

CAROLINE MÜLLER

**EFEITO DO PACLOBUTRAZOL NA GERMINAÇÃO E
NO METABOLISMO DO ETILENO EM SEMENTES DE
Stylosanthes humilis H.B.K.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

CAROLINE MÜLLER

**EFEITO DO PACLOBUTRAZOL NA GERMINAÇÃO E NO METABOLISMO
DO ETILENO EM SEMENTES DE *Stylosanthes humilis* H.B.K.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 16 de março de 2007

Prof^a. Denise C. F. dos Santos Dias

Prof. Eduardo E. de Lima e Borges

**Prof. Fernando Luiz Finger
(Co-orientador)**

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva

**Prof. Raimundo Santos Barros
(Orientador)**

AGRADECIMENTOS

À Deus e minha família, mãe Genecy, pai Bernardo e irmãs Vanessa e Aline, pela grandiosa força concedida ao longo dessa jornada.

Aos meus inúmeros amigos, que me mantiveram firme para atingir mais um objetivo. Em especial à Luciana Barbosa, Larissa Silva e Elisa Baruffi pelo ótimo convívio e ensinamentos; ao namorado Thales Amaral e aos grandes amigos de recente convívio, Danilo Daloso e Thiago Felipe, pelo enorme encurtamento da distância e saudade. Às amigas Adriana Valente, Angelair Balbino, Juliana Valente, Alessandra Suszek, Carol Polido, pela sincera e eterna amizade; Ana Maria, Alessandra Olmedo, Magali Garcia, Vanessa Ramos, Fabíola Chagas e principalmente prof Marize Peres, Sonia Hess e Odival Faccenda pelo despertar à pesquisa e eternos ensinamentos, apoio e incentivo.

Aos inesquecíveis amigos de Dourados que, mesmo longe, são responsáveis pela persistência devido à presença em momentos alegres e tristes e, sobretudo, às valiosas lembranças. Angelair, Carol Castelli, Carol Polido, Alexssandra, Bete Nugoli, Alexandre, Vitor Regiani, Vinícius, Genifer, Micheli, Valdinei, Jhoy Leite, Thales, colegas inesquecíveis. Alessandra, Manoela, Gabi Asmus, Maria Augustha, Karimi Gebara, Fabíola Braun, Raquel Soccol, Tati Chiosini, Toko, Paula Amorim, Vitor Detomini, Fernanda Godoy, amigos de infinito apoio e descontração. Deisy Cardoso, Denise e Paola, grandes amigas de estágio. Diovanny, Thiago e Tati Carnevalli, Natalia, André Rech, André Ricco e Carol, Glauber e Ani Hellen, Danilo, Thiago e Lívia, Carla, Carol Portela, Rodrigo Guavira, Luciano, Vitor Galletti, Thalita, Zildamara, Clayton e Vanessa, Hermano, Carlos Dobes, pelo companheirismo, cumplicidade e apoio.

Aos professores da graduação, por serem meus maiores exemplos, Marize Peres, Alaíde Baruffi, Zefa Valdivina, Mônica Moraes, Leila Clemente, Valter Alves, Alan Sciamarelli, José Benedito Balestieri, Cristina Balestieri, Angela Canesin, Wedson Fernandes, Magda, Mara Nilza, Maria das Dores Marchi, Odival Faccenda, Tarcísio Valente e à Cidinha. Ao Marco Antônio Rangel e à Lílian Zaidan pelas valiosas orientações de estágio.

Ao professor Raimundo Santos Barros pela orientação, fundamental presença e confiança em mim depositada.

Aos professores do Departamento, Fernando Finger e Rolf, co-orientadores, Fábio DaMatta, Marco Aurélio, Marco Oliva, Juraci Alves, José Cambraia e Andréa Miyasaka, pelos ensinamentos, disponibilidade e atenção.

À banca examinadora, Denise Dias, Eduardo Borges, Fernando Finger, Marco Aurélio Pedron, Raimundo Barros, pela disponibilidade, comprometimento e considerações.

Aos colegas de laboratório, que participaram efetivamente deste trabalho, Ricardo Baer, Braulio Maia, Dimas Ribeiro, Rosana Pires, Rafael Vilela pela infinita ajuda, companheirismo e amizade.

Aos amigos conquistados, que fizeram desses dois anos mais alegres. Cleberson Ribeiro, Élcio Meira, Marcelo Guimarães, Mateus Junqueira, Ana Catarina Cunha, Kelly Nascimento, pelas incansáveis horas de estudos. Wagner Araújo, Werner Antunes, pelas valiosas orientações estatísticas. Valdir Diola, Alan Costa pelas preciosas conversas e orientações. Carolina Jamarillo, Wagner, Aldo Mauri, Paulo César Dias, Samuel Martins, Fábio Matos, Diego Carretero, Fabiana Martins, Leonardo Carnevalli, Luiz Fernando, Breno Lourenzzo, Eulene, Camila Khouri, Bruno Soares e demais colegas pela grandiosa amizade. Luciana Ravaglia, Márcio Watanabe, Hebert, Ana Camila Micheletti Viviane Lira, Marcos Meiado, Evandro Vieira, Luciana, Ana Eliza Lima, Valeri Schimdt pelos inesquecíveis congressos.

Aos secretários do Departamento Cássia, Bete, Júnia, Conceição e Ângelo, e aos técnicos Zé Maria, Reginaldo, Zé Antônio, Osvaldo, Geraldo, Maria Mercês, pelo constante auxílio.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos, e à Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal pela oportunidade oferecida.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Caroline Müller, filha de Genecy Maria Cerezer Müller e Bernardo Leopoldo Müller, nasceu em Toledo, Estado do Paraná, no dia 01 de novembro de 1982. Em fevereiro de 2005, graduou-se em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campus de Dourados. Em março de 2005, iniciou o curso de mestrado em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa.

RESUMO

MÜLLER, Caroline. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Efeito do paclobutrazol na germinação e no metabolismo do etileno em sementes de *Stylosanthes humilis* H.B.K.** Orientador: Raimundo Santos Barros. Co-orientadores: Fernando Luíz Finger e Rolf Puschmann

Sementes não-dormentes de estilosante (*Stylosanthes humilis* HBK), leguminosa tropical, forrageira anual, tiveram sua germinação decrescida por suspensões de paclobutrazol (PBZ) [(2*RS*, 3*RS*)-1-(4-clorofenil)-4,4-dimetil-2-(1,2,4-triazol-1-il)pentan-3-ol]. Esse efeito foi revertido com ácido 2-cloroetilfosfônico, composto liberador de etileno, e ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), precursor imediato do etileno em sua rota biossintética. Observou-se um atraso na produção do etileno em sementes não-dormentes e uma redução significativa na produção desse hormônio em sementes dormentes tratadas com PBZ. Sementes não-dormentes tratadas com o inibidor apresentaram níveis significativamente menores de ACC livre, sendo o mesmo também observado em sementes dormentes tratadas com PBZ mais selenouréia. A atividade *in vivo* da oxidase do ACC foi diminuída em sementes dormentes e, em sementes não-dormentes, observou-se uma atividade decrescida nas primeiras 48 h de exposição ao inibidor. A atividade *in vitro* da oxidase do ACC mostrou-se diminuída a partir de 36 h de incubação em sementes não-dormentes tratadas com o PBZ, ocorrendo posteriormente à diminuição da germinação.

ABSTRACT

MÜLLER, Caroline. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2007. **Effect of paclobutrazol on germination and metabolism of ethylene in seeds of *Stylosanthes humilis* H.B.K.** Adviser: Raimundo Santos Barros. Co-advisers: Fernando Luíz Finger and Rolf Puschmann

Germination of non-dormant seeds of Townsville stylo (*Stylosanthes humilis* HBK), a tropical annual forage legume was decreased by the growth retardant paclobutrazol (PBZ) [(2*RS*, 3*RS*)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)pentan-3-ol] suspensions. This effect was reverted by 2-chloroethylphosphonic acid, an ethylene-releasing substance, and 1-amino-1-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), the immediate ethylene precursor in its biosynthetic pathway. A delay in ethylene emanation by non-dormant seeds and a significant decrease in the production of that gaseous regulator by dormant seeds were observed when they were treated with PBZ. The retardant also led non-dormant seeds to show significant lower free ACC content, a similar effect also exhibited by dormant seeds treated simultaneously with the retardant plus selenourea. *In vitro* activity of ACC oxidase of that enzyme was observed in the first 48 h exposure to the inhibitor. *In vitro* activity of ACC oxidase was decreased from 36 h onwards following incubation of non-dormant seeds with PBZ, but this phenomenon occurred after the germination decrease.

CONTEÚDO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 MATERIAL E MÉTODOS	4
3.1 Material vegetal.....	4
3.2 Condução dos experimentos	4
3.3 Quantificação do etileno	5
3.4 Quantificação do ACC	5
3.5 Atividade da oxidase do ACC.....	6
3.6 Inibição da germinação por PBZ.....	8
3.7 Toxicidade do PBZ	8
3.8 Cinética da germinação das sementes	8
3.9 Efeito das giberelinas na quebra da dormência das sementes.....	9
3.10 Reversão do efeito do PBZ na germinação	9
3.11 Cinética da germinação sob os reverteres dos efeitos do PBZ	9
3.12 Efeito do PBZ na emissão do etileno	10
3.13 Efeito do PBZ nos níveis de ACC	10
3.14 Efeito do PBZ na atividade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> da oxidase do ACC.....	11
3.15 Delineamento experimental	12
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1 Inibição da germinação com PBZ	13
4.2 Efeito do tempo de exposição das sementes ao PBZ	15
4.3 Cinética da germinação das sementes	16
4.4 Reversão do efeito do PBZ na germinação	19
4.5 Cinética da germinação sob os reverteres do efeito do PBZ	23
4.6 Efeito do PBZ na emissão do etileno	25
4.7 Efeito do PBZ nos níveis de ACC	30
4.8 Efeito do PBZ na atividade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> da oxidase do ACC.....	34
5 CONCLUSÕES	41
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
7 ANEXOS	49

1 INTRODUÇÃO

Stylosanthes humilis H.B.K (estilosante) é uma leguminosa tropical, endêmica na América Central e América do Sul e, como forrageira, tem contribuído para melhoria da qualidade das pastagens. Apresenta, também, tolerância a diversos tipos de estresses, o que garante maior distribuição e adaptação da espécie (Lovato *et al* 1994). As sementes do estilosante apresentam dois mecanismos de regulação da germinação, a dormência fisiológica e a impermeabilidade tegumentar (Cameron 1967). Esta dormência é acentuada logo após maturação das sementes, sendo gradualmente liberada com o transcurso do tempo, não mais ocorrendo entre 12 e 15 meses de idade pós-colheita (Vieira e Barros, 1994). A barreira tegumentar pode levar à impermeabilidade a gases e água (Bewley e Black 1994), podendo ser rompida por escarificação mecânica (Burin *et al* 1987) ou química (Araújo *et al* 2002, Ribeiro e Barros, comunicação pessoal).

Tem-se demonstrado que a dormência fisiológica é quebrada por condições que estimulam a produção de etileno, tais como baixos pHs do meio de germinação (Frigeri 1998, Pelacani *et al* 2005 a, b), íons alumínio e férrico (Mapeli 2005) e compostos selênicos (Barros e Freitas 2000, 2001, Pinheiro 2004). Esse tipo de dormência pode ser quebrado com ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), precursor imediato da rota biossintética do etileno (Vieira e Barros 1994) e o ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA), substância liberadora de etileno no interior das células (Burin *et al* 1987). O requerimento por etileno é também observado com a inibição da germinação de sementes não-dormentes por inibidores da síntese e da ação do etileno, como 2-aminoeto-xivinilglicina (AVG), Co^{2+} e Ag^{+} (Vieira e Barros 1994).

O etileno tem-se mostrado essencial para a germinação de sementes de diversas espécies como *Striga lutea* (Egley e Dale 1970), *S. asiatica* (Eplee 1975, Babiker *et al* 1993), *S. hermonthica* (Logan e Stewart 1991, 1995), *Xanthium pennsylvanicum* (Satoh e Esashi 1980 a, b), *Amaranthus caudatum* (Kępczyński 1986, Bialecka e Kępczyński 2003), *Arachis hypogea* (Whitehead e Nelson 1992), *Cyclopia* spp (Whitehead e Sutcliffe 1995), *Hordeum vulgare* (Locke *et al* 2000) e inúmeras outras. A germinação de *Cicer arietinum* é diminuída por CoCl_2 , inibidor da biossíntese de etileno. Essa diminuição na germinação é revertida por CEPA, porém não por ACC, o que indica que o inibidor bloqueia a atividade da oxidase do

ACC (Gallardo *et al* 1994) naquelas sementes. Inibidores da ação do etileno, como o 2,5-norbonadieno e íons prata, também causaram diminuição na germinação de *A. caudatus* (Bialecka e Kępczyński 2003) e *Lactuca sativa* (Abeles 1986), mostrando o requerimento por esse hormônio gasoso na germinação daquelas sementes.

O paclobutrazol (PBZ) [(2*RS*, 3*RS*)-1-(4-clorofenil)-4,4-dimetil-2-(1,2,4-triazol-1-il)pentan-3-ol], retardante de crescimento da classe dos triazóis, é conhecido por atuar sobre monooxigenases do tipo citocromo P₄₅₀ da rota biossintética das giberelinas (GAs) (Sugavanam 1984, Köller 1987, Fletcher *et al* 2000, Rademacher 2000, Chizhova *et al* 2005). No entanto, a germinação de sementes de *Malus domestica* (Mâge e Powell 1990) e *Apium graveolens* (Pressman e Shaked 1988), inibida por PBZ, não foi revertida por ácido giberélico (GA₃). Além disso, o GA₃ não se mostrou eficaz na quebra da dormência de sementes de *S. humilis* (AM Mapeli e RS Barros, comunicação pessoal), sugerindo que esse hormônio vegetal não é requerido durante o processo germinativo daquelas sementes. O PBZ, pode, dessa forma, estar afetando a atividade de enzimas similares às monooxigenases como a oxidase do ACC (Sauerbrey *et al* 1988, Grossmann *et al* 1989, Min e Bartholomew 1996), ou ainda, a atividade da sintase do ACC, observada pela redução nos níveis de ACC em *Glycine max* (Wang e Steffens 1985) e *Cucumis sativus* (Abbas *et al* 1989), interferindo, assim, na rota biossintética do etileno.

O PBZ tem-se mostrado um inibidor eficaz na germinação de sementes de *Acer saccharum* (Marshall *et al* 2000) e *Orobancha ramosa* (Zehhar *et al* 2002). A produção de etileno em folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* é inibida pelo PBZ (Tari e Nagy 1994). Sementes de feijão também apresentaram diminuição na síntese de etileno e no conteúdo de ACC, com a aplicação de uniconazol (Hofstra *et al* 1989), um outro inibidor de crescimento da classe dos triazóis. Plântulas de *Cucumis sativus*, tratadas com triadimefon, também um triazol, apresentaram redução na produção de etileno e nos níveis de ACC em raízes primárias (Abbas *et al* 1989). Os autores sugeriram que a redução nos níveis de ACC pode ser devida aos triazóis suprimirem a atividade da sintase do ACC, ou ainda, por sua conjugação a ácido N-malonil-1-carboxílico-1-aminociclopropano (MACC). O PBZ previniu o acúmulo de ACC e MACC em sementes de *Malus domestica* submetidas a estresse hídrico, diminuindo a produção de etileno (Wang e Steffens, 1985). Nesse caso, a síntese de ACC seria a etapa chave na qual o PBZ exerceria seu efeito. O crescimento e a

produção de etileno foram inibidos por PBZ em tecidos foliares basais de *Ananas comosus*, o que não afetou o conteúdo de ACC, mas inibiu a atividade da oxidase do ACC, enzima que converte ACC em etileno (Min e Bartholomew 1996).

