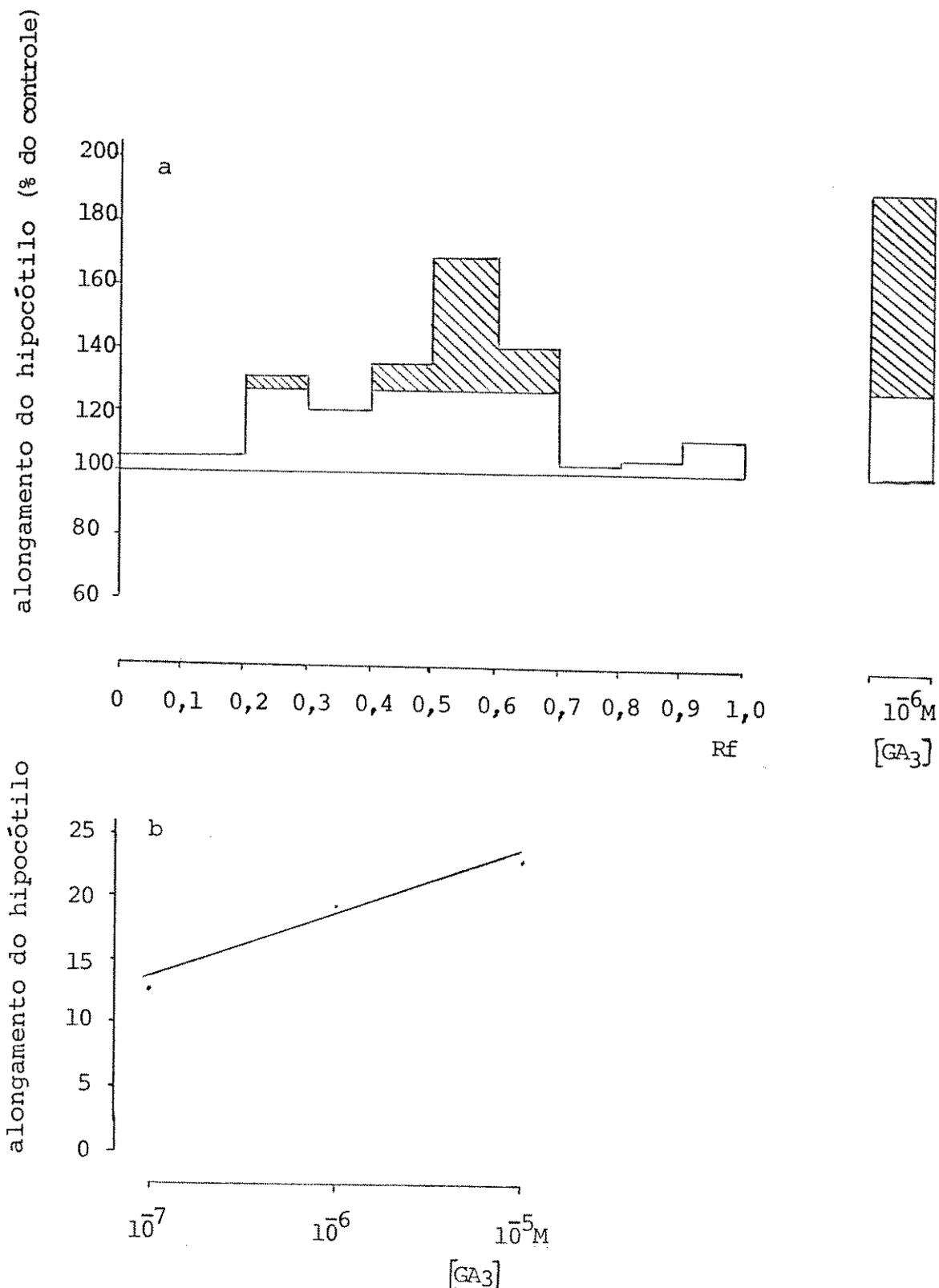


Figura 5 - a-Substâncias de crescimento detectadas na fração ácida de extrato de sementes recém-colhidas de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce na classe 3
 b - Curva padrão obtida com diferentes concentrações de GA_3

Bioteste do hipocótilo de alface
 Áreas hachuradas indicam diferenças significativas ao nível de 5%

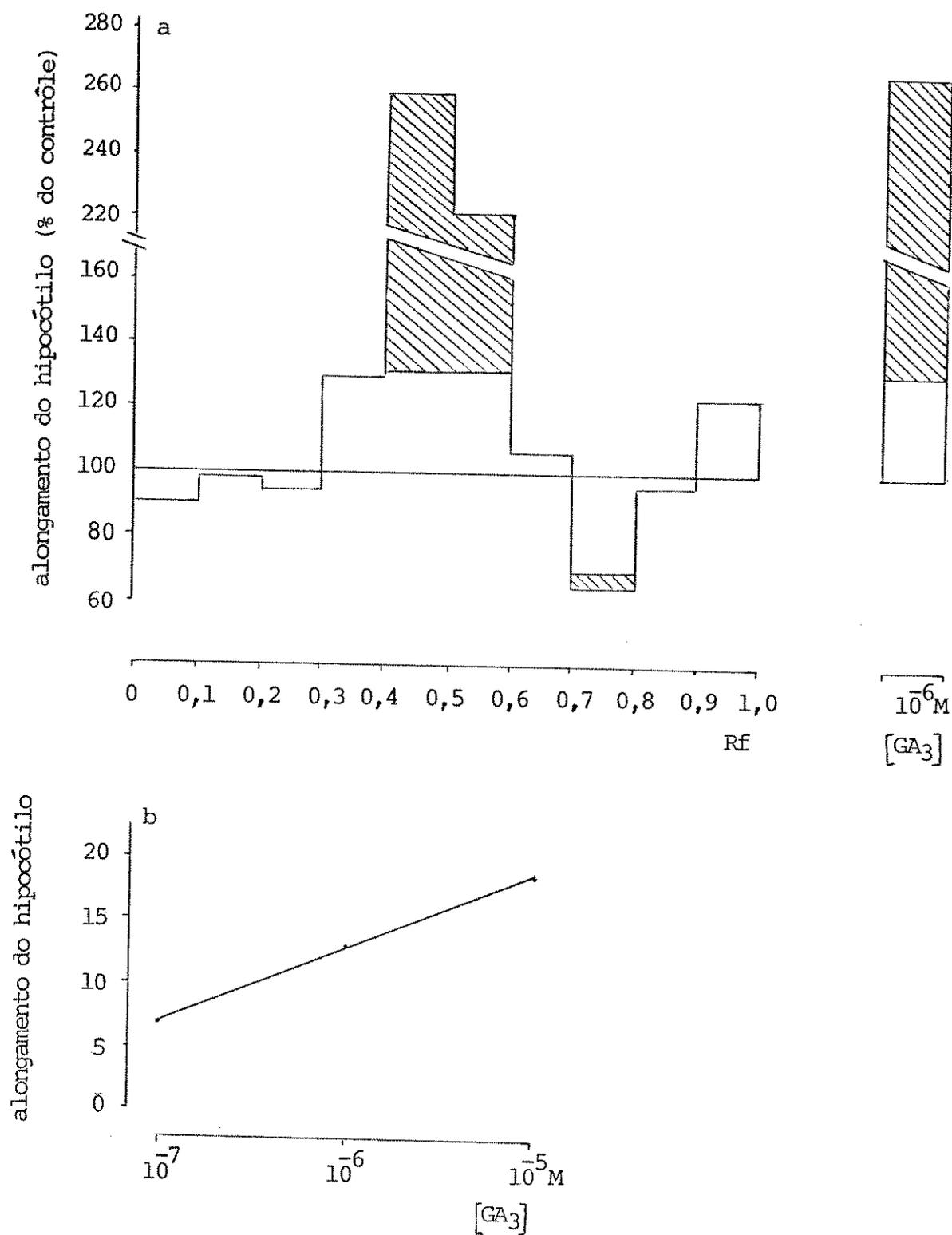


Figura 6. a - Substâncias de crescimento detectadas na fração ácida de extrato de sementes recém-colhidas de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce na classe 4
 b - Curva padrão obtida com diferentes concentrações de GA_3

Bioteste do hipocótilo de alface

Áreas hachuradas indicam diferenças significativas a 5%

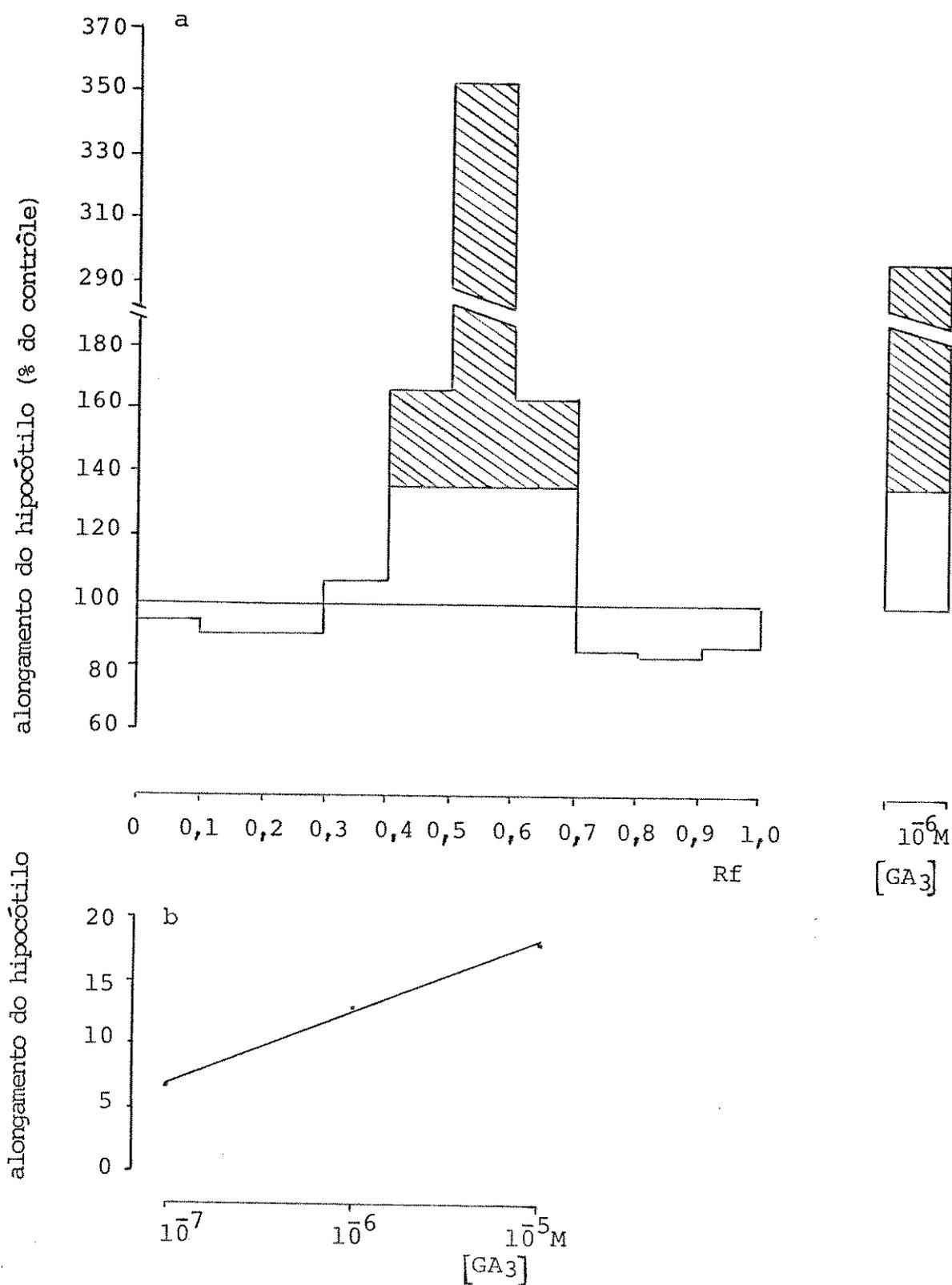


Figura 7. a - Substâncias de crescimento detectadas na fração ácida de extrato de sementes recém-colhidas de *Phaseolus vulgaris* cv. Goiano Precoce na classe 5
 b - Curva padrão com diferentes concentrações de GA₃
 Bioteste do hipocótilo de alface
 Áreas hachuradas indicam diferenças significativas a 5%

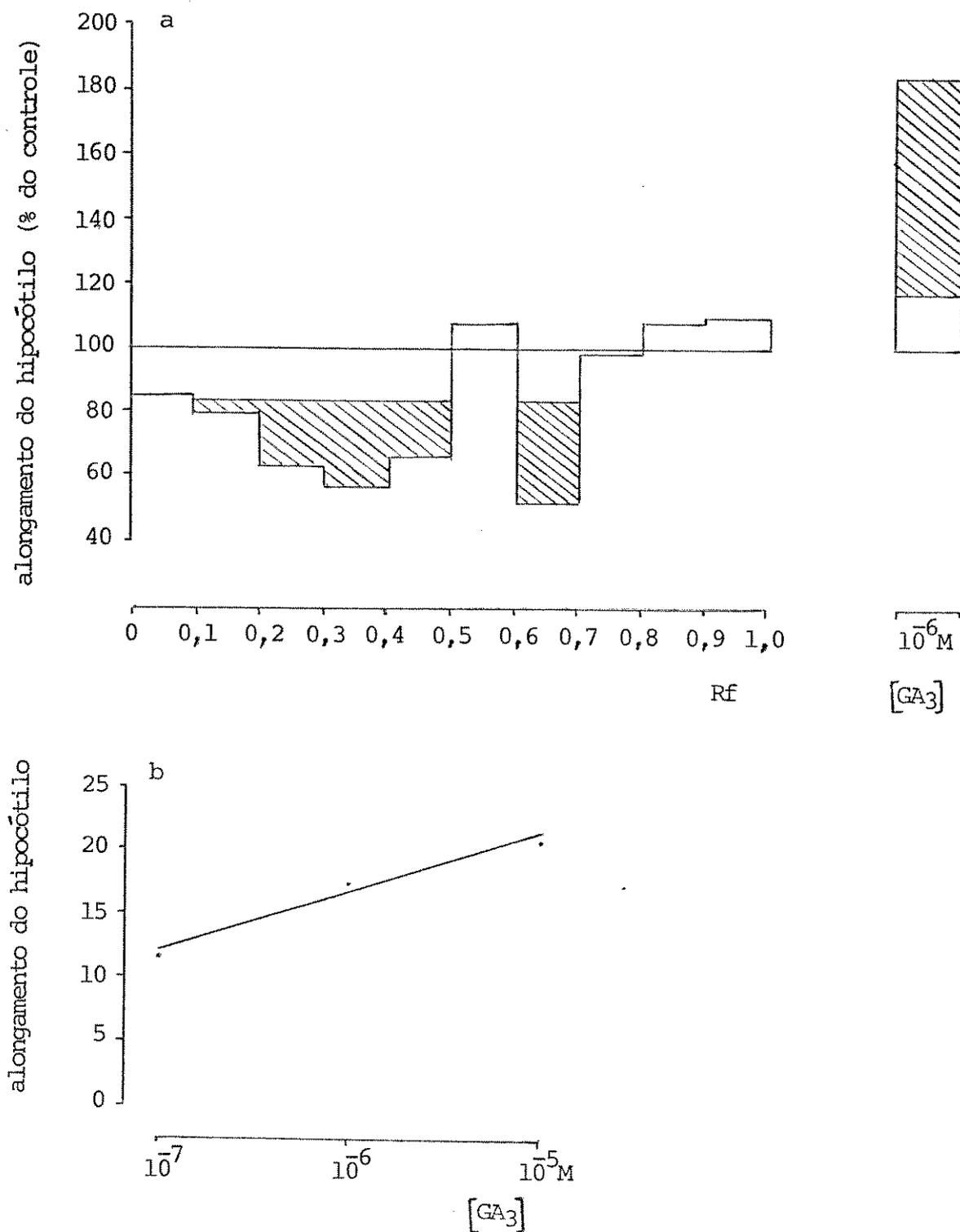


Figura 8. a - Substâncias de crescimento detectadas na fração ácida de extrato de sementes recém-colhidas de *Phaseolus vulgaris* cv. Goiano Precoce na classe 6

b - Curva Padrão com diferentes concentrações de GA₃ Bioteste do hipocótilo de alface

Áreas hachuradas indicam diferenças significativas a 5%

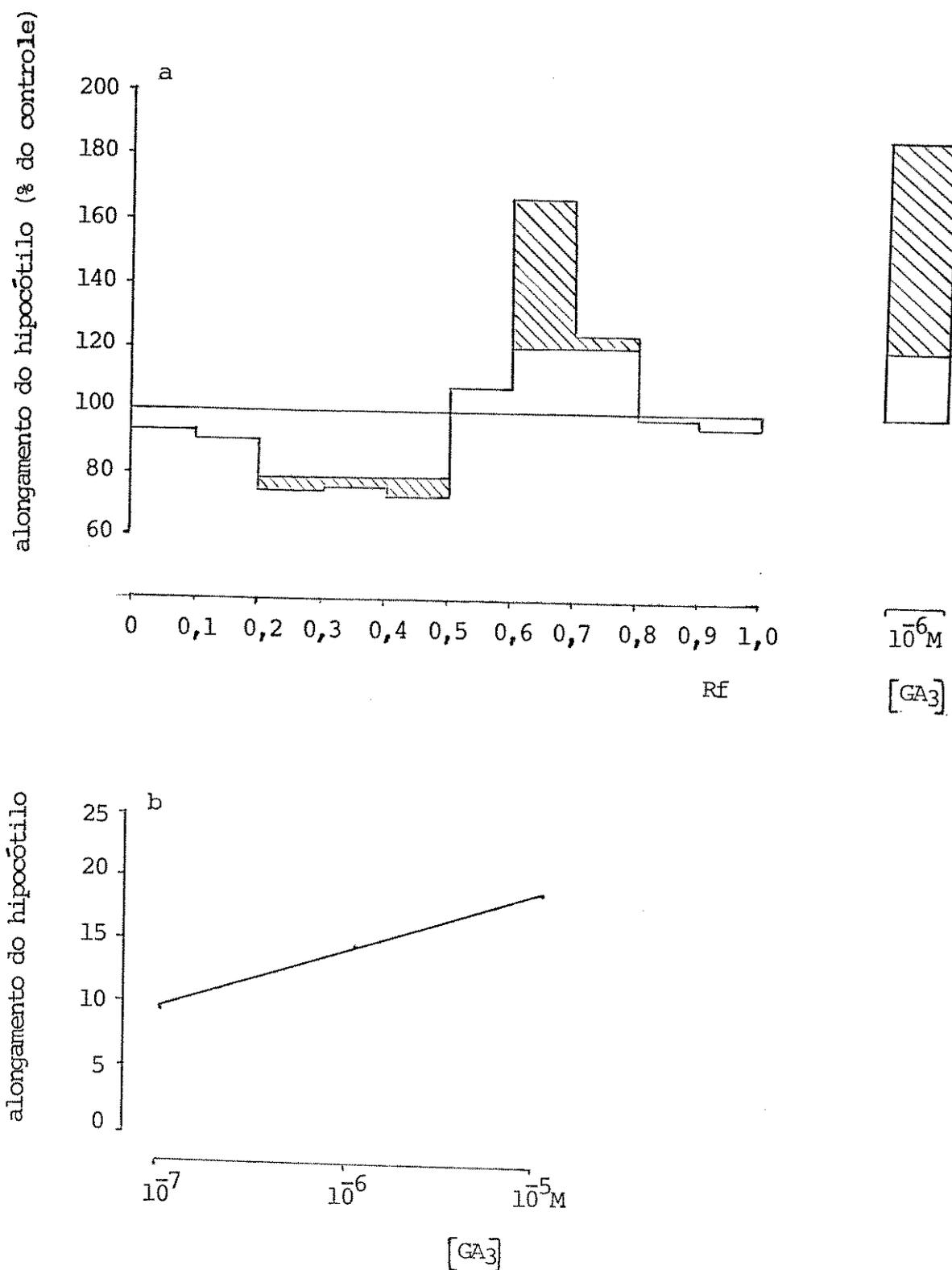


Figura 9. a - Substâncias de crescimento detectadas na fração ácida de extrato de sementes recém-colhidas de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce na classe 7
 b - Curva padrão com diferentes concentrações de GA_3 Bioteste do hipocótilo de alface
 Áreas hachuradas indicam diferenças significativas a 5%