Em condições de laboratório, observou-se que o PBZ causa diminuição na germinação de sementes de *Stylosanthes humilis* (AM Mapeli e RS Barros, comunicação pessoal). Entretanto, os mecanismos pelos quais o PBZ possa estar atuando em uma possível inibição da germinação de sementes de estilosante não são conhecidos. Existe a possibilidade de que o retardante de crescimento atue na etapa oxidativa da rota biossintética do etileno, afetando a atividade da oxidase do ACC, devido sua semelhança com a monooxigenase do tipo citocromo P₄₅₀ da rota biossintética das GAs. A inibição da oxidase do ACC faria diminuir a síntese de etileno, responsável, então, pela diminuição na germinação de sementes. Além da oxidase do ACC, o efeito do PBZ poderia se dar também por uma redução nos níveis de ACC (Abbas *et al* 1989, Hofstra *et al* 1989), caso o PBZ também atue sobre a sintase do ACC, inibindo, consequentemente, a produção de etileno. Neste trabalho, tentar-se-á definir a(s) possível(is) etapa(s) da rota biossintética do etileno na(s) qual(is) poderia ocorrer a ação do PBZ.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho objetivou investigar a ação do paclobutrazol na germinação de sementes de *Stylosanthes humilis*, examinando-se também suas prováveis interferências na rota biossintética do etileno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Plantas de estilante foram cultivadas em casa-de-vegetação, na Universidade Federal de Viçosa (20° 45'S, 42° 15' W), Viçosa, Minas Gerais, em vasos plásticos de 3,5 dm³. O substrato foi composto por solo latossolo vermelho-amarelo e esterco bovino curtido, na proporção de 2:1, e recebeu adubação de cobertura de 15 g de NPK (25-5-20), por vaso, aplicada em duas parcelas, durante o estado vegetativo das plantas. A irrigação foi realizada diariamente a fim de manter-se a umidade do substrato dos vasos próxima à capacidade de campo. Devido ao estilante comportar-se como planta de dia-curto (Cameron e 't Mannerje 1977), as plantas foram cobertas com uma empanada preta durante o período de janeiro a março, reduzindo-se, assim, o fotoperíodo para 8 h diárias, a fim de promover-se a floração. Os frutos foram colhidos periodicamente e armazenados em sacos de papel sob condições de laboratório, até a execução dos experimentos.

3.2 Condução dos experimentos

Para os ensaios, os frutos foram previamente debulhados por fricção entre duas superfícies emborrachadas. As sementes foram submetidas à escarificação mecânica, por meio de leve fricção em lixas finas (lixas d'água nº 150), esterilizadas com hipoclorito de sódio 0,5 %, por 10 min e, posteriormente, lavadas exaustivamente com água destilada. Para os ensaios de germinação, as sementes foram embebidas com as soluções-teste (10 cm³) e transferidas, juntamente com a solução, para placas de Petri (90 mm de diâmetro), contendo, ao fundo, duas camadas de papel de filtro Whatman nº 1. Para os ensaios de quantificação do etileno emanado, as sementes foram embebidas com as soluções-teste (3,0 cm³) e transferidas para frascos Erlenmeyer (50 cm³), os quais foram vedados com seladores de borracha. As placas de Petri e os frascos Erlenmeyer, contendo as duas camadas de papel de filtro, foram previamente semi-esterilizados em estufa, a 105 °C, por 4 h.

Os ensaios de germinação foram conduzidos em câmara de crescimento noite/dia (tipo BOD, Forma Scientific, Inc, Ohio, EUA), no escuro, sob temperatura de 30 °C, por um período de 5 dias. A germinação foi avaliada diariamente, sendo a protrusão da radícula o critério para considerar-se uma semente como germinada.

O PBZ é um composto altamente insolúvel e, devido a um aumento de solubilidade quando autoclavado, foi utilizada nos ensaios suspensão de PBZ autoclavada, tal como se usa rotineiramente em cultivos assépticos. Todas as suspensões e soluções-teste foram preparadas com água pH 7,0, contendo Tween 80 (0,05 %).

Ensaio preliminares mostraram respostas semelhantes das sementes quando embebidas em 10 cm³ de suspensão de PBZ autoclavado (1 mol m⁻³), de uma só vez, ou embebidas inicialmente com 5 cm³ de PBZ (2 mol m⁻³), seguida de adição, após 24 h, de 5 cm³ de água destilada, dando, como resultado final uma suspensão de PBZ 1 mol m⁻³. Com isso, em alguns ensaios de germinação, objetivando-se reversão dos efeitos do PBZ, a segunda opção foi adotada, com a adição, 24 h depois, de 5 cm³ de água ou do reverter correspondente (ver Fig 3).

3.3 Quantificação do etileno

O etileno emanado das sementes foi quantificado segundo técnica de Saltveit e Yang (1987). Amostras de 1,0 cm³ da atmosfera livre dos frascos Erlenmeyer foram coletadas com o auxílio de seringas de 1,0 cm³ de volume (agulhas 29 G ½”). Injeção de igual volume de ar foi efetuada para equilibrar-se a pressão no interior dos recipientes.

As amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5890, série II, equipado com um detetor de ionização de chama e uma coluna de aço inoxidável (1,0 m x 6,0 mm), empacotada com Porapak-N (80-100 mesh). O gás de arraste foi o nitrogênio, em fluxo de 30 cm³ min⁻¹. Os fluxos do hidrogênio e do ar foram mantidos em 30 e 320 cm³ min⁻¹, respectivamente. As temperaturas da coluna, do injetor e do detetor foram mantidas em 60, 110 e 150 °C, respectivamente. A quantificação do etileno foi determinada a partir de áreas de pico de etileno, computadas com o *software* Peaksimple II (PEAKSIMPLE, 2005), associado ao cromatógrafo, por comparação com áreas do padrão de etileno.

3.4 Quantificação do ACC

O ACC nas sementes foi quantificado segundo técnica descrita por Gallardo *et al* (1991), com algumas modificações. Amostras de 100 sementes foram embebidas em suspensão de PBZ autoclavado (1 mol m⁻³) e incubadas em placas de

Petri (90 mm de diâmetro), contendo ao fundo dois discos de papel de filtro Whatman nº 1, no escuro, por períodos de 12, 18, 24 e 36 h, na câmara de crescimento supra-mencionada, a 30 °C. Ao final de cada período de incubação, as sementes foram lavadas em água destilada, secas em papel absorvente, tiveram determinadas suas massas frescas e foram imersas em nitrogênio líquido e estocadas a - 20 °C, até análise.

A extração do ACC foi feita triturando-se as amostras em almofariz com pistilo, com 10 cm³ de etanol (80 %) e mais polivinil-pirrolidona (PVP 5 % m/v). O extrato foi centrifugado a 28000 g, por 20 min, a 4 °C, e o sobrenadante submetido à evaporação em evaporador rotativo, a 45 °C, até secar. O resíduo foi ressuspensão em 4 cm³ de água destilada (extrato original). Metade do extrato original foi utilizada para quantificar-se o ACC livre, por conversão química, para etileno, seguindo-se técnica descrita por Lizada e Yang (1979). Uma alíquota de 0,5 cm³ do extrato foi tomada em um tubo de ensaio com 0,1 cm³ de cloreto de mercúrio (5 µmol), à qual foi adicionada água até um volume de 0,8 cm³. O tubo de ensaio foi vedado com selador de látex e mantido em banho de gelo. Em seguida, 0,2 cm³ de uma mistura resfriada de NaOCl (5 %) e NaOH saturado (v/v 2:1) foram injetados no tubo de ensaio vedado, agitado num misturador vórtex, por 5 s, e incubado em banho de gelo por 2,5 min. Após nova agitação do tubo, por 5 s, uma amostra gasosa de 1,0 cm³ da atmosfera do tubo foi retirada para a quantificação do etileno, segundo a técnica acima descrita.

A outra metade do extrato original foi utilizada para determinar-se o ACC total (ACC livre + ACC conjugado). Após a hidrólise ácida com HCl (2 N), a 100 °C, por 3 h, o extrato foi neutralizado com NaOH (2 N) e evaporado até a secar, adicionando-se, em seguida, 2 cm³ de água. A quantificação do ACC total seguiu procedimento idêntico para a quantificação do ACC livre. Com a diferença entre os conteúdos de ACC antes (livre) e após a hidrólise (ACC total), foi determinado o ACC conjugado no extrato.

3.5 Atividade da oxidase do ACC

A atividade *in vivo* da oxidase do ACC foi determinada segundo técnica de De Rueda et al (1995), com pequenas modificações. As sementes foram tratadas com o retardante de crescimento e incubadas em frascos Erlenmeyer de 50 cm³ selados,

por 24 h. Após esse período, foi realizada adição de suspensão do PBZ puro ou do regulador mais ACC. Seis, 12, 18, 24 e 48 h após a troca da solução foram coletadas amostras gasosas da atmosfera interna dos frascos, para quantificação do etileno emanado pelas sementes, e avaliada a germinação. Os frascos foram mantidos nas câmaras de crescimento, a 30 °C, no escuro.

A atividade *in vitro* da oxidase do ACC foi determinada segundo a técnica de Fernández-Maculet e Yang (1992), com algumas alterações (Pinheiro 2004). Amostras de 100 sementes foram germinadas em placas de Petri (90 mm de diâmetro), com 10 cm³ de suspensão de PBZ autoclavado (1 mol m⁻³), contendo ao fundo dois discos de papel de filtro Whatman nº 1, na câmara de crescimento descrita, a 30 °C, no escuro. Após o período de embebição, as sementes foram lavadas em água destilada, secas em papel absorvente, tiveram determinadas suas massas frescas e foram imersas em nitrogênio líquido e estocadas a - 20 °C, até análise. As amostras foram maceradas em almofariz com pistilo resfriados e todo o procedimento foi conduzido sob banho de gelo.

As amostras foram extraídas com 6,0 cm³ do meio de extração, constituído de tampão Tris-HCl, 100 mol m⁻³, pH 7,0; glicerol 10 % (v/v); ditioneitol (DTT) 1,0 mol m⁻³; Triton X-100 0,1 % (v/v) e PVP 5 % (m/v). O homogenado foi centrifugado a 28000 g, por 20 min, a 4 °C. A reação enzimática foi iniciada pela adição de uma alíquota de 0,2 cm³ do extrato enzimático (sobrenadante) em tubo de ensaio selado e incubado por 1 h, a 32 °C, em volume de reação total de 2,0 cm³, constituído de tampão Tris-HCl 100 mol m⁻³, pH 7,0; DTT 1,0 mol m⁻³; NaHCO₃ 30 mol m⁻³; FeSO₄ 50 mmol m⁻³; ascorbado de sódio 30 mol m⁻³; glicerol 10 % (v/v) e ACC 1,0 mol m⁻³. O etileno liberado após reação enzimática foi determinado segundo a técnica acima mencionada.

Utilizou-se a técnica de Bradford (1976), com algumas modificações (Ramagli e Rodriguez 1985), para determinação dos teores de proteína nos extratos. Uma série de solução de soro albumina bovina diluída com o mesmo tampão de extração serviu como padrão para quantificação das proteínas. A quantificação foi determinada em espectrofotômetro UV-Visível (B582, Micronal, Brasil), a 590 nm.

3.6 Inibição da germinação por PBZ

A germinação foi conduzida em placas de Petri, expondo-se as sementes não-dormentes ao PBZ em diferentes níveis, na faixa entre 0,001 e 10 mol m⁻³. As sementes foram mantidas em câmara de crescimento por cinco dias após embebição.

3.7 Toxicidade do PBZ

Os ensaios sobre a toxicidade do PBZ foram realizados em placas de Petri, expondo-se sementes não-dormentes a 5 cm³ de suspensão de PBZ autoclavado (2 mol m⁻³) por períodos de 12, 24, 48 e 72 h. Após cada período de exposição, foram adicionados 5 cm³ de água ou solução de tiouréia (TU, 200 mol m⁻³), obtendo-se suspensão final de PBZ 1 mol m⁻³ e TU 100 mol m⁻³ (Ballard e Buchwald 1971, Delatorre *et al* 2000). Acompanhou-se a germinação até o quinto dia.

3.8 Cinética da germinação das sementes

A cinética da germinação de sementes do estilósante expostas às suspensões de PBZ autoclavado (0,5 e 1,0 mol m⁻³) foi descrita por meio de parâmetros de germinação, com a execução de cinco ensaios com cinco repetições cada. Os ensaios foram conduzidos em placas de Petri (90 mm de diâmetro), acompanhando-se a germinação por diversos períodos de tempo (até 120 h), a partir da embebição.

Para descreverem-se os parâmetros da germinação de sementes não-dormentes expostas ao PBZ, ajustaram-se as curvas de Gompertz que melhor descreveram a germinação (Amer e Williams 1957, Calbo *et al* 1989). Para o ajuste desse modelo sigmoidal não-linear necessitou-se de métodos computacionais para estimativa dos parâmetros (Santana e Ranal 2004). Utilizou-se para tal o software Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG-UFV 1997), obtendo-se as constantes a , b e k da função: $Y = a e^{-be^{-kt}}$. Y representa a germinação no tempo t , a é o ponto de inflexão da curva; k representa a “taxa constante” que determina a extensão da curva ao longo do eixo do tempo; b torna-se unidade quando o tempo é medido a partir do ponto de inflexão, nesse caso quando $Y = a/e$ (Richards 1959, 1969).

Regressões não-lineares foram obtidas utilizando o software SigmaPlot 10.0 e os componentes da germinação analisados por meio dos cálculos obtidos pelas derivadas de primeira e segunda ordens. Das curvas de germinação integradas ao

longo do tempo, foram estimadas as derivadas primeiras para a obtenção das taxas de germinação (Causton 1983). Os tempos de ocorrência das taxas máximas foram determinados igualando-se a derivada segunda a zero. O tempo de estabilização (limiar da saturação) da germinação foi obtido na curva integrativa (germinação acumulada), quando o processo atingiu 90% de sua germinação final. As taxas médias de germinação foram determinadas pela razão Y/t (Richards 1969), em que a taxa de germinação aumenta em função do tempo, em que a maioria das sementes germina na primeira metade do período de germinação, mostrado por meio da derivada primeira (Bewley e Black 1994). O tempo inicial de germinação foi determinado a partir de extrapolação da parte ascendente da curva de germinação até o eixo do x.

3.9 Efeito das giberelinas na quebra da dormência das sementes

Como o PBZ é um inibidor da biossíntese de GAs, a tentativa de quebra da dormência foi realizada expondo-se sementes dormentes a soluções de GA_3 , GA_{4+7} e GA_9 , na faixa entre 10^{-4} e $10^{-1} \text{ mol m}^{-3}$. As sementes foram embebidas com 10 cm^3 das soluções-teste e transferidas para placas de Petri (90 mm de diâmetro), sendo acondicionadas nas câmaras de crescimento para os testes de germinação.

3.10 Reversão do efeito do PBZ na germinação

Para tentar reverterem-se os efeitos do PBZ, sementes não-dormentes foram tratadas com 5 cm^3 de suspensão autoclavada de PBZ (2 mol m^{-3}) pelos períodos de 0, 12, 24, 48 e 72 h. Ao final de cada período, foram adicionados às placas 5 cm^3 de solução de GA_3 ($0,2 \text{ mol m}^{-3}$), ACC (2 mol m^{-3}) ou CEPA ($0,2 \text{ mol m}^{-3}$), obtendo-se suspensão final de PBZ 1 mol m^{-3} , GA $0,1 \text{ mol m}^{-3}$, ACC 1 mol m^{-3} e CEPA $0,1 \text{ mol m}^{-3}$. A germinação foi registrada até o quinto dia.

3.11 Cinética da germinação sob os reverteres dos efeitos do PBZ

A cinética da germinação sob os reverteres dos efeitos do PBZ foi determinada com sementes não-dormentes. As sementes foram expostas à suspensão de PBZ (2 mol m^{-3} ou 1 mol m^{-3}) ou de soluções conjuntas de PBZ com GA_3 ($0,2 \text{ mol m}^{-3}$), CEPA ($0,2 \text{ mol m}^{-3}$) ou TU (200 mol m^{-3}), obtendo-se suspensão final de PBZ 1 mol m^{-3} ou $0,5 \text{ mol m}^{-3}$, GA_3 $0,1 \text{ mol m}^{-3}$, CEPA $0,1 \text{ mol m}^{-3}$ e TU 100 mol m^{-3} . A

germinação foi acompanhada por diversos períodos de tempo até o quinto dia (120 h) após incubação das sementes. Os parâmetros de cinética da germinação foram obtidos conforme descrito na seção 3.8.

3.12 Efeito do PBZ na emissão do etileno

Nos ensaios para a quantificação do etileno emanado, as sementes do estilante foram embebidas em 3 cm³ de suspensão de PBZ autoclavado (1 mol m⁻³) e transferidas para frascos Erlenmeyers (50 cm³) vedados com seladores de borracha. A atmosfera interna dos frascos foi ocasionalmente homogeneizada utilizando-se de uma seringa de 3,0 cm³, provida com agulha longa inserida através dos seladores de borracha. Foram coletadas amostras gasosas da atmosfera interna dos frascos e avaliada a germinação nos períodos de 12, 24, 48 e 72 h, após início do experimento. Os frascos foram mantidos em câmaras de crescimento noite/dia (tipo BOD), no escuro, sob temperatura de 30 °C, por um período de 72 horas.

3.13 Efeito do PBZ nos níveis de ACC

O efeito do PBZ no conteúdo de ACC foi avaliado utilizando-se sementes dormentes e não-dormentes de estilante. Amostras de 100 sementes não-dormentes foram embebidas em 10 cm³ de suspensão de PBZ autoclavada (1 mol m⁻³) e incubadas em câmaras de crescimento por períodos de 12, 18, 24 e 36 h. Após esse período, as sementes foram lavadas em água destilada, secas em papel absorvente, tiveram determinadas suas massas frescas, foram imersas em nitrogênio líquido e estocadas a - 20 °C, até análise do ACC livre e do ACC total, conforme metodologia descrita anteriormente.

Amostras de 100 sementes dormentes foram tratadas com 7,5 cm³ de suspensão de PBZ autoclavado (2 mol m⁻³) por um período de 24 h, quando foram adicionados 7,5 cm³ de solução de selenouréia (SeU, 2 mol m⁻³), numa tentativa de induzir-se a síntese da sintase do ACC (Pinheiro 2004), ou 7,5 cm³ de água destilada pH 7,0. Após 24 h da adição de SeU, as sementes foram lavadas em água destilada, secas em papel absorvente, tiveram determinadas suas massas frescas, foram imersas em nitrogênio líquido e estocadas a - 20 °C, até análise.

3.14 Efeito do PBZ na atividade *in vivo* e *in vitro* da oxidase do ACC

Para avaliação do efeito do PBZ na atividade *in vivo* da oxidase do ACC, amostras de 50 sementes foram embebidas com 3,0 cm³ de suspensão de PBZ (1 mol m⁻³) e incubadas em frascos Erlenmeyer de 50 cm³ vedados com seladores de borracha, por 24 h. Após esse período, removeu-se a suspensão inicial do PBZ e adicionou-se suspensão de PBZ puro (1 mol m⁻³) ou do regulador mais ACC (1,0 mol m⁻³), substrato da enzima oxidase do ACC (Yang e Hoffman 1984). Os frascos foram mantidos em câmaras de crescimento, a 30 °C, no escuro. Seis, 12, 18, 24 e 48 h após a troca da solução, foram coletadas amostras gasosas da atmosfera interna dos frascos, para quantificação do etileno emanado pelas sementes, e avaliada a germinação.

O efeito do PBZ na atividade *in vitro* da oxidase do ACC foi avaliado com amostras de 100 sementes não-dormentes embebidas em 10 cm³ de suspensão de PBZ autoclavado (1 mol m⁻³), em placas de Petri (90 mm de diâmetro). As sementes foram mantidas em câmara de crescimento pelos períodos de 12, 24, 36 e 48 h. Após cada tempo, as sementes foram lavadas em água destilada, secas em papel absorvente, tiveram determinadas suas massas frescas, foram imersas em nitrogênio líquido e estocadas a -20 °C, até análise. A atividade enzimática foi avaliada conforme metodologia descrita na seção 3.5.

A atividade *in vitro* da oxidase do ACC foi também avaliada em sementes dormentes estimulando-se a atividade enzimática com adição de ACC no meio de embebição. Amostras de 100 sementes dormentes foram embebidas inicialmente em 7,5 cm³ de suspensão de PBZ autoclavado (2 mol m⁻³), transferidas para placas de Petri (150 mm) e mantidas, por 24 h, na câmara de crescimento a 30 °C, no escuro. Após esse período, foram adicionados, ao meio de embebição, 7,5 cm³ de solução de ACC (2 mol m⁻³), obtendo-se suspensão final de PBZ e ACC de 1 mol m⁻³, condição na qual as sementes permaneceram pelos períodos de 24, 36, 48 e 72 h. Após cada tempo, as sementes foram lavadas em água destilada, secas em papel absorvente, tiveram determinadas suas massas frescas, foram imersas em nitrogênio líquido e estocadas a - 20 °C, até a análise. A atividade enzimática foi avaliada conforme metodologia descrita na seção 3.5.

3.15 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado nos experimentos foi o inteiramente casualizado. A unidade experimental dos experimentos de germinação foi composta por 50 sementes, com cinco repetições por tratamento. Os resultados de percentagem de germinação foram transformados em arco-seno $(\% G/100)^{1/2}$, para seguirem uma distribuição normal. As diferenças de médias entre os tratamentos foram avaliadas pelo teste de Scott-Knott (1974).

Nos experimentos sobre quantificação do etileno e da atividade da oxidase do ACC *in vivo*, a unidade experimental foi constituída de frascos Erlenmeyer de 50 cm³, com 50 sementes, com cinco repetições por tratamento. Nos experimentos de quantificação do ACC e da atividade da oxidase do ACC *in vitro*, a unidade experimental foi composta de amostras do extrato de 100 sementes, com cinco repetições por tratamento. Nos dois últimos casos, as diferenças entre os tratamentos foram avaliadas pelo teste de Tukey. Para comparações apenas entre dois tratamentos, utilizou-se do teste *t*. Todos os testes de média empregados foram conduzidos em nível de 5 % de probabilidade, utilizando o SigmaPlot e o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG-UFV, 1997).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Inibição da germinação com PBZ

A germinação das sementes não-dormentes de estilosante reduziu-se com o aumento da dosagem de PBZ na suspensão autoclavada. O PBZ, nas dosagens igual ou acima de $0,1 \text{ mol m}^{-3}$, causou diminuição na germinação das sementes em estudo (Fig 1).

A viabilidade das sementes inibidas foi testada com aplicação de TU 100 mol m^{-3} (Ballard e Buchwald 1971, Delatorre *et al* 2000), após cinco dias de exposição das sementes ao regulador. As dosagens de PBZ que causaram maiores níveis de inibição (6, 8 e 10 mol m^{-3}) mostraram-se tóxicas às sementes (Fig 2). As suspensões entre $0,5$ e 4 mol m^{-3} apresentaram eficácia na inibição da germinação das sementes (Fig 1), sem causarem toxicidade (Fig 2). Selecionou-se, portanto, como nível ótimo, para os trabalhos posteriores, a suspensão de 1 mol m^{-3} , por causar redução significativa da germinação sem mostrar-se tóxica às sementes.

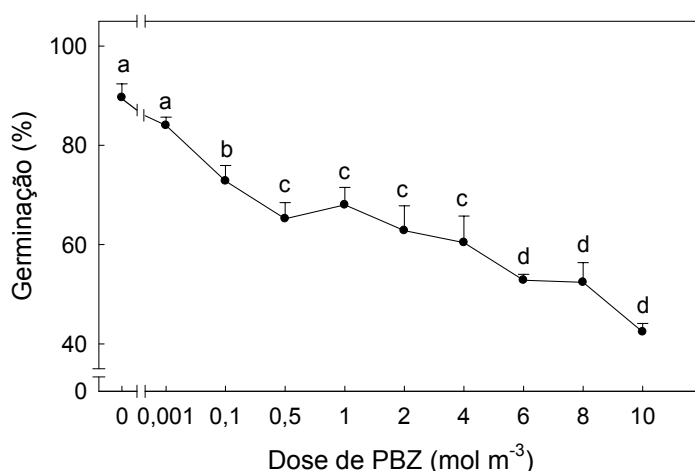


Figura 1 – Efeito do PBZ em suspensão sobre a germinação de sementes de estilosante, de 364 dias de idade pós-colheita. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

O PBZ, em dose de 1 mol m^{-3} , causou inibição de aproximadamente 22 % na germinação do estilosante (Fig 1). As sementes do estilosante apresentaram menor resposta ao regulador do que as sementes de *Orobancha ramosa*, que foram inibidas

em 80 % sob uma dosagem 10 vezes menor ($0,1 \text{ mol m}^{-3}$) (Zehhar *et al* 2002). Sementes de *Malus domestica* também mostraram maior resposta ao regulador, com inibição de 35 % da germinação, quando submetidas a $0,025 \text{ mol m}^{-3}$ do PBZ (Mâge e Powell 1990). Song *et al* (2005) observaram que o uniconazol, também um triazol, inibiu a germinação de três espécies de *Orobancha*, em até 86 %, sob $0,5 \text{ mol m}^{-3}$ em *O. ramosa*.

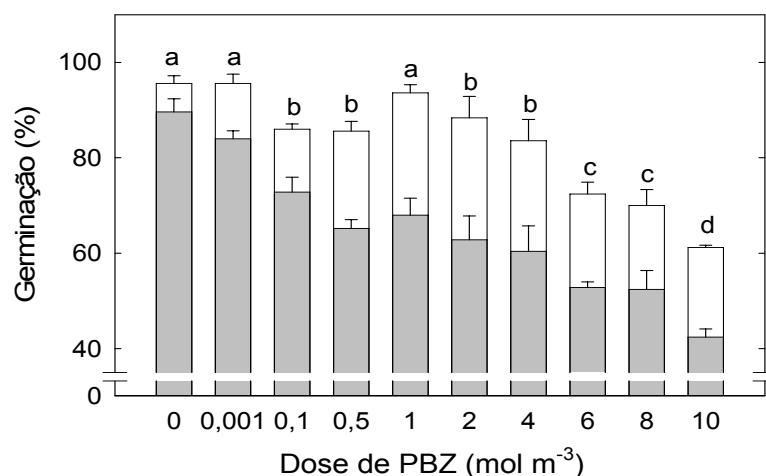


Figura 2 – Toxicidade do PBZ em sementes não-dormentes de estilósante, com 364 dias de idade pós-colheita. Germinação sob as suspensões-teste (■) e com aplicação de TU 100 mol m^{-3} (□) após cinco dias de exposição ao regulador. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

Avaliaram-se as possíveis diferenças entre as técnicas de troca e adição de suspensões-teste. Na primeira técnica, as sementes foram expostas continuamente à suspensão-teste (10 mL de PBZ 1 mol m^{-3}). Com a segunda técnica testada, as sementes foram embebidas em suspensão-teste (10 mL de PBZ 1 mol m^{-3}), por 24 h, quando se procedeu a remoção da suspensão e adição de nova suspensão. Pela terceira técnica, as sementes foram expostas à suspensão-teste (5 mL de PBZ 2 mol m^{-3}), seguida de adição, após 24 h, de 5 mL de água, resultando, assim, numa suspensão final de PBZ 1 mol m^{-3} . Observou-se que a segunda técnica (troca de suspensão) causou maior germinação, após cinco dias de avaliação (Fig 3). Isso se deve a uma possível lavagem de inibidores das sementes ao se realizar a troca de

suspensão. A terceira técnica (PBZ 2 mol m⁻³ mais água posteriormente) não produziu resultado diferente dos dados obtidos com a exposição continuada das sementes ao PBZ 1 mol m⁻³ (Fig 3), sendo, então, selecionada em estudos que requeressem adição posterior de novas suspensões ou soluções.

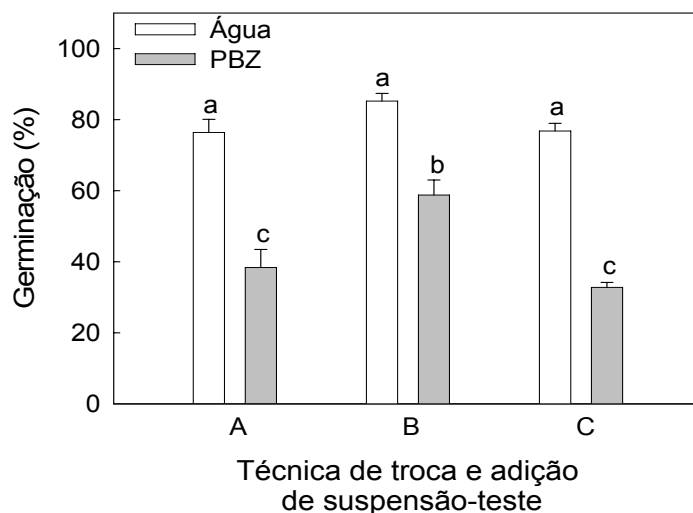


Figura 3 – Efeito das técnicas de troca e adição da suspensão-teste na germinação de sementes não-dormentes de estilosante, com 532 dias de idade pós-colheita. A - Suspensão continuada (10 mL PBZ 1 mol m⁻³ mL ou 10 mL de água pH 7,0); B - Suspensão inicial de PBZ (1 mol m⁻³) ou água pH 7,0, remoção após 24 h, seguida de adição de nova suspensão (PBZ 1 mol m⁻³) ou água pH 7,0 para o controle; C - Suspensão de PBZ (5 mL 2 mol m⁻³) ou água pH 7,0 (5 mL), com adição de água, após 24 h (5 mL). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

4.2 Efeito do tempo de exposição das sementes ao PBZ

Considerando-se que o PBZ pode ser tóxico às sementes, estimou-se, então, o efeito do tempo de exposição das sementes não-dormentes à suspensão de PBZ, utilizando a terceira técnica, isto é, exposição das sementes à suspensão de PBZ (2 mol m⁻³, 5 mL), seguida de adição, após 12, 24, 48 e 72 h, de 5 mL de água, obtendo-se, assim, uma suspensão final de PBZ 1 mol m⁻³. Para avaliar-se se o regulador estaria afetando a germinação sem danificar o embrião, após aqueles períodos de exposição ao PBZ, aplicou-se TU (200 mol m⁻³, 5 mL), obtendo-se suspensão final de PBZ 1 mol m⁻³ e TU 100 mol m⁻³ (Ballard e Buchwald 1971, Delatorre *et al*

2000). A germinação das sementes foi registrada no quinto dia após o início do experimento.

A germinação das sementes reduziu-se com o aumento do tempo de exposição à suspensão de PBZ (2 mol m^{-3}). Ao se aplicar TU, observou-se que o regulador havia inibido a germinação sem afetar a viabilidade das sementes, sob todos os tempos de exposição ensaiados, ocorrendo completa reversão da inibição causada pelo PBZ (Fig 4).

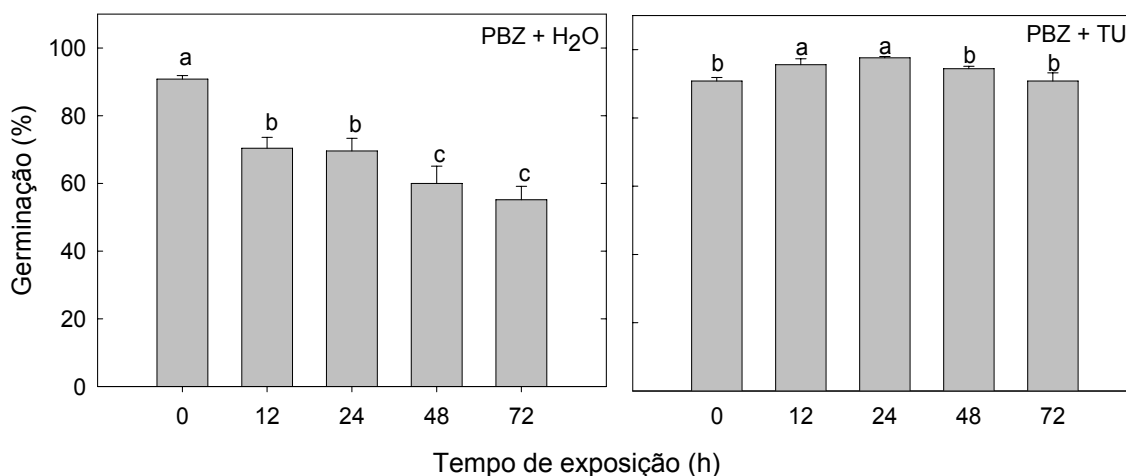


Figura 4 – Efeito do tempo de exposição das sementes à suspensão de PBZ, seguido de adição, após cada período, de água (esquerda) ou TU (direita), sobre a germinação de sementes, de 442 dias de idade pós-colheita. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média. Médias seguidas de mesma letra, dentro de cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste Scott-Knott

4.3 Cinética da germinação das sementes

Realizaram-se cinco ensaios, cada qual com cinco repetições, para estabelecerem-se os componentes da germinação afetados pelo PBZ ($0,5$ e $1,0 \text{ mol m}^{-3}$) em sementes não-dormentes (Fig 5). Os fenômenos de germinação de sementes ou crescimento de plantas têm sido ajustados satisfatoriamente ao modelo de Gompertz, para avaliação dos efeitos biológicos decorrentes de tratamentos, por vários autores (Richards 1957, 1959, Amer e Williams 1957, Lehle e Putnam 1982, Dantigny *et al* 2007). Como esperado a germinação de sementes não-dormentes de estíloso, ajustou-se com boa precisão à função de Gompertz.