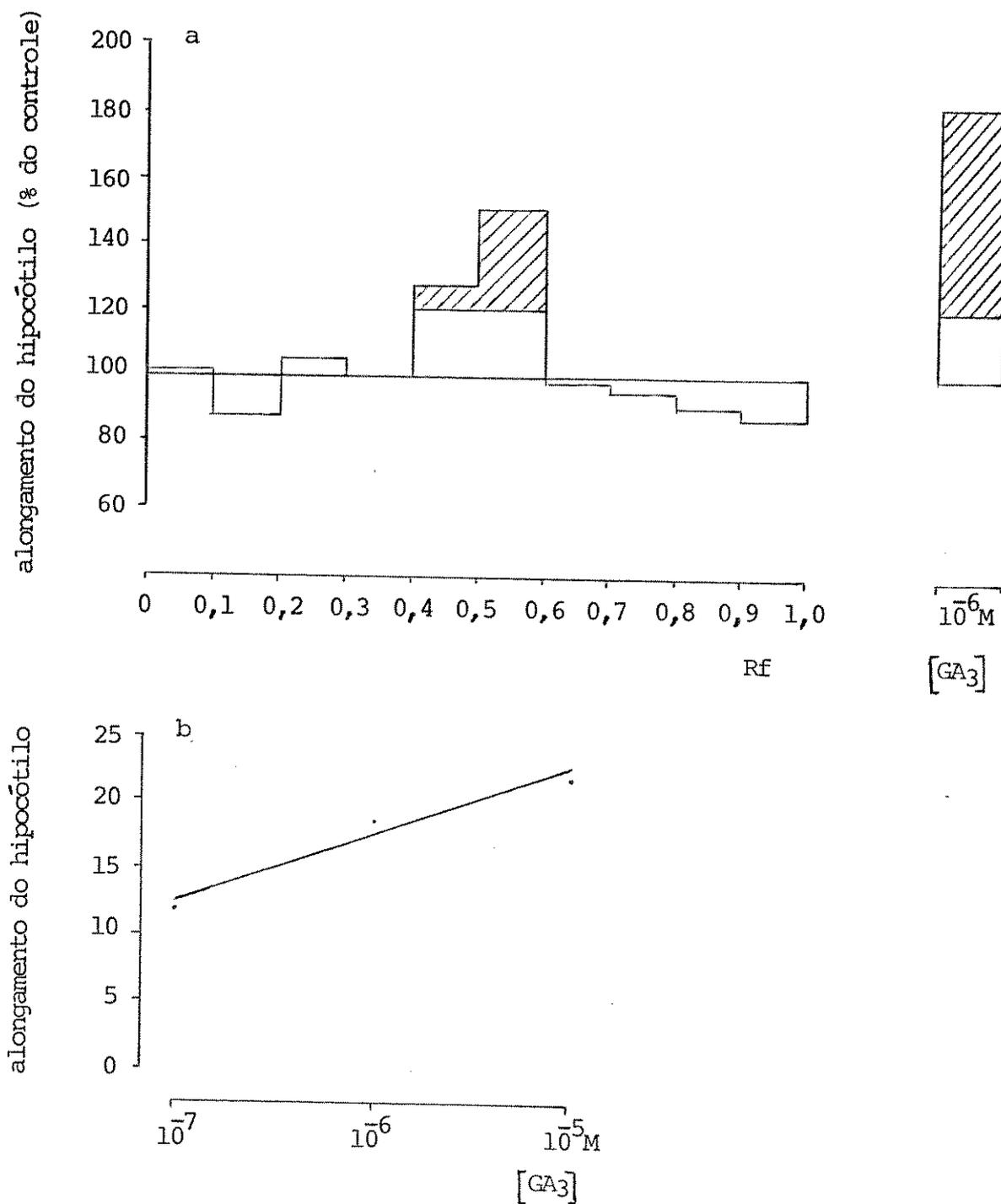


Figura 10. a - Substâncias de crescimento detectadas na fração ácida de extrato de sementes secas artificialmente de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce na classe 3

b - Curva padrão com diferentes concentrações de GA₃ Bioteste do hipocótilo de alface

Áreas hachuradas indicam diferenças significativas a 5%

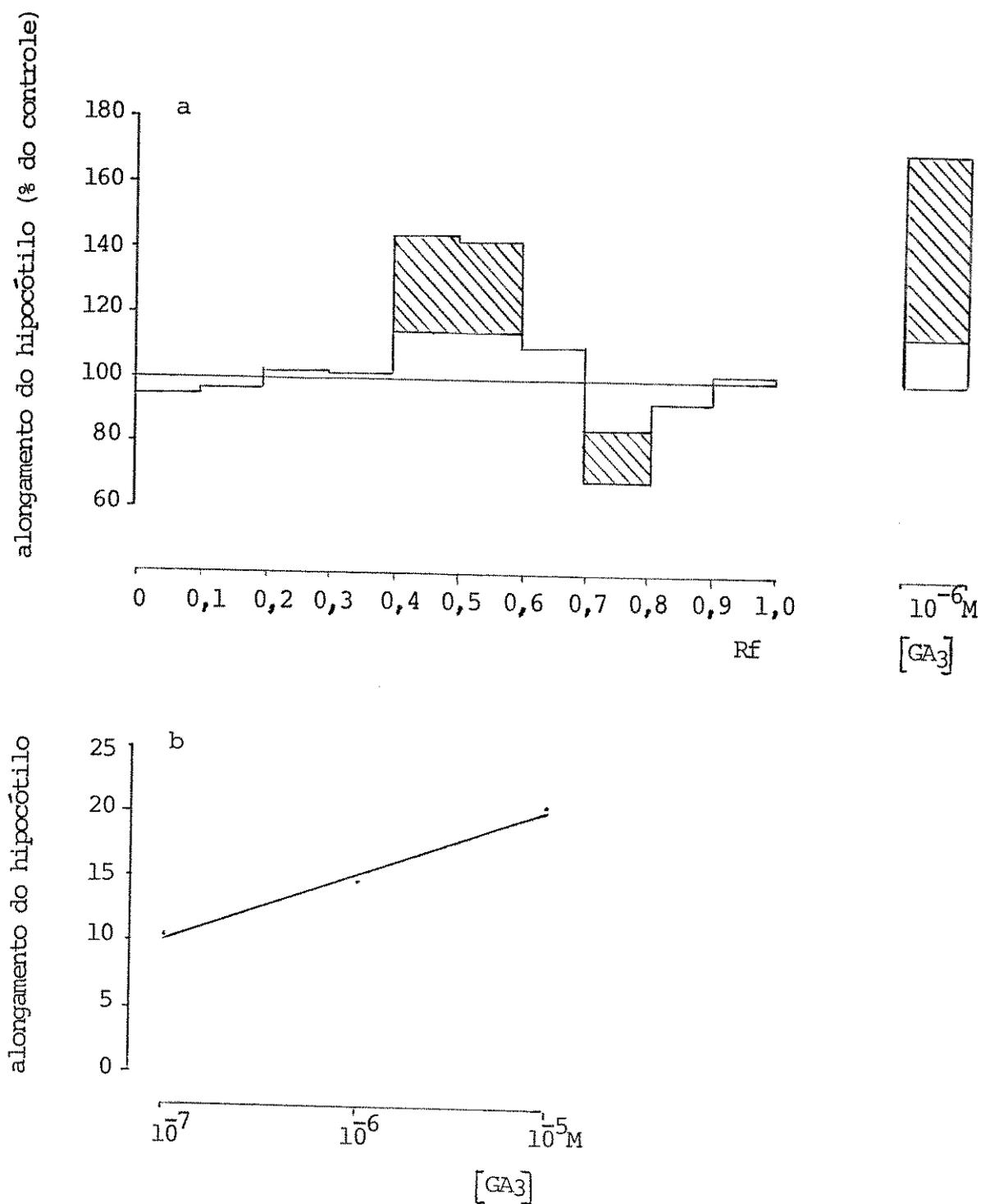


Figura 11. a - Substâncias de crescimento detectadas na fração ácida de extrato de sementes secas artificialmente de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce na classe 4

b - Curva padrão com diferentes concentrações de GA₃ Bioteste do hipocótilo de alface

Áreas hachuradas indicam diferenças significativas a 5%

berelínica estatisticamente significativa, está localizada na faixa entre os Rfs 0,4 e 0,6 e a atividade inibidora, estatisticamente significativa, na faixa entre os Rfs 0,7 e 0,8 (figura 11). Na classe 5 observa-se resultado semelhante com a região de atividade giberelínica, estatisticamente significativa, localizada na faixa entre os Rfs 0,3 e 0,6 e a região com atividade inibidora na faixa entre os Rfs 0,6 e 0,7 (figura 12).

4.2. Atividade citocinínica

Foram analisadas sementes nos estádios de desenvolvimento onde se supôs um possível envolvimento de reguladores de crescimento no controle da germinação e nos quais foram observados diferenças com relação à capacidade e/ou velocidade de germinação de sementes imaturas.

Os resultados do bioteste das faixas com resposta positiva no teste de Wood com extratos provenientes de sementes imaturas recém-colhidas nas classes de desenvolvimento 3,4,5,6 e 7 assim como a curva padrão correspondente estão apresentados nas figuras 13 e 14.

Na classe 3 observam-se duas regiões com atividade citocinínica, estatisticamente significativas, na faixa entre os Rfs 0,3 e 0,5 e Rfs 0,5 e 0,6 (figura 13a). A curva padrão referente aos biotestes realizados para sementes recém-colhidas mostra a linearidade na faixa de concentrações testada (figura 13b).

Na classe 4, somente uma região com atividade citocinínica, estatisticamente significativa, foi detectada, compreendida na faixa entre os Rfs 0,6 e 0,8 (figura 14a). Nos extratos de sementes nas demais classes de desenvolvimento analisadas, classes 5,6 e 7, não se observa atividade citocinínica es

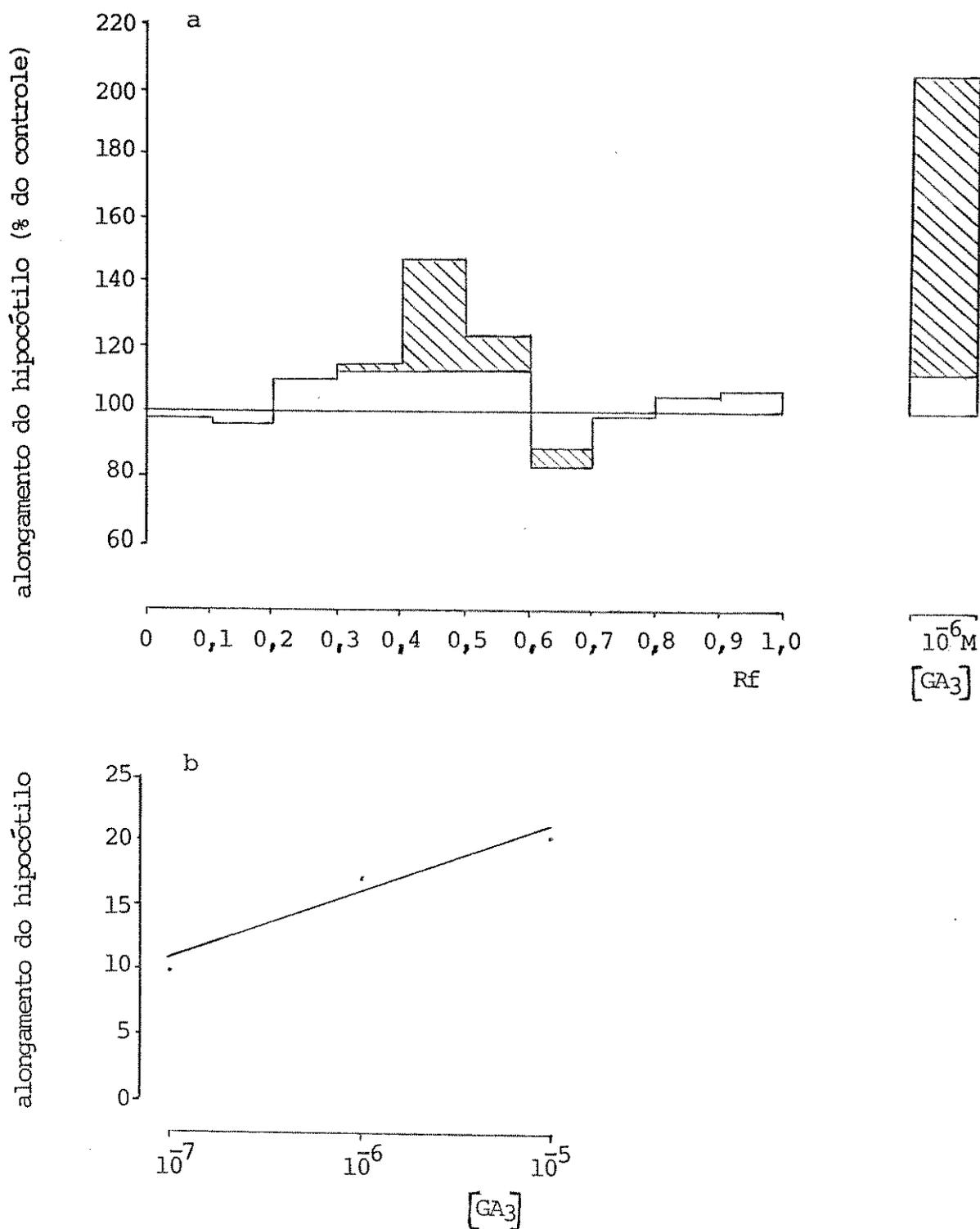


Figura 12. a - Substâncias de crescimento detectadas na fração ácida de extrato de sementes secas de *Phaseolus vulgaris* cv. Goiano Precoce na classe 5

b - Curva padrão com diferentes concentrações de GA₃
Bioteste do hipocótilo de alface

Áreas hachuradas indicam diferenças significativas a 5%

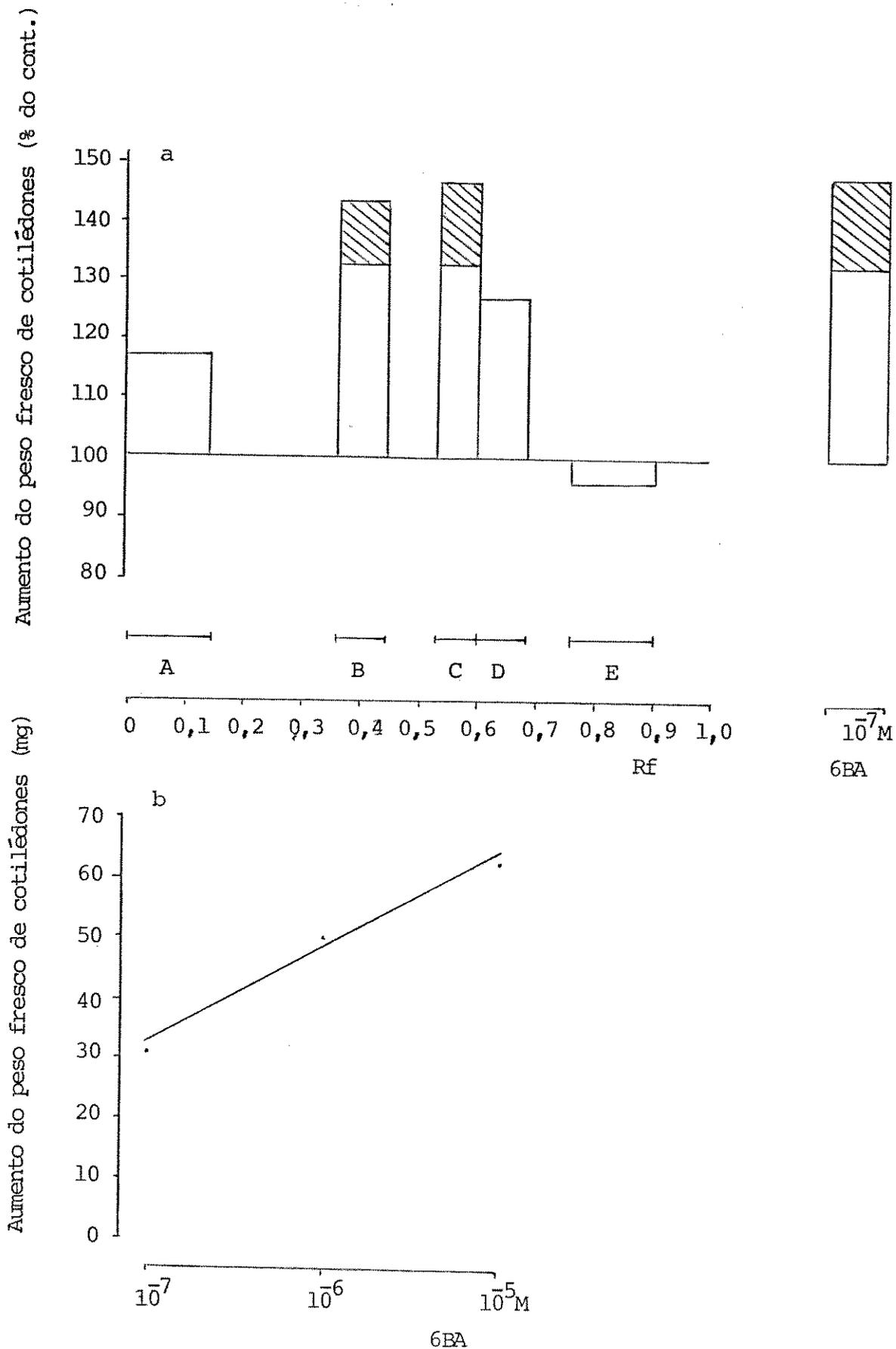


Figura 13. a - Atividade citocinínica detectada na fração básica de extra-
to de sementes recém-colhidas de *Phaseolus vulgaris* cv.
Goiano Precoce na classe 3

A,B,C,D e E - Faixas detectadas pelo reagente de Wood
b - Curva padrão para sementes recém-colhidas nas classes 3 a 7
Bioteste do peso fresco de cotilédones de rabanete
Áreas hachuradas indicam diferenças significativas a 5%

Figura 14.

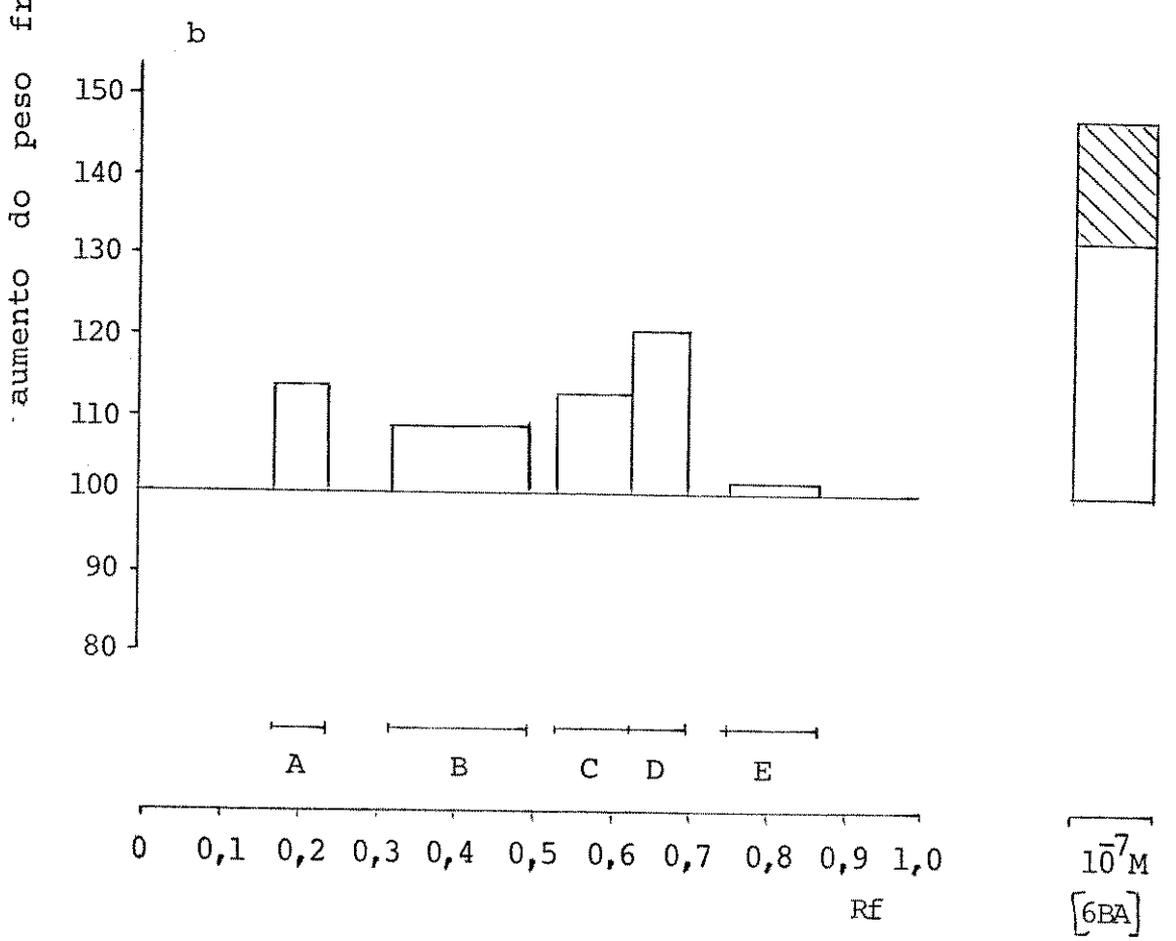
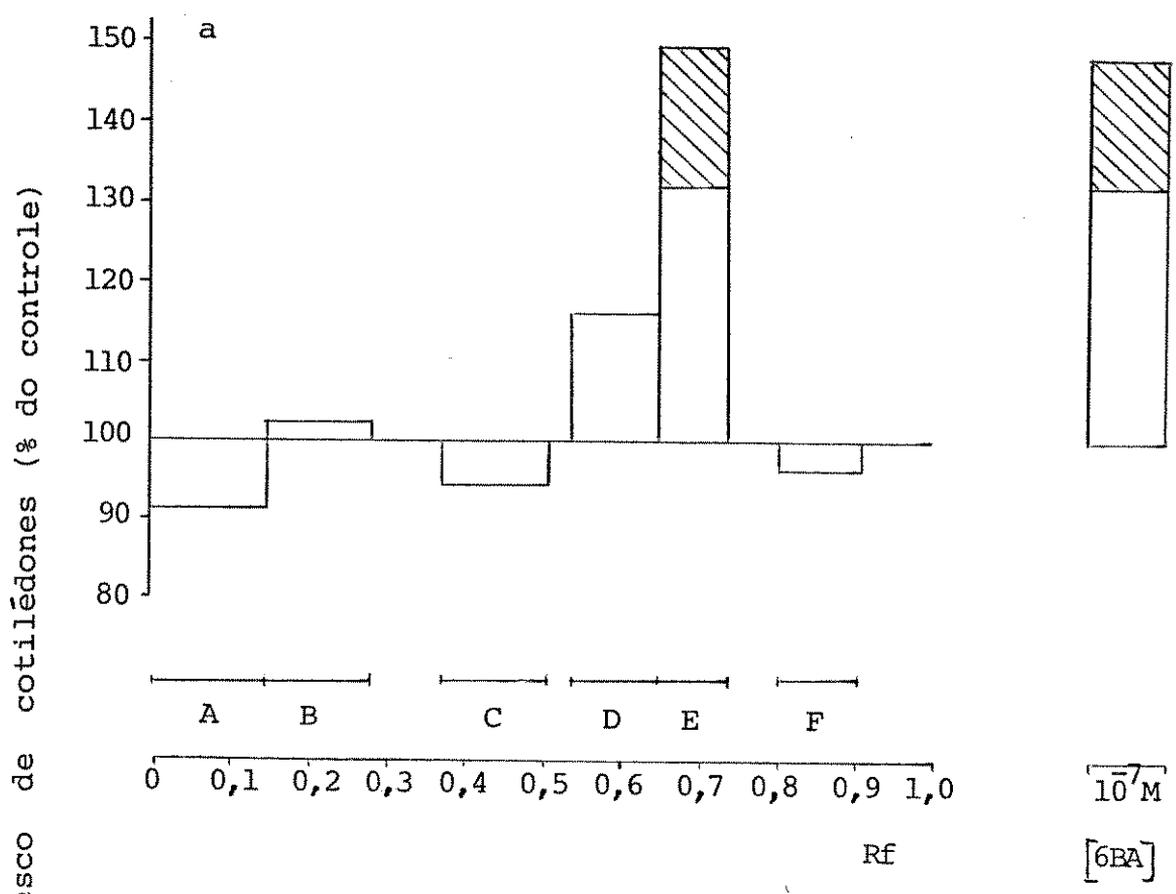
Atividade citocinínica detectada na fração
básica de extrato de sementes recém-colhi-
das de *Phaseolus vulgaris* cv. Goiano Preco-
ce

a - classe 4

b - classe 5

Bioteste do peso fresco de cotilédones de
rabanete

Áreas hachuradas indicam diferenças significativas
a 5%



tatisticamente significativa (figuras 14b, 15a e 15b respectivamente).

Os resultados do bioteste das frações básicas com extratos provenientes de sementes imaturas secas artificialmente nas classes de desenvolvimento 3,4 e 5, estão apresentados nas figuras 16a,b e c respectivamente. A curva padrão correspondente está mostrada na figura 17.

Na classe 3, observam-se duas regiões com atividade citocinínica, estatisticamente significativas, compreendidas nas faixas entre os Rfs 0,4 e 0,6 e Rfs 0,6 e 0,8 (figura 16a). Na classe 4 a atividade citocinínica estatisticamente significativa é observada nas mesmas regiões, compreendidas respectivamente nas faixas entre os Rfs 0,4 e 0,6 e Rfs 0,6 e 0,8 (figura 16b). Na classe 5 não foi detectada atividade citocinínica a um nível estatisticamente significativo (figura 16c). Na figura 17, está apresentada a curva padrão que mostra a linearidade na faixa de concentrações de 6BA testada.

4.3. Substâncias de crescimento detectadas na fração neutra

Foram analisadas sementes nos estádios de desenvolvimento onde se supôs um possível envolvimento de reguladores de crescimento no controle da germinação e nos quais foram observados diferenças com relação a capacidade e/ou velocidade de germinação de sementes imaturas.

Os resultados do bioteste do alongamento do hipocótilo de alface para as frações neutras provenientes de sementes recém-colhidas, nas classes de desenvolvimento 3,4,5,6 e 7, estão apresentados nas figuras 18 e 19.

Figura 15. Atividade citocinínica detectada na fração
básica de extrato de sementes recém-colhi-
das de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Preco
ce

a - classe 6

b - classe 7

A,B,C,D,E,F e G - Faixas detectadas pelo
reagente de Wood

Bioteste do peso fresco de cotilédones de rabanete

Áreas hachuradas indicam diferenças significativas

a 5%

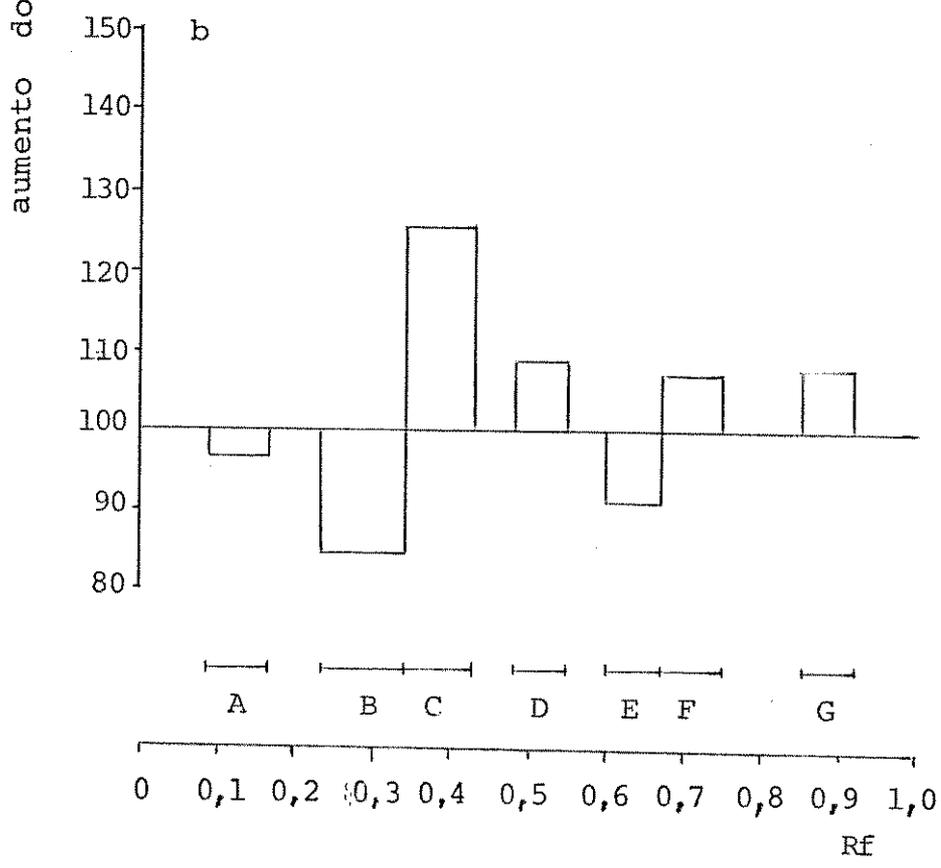
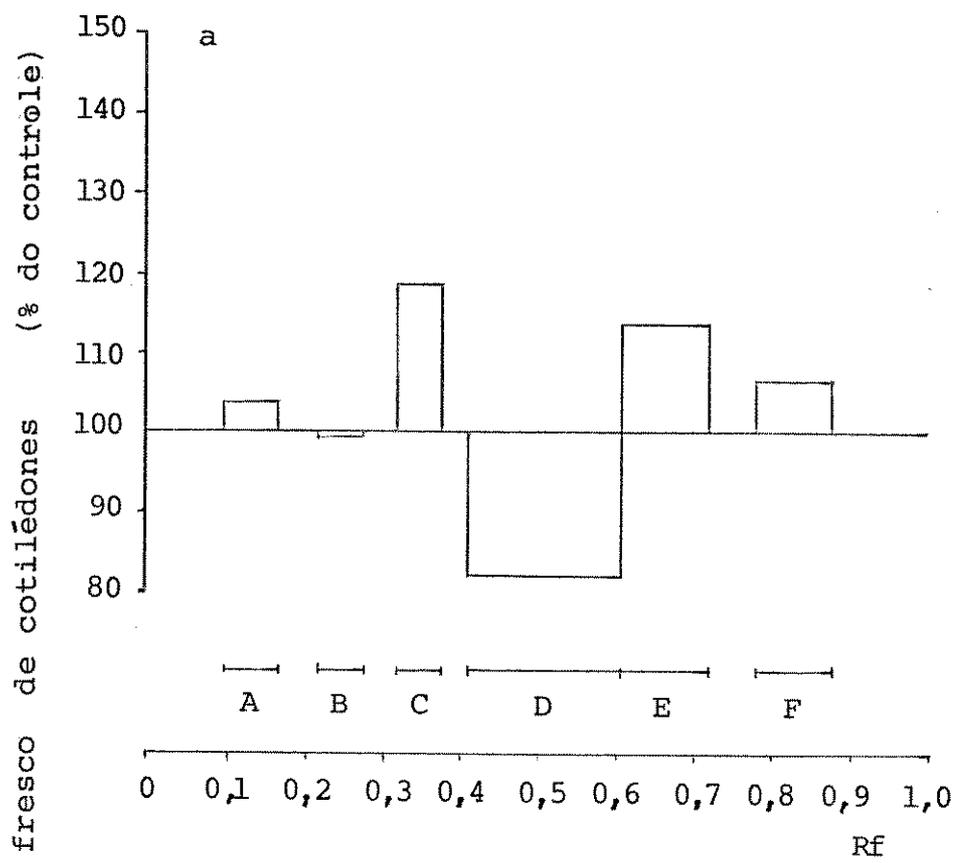


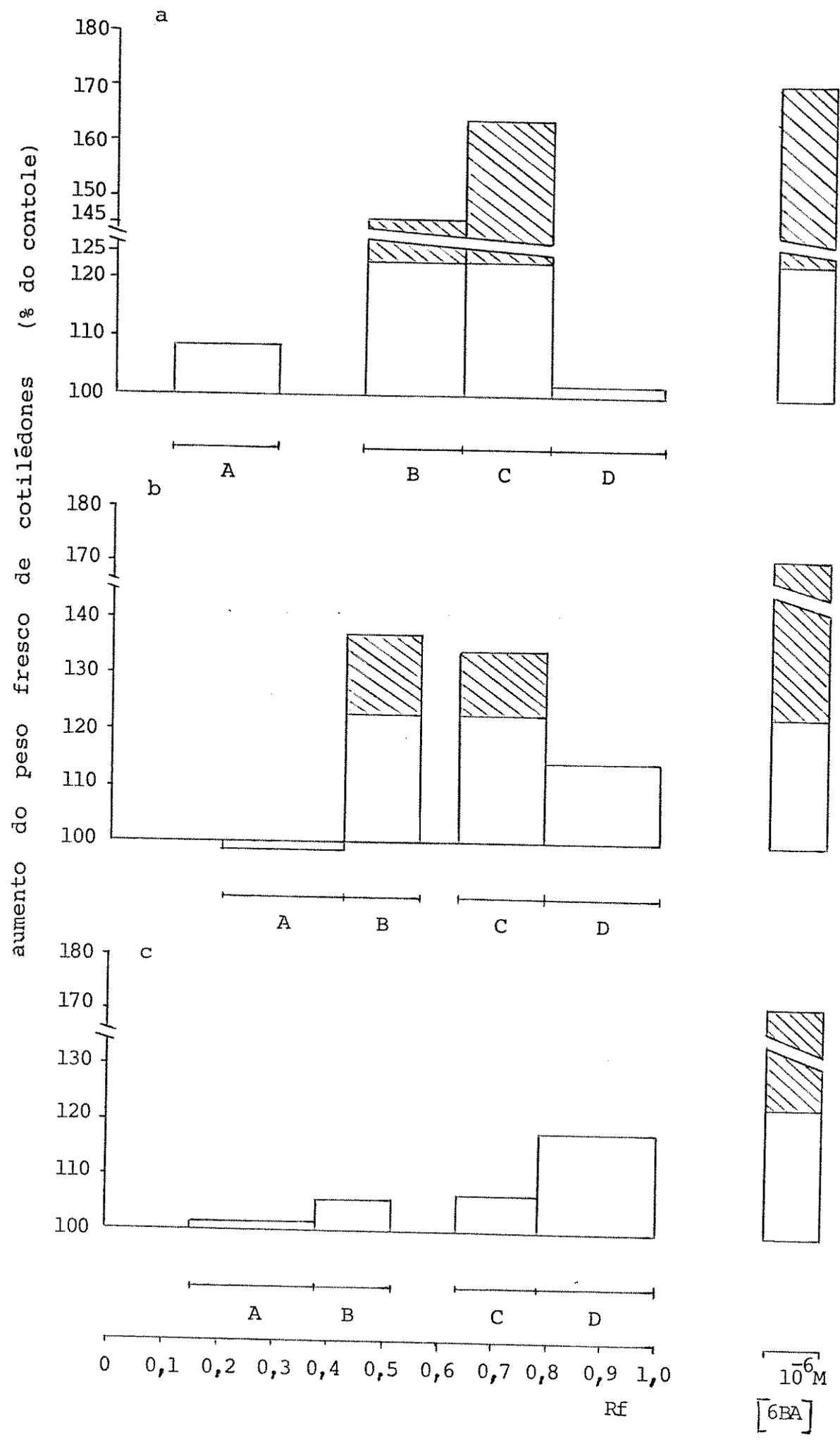
Figura 16. Atividade citocinínica detectada na fração bá
sica de extrato de sementes secas de Phaseolus
vulgaris cv. Goiano Precoce

a - classe 3 b - classe 4 c - classe 5

A, B, C e D - Faixas detectadas pelo reagente de
Wood

Bioteste do peso fresco de cotilédones de raba
nete

Áreas hachuradas indicam diferenças significa-
tivas a 5%



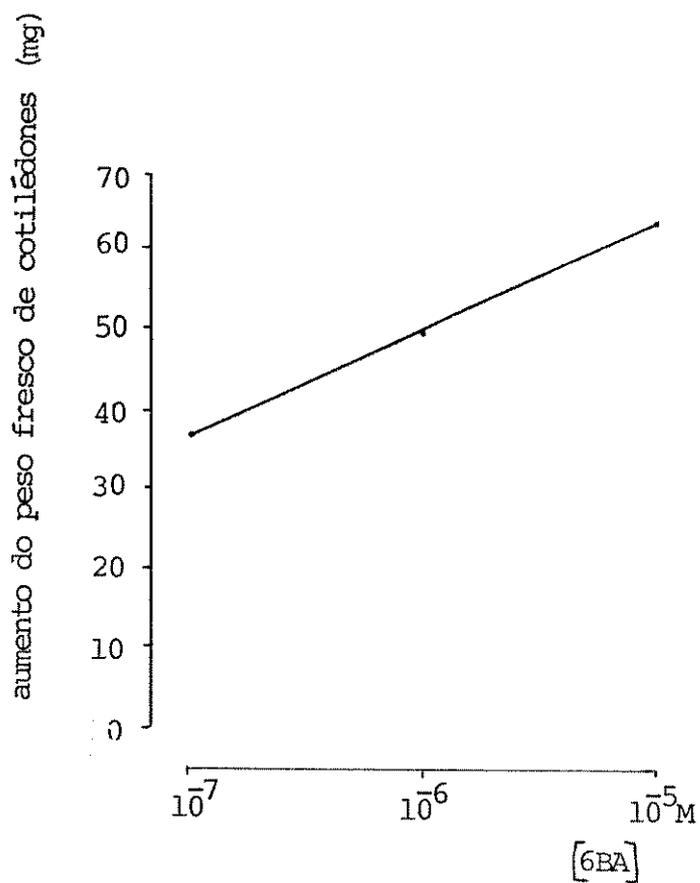
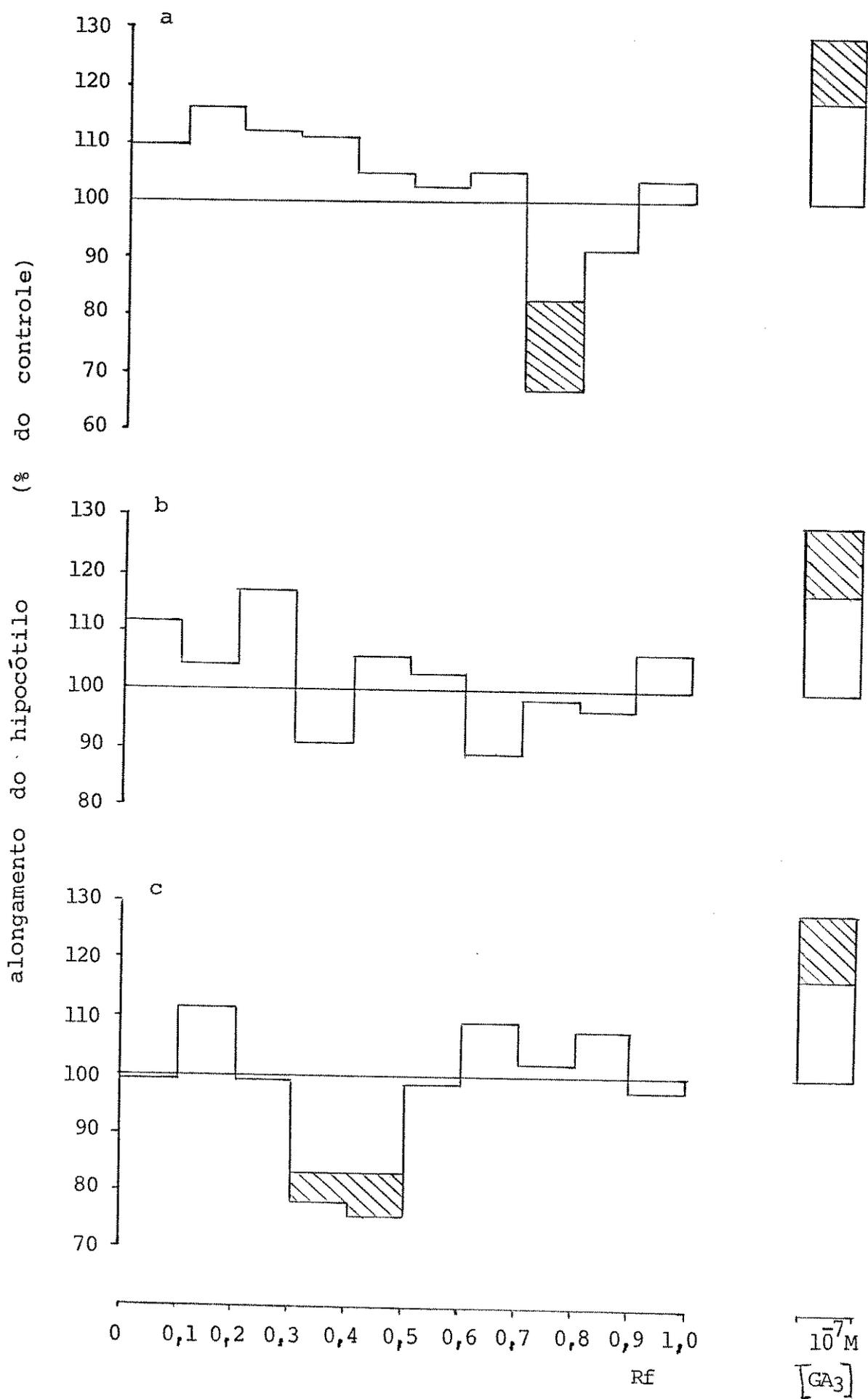