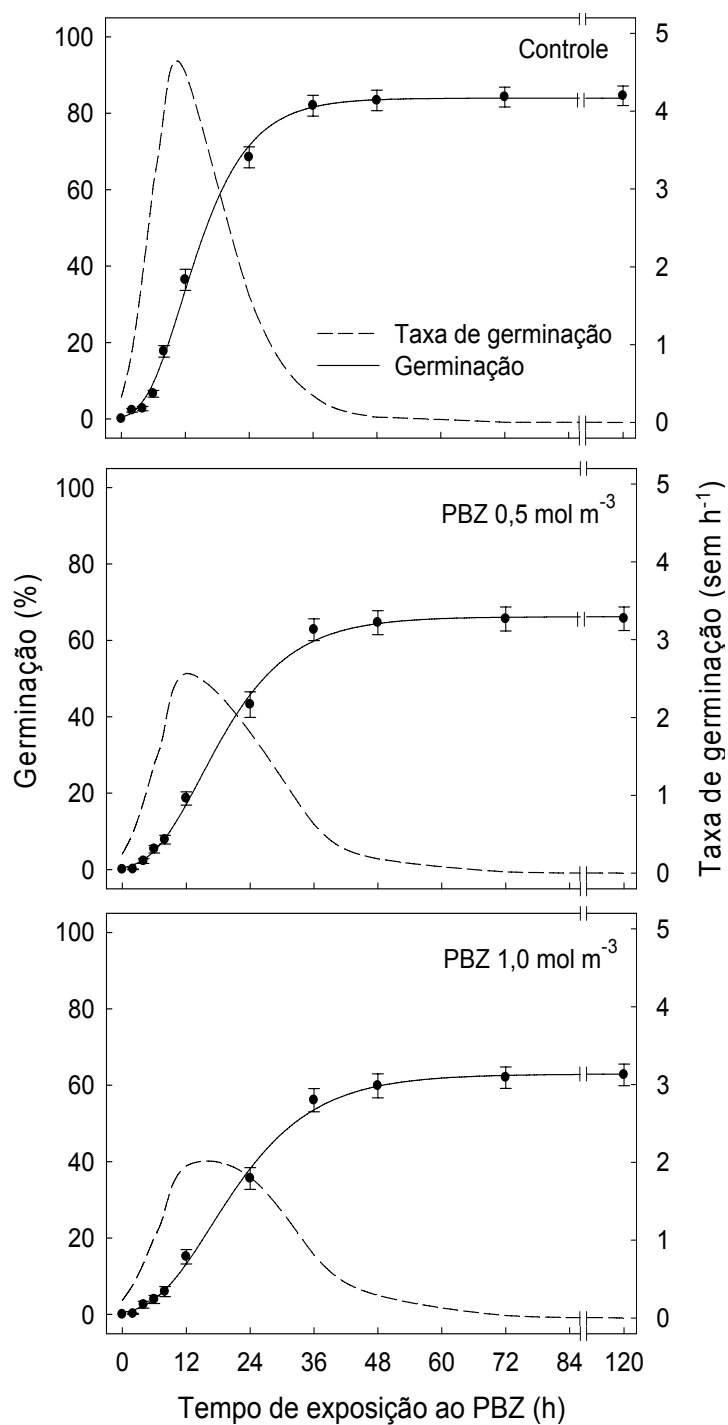


Figura 5 – Germinação acumulada (—) e taxa de germinação (---) de sementes não-dormientes de *estilosante*, com 356 dias de idade pós-colheita, expostas às suspensões de PBZ. Média de 5 ensaios (cada qual com 5 repetições) $\pm$ erro da média

O início visível do processo germinativo ocorreu nas horas iniciais de embebição, não ocorrendo diferenças significativas entre as sementes dos diversos tratamentos empregados, i.e., o regulador aparentemente não afetou o início do processo de germinação. Contudo, nas sementes tratadas com o regulador, a saturação da germinação ocorreu em um patamar, em média, 23,5 % mais baixo que nas sementes-controle, o que mostra seu efeito inibidor. O PBZ, um retardante de crescimento, tem sido amplamente descrito como inibidor da germinação de diversas espécies (Kępczyński e Kępczyńska 1988, Marshal *et al* 2000, Faria *et al* 2004, Chen *et al* 2007). O efeito inibitório do PBZ pode dever-se a um ou dois fatores. As sementes requereriam GAs para germinar ou, desde que o etileno é requerido na germinação do estilósante (Ribeiro e Barros 2004), o inibidor estaria afetando, de uma forma ou de outra, a produção de etileno. Essas hipóteses serão examinadas no presente trabalho.

A curva de germinação mostra que a taxa média de germinação, sob a maior dosagem do PBZ (1 mol m^{-3}), mostrou-se 50 % menor do que das sementes-controle, o que produziu um patamar mais baixo de germinação nas sementes tratadas. A taxa máxima de germinação apresentou-se, sob PBZ 1 mol m^{-3} , com 2,2 sementes h^{-1} , menor do que as 4,5 sementes h^{-1} no meio de controle.

Observa-se ainda que, além de uma menor germinação, o processo germinativo afetado pelo PBZ ocorreu em um maior tempo que a germinação das sementes-controle (Tab 1). Assim, apesar de uma inibição de 50 % nas taxas médias de germinação, a diminuição em apenas 23 % da germinação acumulada ocorreu devido a uma maior duração do processo germinativo.

Todos esses resultados podem ser atribuídos a dois fatores contrastantes. Primeiro, à baixa solubilidade do PBZ; assim, entre sua aplicação e atingimento das células-alvo, um grande tempo é decorrido. O outro é a inédita produção de etileno, que ocorre poucas horas após a embebição das sementes não-dormentes. Isso explica por quê, a inibição da germinação foi de apenas 23,5 % (Fig 5), quando deveria ser bem maior. E explica também os atrasos nos outros parâmetros de germinação observados na tabela 1. Assim o tempo para atingir-se a germinação máxima, foi, em média, de 37,5 h nos tratamentos com PBZ, bem maior que as 26 h observadas no controle.

Tabela 1 – Componentes da cinética da germinação de sementes não-dormentes de estilosante, com 356 dias de idade pós-colheita, tratadas com PBZ

Tratamento	Início da germ (h)	Taxa média (sem h ⁻¹)	Taxa máx (sem h ⁻¹)	Tempo taxa máx (h)	Saturação germ (%)	Limiar de satur (h)
Controle	2,2 ± 0,03a	3,16 ± 0,18a	4,59 ± 0,33a	11,4 ± 0,46c	84,6 ± 0,79a	26,9 ± 1,44c
PBZ 0,5 mol m ⁻³	2,4 ± 0,03a	1,89 ± 0,13b	2,69 ± 0,22b	14,7 ± 0,31b	65,7 ± 2,95b	35,3 ± 1,21b
PBZ 1,0 mol m ⁻³	2,5 ± 0,03a	1,56 ± 0,02c	2,20 ± 0,03b	16,7 ± 0,18a	62,7 ± 1,07b	40,4 ± 0,55a

4.4 Reversão do efeito do PBZ na germinação

O PBZ, em sua forma isomérica 2*R*,3*R*, com estrutura heterocíclica nitrogenada, possui alta atividade regulatória de crescimento vegetal (Rademacher 2000). Apresenta, como mecanismo primário, a inibição da conversão do *ent*-caureno a ácido *ent*-caurenóico, bloqueando as reações mediadas por monooxigenases do tipo citocromo P₄₅₀, da rota biossintética das GAs (Sugavanam 1984, Köller 1987, Fletcher *et al* 2000, Rademacher 2000, Chizhova *et al* 2005). A fim de se detectar um possível requerimento dessa classe de hormônio na germinação de sementes de estilosante, tentou-se quebrar sua dormência com algumas GAs. As GAs testadas (GA₃, GA₄₊₇ e GA₉) não quebraram a dormência (Fig 6), mostrando que essa classe de hormônio vegetal não é requerida naquele processo.

A dormência fisiológica de sementes de estilosante pode ser quebrada por condições que estimulem a produção de etileno (Frigeri 1998, Barros e Freitas 2000, 2001, Pinheiro 2004, Pelacani *et al* 2005 a, b, Mapeli 2005). Tendo em vista os dados obtidos na Tabela 1, às sementes tratadas com o inibidor, foram fornecidas substâncias giberelínicas e etilênicas. O CEPA, em níveis acima de 0,01 mol m⁻³, foi eficaz na quebra da dormência (Fig 7), confirmando o requerimento do etileno no processo germinativo. O mesmo foi observado com sementes dormentes de *Amaranthus caudatus*, que responderam ao CEPA, com germinação superior a 80 % (Kępczyński *et al* 2006). Semelhantemente, o requerimento por etileno na germinação de sementes tem sido observado em várias outras espécies (Egley e Dale 1970, Kępczyński 1986, Babiker *et al* 1993, Bialecka e Kępczyński 2003).

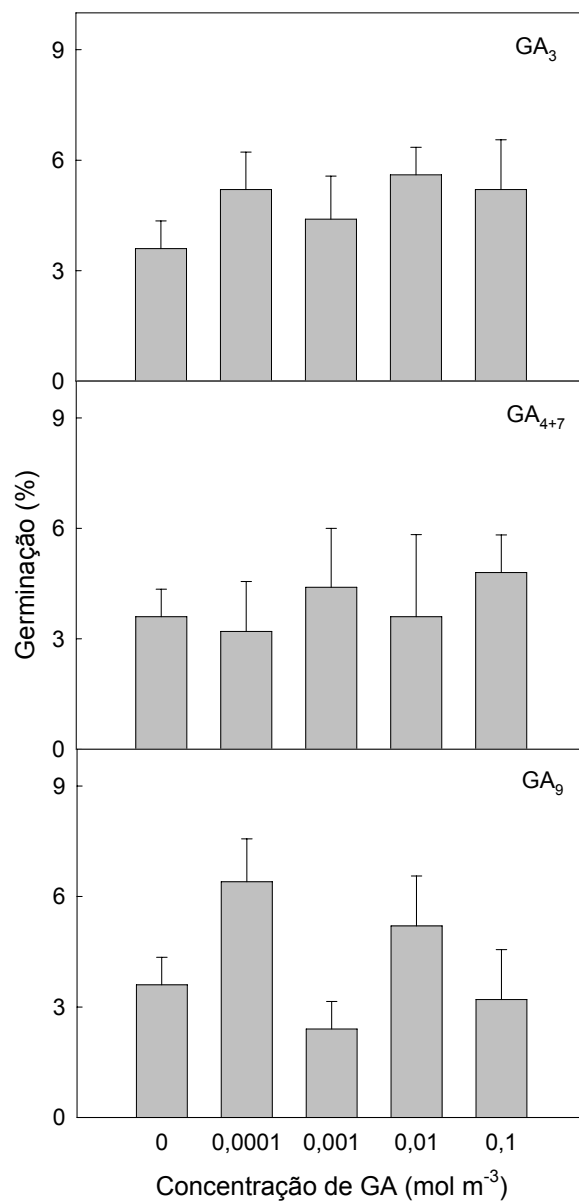


Figura 6 – Efeito de algumas GAs na germinação de sementes dormentes de *estilosante*, com 8 dias de idade pós-colheita. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média. As médias, dentro de cada tratamento, não diferiram estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

Segundo Kępczyński e Kępczyńska (1997), etileno, nos níveis de 0,1 a 200 $\mu\text{L L}^{-1}$, é usualmente suficiente para estimular a germinação de muitas espécies.

Tendo em vista a redução da germinação de sementes de estilosate pelo PBZ (Fig 1), tentou-se reverter o efeito do regulador com a adição de GA_3 , ou compostos associados à produção de etileno, como o CEPA e o ACC.

Sementes não-dormentes foram expostas a suspensão de PBZ (2 mol m^{-3}) pelos períodos de 12, 24, 48 e 72 h, uma vez que, por esses períodos, o PBZ não se mostrou tóxico às sementes (Fig 4). Após cada tempo, adicionou-se solução de GA_3 ($0,2 \text{ mol m}^{-3}$), ACC (2 mol m^{-3}) ou CEPA ($0,2 \text{ mol m}^{-3}$), obtendo-se suspensão final de PBZ 1 mol m^{-3} , GA_3 $0,1 \text{ mol m}^{-3}$, ACC 1 mol m^{-3} e CEPA $0,1 \text{ mol m}^{-3}$, acompanhando-se a germinação até o quinto dia após a incubação das sementes.

O GA_3 , independentemente do tempo de exposição, não reverteu a inibição causada pelo PBZ (Fig 8), fato já esperado, uma vez que as GAs não promoveram a germinação de sementes dormentes de estilosate (Fig 6).

ACC e CEPA reverteram completamente o efeito causado pelo PBZ, com até 24 h de exposição ao regulador. Com 48 h, o ACC promoveu germinação de 76 % e de 56 %, com 72 h de exposição (Fig 8). O precursor imediato do etileno mostrou-se eficaz na reversão da inibição da germinação causada pelo PBZ também em sementes de *Amaranthus caudatus* (Kępczyński *et al* 1988).