Figura 17. Curva padrão referente às classes 3,4 e 5 de sementes secas de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce

Figura 18. Substâncias promotoras e inibidoras detectadas na fração neutra de extrato de sementes recém-colhidas de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce
a - classe 3 b - classe 4 c - classe 5
Bioteste do alongamento do hipocótilo de alface
Áreas hachuradas indicam diferenças significativas a 5%



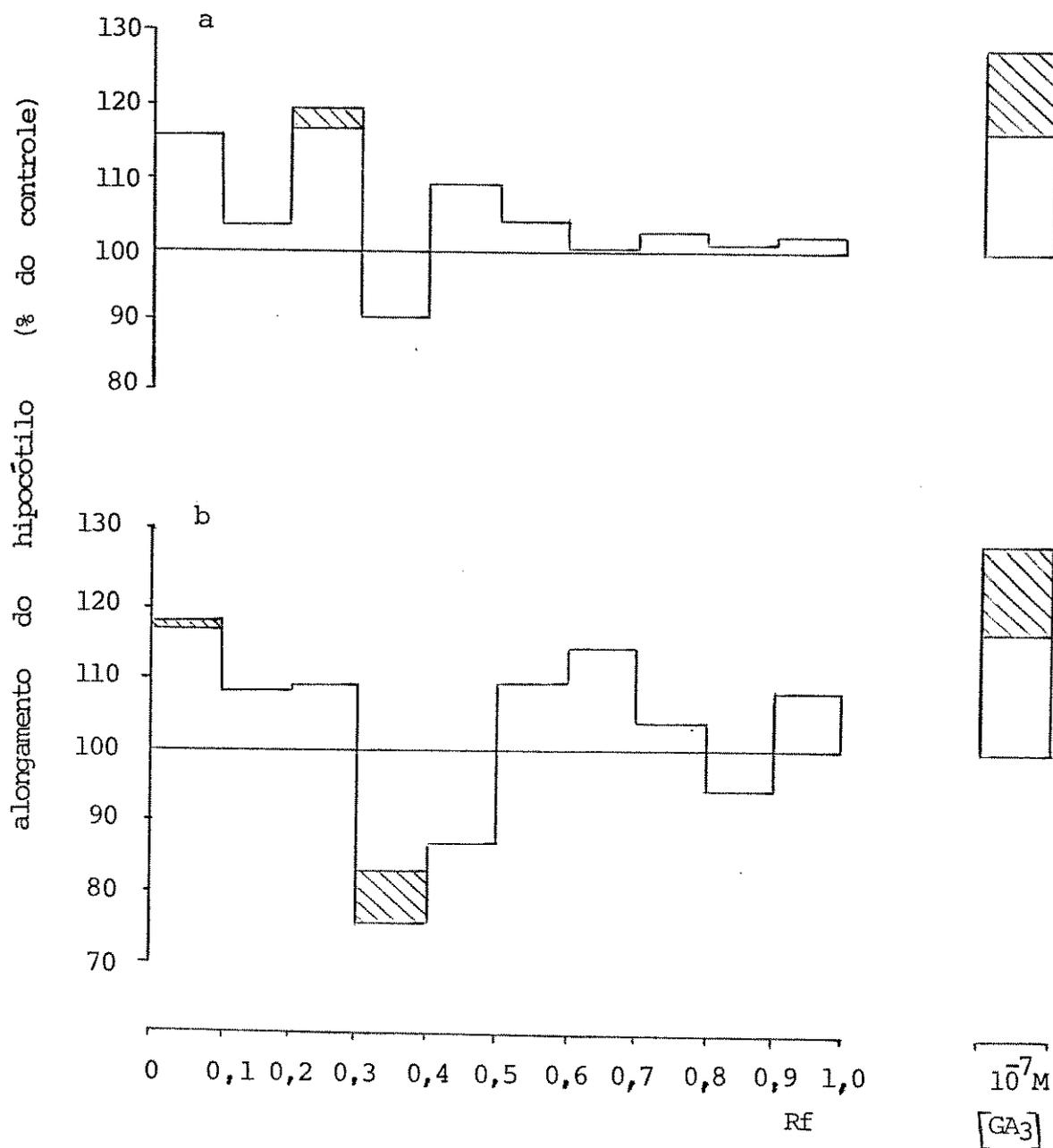


Figura 19. Substâncias de crescimento detectadas na fração neutra de extrato de sementes recém-colhidas de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce

a - classe 6

b - classe 7

Bioteste do hipocótilo de alface

Áreas hachuradas indicam diferenças significativas a 5%

Na classe 3 observa-se uma região com atividade inibidora, estatisticamente significativa, na faixa entre os Rfs 0,7 e 0,8 (figura 18a). Na classe 5 a atividade inibidora estatisticamente significativa, foi detectada na faixa entre os Rfs 0,3 e 0,6 (figura 18c). Na classe 7 observa-se uma região com atividade inibidora, estatisticamente significativa, na faixa entre os Rfs 0,3 e 0,4 e uma região com atividade promotora na faixa entre o ponto de aplicação e o Rf 0,1 (figura 19b). Nas classes 4 (figura 18b) e 6 (figura 19a), não foram detectadas atividades inibidoras estatisticamente significativas, sendo que nesta última, se observou uma região com atividade promotora estatisticamente significativa, na faixa entre os Rfs 0,2 e 0,3.

Os resultados do bioteste do alongamento do hipocótilo de alface para as frações neutras provenientes de sementes secas artificialmente nas classes 3, 4 e 5, estão apresentados nas figuras 20a, b e c respectivamente.

Na classe 4 detectou-se atividade inibidora estatisticamente significativa na faixa entre os Rfs 0,8 e 0,9 (figura 20b). Nas classes 3 e 5 não foi detectada atividade estatisticamente significativa (figuras 20a e c respectivamente).

4.4. Nível endógeno de giberelinas e citocininas

Para uma melhor interpretação dos resultados obtidos na análise de substâncias endógenas em sementes imaturas, foi feita a quantificação da atividade giberelínica e citocinínica em sementes nos estádios de desenvolvimento, onde se observou a presença destas substâncias a níveis estatisticamente significativos.

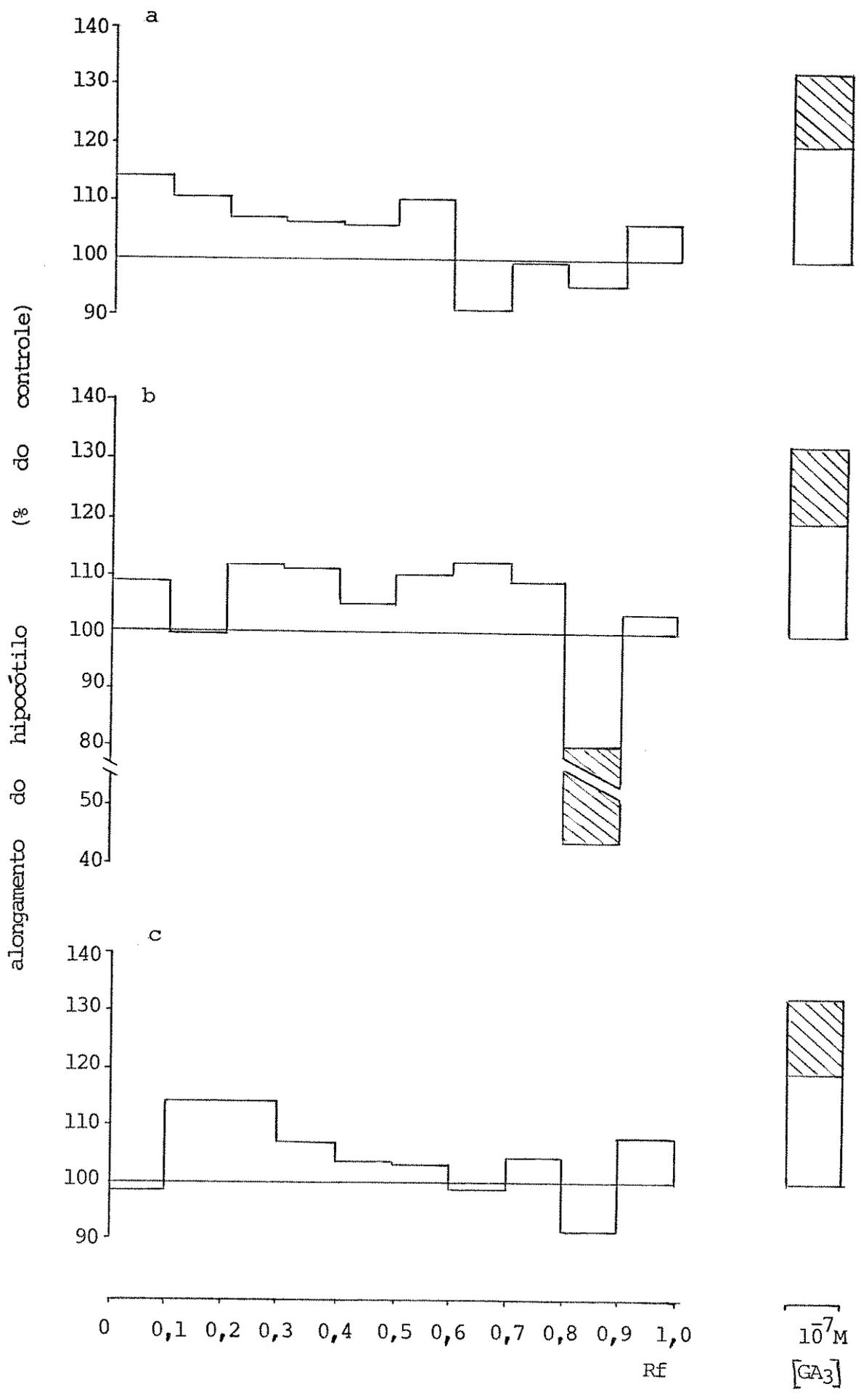
Para o cálculo das atividades em equivalentes de GA₃ ou

Figura 20. Substâncias de crescimento detectadas na fração neutra de extrato de sementes secas de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce

a - classe 3 b - classe 4 c - classe 5

Bioteste do hipocótilo de alface

Áreas hachuradas indicam diferenças significativas a 5%



6BA, consideraram-se integralmente as faixas entre os Rfs que mostraram promoção estatisticamente significativa. Nos casos em que a atividade foi detectada em mais de uma faixa entre Rfs, o cálculo foi feito somando-se as respectivas porcentagens de promoção obtidas, isto é, foi computada a atividade total de uma dada fração em relação à substância padrão.

As atividades em equivalentes de GA₃ ou 6BA em sementes, recém-colhidas ou secas artificialmente, nos diferentes estádios de desenvolvimento estão apresentadas na tabela 5. Pode-se observar uma maior quantidade de giberelinas livres em sementes recém-colhidas nos estádios iniciais de desenvolvimento (classes 3, 4 e 5), sendo que a atividade em sementes nos estádios mais avançados diminui acentuadamente (classes 6 e 7). A desidratação artificial reduz o nível de giberelinas livres nos estádios iniciais de desenvolvimento, a níveis comparáveis aos de sementes recém-colhidas em estádios mais avançados.

Os mais altos níveis de citocininas biologicamente ativas são observados em sementes recém-colhidas ou secas artificialmente, nos estádios iniciais de desenvolvimento (classe 3). O decréscimo na atividade de citocininas, a medida que a semente se desenvolve, é rápido, sendo observado já uma drástica redução em sementes na classe 4. Nos demais estádios de desenvolvimento analisados, não foi detectada atividade citocinínica a níveis significativos. A desidratação artificial não reduz o nível de atividade citocinínica em sementes nas classe 3 e 4.

4.5. Nível endógeno de ABA

Para verificar o possível envolvimento de ABA no controle da germinação de sementes imaturas foi feita a determinação deste inibidor, utilizando-se de metodologia mais específica, em sementes recém-colhidas ou secas artificialmente, nos diferentes estádios de desenvolvimento.

Tabela 5 - Substâncias hormonais endógenas em sementes imaturas de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce

Classes	Atividade em equivalentes de GA ₃ ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco da semente $\cdot 10^6$)		Atividade em equivalentes de 6BA ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco da semente $\cdot 10^6$)	
	Sementes recém-colhidas	Sementes secas	Sementes recém-colhidas	Sementes secas
3	0,53	0,26	0,33	0,27
4	0,46	0,34	0,18	0,18
5	0,53	0,22	< 0,09	< 0,09
6	< 0,08	-	< 0,07	-
7	0,29	-	< 0,06	-

- não analisada

4.5.1. Determinação de ABA por espectroscopia em luz ultra-violeta

A tabela 6 mostra o resultado da análise quantitativa de ABA baseada na absorbância desta substância em luz ultra-violeta em sementes imaturas recém-colhidas ou secas artificialmente.

Em sementes recém-colhidas o nível de ABA é comparativamente baixo nos estádios iniciais de desenvolvimento (classe 3 e 4), não sendo significativas as diferenças entre os níveis encontrados nestas classes. Um pico estatisticamente significativo na atividade é observado em sementes nas classes 5 e 6, ocorrendo, um decréscimo estatisticamente significativo em sementes na classe 7 mas ainda se mantendo superior, estatisticamente, às atividades observadas nos estádios iniciais de desenvolvimento.

Em linhas gerais, este padrão se repete em sementes secas artificialmente, porém neste caso, as atividades medidas são significativamente menores do que as de sementes recém-colhidas, com exceção de sementes no estágio de desenvolvimento correspondente à classe 4. A atividade é baixa na classe 3, aumenta aparentemente com o decorrer do desenvolvimento (classes 4, 5 e 6), sendo novamente reduzida na classe 7.

A curva padrão mostrando a sensibilidade e linearidade de resposta à diferentes concentrações de ABA, está apresentada na figura 21.

4.5.2. Determinação de ABA através do bioteste da inibição da germinação de sementes de alface.

Os resultados obtidos na quantificação de ABA através da atividade biológica da inibição da germinação de sementes de al-

Tabela 6 - Atividade em equivalentes de ABA quantificada por espectroscopia em UV. ($\text{pg}, \text{m}\bar{\text{l}}^{-1} \cdot \text{semente}^{-1}$) em sementes de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce

Classes	3	4	5	6	7
Sementes recém-colhidas	5,2	8,5	21,5	20,7	15
Sementes secas	1,3	6,0	4,9	9,1	1,7

$\Delta_{p < 0,05} = 0,539$ Para sementes nas diferentes classes de desenvolvimento

$\Delta_{p < 0,05} = 0,376$ Para sementes recém-colhidas e secas artificialmente

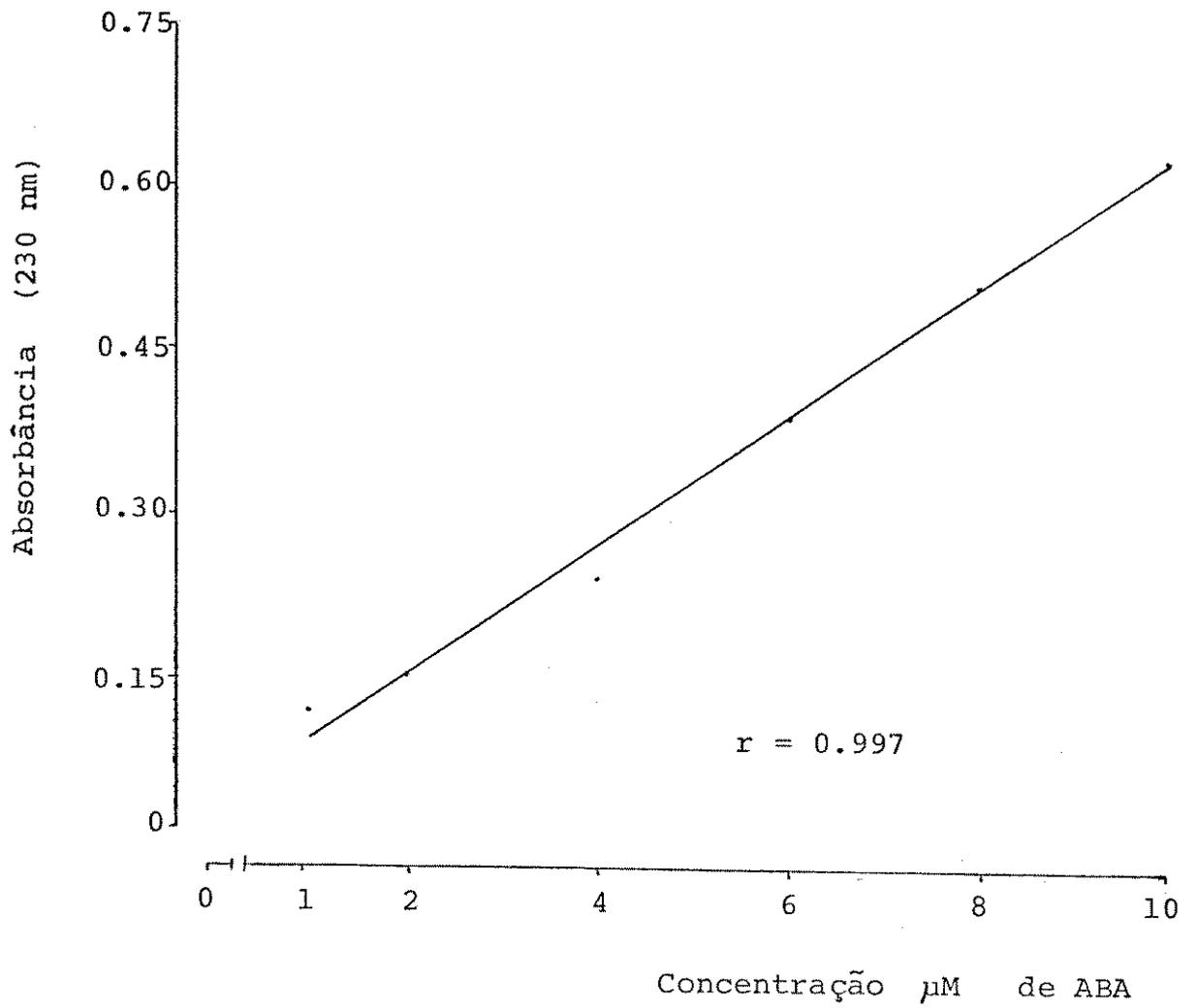


Figura 21 - Curva padrão de ABA obtida através da absorvância a 230 nm

face, confirmam os aspectos principais observados com relação aos níveis de ABA encontrados em sementes imaturas no item anterior. Sementes recém-colhidas nos estádios iniciais de desenvolvimento (classes 3 e 4), possuem níveis relativamente baixos de ABA. A atividade aumenta drasticamente em sementes nos estádios subsequentes (classes 5 e 6), diminuindo significativamente em sementes na classe 7. Sementes nos estádios de desenvolvimento correspondentes às classes 5, 6 e 7 quando submetidas à dessecação artificial, sofrem uma redução significativa no nível deste inibidor (tabela 7).