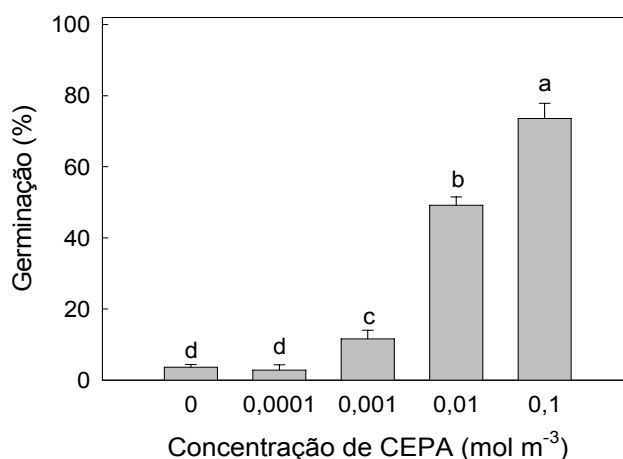


Figura 7 – Efeito do CEPA sobre a germinação de sementes dormentes de estilosate, com 8 dias de idade pós-colheita. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

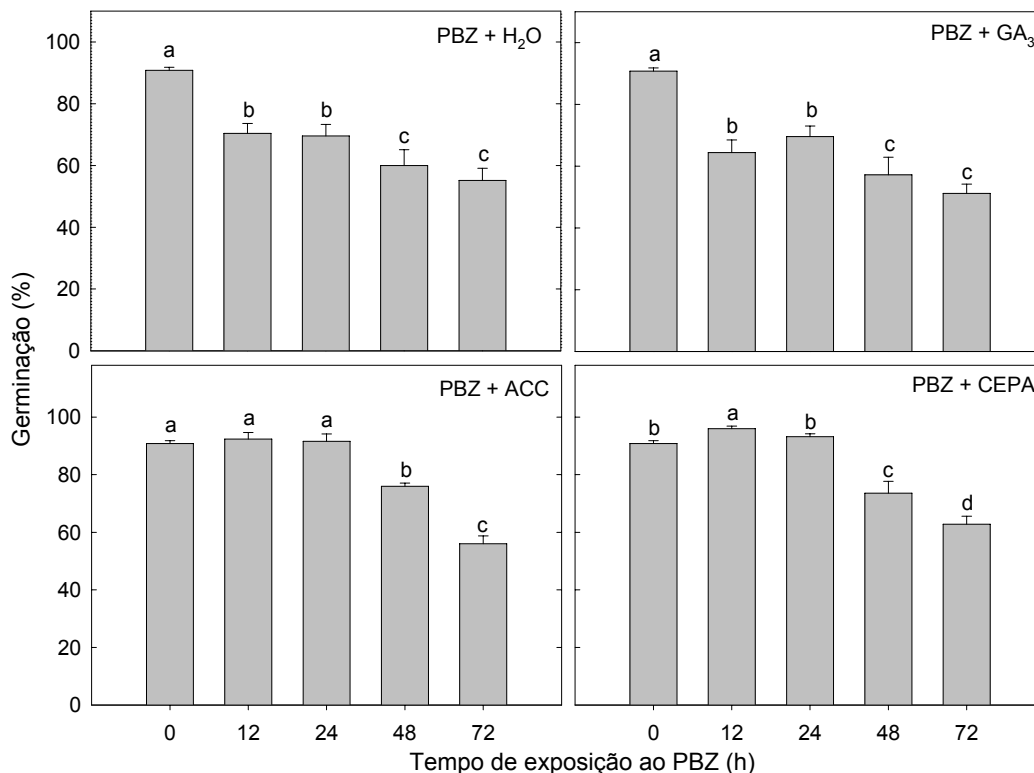


Figura 8 – Teste de reversão do efeito do PBZ com GA₃, ACC e CEPA, após diferentes períodos de exposição ao retardante de crescimento, em sementes não-dormentes de estilosante, com 442 dias de idade pós-colheita. Média de 5 repetições ± erro da média. Médias seguidas de mesma letra, dentro de cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

A aplicação de CEPA, após 48 h de exposição ao PBZ, proporcionou 73,6 % de germinação e, 62,8 % após 72 h. Entretanto, nesses períodos, o CEPA e o ACC não reverteram completamente a ação do retardante de crescimento (Fig 8).

Em experimento conduzido sob intervalos mais estreitos de concentração, observou-se que o CEPA reverteu completamente o efeito inibitório do PBZ 1 mol m⁻³, às concentrações de 0,01 e 0,1 mol m⁻³ (Fig 9). A diminuição da germinação pelo PBZ em sementes de *Striga hermonthica* deveu-se à redução da produção de etileno, uma vez que este efeito foi revertido por CEPA (Zehhar *et al* 2002), por inibição da sintase do ACC ou ainda da conversão do ACC, etapa final da biossíntese do etileno.

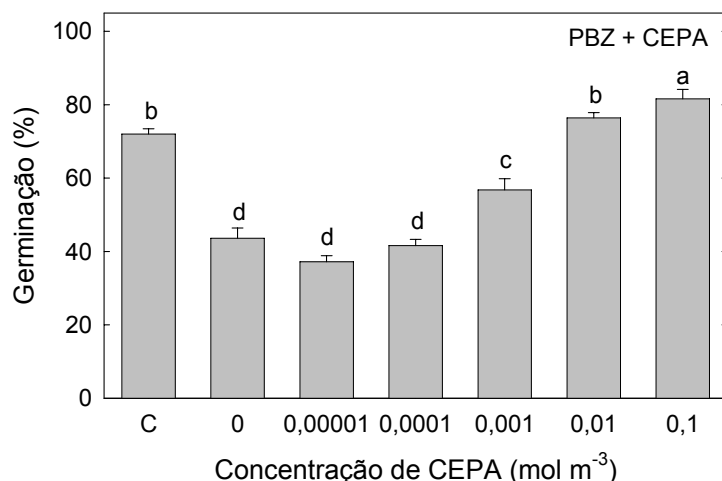


Figura 9 – Reversão do efeito do PBZ pela adição, após 24 h de exposição, de CEPA ao meio de embebição em sementes não-dormentes de estilósante, com 422 dias de idade pós-colheita. C - controle (água pH 7,0); 0 - suspensão pura de PBZ. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

O fato de que CEPA e ACC reverterem a inibição da germinação causada pelo PBZ leva à sugestão de que o regulador estaria atuando na rota biossintética do etileno. A diminuição do nível do precursor imediato do etileno, o ACC, poderia levar à redução na produção daquele hormônio, diminuindo, assim, a germinação. Isso foi observado por Abbas *et al* (1989), ao verificarem que a diminuição da germinação de *Cucumis sativus* por outro triazol, o triadimefon, deveu-se à inibição de atividade da sintase do ACC.

4.5 Cinética da germinação sob os reverteres do efeito do PBZ

Para uma análise mais definitiva dos dados observados na tabela 1 e confirmação dos dados da seção anterior, estimaram-se alguns parâmetros da germinação das sementes expostas à suspensão de PBZ (0,5 e 1,0 mol m⁻³) e às suspensões conjuntas de PBZ mais CEPA (0,1 mol m⁻³), além de PBZ mais GA₃ (0,1 mol m⁻³), ou PBZ mais TU (100 mol m⁻³) (Tab 2, Figs 10 e 11).

As sementes expostas ao PBZ (0,5 e 1,0 mol m⁻³) apresentaram taxas de germinação inferiores às apresentadas pelas sementes-controle. O tempo para atingir-

se a germinação máxima foi, em média, 30 % maior nas sementes tratadas com o PBZ, em comparação com as sementes-controle (Tab 2, Figs 10 e 11).

As sementes tratadas simultaneamente com PBZ e GA₃ apresentaram comportamento semelhante às sementes tratadas apenas com o PBZ (Figs 10 e 11), uma vez que o GA₃ parece não afetar a germinação dessas sementes (Fig 6).

As sementes tratadas conjuntamente com PBZ mais CEPA apresentaram taxas de germinação superiores às apresentadas pelas sementes-controle, com aceleração da germinação.

As sementes tratadas com PBZ sofreram inibição média de 23,5 % na germinação, em comparação com as sementes-controle (Figs 10 e 11). A diminuição da germinação das sementes pelo PBZ não afetou a sua viabilidade, como foi observado nas sementes tratadas com PBZ + TU, em que a TU promoveu germinação semelhante à do controle (Figs 10 e 11).

Tabela 2 – Alguns parâmetros de cinética de germinação de sementes não-dormentes de estilosante, com 296 dias de idade pós-colheita, tratadas com PBZ, ou suas combinações com GA₃, CEPA e TU

Tratamento	Início da germ (h)	Taxa média (sem h ⁻¹)	Taxa máx (sem h ⁻¹)	Tempo taxa máx (h)	Saturação da germ (%)	Limiar de satur (h)
Controle	1,9	2,0	11,3	7,0	82,4	13,0
PBZ 0,5 mol m ⁻³	2,1	1,2	4,3	9,7	64,4	21,8
PBZ 0,5 + GA ₃	2,3	1,3	7,6	9,4	70,4	16,9
PBZ 0,5 + CEPA	1,7	2,5	16,8	5,8	84,8	9,9
PBZ 0,5 + TU	1,6	2,8	19,1	5,3	91,2	9,2
PBZ 1,0 mol m ⁻³	2,3	1,1	5,0	10,1	61,6	20,1
PBZ 1,0 + GA ₃	2,2	1,0	3,7	9,8	56,8	22,0
PBZ 1,0 + CEPA	1,7	2,5	14,3	5,8	91,6	10,9
PBZ 1,0 + TU	1,6	2,8	19,5	4,9	92,0	8,7

4.6 Efeito do PBZ na emissão do etileno

Considerando-se que o PBZ inibe a germinação de sementes de estiracoe (Fig 1), possivelmente via produção de etileno (Fig 9), sementes não-dormentes foram embebidas em suspensão de PBZ 1 mol m^{-3} e mantidas em frascos Erlenmeyers selados, por diferentes períodos. A produção de etileno, em sementes tratadas, ocorreu posteriormente à produção do gás pelas sementes-controle, observando-se o mesmo com a germinação das sementes (Fig 12). Analisando-se alguns parâmetros de cinética da produção de etileno (Tab 3), ajustados à função de Gompertz, observou-se que as sementes-controle apresentaram taxa máxima de produção de etileno ($6,9 \text{ } \mu\text{mol sem}^{-1} \text{ h}^{-1}$) cinco vezes superior à apresentada pelas sementes tratadas com PBZ ($1,4 \text{ } \mu\text{mol sem}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Entretanto, a produção acumulada do gás ao final de 72 h, não diferiu entre os tratamentos (Fig 12). O atraso na germinação e produção de etileno causado pelo PBZ indica o envolvimento do regulador na rota biossintética do etileno. O inibidor pode estar reduzindo a produção desse hormônio pela atuação na atividade da sintase do ACC ou pela conjugação do ACC, reduzindo a disponibilidade do precursor imediato desse hormônio, ou ainda, diminuindo a conversão de ACC em etileno, por meio da redução da atividade da oxidase do ACC. Contudo, apesar do atraso observado na emissão do etileno pelas sementes expostas ao PBZ, a emissão não mais diferiu das sementes-controle ao final do período experimental. Provavelmente isso ocorreu devido à insolubilidade do PBZ, levando a um atraso no atingimento das células-alvo, o que proporcionaria, devido esse atraso, a biossíntese do etileno. Devido a sensibilidade das sementes e, ainda, pelo ambiente fechado dos frascos proporcionar acúmulo do hormônio em sua atmosfera, induziria a síntese do etileno afetando a atuação do composto. Por isso, o efeito desse regulador na síntese de etileno foi avaliado em sementes dormentes.

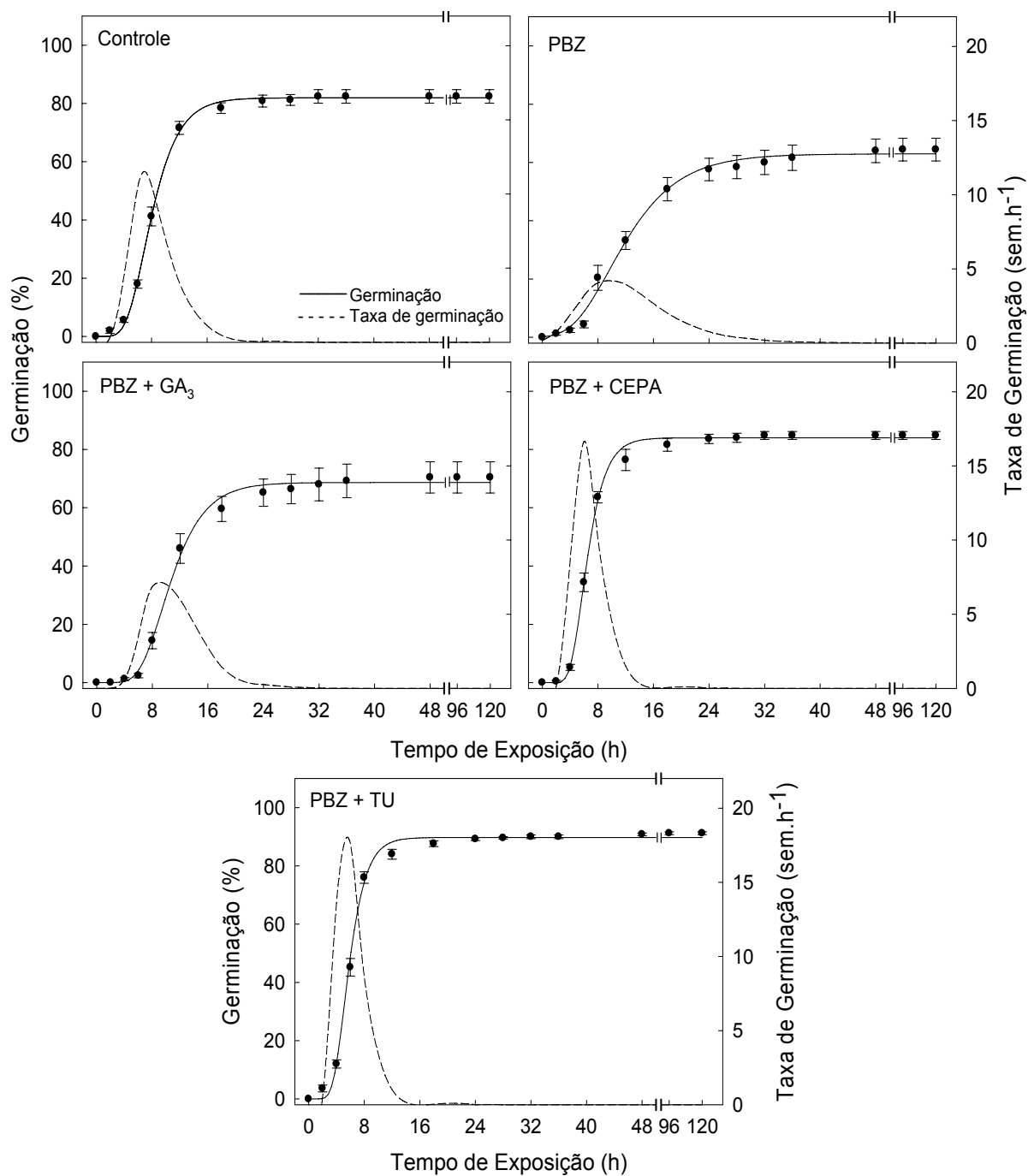


Figura 10 – Germinação acumulada e taxa de germinação de sementes não-dormentes de estilósante, com 296 dias de idade pós-colheita, expostas às suspensões de PBZ ($0,5 \text{ mol m}^{-3}$) combinadas com GA_3 ($0,1 \text{ mol m}^{-3}$), CEPA ($0,1 \text{ mol m}^{-3}$) ou TU (100 mol m^{-3}). Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

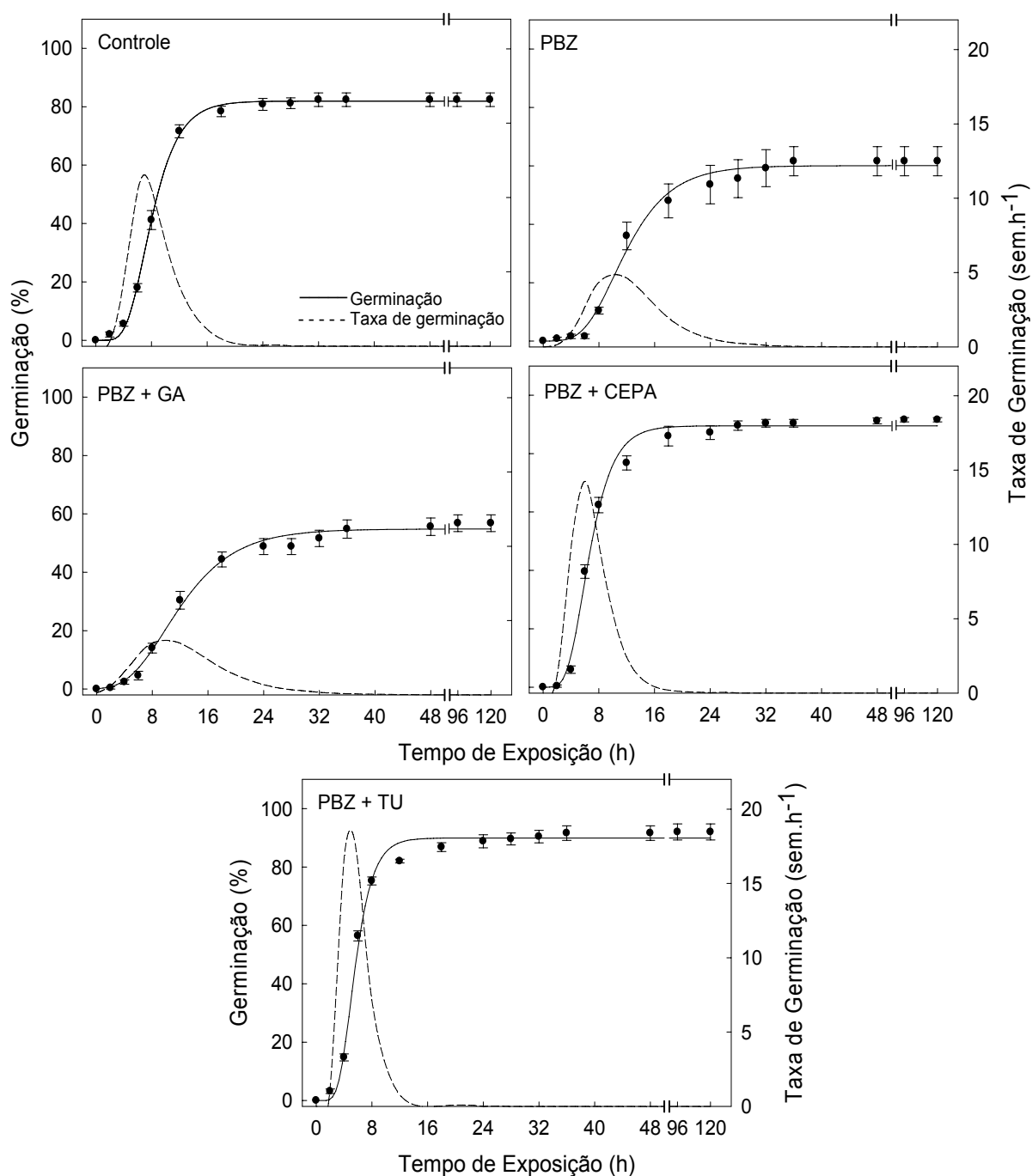


Figura 11 – Germinação acumulada e taxa de germinação de sementes não-dormentes de estilosante, com 296 dias de idade pós-colheita, expostas às suspensões de PBZ (1 mol m^{-3}) combinadas com GA_3 ($0,1 \text{ mol m}^{-3}$), CEPA ($0,1 \text{ mol m}^{-3}$) ou TU (100 mol m^{-3}). Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