A curva padrão mostrando a linearidade de resposta da inibição da germinação de sementes de alfaca na faixa de concentração de ABA testada, está apresentada na figura 22.

5. Efeito de reguladores de crescimento na germinação de sementes imaturas

Para confirmar e complementar os resultados obtidos acerca do papel de reguladores de crescimento na germinação de sementes imaturas, procurou-se verificar o comportamento, com relação à germinação, de sementes imaturas quando colocadas para germinar em contato com soluções destas substâncias.

5.1. Efeito de GA₃

A figura 23 mostra que o ácido giberélico nas diferentes concentrações testadas, não teve efeito promotor na germinação de sementes imaturas recém-colhidas, em todos os estádios de de

Tabela 7 - Atividade em equivalentes de ABA quantificada através do bioteste da inibição da germinação de sementes de alface ($\text{pg.ml}^{-1} \cdot \text{semente}^{-1}$)

Classes	3	4	5	6	7
Sementes recém-colhidas	0,36	0,79	2,76	2,56	1,1
Sementes secas	0,44	0,60	1,0	0,86	0,37

$\Delta_{p < 0,05} = 0.682$ para sementes nas diferentes classes de desenvolvimento

$\Delta_{p < 0,05} = 0.421$ para sementes recém-colhidas e secas artificialmente

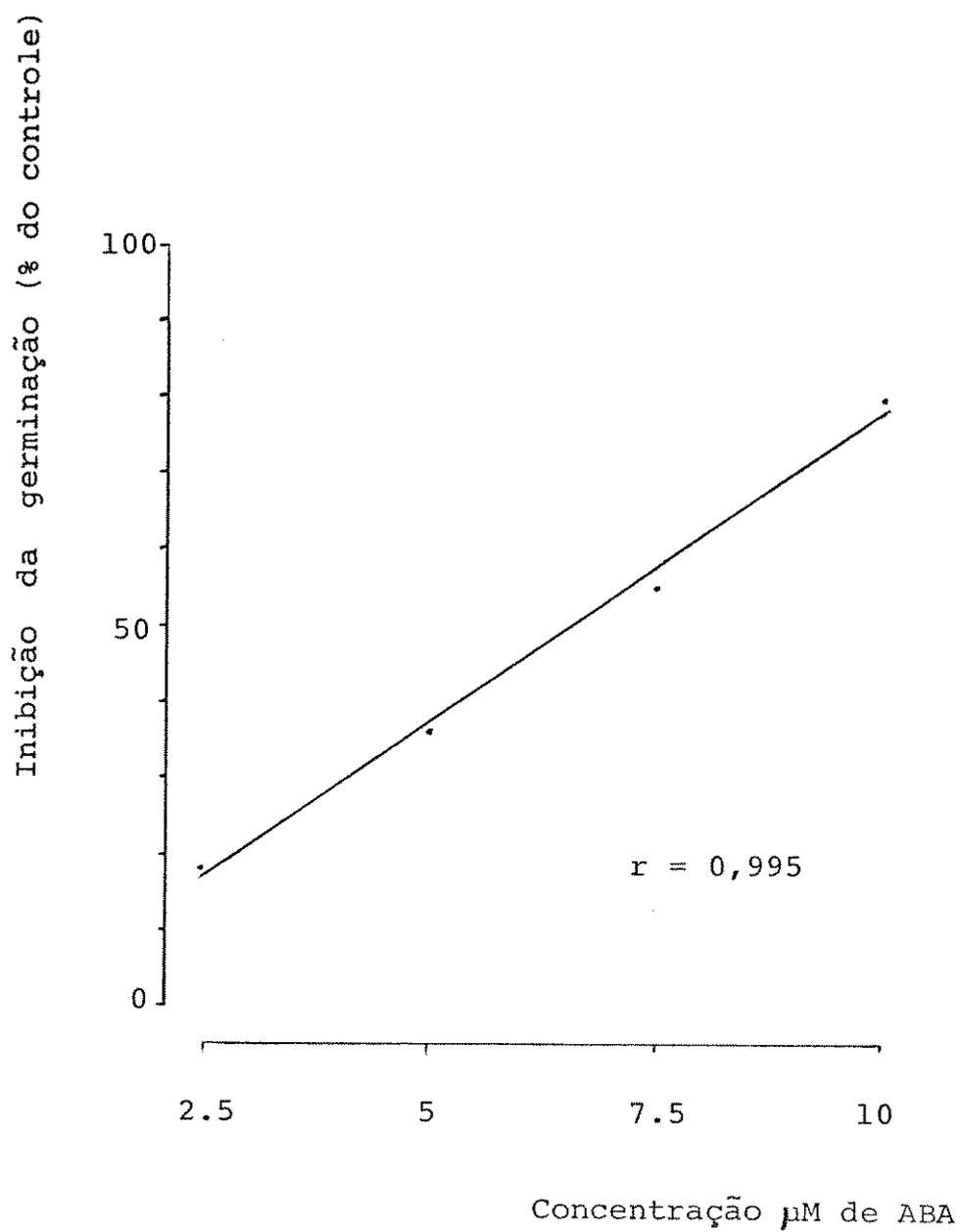


Figura 22 - Curva padrão de ABA obtida através do bioteste da inibição da germinação de sementes de alface

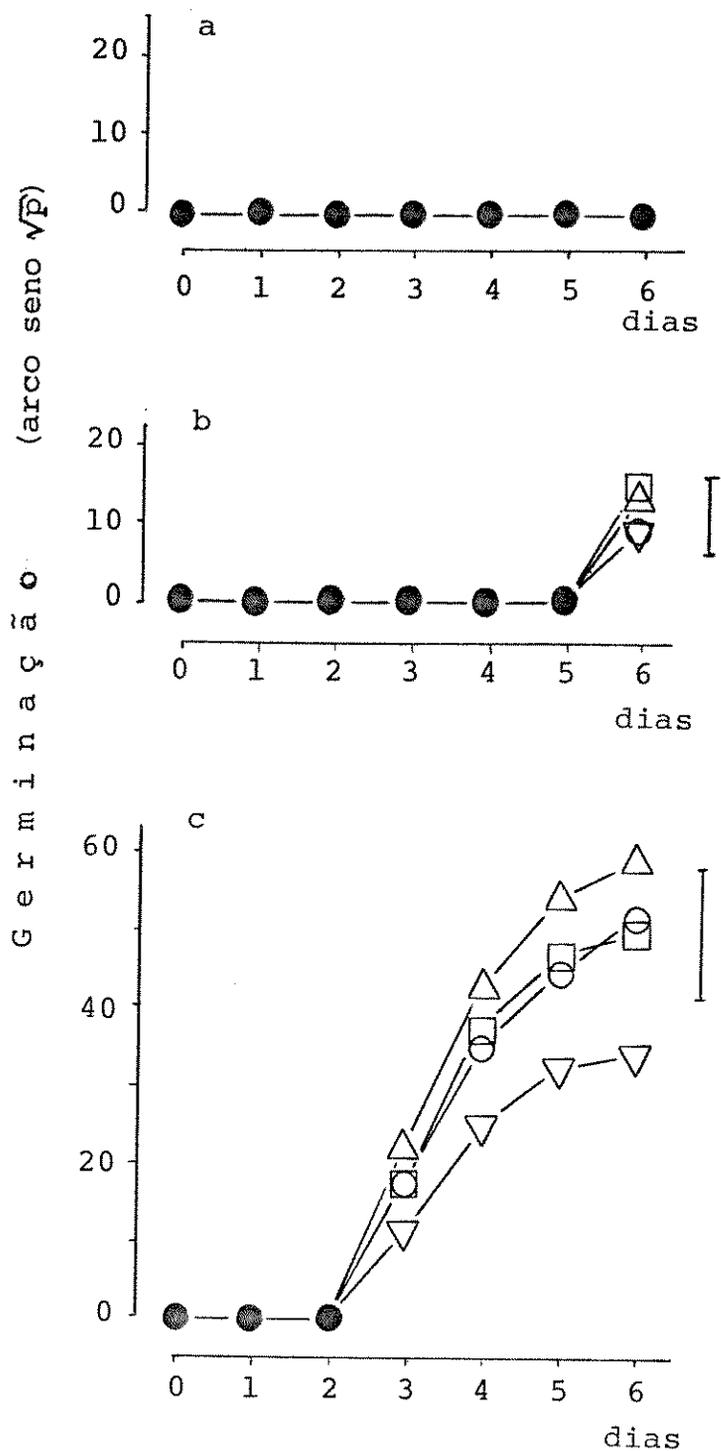


Figura 23 - Efeito de GA_3 exógeno em sementes imaturas recém-colhidas de *Phaseolus vulgaris* cv. Goiano Precoce

a - classe 3 b - classe 4 c - classe 5

○ controle △ $10^{-4}M$ □ $3 \cdot 10^{-4}M$ ▽ $6 \cdot 10^{-4}M$

● valores coincidentes

Barra vertical representa a DMS Tukey com $p \leq 5\%$

desenvolvimento cuja germinação foi avaliada. Em sementes na classe 5, a concentração mais alta de GA₃ inibiu significativamente a germinação (figura 23c)

Em sementes secas artificialmente também se observou que GA₃ exógeno não teve efeito promotor, estatisticamente significativo, na germinação de sementes imaturas nos diferentes estádios de desenvolvimento (figura 24).

5.2. Efeito de 6BA

O 6BA, nas concentrações testadas, promoveu significativamente a germinação de sementes imaturas recém-colhidas na classe 4 (figura 25b). Na classe 3 e na classe 5, não se observa efeito promotor de 6BA na germinação (figuras 25a e c respectivamente).

A figura 26 mostra que em sementes secas artificialmente, o efeito promotor de 6BA na germinação é observado na classe 4, sendo que somente a concentração de 10^{-3} M mostrou efeito promotor estatisticamente significativo.

5.3. Efeito de ABA

Sementes imaturas recém-colhidas ou secas artificialmente nos estádios de desenvolvimento correspondentes às classes 5 (fig. 27a e b) e 6 (fig. 27c e d), tiveram sua germinação inibida significativamente em presença de ABA nas concentrações de $3 \cdot 10^{-4}$ M e $6 \cdot 10^{-4}$ M. O efeito inibitório se mostrou crescente com o aumento da concentração de ABA, sendo que 10^{-4} M não teve efeito na germinação.

6. Atividade amilolítica em sementes, nos diferentes estádios de

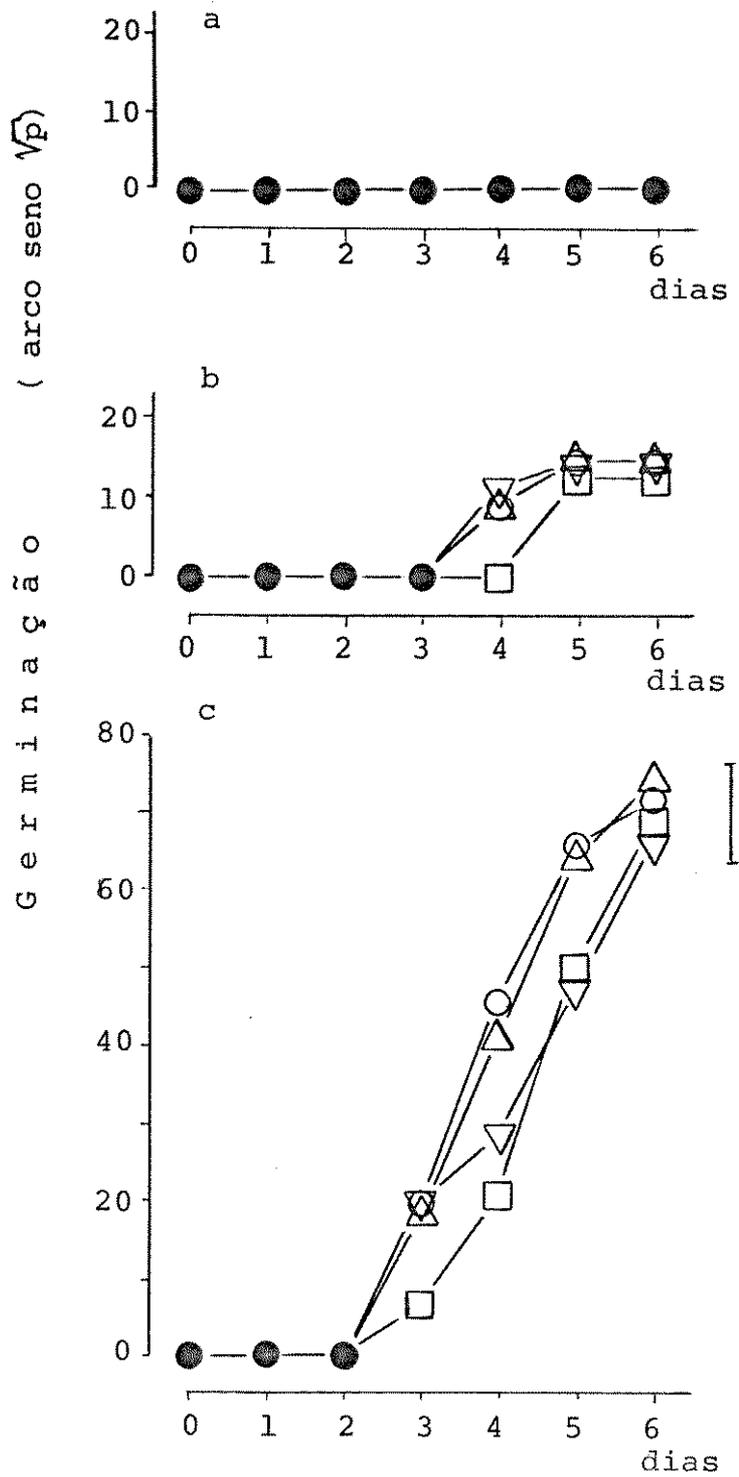


Figura 24 - Efeito de GA₃ exógeno na germinação de sementes imaturas secas de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce

a - classe 3 b - classe 4 c - classe 5

○ controle △ 10⁻⁴M □ 3.10⁻⁴M ▽ 6.10⁻⁴M

● valores coincidentes

Barras verticais representam a DMS Tukey com $p \leq 5\%$

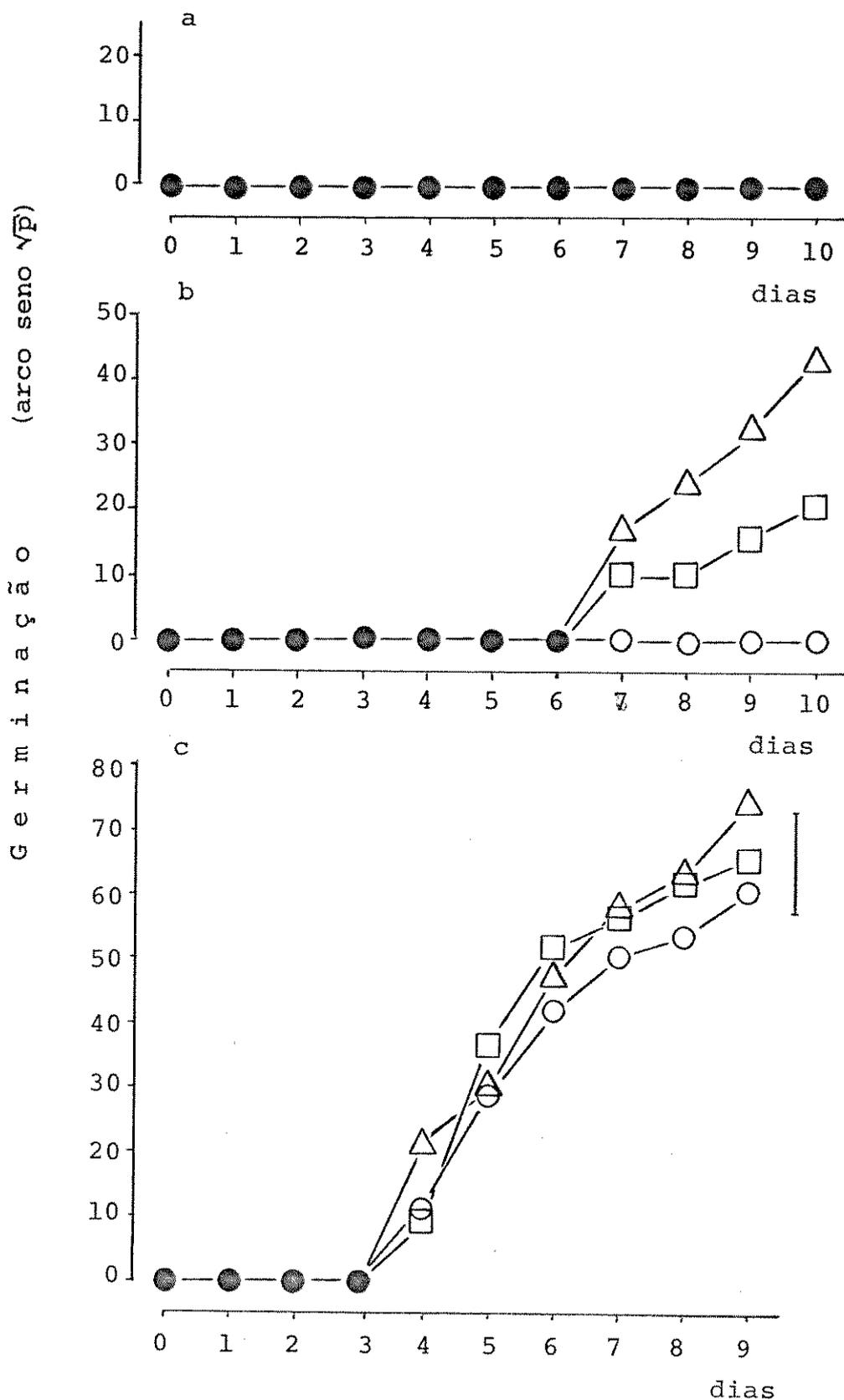


Figura 25 - Efeito de 6BA exógeno sobre a germinação de sementes imaturas recém-colhidas de *Phaseolus vulgaris* cv. Goiano Precoce

a - classe 3

b - classe 4

c - classe 5

○ controle

□ $10^{-4}M$

△ $10^{-3}M$

● valores coincidentes

Barras verticais representam a DMS Tukey com $p \leq 5\%$

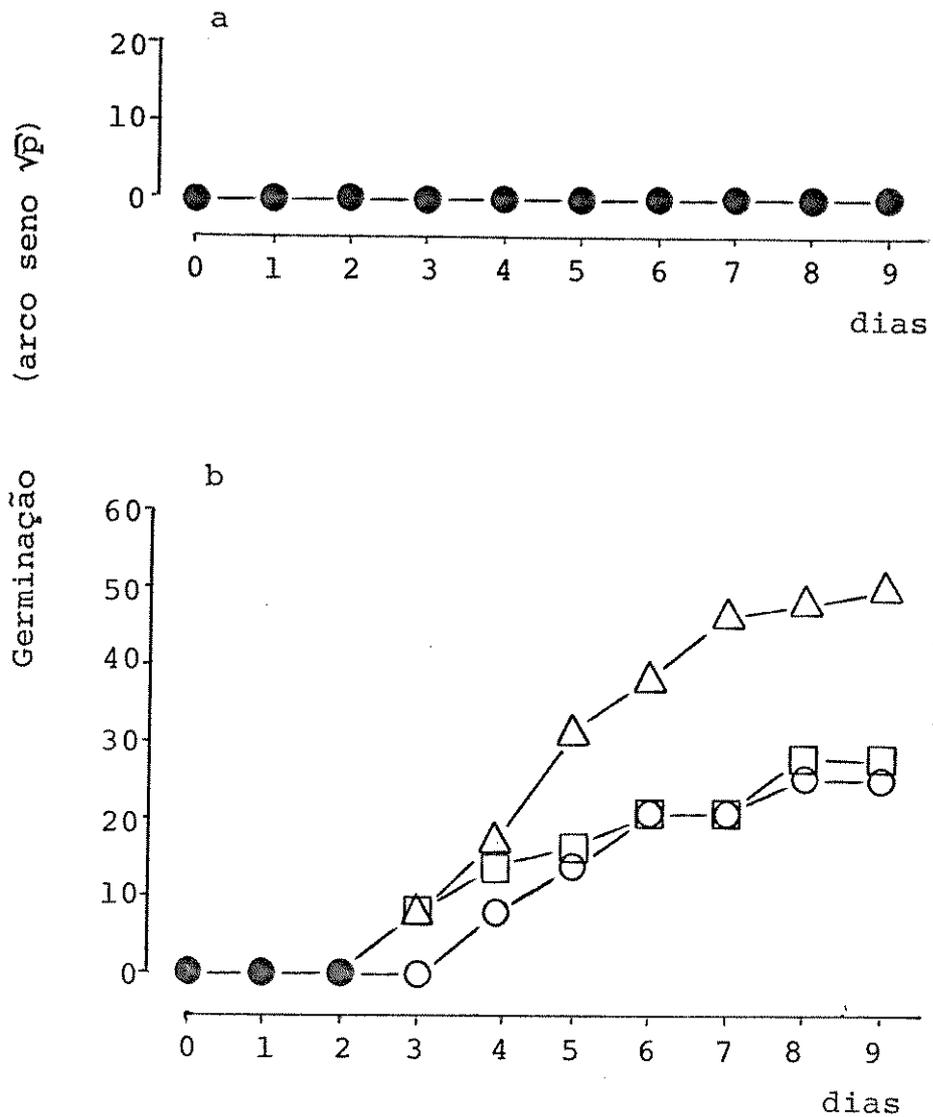


Figura 26 - Efeito de 6BA na germinação de sementes imaturas secas de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce

○ - controle □ $10^{-4}M$ △ $10^{-3}M$ ● valores coincidentes

a-classe 3 b - classe 4

Barra vertical representa a DMS Tukey com $p \leq 5\%$

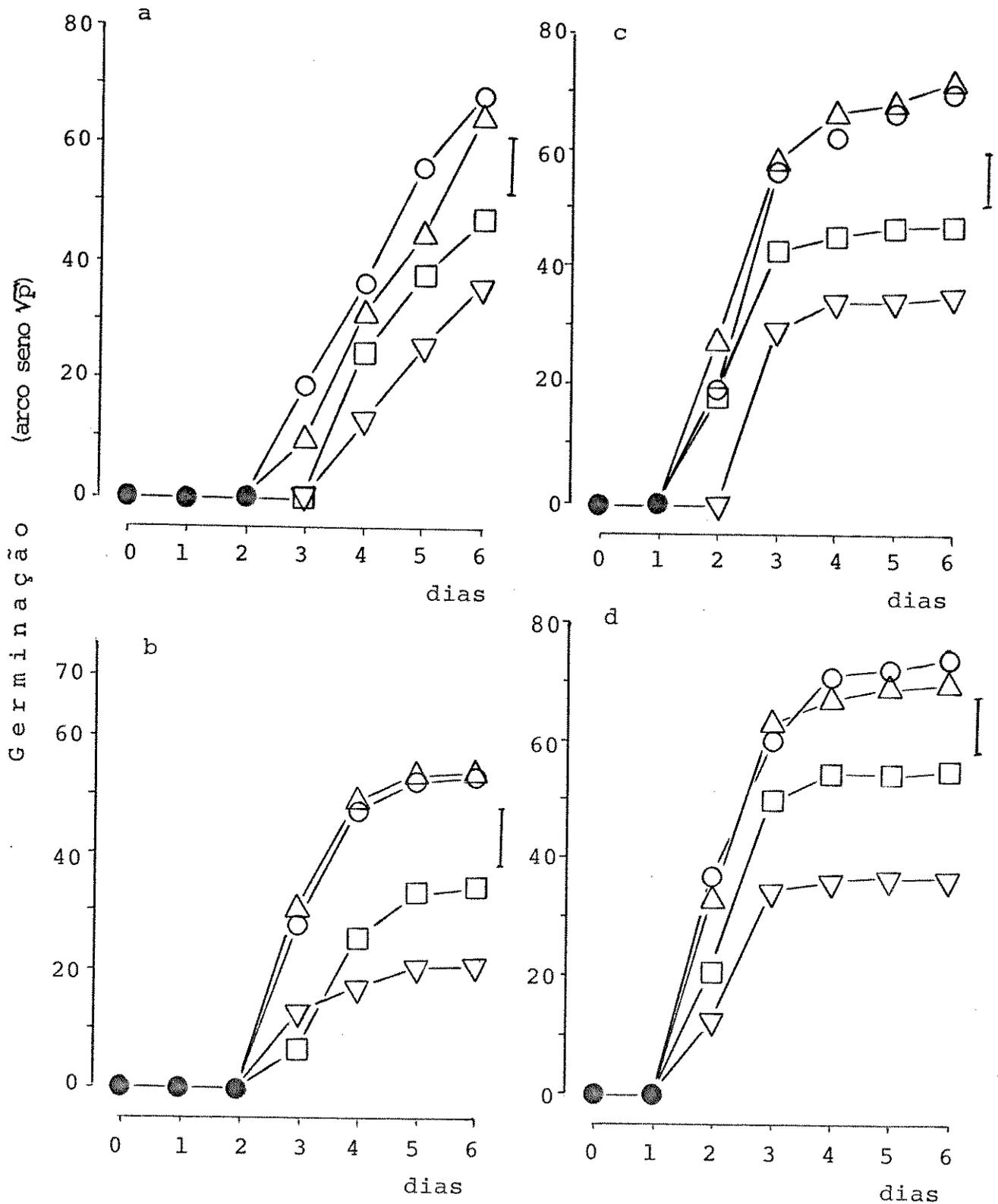


Figura 27 - Efeito de ABA exôgeno na germinação de sementes imaturas de *Phaseolus vulgaris* cv. Goiano Precoce

a - Classe 5 recém-colhida

b - Classe 5 seca

c - Classe 6 recém colhida

d - Classe 6 seca

○ controle △ 10⁻⁴M □ 3.10⁻⁴M ▽ 6.10⁻⁴M ● valores coincidentes

Barras verticais representam a DMS Tukey com $p \leq 5\%$

desenvolvimento, durante a embebição.

Para verificar a existência de barreiras para a germinação de sementes imaturas a nível de mobilização de reservas para o crescimento do embrião, foi feita a análise da atividade amilolítica em sementes imaturas que não germinam e naquelas que já possuem a capacidade de germinação, comparando-se os níveis de atividade amilolítica aí encontrados com os de sementes maduras.

Sementes nas classes 3 e 4 (figuras 28a e b respectivamente), têm atividade amilolítica baixa quando comparadas com a atividade em sementes na classe 5 e sementes maduras, durante todo o período de embebição avaliado.

Sementes imaturas na classe 5 mostram atividade amilolítica inferior à de sementes maduras, com um pico de atividade ocorrendo com 30 horas de embebição. O pico de atividade observado, em sementes neste estágio de desenvolvimento, com 106 horas de embebição é provavelmente decorrente da mobilização de reservas após a protrusão da radícula, uma vez que sementes neste estágio germinam a partir de 96 horas aproximadamente.

É interessante notar que sementes recém-colhidas (zero horas de embebição) mostram atividade amilolítica alta, significando que esta enzima já está presente neste estágio de desenvolvimento, antes das sementes serem colocadas em condições de germinação (figura 28c).

Em sementes maduras (classe 9) um pico de atividade amilolítica ocorre com 18 horas de embebição. A partir de 30 horas, o aumento de atividade deve ser atribuído à mobilização de reservas após a protrusão da radícula, uma vez que estas sementes germinam a partir de 30 horas de embebição aproximadamente. Nesta

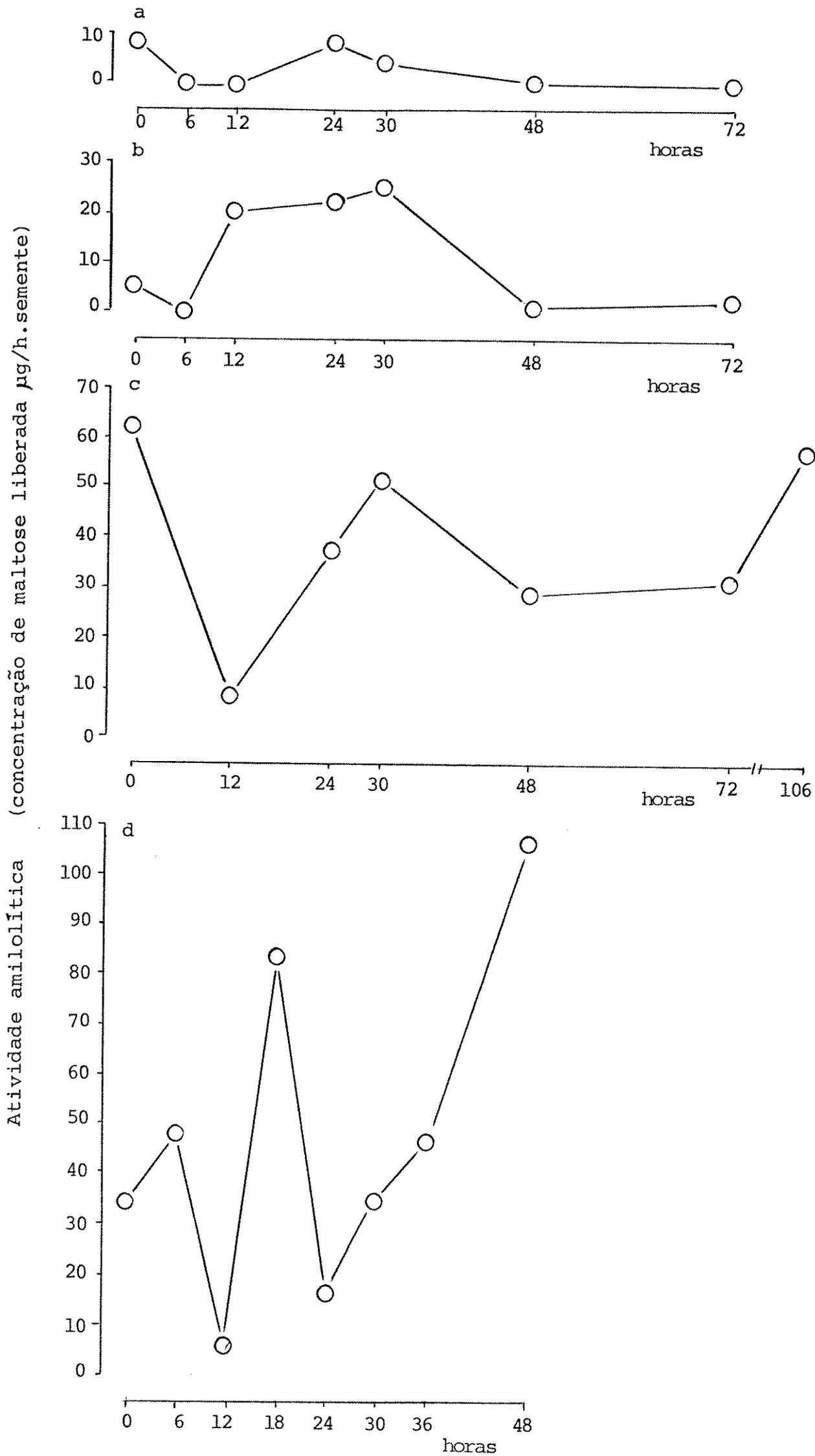
Figura 28. Atividade amilolítica em sementes recém-colhidas de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce em diferentes estádios de desenvolvimento

a - classe 3

b - classe 4

c - classe 5

d - classe 9



classe, a atividade amilolítica em sementes não embebidas é tam
bém relativamente alta mostrando que esta enzima já está presen
te (figura 28d)

A curva padrão mostra a linearidade de resposta obtida en
tre absorvância e concentração de maltose (figura 29).

7. Efeito de 6BA sobre a atividade amilolítica

Na tentativa de se verificar se o efeito promotor de 6BA na germinação está associado à estimulação da atividade enzimática, foi feita a análise da atividade amilolítica em sementes imaturas recém-colhidas, colocadas para germinar em presença de 6BA nas concentrações testadas na germinação.

Na figura 30 pode-se observar que a concentração de $10^{-3}M$ de 6BA aumentou de forma estatisticamente significativa, a atividade amilolítica em sementes imaturas recém-colhidas. Esta promoção na atividade, que não chega a ser comparável com as atividades encontradas em sementes nos estádios mais avançados de desenvolvimento, é observada em sementes na classe 3 com 30 horas de embebição (figura 30a) e na classe 4 a partir de 24 horas (figura 30b).

8. Capacidade reprodutiva de plantas provenientes de sementes imaturas

Para avaliar o efeito do estágio de desenvolvimento da semente na capacidade reprodutiva das plantas que elas originam,

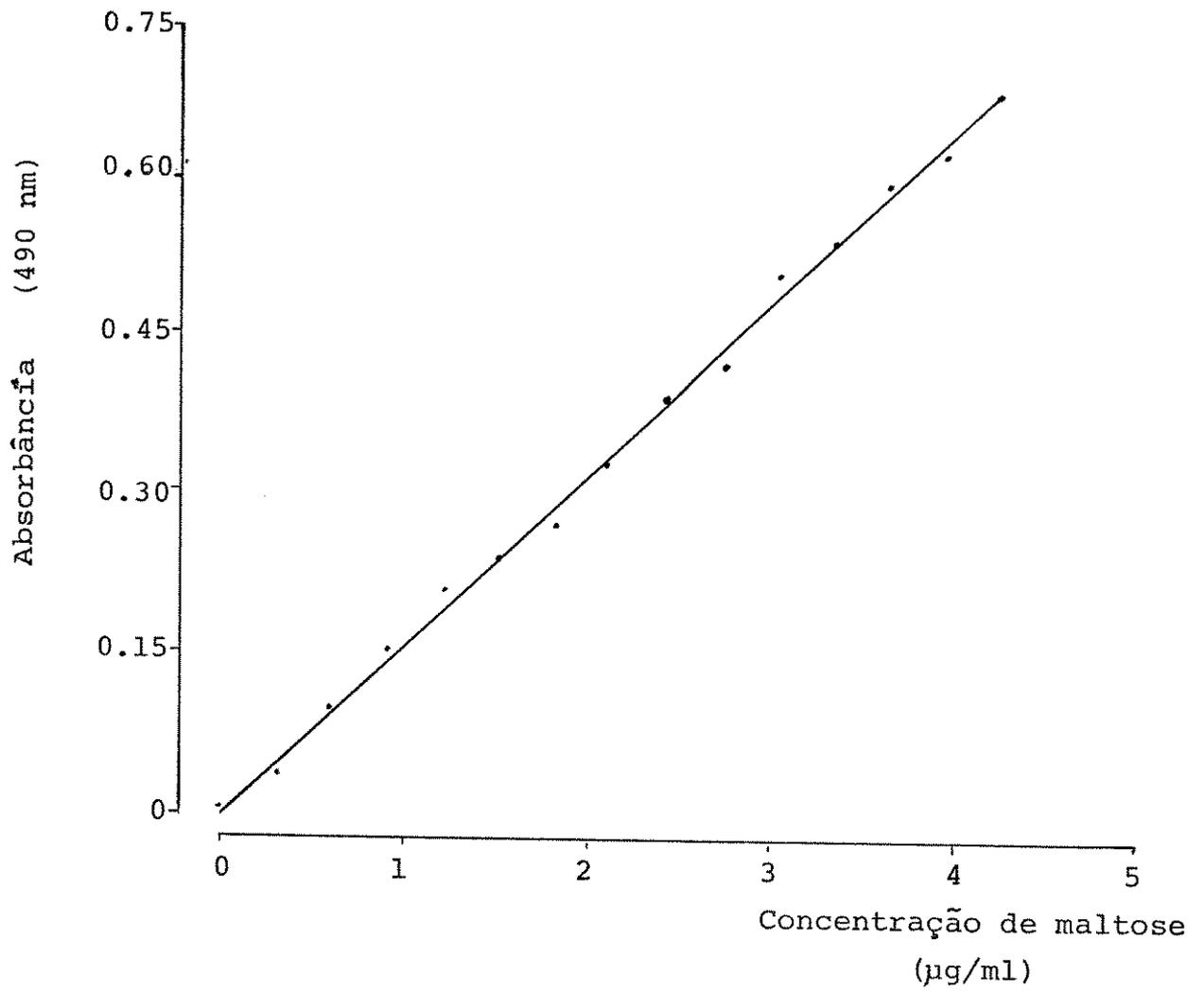


Figura 29 - Curva padrão de maltose

acompanhou-se o desenvolvimento medindo-se parâmetros indicativos desta capacidade reprodutiva como: nº de dias para o início da floração medido através de observação da ântese, nº de flores por planta, nº de vagens maduras por planta, nº de sementes por vagem e peso fresco médio destas sementes.

A tabela 8 mostra que o tempo necessário para o início da floração não é influenciado pelo grau da semente que deu origem às plantas.

As sementes nos estádios de desenvolvimento correspondentes às classes 8 e 9, dão origem a plantas cujo nº de flores / planta é significativamente maior do que o de plantas provenientes de sementes imaturas nos estádios de desenvolvimento correspondentes às classes 5 e 6 (figura 31a). A análise estatística, considerando a curva de regressão linear ajustada, mostra que o nº de flores produzido por planta, a partir de plantas provenientes de sementes na classe 6, aumenta à medida que a semente que lhe deu origem avança em direção à maturidade (figura 31b).

Resultado semelhante observa-se com relação ao nº de vagens por planta, onde a análise de variância não detecta diferenças significativas entre o nº de vagens produzido por plantas provenientes de sementes nos diferentes estádios de desenvolvimento (figura 31c). Entretanto, a análise considerando a regressão linear ajustada indica que o nº de vagens/planta aumenta, porém de forma menos acentuada que o nº de flores/planta, à medida que a semente que lhe deu origem avança em direção à maturidade (figura 31d).