Tabela 3 – Alguns parâmetros de cinética da produção de etileno em sementes não-dormentes de estilosante, com 396 dias de idade pós-colheita, tratadas com PBZ

Tratamento	Taxa média ($\mu\text{mol sem}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	Taxa máxima ($\mu\text{mol sem}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	Tempo taxa máx (h)	Prod acum etileno ($\mu\text{mol sem}^{-1}$)	Limiar de saturação (h)
Controle	1,51	6,92	25,3	126,8 $\pm$ 14,7a	40,5
PBZ	0,96	1,40	39,8	119,2 $\pm$ 18,7a	-

- não atingido

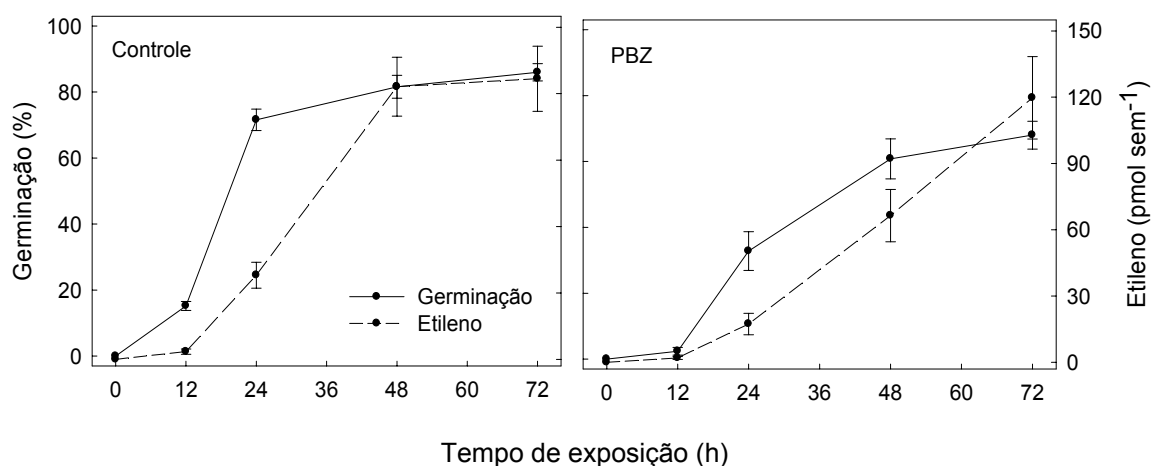


Figura 12 – Germinação e produção de etileno em sementes não-dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de 396 dias, tratadas com PBZ (1 mol m^{-3}). Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

Devido às situações descritas com as sementes não-dormentes, sementes dormentes foram embebidas em suspensão de PBZ 1 mol m^{-3} e o etileno emanado foi medido por diferentes períodos. O PBZ causou redução de 16 % na germinação das sementes, com 72 h de incubação, em comparação com as sementes-controle (Fig 13). O regulador inibiu significativamente, em aproximadamente 48 %, a produção de etileno, após 36 h de incubação. A maior inibição (63 %) ocorreu com 42 h de exposição ao regulador, em comparação com a produção do hormônio gasoso pelas sementes-controle. Abbas *et al* (1998) observaram uma redução de 63 % nos níveis de etileno, em sementes de *Cucumis sativus*, após 48 h de incubação com triadimefon, outro triazol.

As sementes submetidas ao tratamento com o PBZ apresentaram taxa máxima de $0,43 \mu\text{mol sem}^{-1} \text{ h}^{-1}$, a metade da taxa máxima de produção de etileno observada

nas sementes-controle. O tempo para atingir-se a taxa máxima de produção de etileno foi de 39 e 55 h, nas sementes controle e tratadas com PBZ, respectivamente (Tab 4). Gallardo *et al* (1991) correlacionaram o aumento da produção de etileno com a emergência radicular de *Cicer arietinum*, em sementes embebidas com água. A diminuição da produção de etileno em sementes de *Cucumis sativus* tratadas com triadimefon foi acompanhada de diminuição no acúmulo de ACC nas radículas das plântulas (Abbas *et al* 1989), sugerindo que a inibição da produção de etileno se deveu à atuação do regulador na atividade da sintase do ACC. O PBZ pode estar ainda, atuando na etapa final da rota biossintética do etileno, reduzindo, assim, a atividade da oxidase do ACC.

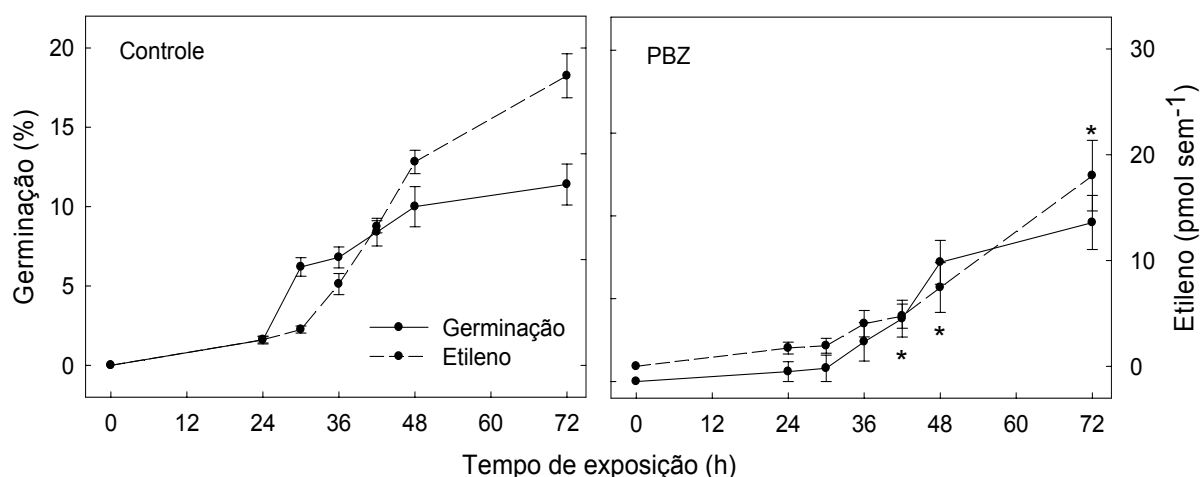


Figura 13 - Germinação e produção de etileno em sementes dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de 131 dias, tratadas com PBZ 1 mol m⁻³. Média de 5 repetições ± erro da média. O asterisco denota diferença significativa na produção de etileno, entre sementes-controle e tratadas com PBZ, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste *t*

Tabela 4 – Alguns parâmetros de cinética da produção de etileno em sementes dormentes de estilosante, com 131 dias de idade pós-colheita, tratadas com PBZ

Tratamento	Início prod etileno (h)	Taxa média (pmol sem ⁻¹ h ⁻¹)	Taxa máxima (pmol sem ⁻¹ h ⁻¹)	Tempo taxa máx (h)	Prod acum etileno (pmol sem ⁻¹)
Controle	1	0,50	0,90	38,9	27,4 ± 2,1a
PBZ	1	0,25	0,43	55,7	18,0 ± 3,3b

4.7 Efeito do PBZ nos níveis de ACC

Considerando-se que o PBZ estaria diminuindo a germinação de sementes pela redução da produção de etileno (Fig 13), avaliou-se o efeito do regulador nos níveis de ACC, como forma indireta de se determinar sua atuação sobre a sintase do ACC.

Os níveis de ACC e a germinação de sementes não-dormentes tratadas com PBZ 1 mol m^{-3} são mostrados na Fig 14. As sementes tratadas apresentaram níveis significativamente menores de ACC livre, por semente, já com 12 h de incubação no PBZ. O maior nível de inibição (46 %) ocorreu com 18 h de incubação, em relação às sementes-controle. A diferença foi menor com base na massa fresca (MF) como resultado de um aumento da MF nas sementes controle.

Os níveis de ACC conjugado mostraram-se maiores em sementes tratadas com PBZ com 18 (27 %) e 24 (34 %) h de incubação, comparados com as sementes-controle (Fig 14). A redução nos níveis de ACC livre pelo PBZ pode ter sido devida à conjugação do ACC, possivelmente a ácido 1-carboxílico-N-malonil-1-aminociclopropano (MACC), como foi sugerido por Abbas *et al* (1989), ao observarem redução na produção de etileno e nos níveis de ACC total em raízes primárias de *Cucumis sativus*, tratadas com triadimefon, um outro triazol.

Com 18 h de incubação, as sementes tratadas com PBZ apresentaram, em média, na forma conjugada, 87% do ACC acumulado, e 82% após 24 h de incubação. As sementes-controle apresentaram menor conjugação do ACC, com 72 %, no período de 18 h, e 69%, com 24 h de incubação (Fig 14). O incremento nos níveis de ACC conjugado, em sementes tratadas, representa uma menor disponibilidade de ACC livre, reduzindo assim, sua conversão a etileno. A diminuição na produção de etileno ocasionaria menor germinação das sementes, uma vez que o ACC conjugado para a forma livre parece irreversível, sendo, também, aparentemente, biologicamente inativo (Hoffman e Yang 1982, Yang e Hoffman 1984, Mansour *et al* 1986). A conjugação funcionaria como mecanismo para controlar possível excesso de ACC livre, o que regularia a biossíntese de etileno (Martin-Remesal *et al* 2000).

Os níveis de ACC total diferiram estatisticamente entre as sementes não-dormentes expostas à suspensão de PBZ e à solução-controle, quando expressos em

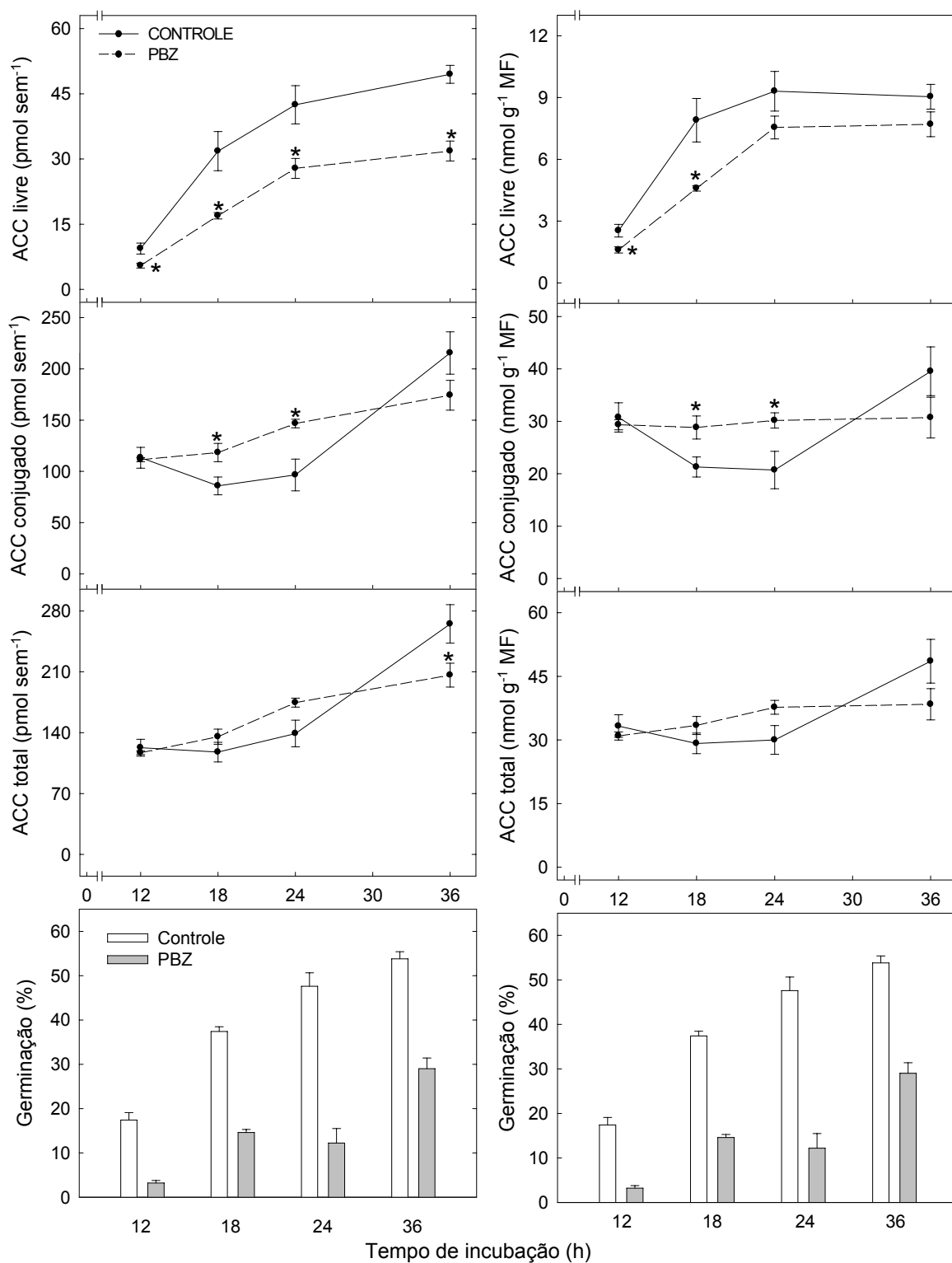


Figura 14 – Efeito do PBZ nos níveis de ACC e na germinação de sementes não-dormientes de estilosante com 395 dias de idade pós-colheita. Médias de 5 repetições $\pm$ erro da média. O asterisco denota diferença significativa, entre controle e PBZ, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste *t*. Notar a diferença de escala nos níveis de etileno

número de sementes, com 36 h de incubação (Fig 14). Esses dados podem ser atribuídos ao efeito do PBZ na conjugação do composto pelo incremento no ACC conjugado, disponibilizando um menor nível de ACC ativo para conversão a etileno. Plântulas de *Cucumis sativus*, tratadas com triadimefon, também apresentaram redução na produção de etileno e nos níveis de ACC em raízes primárias (Abbas *et al* 1989). Os autores sugerem que a redução nos níveis de ACC livre foi devida aos triazóis inibirem a atividade da sintase do ACC, ou ainda, pela conjugação do composto. Segundo Wang e Steffens (1985), o PBZ previniu o acúmulo de ACC e MACC em sementes de *Malus domestica* submetidas a estresse hídrico, diminuindo a produção de etileno. Para os autores, a síntese de ACC seria a etapa chave na qual o PBZ exerceria seu efeito.