A figura 32a mostra que o nº de sementes/vagem produzido por plantas, não é, aparentemente, influenciado pelo grau de maturidade da semente que a origina. A análise estatística acusou

Tabela 8 - Número de dias para o início da floração em plantas provenientes de sementes de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce em diferentes estádios de desenvolvimento

Classes	5	6	7	8	9
Número de dias para a floração	32	30	31	32	31

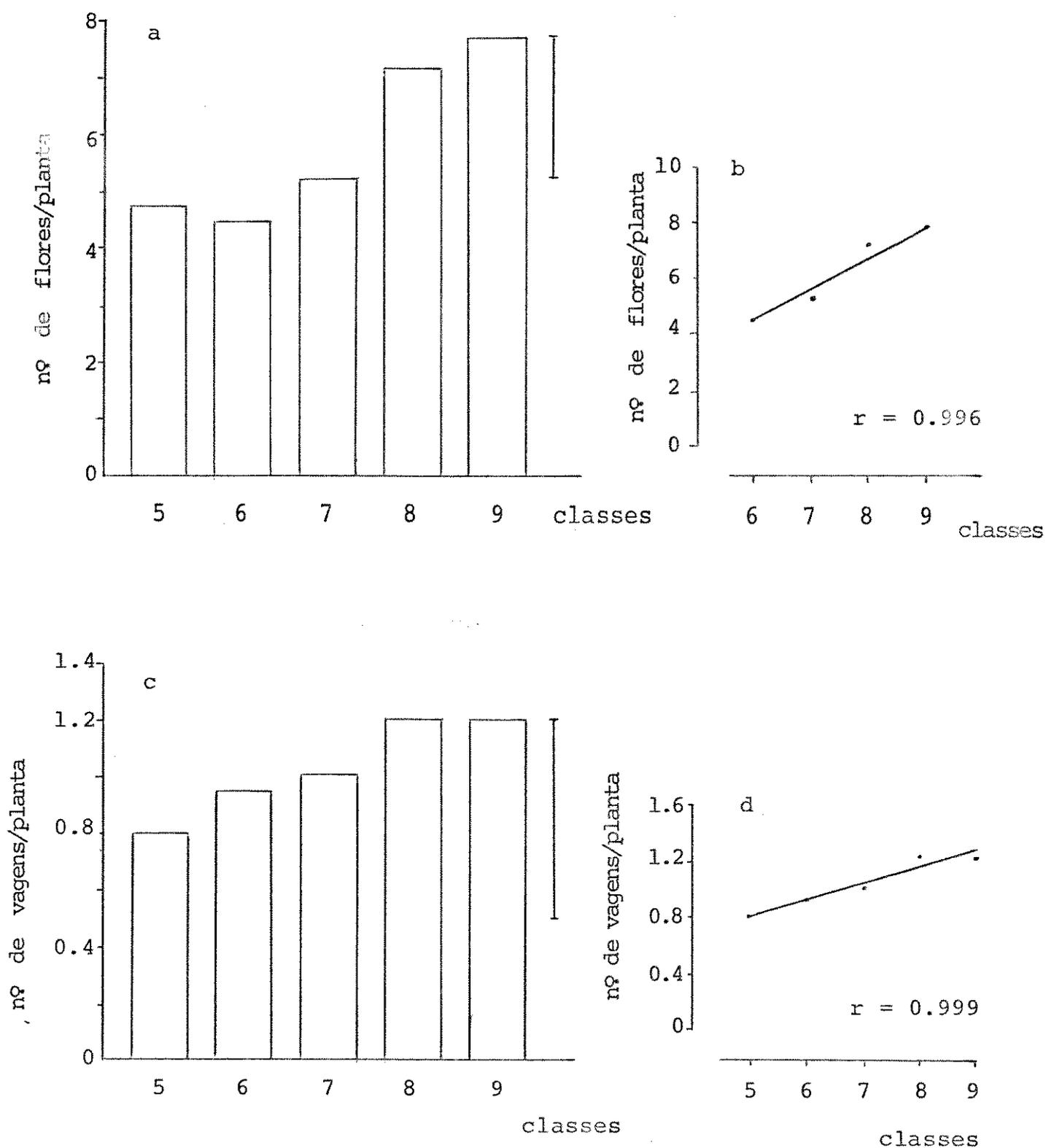


Figura 31 - Capacidade reprodutiva de plantas provenientes de sementes imaturas de *Phaseolus vulgaris* cv. Goiano Precoce

a - nº de flores/planta

b - nº de flores/planta (regressão)

c - nº de vagens/planta

d - nº de vagens/planta (regressão)

Barras verticais indicam a DMS Tukey com $p \leq 5\%$

Figura 32. Capacidade reprodutiva de plantas provenientes de sementes de Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce

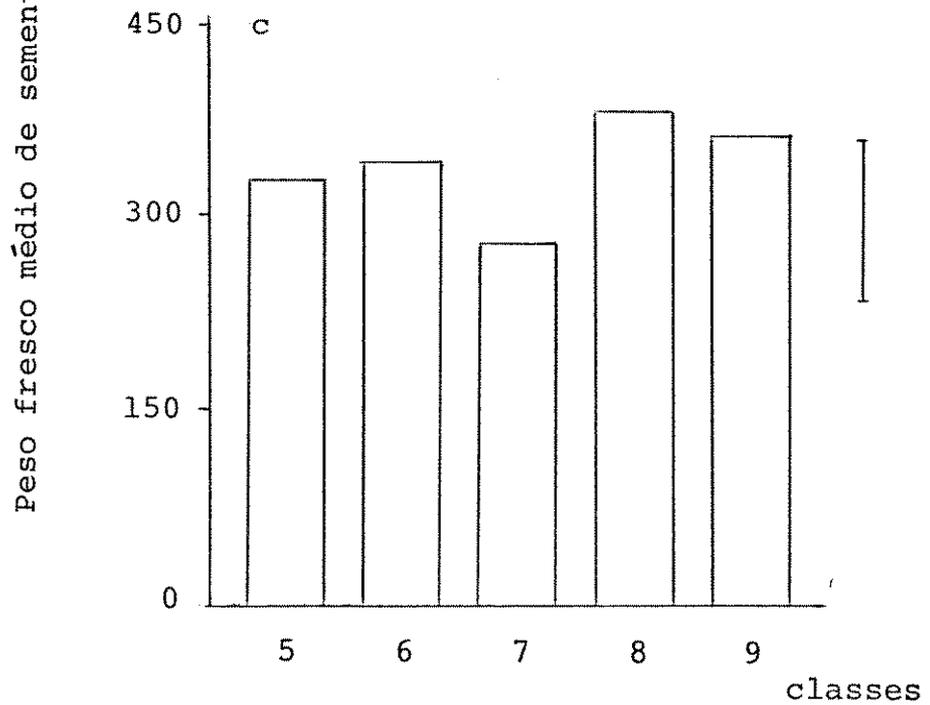
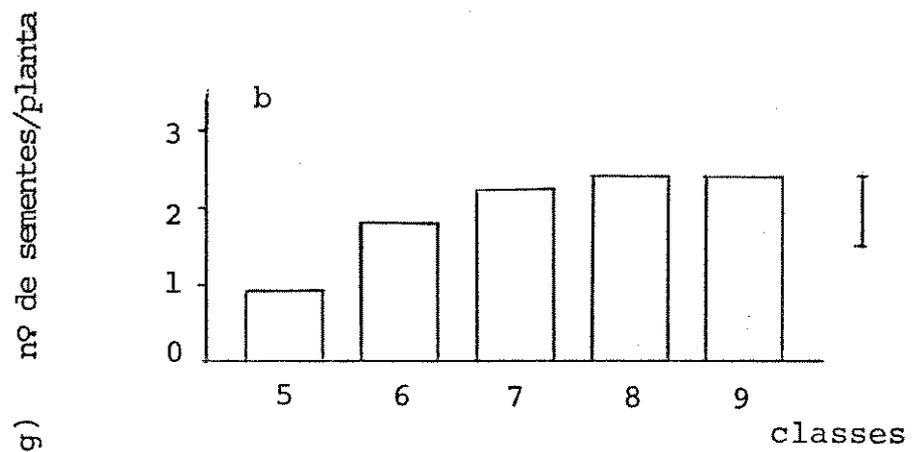
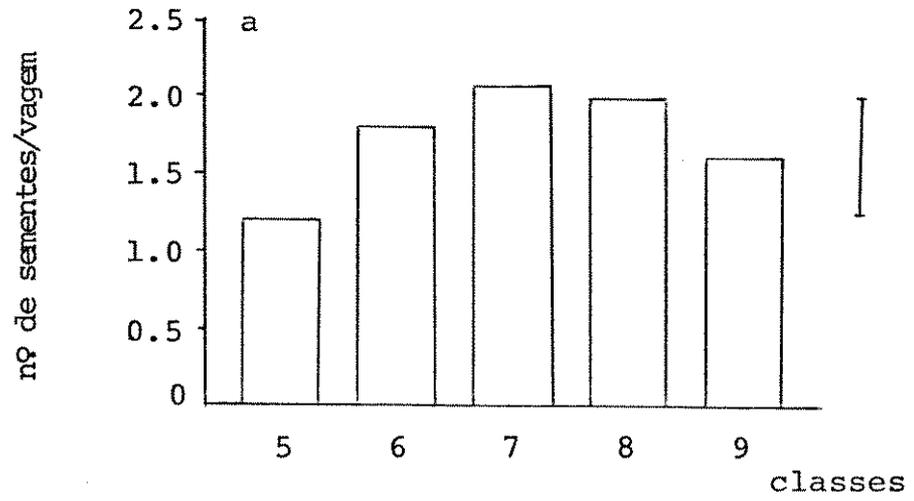
a - nº de sementes/vagem

b - nº de sementes/planta

c - Peso fresco de sementes

Barras verticais representam a DMS Tukey com

$p \leq 5\%$



diferenças significativas entre os valores observados nas classes 5 e 7. Entretanto, sementes maduras (classe 9) deram origem a plantas cujo nº de sementes/vagem não difere do observado em plantas provenientes de sementes imaturas na classe 5.

A figura 32b mostra que o nº de sementes por planta é significativamente menor em plantas provenientes de sementes imaturas na classe 5. A partir da classe 6 até o final do processo de desenvolvimento, não são observadas diferenças significativas com relação ao nº de sementes/planta.

O peso fresco de sementes provenientes destas plantas, não sofre influência do estágio de maturidade da semente que a origina. A variação observada entre o peso fresco destas sementes não é estatisticamente significativa (figura 32c).

IV. DISCUSSÃO

Algumas mudanças que ocorrem durante o desenvolvimento de frutos e sementes podem ser utilizadas para se caracterizar índices de idade fisiológica. O uso destes índices para se definir estádios de desenvolvimento fisiológico é extremamente convenien-te, principalmente sob condições naturais onde se torna difícil usar a idade cronológica como uma medida reproduzível. Índices de idade fisiológica baseados no comprimento e/ou morfologia de frutos e sementes têm sido frequentemente utilizados para se caracterizar estádios de desenvolvimento de sementes (Walbot et al., 1972; Adams e Rinne, 1980; Sanklla e Chawan, 1980).

No caso de Phaseolus vulgaris cv. Goiano precoce, os estãdios de desenvolvimento fisiológico foram caracterizados pela associação do comprimento com características morfológicas das sementes. Esta associação é necessária uma vez que nenhum dos parâmetros avaliados sofre modificações durante todo o período de desvolvimento. Nas etapas iniciais, as principais modificações observadas estão relacionadas ao comprimento das sementes, com pouca ou nenhuma variação nos demais aspectos morfológicos. Em estãdios mais avançados de desenvolvimento, enquanto o comprimento se mantém constante ou diminui, as frequentes variações na coloração e pigmentação das sementes são mais adequadas para se estimar a idade fisiológica. A associação de diferentes parâmetros, além disso, permite maior segurança e precisão na caracterização do estádio fisiológico de desenvolvimento das sementes

Sementes imaturas recém-colhidas de Phaseolus vulgaris não germinam durante os estádios iniciais de desenvolvimento. A capa

cidade de germinação é adquirida antes das sementes terem atingido o ponto de máximo acúmulo de matéria seca, sendo que aparentemente, a capacidade de germinação aumenta à medida que a semente avança em direção aos estádios finais de desenvolvimento.

Comportamento semelhante com relação à capacidade de germinação de sementes imaturas tem sido observado em outras cultivares de feijão (Sanklla e Chawan, 1980; Adams e Rinne, 1980) e em soja (Obendorf et al., 1980). Segundo estes autores, a máxima capacidade de germinação é exibida na maturidade fisiológica, resultado que não está de acordo com os aqui obtidos, uma vez que sementes com máximo peso seco mostram capacidade de germinação ainda inferior à de sementes no estágio final de desenvolvimento sugerindo, portanto, que o máximo acúmulo de matéria seca não é o fator limitante para a máxima capacidade de germinação de sementes imaturas.

Foi encontrado tanto em sementes intactas (Onckelen et al., 1980) como em embriões isolados (Walbot et al., 1972) imaturos de feijão que a velocidade de germinação aumenta gradativamente a medida que a semente avança em direção à maturidade. Na cultivar Goiano precoce, em sementes recém-colhidas, foi evidenciada a existência de três faixas de tempo médio de germinação. Sementes em estágio mais imaturo (classe 5) germinam lentamente. A velocidade de germinação aumenta em sementes nos estádios intermediários de desenvolvimento (classe 6, 7 e 8), sendo a maior velocidade obtida em sementes maduras (classe 9).

A desidratação artificial das sementes imaturas, reduzindo o teor de umidade a níveis equivalentes ao de sementes maduras, modificou tanto a capacidade como a velocidade de germina-

ção de sementes imaturas. Assim, sementes em estádios de desenvolvimento que não são capazes de germinar quando recém-colhidas germinam após a desidratação artificial. Em sementes nos demais estádios nos quais as recém-colhidas germinam, mas em porcentagem e velocidade inferiores às sementes maduras, tanto a capacidade quanto a velocidade de germinação foram iguais às de sementes maduras.

Estes dados mostram que o processo de desidratação não é essencial para a germinação visto que sementes imaturas recém-colhidas germinam. No entanto a sua importância é bastante grande pois, tanto a capacidade como a velocidade de germinação de sementes são promovidas através deste processo.

A importância da desidratação na capacidade de germinação de sementes imaturas foi também mostrada por Adams e Rinne, 1980. Os autores sugeriram que o efeito promotor da desidratação artificial sobre a capacidade de germinação de sementes imaturas de soja, em diferentes estádios de desenvolvimento, seria através da imposição do processo de maturação nas sementes.

A desidratação artificial que favoreceu a germinação de sementes imaturas em determinados estádios de desenvolvimento, reduziu de forma acentuada o nível de giberelinas livres nestas sementes, sugerindo que a germinação de sementes imaturas seria favorecida por baixos níveis destas substâncias. No entanto as variações nos níveis endógenos de giberelinas em sementes recém-colhidas não corroboram esta hipótese, dado que níveis altos e comparáveis de giberelinas estão presentes tanto em sementes que não germinam (classes 3 e 4) como naquelas em que a capacidade de germinação é alta (classe 5). Além disto, a redução na atividade destas substâncias em sementes a partir da classe

6, não é acompanhada por uma mudança significativa na capacidade de germinação.

A análise conjunta destes dados sugere que, provavelmente, estas giberelinas não estão diretamente envolvidas no processo de germinação de sementes imaturas.

Outras evidências neste sentido vêm de experimentos com GA₃ exógeno. Neste caso foi mostrado que GA₃ não tem efeito promotor na germinação de sementes em diferentes estádios de desenvolvimento. Por outro lado, os altos níveis de giberelinas encontrados coincidem com o período de alta taxa de crescimento de sementes sugerindo, como foi também sugerido por outros autores (Corcoram e Phynney, 1962; Carr e Skene, 1961; Phynney e West, 1960; Skene, 1970), que as giberelinas nas sementes em desenvolvimento estão relacionadas com este processo durante o curso normal da embriogênese. O fato da desidratação artificial, que interrompe o processo normal de desenvolvimento das sementes, reduzir o nível de giberelinas biologicamente ativas pode ser considerada como uma evidência a favor desta hipótese.

Aparentemente ocorre uma mudança qualitativa de giberelinas durante o desenvolvimento das sementes. O grupo de substâncias giberelínicas detectadas nos estádios iniciais na faixa entre os Rfs 0,3 e 0,6 (classes 3, 4 e 5) não está presente em sementes na classe 6, a níveis estatisticamente significativos, observando-se na classe 7 a atividade giberelínica que pode corresponder a um novo grupo destas substâncias, dado a sua localização na faixa entre os Rfs 0,6 e 0,8. A ausência de atividade giberelínica, em níveis estatisticamente significativos, em sementes na classe 6 poderia ser explicada considerando -se

que nesta fase do desenvolvimento estão ocorrendo modificações qualitativas e quantitativas nesse grupo de substâncias marcando uma transição onde teríamos uma redução na atividade giberelínica e simultaneamente a ocorrência da transformação das giberelinas presentes nos estádios iniciais de desenvolvimento e naquelas encontradas nas etapas posteriores.

A outra possibilidade que se apresenta é uma redução no nível de giberelinas presentes nos estádios iniciais e a simultânea síntese de giberelinas presentes nos estádios posteriores, atingindo estas, níveis detectáveis somente a partir da classe 7.

Citocininas endógenas detectadas em sementes durante o desenvolvimento parecem não estar diretamente envolvidas com a capacidade de germinação de sementes imaturas tanto recém-colhidas como secas artificialmente uma vez que níveis relativamente altos de citocininas são encontrados, em ambas as condições, em sementes imaturas que não germinam (classe 3). Em sementes que apresentam uma baixa capacidade de germinação foram detectados níveis mais baixos destas substâncias (classe 4 - sementes secas), não tendo sido encontradas citocininas, a níveis estatisticamente significativos, em sementes com alta capacidade de germinação ou germinação máxima. Além disso a desidratação artificial que promove a velocidade e/ou capacidade de germinação, não alterou o nível de atividade citocinínica em sementes imaturas.

Níveis de citocininas mais altos em sementes imaturas do que os níveis observados em sementes em estádios mais avançados de desenvolvimento foram também encontrados por Burrows

e Carr (1970).

Apesar da análise do nível endógeno de citocininas em sementes imaturas não ter fornecido evidências para a participação deste grupo de hormônios na germinação, a aplicação de 6BA promoveu significativamente a germinação de sementes imaturas. Foi promovida a germinação tanto de sementes que, na ausência de 6BA não germinam (classe 4 - sementes recém-colhidas), como em sementes que apresentam baixa capacidade de germinação (classe 4 - sementes secas artificialmente), sugerindo que citocininas podem estar envolvidas com o controle da germinação de sementes imaturas. Uma possível explicação é que as citocininas detectadas em sementes durante o desenvolvimento estejam envolvidas com a regulação deste processo como foi sugerido para sementes de ervilha por Burrows e Carr (1970). As citocininas envolvidas com o processo de germinação seriam sintetizadas ou liberadas durante a embebição.

Metivier e Paulilo (1980) mostraram que, em sementes maduras de Phaseolus vulgaris, o nível endógeno de citocininas aumentou durante as primeiras 20 horas de embebição indicando que este hormônio está presente durante as etapas iniciais de germinação. Segundo Van Staden (1973), as citocininas são ativamente metabolizadas durante a germinação de sementes. Nos estádios precoces de germinação, citocininas seriam convertidas de uma forma inativa para uma forma ativa. Em sementes de café (Válio, 1976), foi observado que cinetina promove a germinação estimulando o crescimento da radícula.

Vários trabalhos com diferentes espécies têm atribuído ao ABA um importante papel na regulação de germinação de sementes imaturas. Vários autores têm sugerido que os altos níveis de

ABA, em sementes em desenvolvimento, são responsáveis pela inibição da germinação precoce de sementes e embriões isolados e pela prevenção da germinação prematura dentro do fruto. A capacidade de germinação de sementes isoladas em estádios mais avançados de desenvolvimento seria possível devido a uma redução na atividade deste inibidor durante a maturação (King, 1976; Dure, 1975; Eeuwens e Schwabe, 1975; Quebedeaux, 1976; Onckelen et al., 1980).

Analisando-se o nível endógeno de ABA com relação à germinação de sementes imaturas pode-se observar que em sementes recém-colhidas, os maiores níveis de atividade deste inibidor ocorrem em sementes cuja capacidade e/ou velocidade de germinação são inferiores às de sementes maduras (classes 5,6 e 7). A desidratação, que aumenta a capacidade e/ou velocidade de germinação destas sementes, reduz significativamente o nível de ABA. Em estádios anteriores a relação não é tão clara. Em estádios iniciais de desenvolvimento (classes 3 e 4) os níveis de ABA são baixos e apesar da desidratação artificial reduzir o nível endógeno de ABA em sementes na classe 3, estas sementes não germinam. Na classe 4 o pequeno aumento na capacidade de germinação de sementes secas não é acompanhado pela redução no nível endógeno de ABA com a desidratação, a nível significativo, sugerindo que a incapacidade de germinação de sementes imaturas nos estádios iniciais de desenvolvimento deve estar relacionada a outros fatores que não a presença de ABA.

Os resultados obtidos com relação ao efeito de ABA exógeno em sementes imaturas, confirmam a hipótese da função inibidora deste hormônio na germinação de sementes imaturas.

Estes dados corroboram a hipótese anteriormente descrita

na literatura, que durante o desenvolvimento, os altos níveis de ABA previnem a germinação prematura da semente dentro do fruto (Dure, 1975; Onckelen et al., 1980; Quebedeaux, 1976; King, 1976). Assim sementes imaturas isoladas nos estádios de desenvolvimento a partir da classe 5 são capazes de germinar, porém a sua capacidade e/ou velocidade de germinação são inferiores à de sementes maduras provavelmente devido ao seu alto nível de ABA.

Aparentemente a partir da classe 5, a capacidade e/ou velocidade de germinação de sementes imaturas aumenta à medida que diminui o nível de ABA em sementes durante o desenvolvimento.

Onckelen et al. (1980), trabalhando com Phaseolus vulgaris cv. Limburg, mostraram que sementes adquirem a capacidade de catabolizar ABA durante o desenvolvimento e uma vez isoladas, são capazes de germinar com maior ou menor velocidade dependendo do nível inicial de ABA na semente. Os autores mostraram ainda que sementes imaturas com um alto nível de ABA inicial (532 ng/semente) germinaram após 5 dias de embebição, quando o nível de ABA havia sido reduzido a 35 ng/semente.

A desidratação artificial de sementes, a partir de determinado estágio de desenvolvimento, favorece a germinação reduzindo drasticamente o nível de ABA em sementes imaturas sugerindo que a desidratação natural que ocorre durante o desenvolvimento possa atuar de forma idêntica na fase final de desenvolvimento das sementes.

A incapacidade de germinação de sementes imaturas em estádios iniciais de desenvolvimento pode estar relacionada com a falta de enzimas hidrolíticas ou de atividade enzimática que

possibilite a mobilização de reservas para o crescimento do embrião. A análise da atividade amilolítica mostrou que em sementes imaturas que não germinam, a atividade é baixa quando comparada à atividade em sementes imaturas que germinam e à de sementes maduras, durante todo o período de embebição. Em sementes imaturas que germinam (classe 5), porém com capacidade e velocidade de germinação inferiores à de sementes maduras, a atividade amilolítica foi consideravelmente maior, embora ainda inferior à atividade observada em sementes maduras.

Um pico de atividade amilolítica em sementes maduras é observado com 18 horas de embebição, antes da protrusão da radícula, que ocorre nestas sementes ao redor de 30 horas de embebição. Em sementes imaturas que germinam a partir de 96 horas (classe 5), o pico de atividade anterior à protrusão da radícula ocorre com 30 horas de embebição.

Onckelen et al. (1980), mostraram que o início da atividade amilolítica em cotilédones destacados de feijão foi consideravelmente retardada na presença de ABA exógeno. Os autores sugerem que os altos níveis de ABA em sementes em desenvolvimento, seriam responsáveis pela prevenção tanto da hidrólise prematura de amido como da germinação precoce.

O atraso no início da germinação assim como no pico de atividade amilolítica em sementes imaturas na classe 5 pode estar relacionado, portanto, com o alto nível de ABA encontrado nestas sementes. Esta hipótese, entretanto, necessita de evidências complementares uma vez que em sementes neste estágio de desenvolvimento, a atividade amilolítica medida em sementes não embebidas (recém-colhidas) foi surpreendentemente alta.

O efeito promotor de citocininas sobre a atividade a-

amilolítica foi mostrado em várias dicotiledôneas (Gepstain e Ilan, 1970; Locker e Ilan, 1975; Metivier e Paulilo, 1980). Assim é possível que a promoção da germinação de sementes imaturas por 6BA seja devida a uma promoção na atividade amilolítica nessas sementes na fase anterior à protrusão da radícula. A concentração de 6BA que mostrou maior efeito promotor na germinação de sementes na classe 4, recém-colhidas, promoveu significativamente a atividade amilolítica após 24 horas de embebição destas sementes.

Apesar destes resultados sugerirem que citocininas estimulam a germinação promovendo a atividade amilolítica, este não parece ser o único processo envolvido no controle da capacidade de germinação de sementes em estádios iniciais de desenvolvimento. O 6BA promove a atividade amilolítica em sementes na classe 4, porém, em níveis inferiores aos encontrados em sementes em estádios mais avançados de desenvolvimento e aos observados em sementes maduras.

Por outro lado, o efeito promotor de 6BA sobre a germinação de sementes imaturas na classe 4 não foi suficiente para igualar a capacidade de germinação destas sementes à de sementes em estádios mais avançados de desenvolvimento. A incapacidade de síntese de citocininas que promovam a síntese ou a atividade amilolítica associada a uma insuficiente quantidade de reservas na semente e a uma possível inoperância de outros sistemas enzimáticos envolvidos na mobilização de reservas como proteínas e lipídios podem ser alguns dos fatores limitantes para a germinação em sementes neste estágio de desenvolvimento.

Em sementes na classe 3, o ligeiro aumento da atividade amilolítica por 6BA, observado com 30 horas de embebição, não

correspondeu a uma promoção da germinação de sementes nesta classe. Neste caso, embora a inatividade de sistemas enzimáticos possa, por si só, impedir a germinação, uma das principais barreiras para a germinação pode ser o baixo teor de reservas acumulado nas sementes.

O grau de maturidade da semente influencia significativamente não só a sua capacidade de germinação mas também a capacidade reprodutiva das plantas a que ela dá origem. Sementes imaturas em estágio precoce de desenvolvimento (classe 5 e 6) dão origem a plantas cujo nº de flores/planta é significativamente menor que o de plantas provenientes de sementes maduras. Aparentemente o nº de flores e o nº de vagens/planta aumenta à medida que a semente que lhe deu origem avança em direção a maturidade.

É interessante notar que sementes que já atingiram o máximo peso seco (classe 6) dão origem a plantas cujo nº de flores por planta é ainda significativamente inferior ao de plantas provenientes de sementes maduras.

Este fato sugere que a influencia do grau de maturidade da semente na capacidade reprodutiva das plantas a que elas dão origem, não é devida unicamente a insuficiência de material de reserva nas sementes que lhe deram origem. O desenvolvimento precário das plantas afetando a capacidade de reprodução é nitidamente observado em plantas provenientes de sementes na classe 5, enquanto que plantas provenientes de sementes na classe 6 mostram desenvolvimento geral comparável ao de plantas de sementes maduras.

O número de sementes produzido pelas plantas mostra o mesmo padrão observado com relação ao nº de flores/planta e

nº de vagens por planta. A maior redução na produtividade sendo observada em plantas provenientes de sementes na classe 5.

Pereira (1978), mostrou que o nº de flores por planta, assim como o nº de sementes por vagem é drasticamente reduzido em plantas submetidas a deficiência nutricional. Este fato pode explicar a baixa capacidade reprodutiva de plantas provenientes de sementes na classe 5, uma vez que sementes neste estágio de desenvolvimento ainda não adquiriram o seu conteúdo máximo de reservas.

Plantas provenientes de sementes na classe 6, apesar da redução significativa no nº de flores/planta e aparente no nº de vagens/planta, produzem sementes em quantidade comparável à de plantas provenientes de sementes maduras. Isto se deve provavelmente a uma menor taxa de abscisão de vagens e ao maior nº de sementes/vagem observado nestas plantas comparado à de plantas provenientes de sementes maduras. Este fato sugere a existência de um mecanismo que compensa deficiências fisiológicas que afetam determinados estádios reprodutivos mantendo a capacidade reprodutiva final das plantas.

V. RESUMO.

Sementes imaturas de Phaseolus vulgaris cv. Goiano precoce, adquirem a capacidade de germinar antes de ter sido completado o seu desenvolvimento. A desidratação completa o processo de maturação, aumentando a capacidade e a velocidade de germinação das sementes. Este processo final de maturação pode ser precocemente obtido através de desidratação artificial de sementes imaturas a partir de determinado estágio de desenvolvimento, sendo possível promover a germinação mesmo de sementes imaturas que não adquiriram seu máximo conteúdo de reservas, igualando - a a germinação de sementes maduras.

A incapacidade de germinação de sementes imaturas em estádios iniciais de desenvolvimento pode estar relacionada com a ausência de um nível mínimo de atividade de amilase ou de reservas para o crescimento do embrião.

O envolvimento de citocininas com a germinação de sementes imaturas é sugerido pelo efeito promotor de 6BA na germinação, sendo que este efeito está associado, aparentemente, com a estimulação da atividade amilolítica.

Em estádios mais avançados de desenvolvimento, a menor capacidade e/ou velocidade de germinação de sementes imaturas parece estar relacionada com os níveis endógenos de ABA. O efeito da desidratação promovendo a germinação de sementes nestes estádios de desenvolvimento, pode ser explicado através de uma drástica redução no nível de ABA.

A capacidade reprodutiva da planta é influenciada pelo grau de maturidade da semente que lhe deu origem.

A baixa capacidade reprodutiva de plantas provenientes de sementes que não atingiram seu máximo peso seco, pode ser atribuída a uma deficiência nutritiva inicial para o estabelecimento da plântula. Sementes no ponto de maturidade fisiológica (máximo peso seco) originam plantas que ainda apresentam menor nº de flores/planta, porém esta deficiência é aparentemente compensada em estádios reprodutivos posteriores.

VI. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, C.A. e RINNE, R.W., 1980. Seed maturation in soybeans (Glycine max. L. merr.) is independent of seed mass and the parent plant, yet is necessary for production of viable seeds. J. Exp. Bot. 32: 615-620.
- ADDICOTT, F.T. e LYON, T.L., 1969. Physiology of abscisic acid and related substances. Ann. Rev. Plant. Physiol. 20: 139-164.
- BACCHI, O. e FRANCO, C.M., 1960. Estudos sobre a conservação de sementes. VII. Fumo. Bragantia 19: 105-107.
- BERNFELD, P., 1955. Methods in Enzimology. S.P. Colowick and N.P. Kaplan. Academic Press Inc. N.Y.
- BEWLEY, J.D. e BLACK, M., 1978. The legacy of seed maturation. In Physiology and Biochemistry of seed dormancy and Germination. Springer-Verlag Vol. I, Berlin pp 74-114.
- BISSON, C.S. e JONES, H.A., 1932. Changes accompanying fruit development in the garden pea. Plant Physiol. 7: 91-105.
- BOULTER, D., 1981. Biochemistry of storage protein synthesis and deposition in the developing legume seed. Adv. Bot. Res. 9: 1-13.

- BROWNING, G., 1980. Endogenous cis,trans-abscisic acid and pea seed development. Evidence for a role in seed growth from changes induced by temperature. J. Exp. Bot. 31: 185-197.
- BURROWS, W.J. e CARR, D.J., 1970. Cytokinin content of pea seeds during their growth and development. Physiol. Plant. 23: 1064-1070.
- CARR, D.J. e SKENE, K.G.M., 1960. Diauxic curves of seeds with special reference to French Beans (Phaseolus vulgaris L.). Aust. J. Biol. Sci. 14: 1-12.
- CORCORAN, M.R. e PHYNNEY, B.O., 1962. Changes in amounts of gibberellins-like substances in developing seed of Echinocystis, Lupinus and Phaseolus. Physiol. Plant. 15: 252-261.
- DALE, J.E. e FELIPPE, G.M., 1968. The gibberellin content and early seedling growth of plants Phaseolus vulgaris treated with the growth retardant C.C.C. Planta 80: 288-298.
- DURE, L.S., 1975. Seed formation. Ann. Rev. Plant. Physiol. 26: 259-278.
- 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 Phaseolus vulgaris by gas chromatography and by gas chromatography-mass spectrometry. Phytochemistry 10: 1891-1908.

- EASTWOOD, D.; TAVERER, R.J.A. e LAIDMAN, D.L., 1969. Sequential action of cytokinin and gibberellic acid in wheat aleurone tissue. Nature 221: 1267.
- EFUWENS, C.J. e SCHWABE, W.W., 1975. Seed and pod wall development in Pisum sativum L. in relation to extracted and applied hormones. J. Exp. Bot. 26: 1-14
- FRANKLAND, B. e WAREING, P.F., 1960. Effects of gibberellic acid on hypocotyl growth of lettuce seedling. Nature 185: 336-356.
- GEPSTAIN, S. e ILAN, I., 1970. A promotive action of Kinetin on amylase activity in cotyledons of Phaseolus vulgaris. Plant. Cell Physiol. 11: 819-822.
- GOMES, F.P., 1960. Curso de Estatística Experimental. Vol. 2 .
Universidade de São Paulo. São Paulo, 352p.
- IHLE, J.N. e DURE, L., 1972. The developmental biochemistry of cotton seeds embryogenesis and germination. III. Regulation of the biosynthesis of enzymes utilized in germination. J. Biol. Chem. 247: 5048-5055.
- JOHANSEN, D.A., 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book Company. N.Y. and London. 523p.
- KEFELI, V.I., 1978. Principles of analysis of phytohormones and natural growth inhibitors. In Natural Plant Growth Inhibitors and Phytohormones. The Hague, Boston pp 29-31.

- KHAN, A.A., 1971. Cytokinins: Permissive role in seed germination Science 171: 853-859.
- KJNG, R.W., 1975. Absciscic acid in developing wheath grains growth and maturation. Planta 132: 43-51.
- LABOURIAU, L.G., 1967. Sobre a fisiologia da germinação das sementes de Vicia graminea Sm. Tese de livre-docência em Fisiologia Vegetal. Universidade Rural do Brasil.
- LANG, A., 1970. Gibberellins: structure and metabolism. Ann. Rev. Plant. Physiol. 21: 537-570.
- LETHAM, D.S., 1968. A new bioassay and the naturally occurring cytokinin complex. In Biochemistry and Physiology Of Plant Growth substances. F. Wightman e G. Setterfield. The Runge Press Ltd., Ottawa pp 19-23.
- LOCKER, A. e ILAN, I., 1975. On the nature of the hormonal regulation of amylase activity in cotyledons of germinating peas. Plant Cell Physiol. 16: 449-454.
- MAYER, A.M. e POLJAKOFF-MAYBER, A., 1975. The germinations of seeds. Pergamon Press, Oxford. 192p.
- MCWHA, J.A., 1975. Changes in absciscic acid levels in developing grains of (Triticum aestivum L.). J. Exp. Bot. 26: 823-827.

- METIVIER, J. e PAULILO, M.T., 1980. The utilization of cotyledonary reserves in Phaseolus vulgaris L. cv. Carioca II. The effects of 6-benziladenine and gibberellic acid upon embryonated and detached cotyledons. J. Exp. Bot. 31: 1271-1282.
- MILBORROW, B.V. e ROBINSON, D.R., 1973. Factors affecting the biosynthesis of abscisic acid. J. Exp. Bot. 24: 537-548.
- MILLER, C.O., 1958. The relationship of kinetin and red light promotion of lettuce seed germination. Plant Physiol. 33: 115-117.
- MORRIS, D.A., 1977. Germination inhibitors in developing seeds of Phaseolus vulgaris L. Z. Pflanzenphysiol. 86: 433-441.
- OBENDORF, R.L.; ASHWORTH, E.N. e RYTKO, G.T., 1980. Influence of seed maturation on germinability in soybean. Crop Sci. 20: 483-486.
- ONCKELEN, H.V.; Causbergs, R.; HOREMANS, S. e GREEF, J.A., 1980. Metabolism of abscisic acid in developing seeds of Phaseolus vulgaris L. and its correlation to germination and amylase activity. J. Exp. Bot. 31: 913-920.
- PEREIRA, M.F.D.A., 1978. Primordial development in Phaseolus. Ph.D. Thesis. University of Edinburgh.

BC/5370

- PHYNNEY, B.O. e WEST, C.A., 1960. Gibberellins as native plant growth regulators. Ann. Rev. Plant. Physiol. 11: 411-436.
- QUEBEDEAUX, B.; SWETSER, P.B. e ROWELL, J.C., 1976. Absciscic acid levels in soybean reproductive structures during development. Plant Physiol. 58: 363-366.
- REYNOLDS, T. e THOMPSON, P.A., 1973. Effects of kinetin gibberellins and () absciscic acid on the germination of lettuce (Lactuca sativa). Physiol. Plant. 28: 516-522.
- RUDNICKI, R., 1969. Studies on absciscic acid in apple seeds . Planta 86: 63-69.
- SANKLLA, R. e CHAWAN, D.D., 1980. Effects of different seed moisture levels on germination behavior of Phaseolus vulgaris AIT. Biol. Plant. 22: 388-391.
- SCALA, J.; PATRICK, C. e MACBETH, G., 1969. Gibberellic acid and castor bean fructose 1-6 diphosphatases. Phytochemistry 8: 37-44.
- SKENE, K.G.M., 1970. The gibberellins of developing bean seeds. J. Exp. Bot. 21: 236-246.

- SNEDECOR, G.W., 1962. Statistical Methods. The Iowa State University Press, U.S.A.
- SWAIN, R.R. e DEKKER, E.E., 1966. Seed germination studies I. Purification and properties of an amylase from the cotyledons of germinating pea seedlings. Biochim. Biophys. Acta. 122: 75-86.
- USBERTI, R., 1969. Estudo da germinação de sementes de limão-cravo (Citrus reticulata var. Austera Hib.- Swingle): condições de umidade e armazenamento e relações hormonais. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas.
- VÁLIO, I.F.M., 1976. Germination of coffee seeds (Coffea arabica L. cv. Mundo Novo). J. Exp. Bot. 27: 983-991.
- VAN STADEN, J., 1973. Changes in endogenous cytokins of lettuce seed during germination. Physiol. Plant. 28: 222-227.
- WALBOT, V.; CLUTTER, M. e SUSSEX, M., 1972. Reproductive development and embryogeny in Phaseolus. Phytomorfology 22 : 59-68.
- WEBB, D.P. e WAREING, P.F., 1972. Seed dormancy in Acer: endogenous germinating inhibitors and dormancy in Acer pseudoplatanus L. Planta. 104: 115-125.
- WILHANS, P.M.; ROSS, J.D. e BRADBEER, J.W., 1973. Studies in seed dormancy. VII. The abscisic acid content of the seeds and fruit of Corylus avellana L. Planta. 110: 303-310.

WOOD, T., 1955. A reagent for the detection and certain purines and pyrimidines on paper chromatograms. Nature 176: 175.

YOMO, H. e VARNER, J.E. 1973. Control of the formation of amylases and proteases in cotyledons of germinating peas. Plant Physiol. 51: 708-713.

YOUNG, J.L.; HUANG, R.C.; VANECKO, S.; MARKS, J.D. e VARNER, J. E., 1960. Conditions affecting enzyme synthesis in cotyledons of germinating seeds. Plant Physiol. 35: 288-292.