Em um segundo experimento, buscando-se avaliar uma possível ação do PBZ na indução da sintase do ACC, utilizou-se a selenouréia (SeU) como um possível composto indutor daquela enzima (Pinheiro 2004). Sementes dormentes de estilósante foram tratadas com solução-controle ou PBZ 2 mol m^{-3} e, após 24 h, adicionou-se SeU 2 mol m^{-3} , obtendo-se uma suspensão final de PBZ e SeU de 1 mol m^{-3} . Após 24 h de incubação, observou-se que a SeU ocasionou um pequeno incremento nos níveis de ACC total. Entretanto, esse estímulo foi suficiente para aumentar três vezes o nível de ACC livre, inibido pelo PBZ (Fig 15), em comparação com as sementes não-tratadas.

Os níveis de ACC conjugado não diferiram com os tratamentos aplicados, ao passo que, os níveis de ACC total apresentaram-se maiores (26,8 %) nas sementes tratadas com SeU, devido ao incremento nos níveis de ACC livre. Sementes tratadas com suspensão de PBZ mais SeU não apresentaram aumento nos níveis de ACC livre, indicando atuação do regulador na conjugação do ACC (Fig 15).

A conjugação do ACC reduz a disponibilidade de ACC biologicamente ativo que, por ser precursor imediato do etileno, diminui a produção desse hormônio, correlacionando-se com a menor germinação das sementes de estilósante (Fig 15). A diminuição na produção de etileno, relacionada com a diminuição no conteúdo de ACC, foi também observada por Hofstra *et al* (1989), em plantas de feijão tratadas com uniconazol, um retardante da classe dos triazóis.

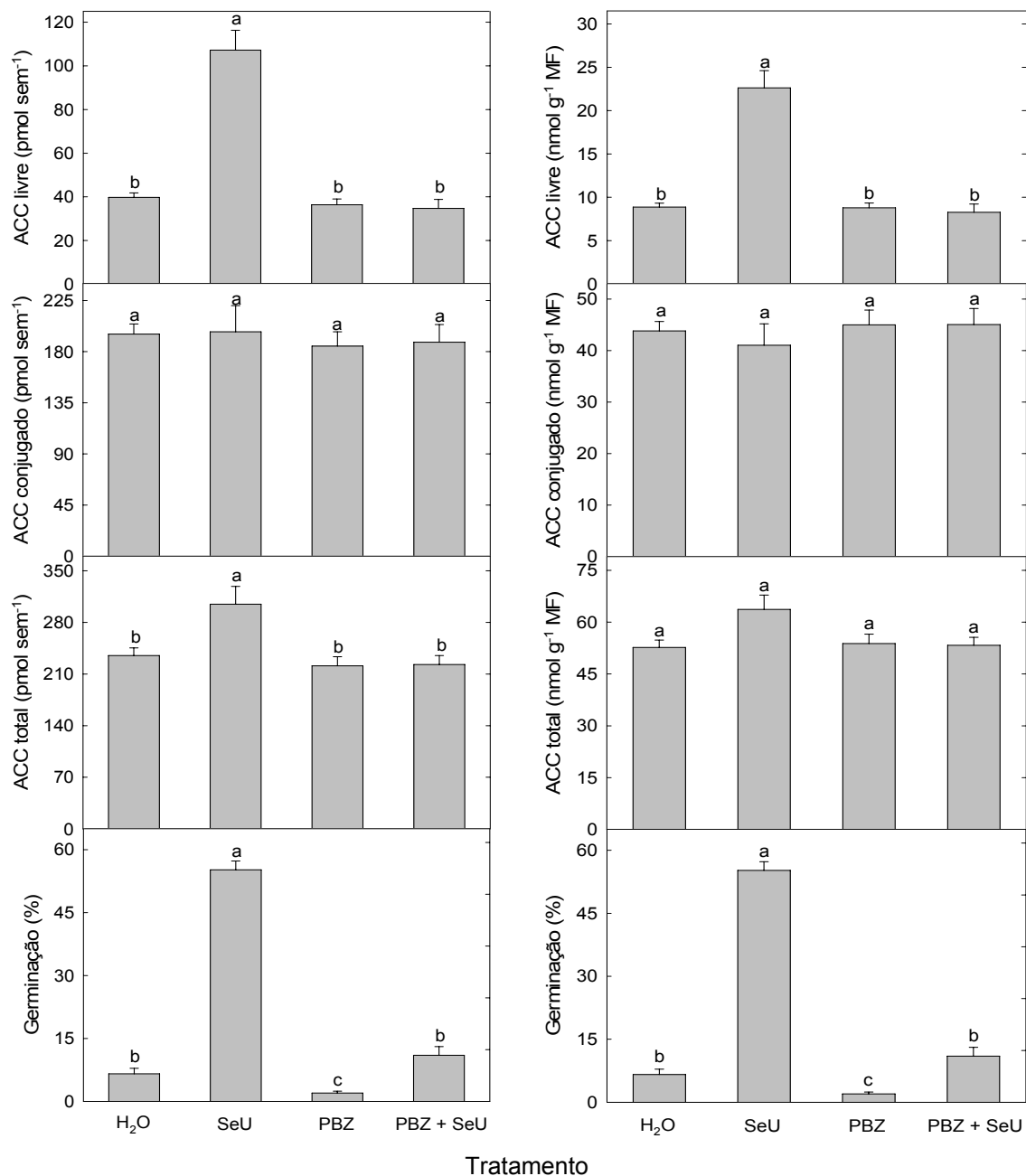


Figura 15 – Níveis de ACC e germinação de sementes dormentes de estilosante com 147 dias de idade pós-colheita. Tratamentos iniciais com SeU ou PBZ (ambos 2 mol m⁻³), seguidos de adição, no meio de embebição, após 24 h, de água ou solução de SeU (2 mol m⁻³), obtendo-se suspensão final de PBZ e SeU de 1 mol m⁻³. Médias seguidas de mesma letra, dentro de cada tratamento, não diferem entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey (níveis de ACC) ou Scott-Knott (germinação). Média de 5 repetições ± erro da média. Notar a diferença de escala nos níveis de ACC

4.8 Efeito do PBZ na atividade *in vivo* e *in vitro* da oxidase do ACC

Para verificar se a diminuição da produção do etileno em sementes tratadas com PBZ se dá em nível da oxidase do ACC, avaliou-se o efeito do PBZ na atividade *in vivo* dessa enzima. Sementes não-dormentes foram embebidas em suspensão de PBZ 1 mol m^{-3} , por 24 h. Após esse período, removeu-se a suspensão inicial e adicionou-se suspensão de PBZ pura 1 mol m^{-3} ou suspensão conjunta de PBZ mais ACC (ambos a 1 mol m^{-3}), substrato da oxidase do ACC (Yang e Hoffman 1984).

Com 24 h de incubação, a atividade enzimática apresentou-se menor em sementes tratadas com o PBZ. Após 24 h, observou-se que a atividade da oxidase do ACC *in vivo* tendeu a se igualar entre os tratamentos (Fig 16), provavelmente devido uma baixa atuação do inibidor visto a parcial insolubilidade do composto, reduzindo assim, a possibilidade de atingimento do tecido-alvo, com a recuperação de produção do etileno.

Devido ao acúmulo de etileno emanado pelas sementes em sistema fechado, a atividade *in vivo* da oxidase do ACC em sementes dormentes foi avaliada em sementes não-dormentes, que produzem menos etileno e são menos sensíveis ao regulador. Sementes tratadas com PBZ apresentaram redução na atividade *in vivo* da oxidase do ACC. A suspensão conjunta de PBZ mais ACC inibiu de forma expressiva (78 %) a atividade da enzima, com 12 h de incubação, em comparação com o controle (- PBZ). A redução da atividade enzimática sob suspensão de PBZ mais ACC (ambos 1 mol m^{-3}) manteve-se em 67 % com 24 h, e 49 % de inibição com 48 h de incubação (Fig 17).

O PBZ reduziu a atividade *in vivo* da oxidase do ACC em sementes dormentes de estíloso (Fig 17) que, juntamente com a diminuição na germinação, nos níveis de etileno (Fig 13) e de ACC livre (Fig 15), indica a atuação do PBZ na rota biossintética do etileno. Min e Bartholomew (1996) verificaram redução na produção de etileno em tecidos foliares basais de *Ananas comosus* tratados com PBZ, sem afetar o conteúdo de ACC. O regulador, segundo os autores, estaria atuando possivelmente sobre a atividade da oxidase do ACC. Tari e Mihalik (1998) observaram que hipocótilos de *Phaseolus vulgaris* sofreram redução no crescimento e diminuição na produção de etileno, quando tratados com PBZ. Os autores verificaram acúmulo de ACC nos hipocótilos tratados com o regulador,

possivelmente devido à atuação do PBZ na conversão de ACC em etileno (Tari e Nagy 1994), por meio da redução na atividade da oxidase do ACC.

A atividade *in vitro* da oxidase do ACC foi estimada em sementes não-dormentes de estilósante submetidas ao PBZ (1 mol m^{-3}) por 12, 24, 36 e 48 h. O PBZ inibiu significativamente a atividade *in vitro* da oxidase do ACC com 36 h de incubação, quando expressa com base no número de sementes e em proteína. Ao final de 48 h de embebição em PBZ, a atividade da oxidase do ACC mostrou-se inibida (43 %) em relação ao controle (Fig 18). A redução na atividade da oxidase do ACC apresentou-se atrasada em relação ao processo de germinação e de produção de etileno em sementes tratadas com o regulador.

A redução na produção de etileno em sementes de *Triticum aestivum* e suspensão celular de *Helianthus annuus* tratadas com compostos triazólicos não foi acompanhada pela diminuição nos níveis de ACC (Sauerbrey *et al* 1988, Kraus *et al* 1991) e nem pela conjugação do ACC, em sementes de *Glycine max* (Sauerbrey *et al* 1988). Isso sugere que os triazóis estariam bloqueando a síntese de etileno, por meio da inibição da conversão de ACC para o regulador gasoso, pela oxidase do ACC (Sauerbrey *et al* 1988, Grossmann *et al* 1989, Kende 1993).

Calvo *et al* (2004) isolaram um clone (cDNA) da oxidase do ACC, o *FsACO1*. Observaram que a expressão do *FsACO1* correlacionou-se com a atividade *in vitro* da oxidase do ACC, o conteúdo de ACC e a produção de etileno, mostrando-se associados com a germinação de sementes de *Fagus sylvatica*. O efeito estimulatório do CEPA foi revertido pela aplicação de PBZ, causando diminuição na produção de etileno, no conteúdo de ACC livre e na atividade *in vitro* da oxidase do ACC naquelas sementes (Calvo *et al* 2004). Observou-se, no presente trabalho, com sementes de estilósante, uma diminuição na atividade da oxidase do ACC em sementes tratadas com PBZ que se correlacionou com a produção de etileno, a partir de 36 h de incubação (Fig 13). Entretanto, essa redução na atividade enzimática ocorreu após a redução nos níveis de ACC livre (Fig 14) e a diminuição da germinação afetada pelo regulador (Tab 1).

Para avaliar-se o efeito do PBZ na atividade *in vitro* da oxidase do ACC, em sementes dormentes estimuladas, as sementes foram previamente tratadas com ACC a fim de ativar a oxidase do ACC, uma vez que, quando dormentes, apresentam baixa atividade enzimática devido a um baixo conteúdo de ACC (Pinheiro 2004).

Sementes dormentes apresentaram um pico de atividade da oxidase do ACC após 36 h de incubação (Fig 19), i.e., após as sementes não-dormentes (Fig 18), que apresentaram maior atividade com 24 h de incubação em suspensão de PBZ.

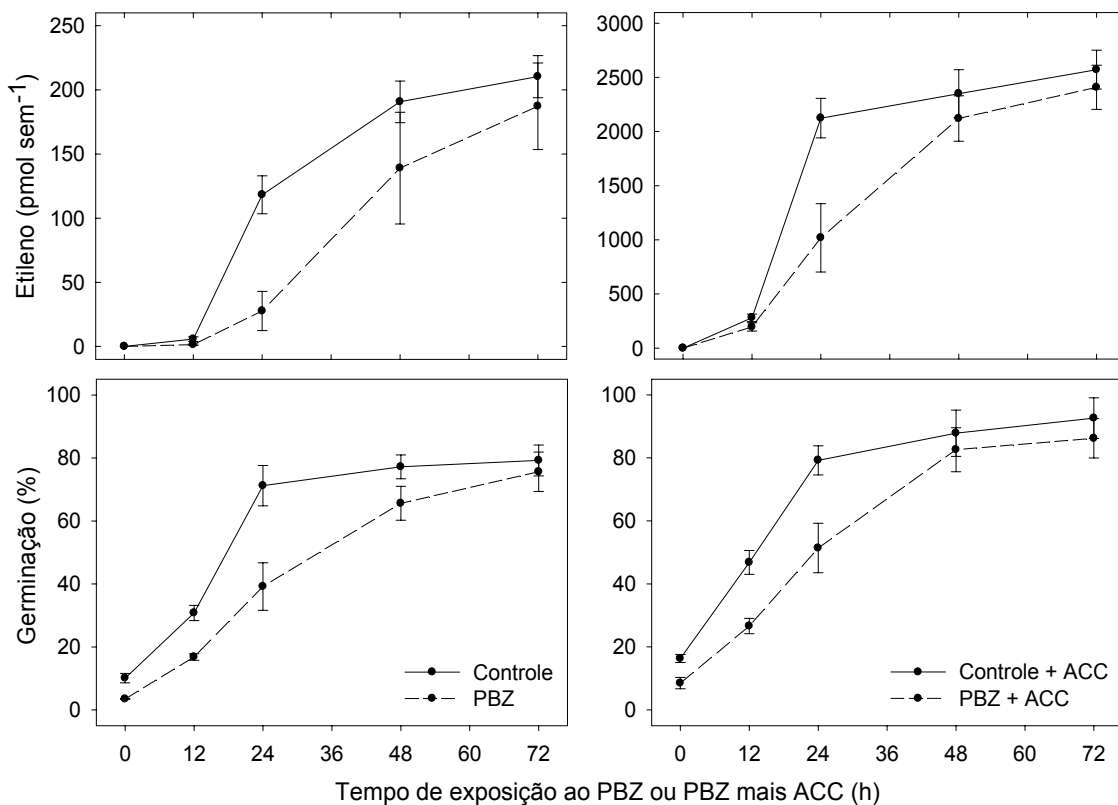
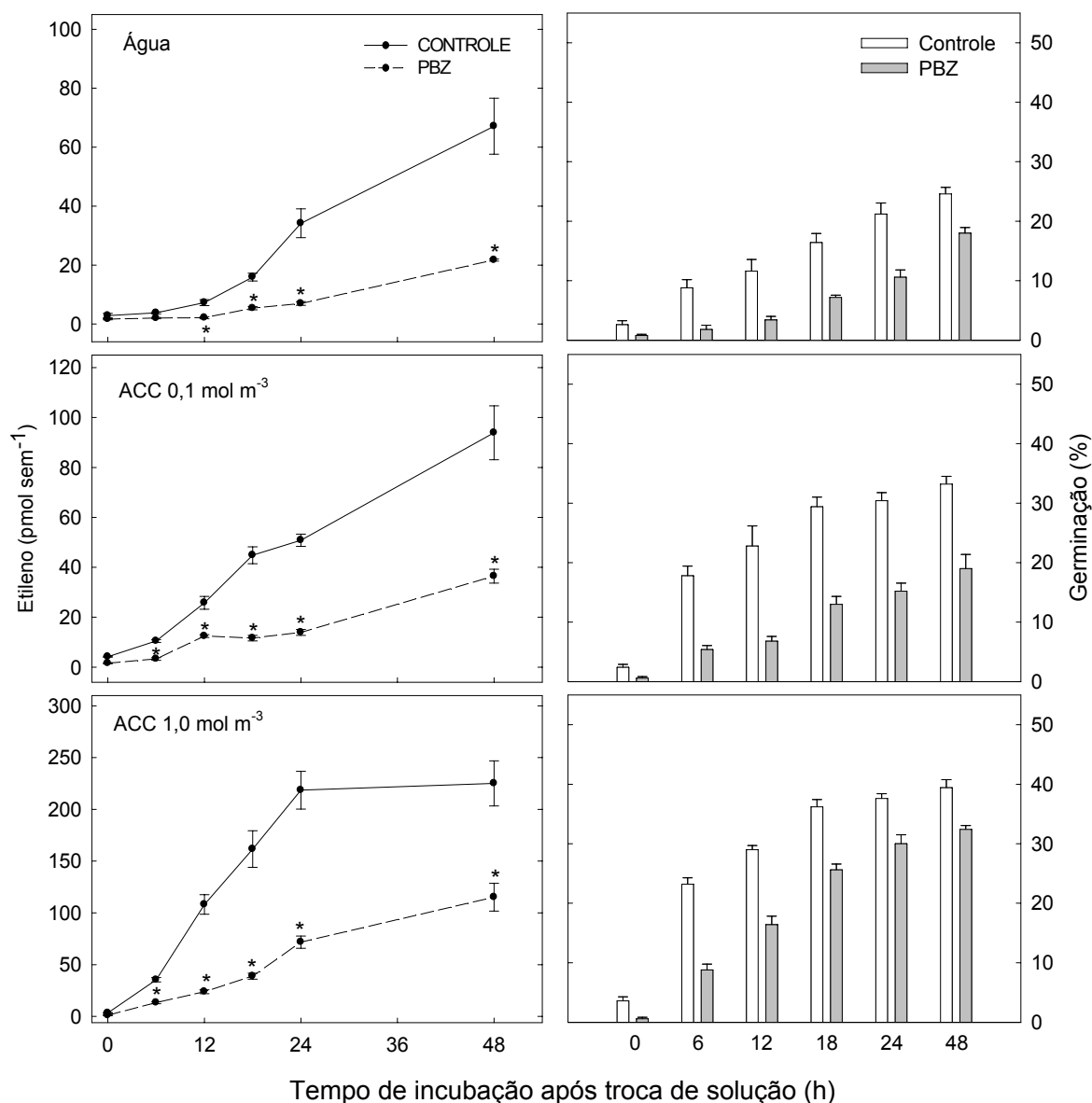


Figura 16 – Atividade *in vivo* da oxidase do ACC e germinação de sementes não-dormentes de estíloso, com idade pós-colheita de 378 dias, tratadas com suspensão de PBZ (1 mol m^{-3}) por 24 h. Após esse período, realizou-se troca do meio inicial por suspensão pura de PBZ (1 mol m^{-3}) (esquerda) ou por suspensão conjunta de PBZ mais ACC (ambos 1 mol m^{-3}) (direita). A quantificação do etileno ocorreu 0, 12, 24, 48 e 72 h após a troca de solução. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média. Notar a diferença de escala nos níveis de etileno



No período de maior atividade enzimática, 36 h, o PBZ causou, em média, redução em 71 % na atividade da oxidase do ACC. Com 72 h de incubação, a atividade da oxidase do ACC diminuiu 42 %, quando expressa em número de sementes e teor de proteína (Fig 19). Esses dados assemelham-se aos dos experimentos de Min e Bartholomew (1996), com tecidos foliares de *Ananás comosus*, ao observarem inibição da atividade da oxidase do ACC por retardantes de crescimento da classe dos triazóis. Observou-se nas sementes dormentes de estilosante tratadas com PBZ, que a emissão de etileno se apresentou significativamente reduzida com 42 h de incubação (Fig 13). A diminuição na produção de etileno em sementes dormentes correlacionou-se com o período de maior inibição da atividade *in vitro* da oxidase do ACC pelo regulador (Fig 19). Em sementes não-dormentes observou-se um atraso na germinação e uma diminuição da atividade *in vitro* da oxidase do ACC, quando tratadas com PBZ. A redução na atividade da oxidase do ACC pode ser devida ao regulador atuar na conjugação do ACC, reduzindo a disponibilidade do precursor imediato do etileno, diminuindo, assim, a produção desse hormônio gasoso requerido para a germinação das sementes.

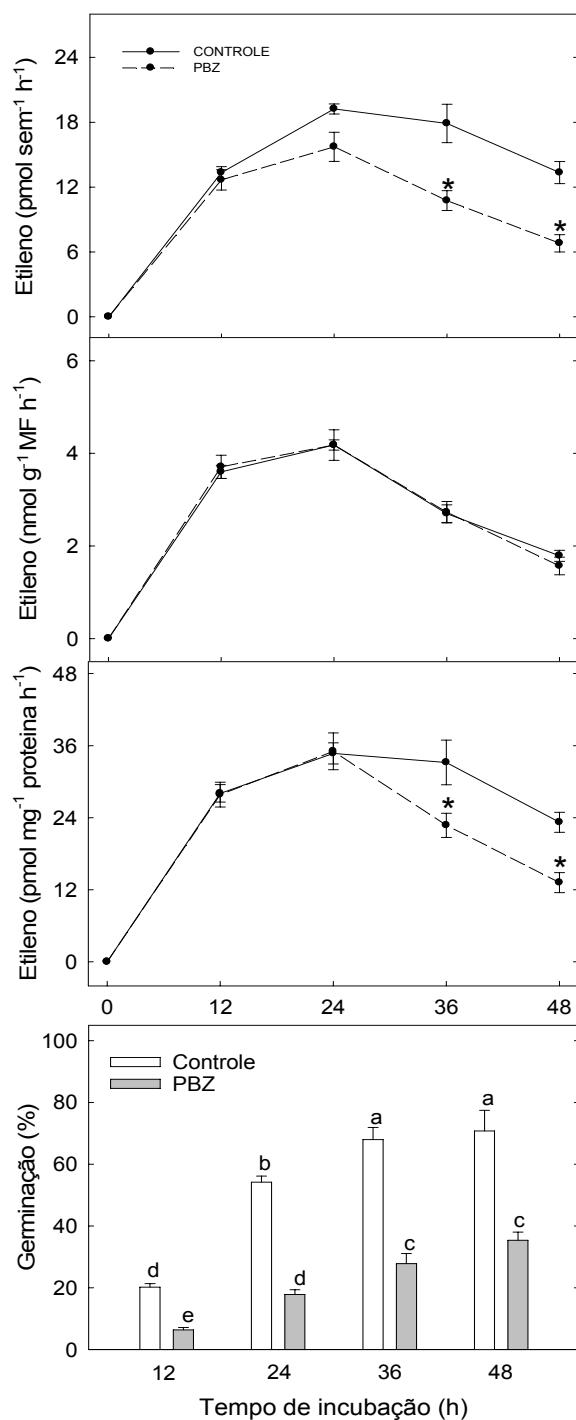


Figura 18 – Atividade *in vitro* da oxidase do ACC em extrato de sementes não-dormentes, com 405 dias de idade pós-colheita, tratadas com suspensão de PBZ por 12, 24, 36 e 48 h de incubação. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey. O asterisco denota diferença significativa, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste *t*

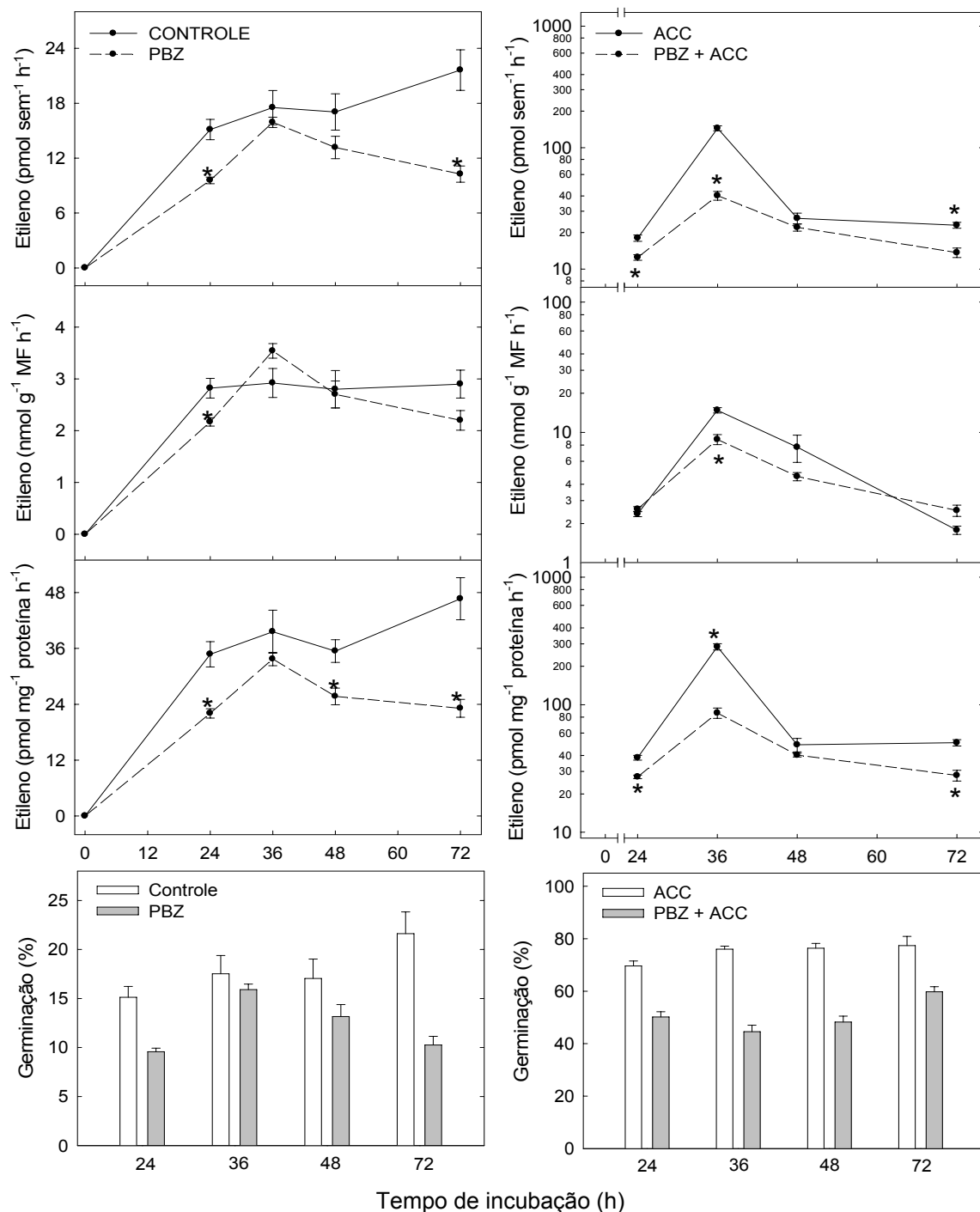


Figura 19 – Atividade *in vitro* da oxidase do ACC em extrato de sementes dormentes, com 163 dias de idade pós-colheita, tratadas com suspensão de PBZ (2 mol m⁻³) seguida de adição, após 24 h, de água (esquerda) ou ACC 2 mol m⁻³ (direita), obtendo-se assim, suspensões final de PBZ e ACC 1 mol m⁻³. Média de 5 repetições ± erro da média. O asterisco denota diferença significativa, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste *t*. Notar a escala logarítmica na produção de etileno, à direita.

5 CONCLUSÕES

O paclobutrazol (PBZ) promoveu uma diminuição na germinação de sementes não-dormentes de *Stylosanthes humilis*. As giberelinas não quebraram a dormência das sementes e a GA₃ tampouco reverteu o efeito do PBZ em sementes não-dormentes, demonstrando não serem requeridas no processo germinativo de estilósante. O ácido 1-carboxílico-1-amonociclopropano (ACC), precursor imediato do etileno e o ácido 2-cloroetilfosfônico, substância liberadora de etileno, reverteram os efeitos do PBZ na germinação de sementes não-dormentes, demonstrando uma possível atuação do regulador na biossíntese do etileno.

A produção de etileno mostrou-se diminuída em sementes dormentes e sofreu atraso em sementes não-dormentes, tratadas com PBZ. Sementes não-dormentes apresentaram redução nos níveis de ACC livre, quando submetidas ao PBZ, correlacionando-se com o atraso na germinação e na emissão do etileno.

Os níveis de ACC livre mostraram-se reduzidos em sementes tratadas com PBZ, devido a uma possível conjugação do ACC. A conjugação do ACC pareceu correlacionar-se, dessa forma, com a diminuição na germinação e com os níveis menores de etileno emanado pelas sementes de estilósante.

A atividade *in vivo* da oxidase do ACC foi reduzida pelo tratamento com PBZ em sementes dormentes. O PBZ também diminuiu a atividade *in vitro* da oxidase do ACC, quando expressa por número de sementes e proteína, a partir de 36 h de incubação. As sementes tratadas com o PBZ apresentaram menor porcentagem de germinação, possivelmente devido à redução da atividade *in vivo* da oxidase do ACC, diminuindo, assim, a produção de etileno requerido para a germinação das sementes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS S, FLETCHER RA, MURR DP (1989) Alteration of ethylene synthesis in cucumber seedlings by triadimefon. **Can J Bot** 67:278-280
- ABELES FB (1986) Role of ethylene in *Lactuca sativa* cv “Grand Rapids” seed germination. **J Plant Physiol** 81:780-787
- AMER FA, WILLIAMS WT (1957) Leaf-area growth in *Pelargonium zonale*. **Ann Bot** 21:339-342
- ARAUJO EF, ARAUJO RF, SILVA RF, GALVÃO JCC (2002) Superação da dureza de sementes e frutos de *Stylosanthes scabra* J. Vogel e seu efeito na germinação. **Rev Bras Sem** 24:77-81
- BABIKER AGT, BUTLER LG, EJETA G, WOODSON WR (1993) Enhancement of ethylene biosynthesis and germination by cytokinins and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Striga asiatica* seeds. **Physiol Plant** 89:21-26
- BALLARD LAT, BUCHWALD T (1971) A viability test for seeds of Townsville stylo using thiourea. **Aust J Exp Agr Anim Husb** 11:207-210
- BARROS RS, FREITAS AWP (2000) Stimulation of germination of dormant seeds of Townsville stylo by selenomethionine. **Seed Sci Technol** 28:241-247
- BARROS RS, FREITAS AWP (2001) Selenomethionine as a dormancy-breaking agent in seeds of *Stylosanthes humilis*. **Acta Physiol Plant** 23:279-284
- BARROS RS, RIBEIRO DM (2006) Enhancement of ethylene production by dormant seeds of *Stylosanthes humilis* induced to germinate in closed environments. **Trop Grasslands** 40: 237-243
- BEWLEY JD, BLACK M (1994) **Seeds: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York, Plenum Press. 445 p
- BIAŁECKA B, KĘPCZYŃSKI J (2003) Regulation of α -amylase activity in *Amaranthus caudatus* seeds by methyl jasmonate, gibberellin A₃, benzyladenine and ethylene. **Plant Growth Regul** 39:51-56
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72:248-254
- BURIN M, BARROS RS, RENA AB (1987) Chemical regulation of endogenous dormancy in seeds of *Stylosanthes humilis* H.B.K. **Turrialba** 37:281-285

- CALBO AG, SILVA WLC, TORRES AC (1989) Ajuste de funções não lineares de crescimento. **Rev Bras Fisiol Veg** 1:9-18
- CALVO PC, NICOLÁS C, LORENZO O, NICOLÁS G, RODRÍGUEZ D (2004) Evidence for positive regulation by gibberellins and ethylene of acc oxidase expression and activity during transition from dormancy to germination in *Fagus sylvatica* L. seeds. **J Plant Growth Regul** 23: 44-53
- CAMERON DF (1967) Hardseededness and seed dormancy of Townsville Lucerne (*Stylosanthes humilis*) selections. **Aust J Exp Agr Anim Husb** 7:237-240
- CAMERON DF, 't MANNETJE L (1977) Effects of photoperiod and temperature on flowering of twelve *Stylosanthes* species. **Aust J Exp Agr Anim Husb** 17:417-424
- CAUSTON DR (1983) **A biologist's basic mathematics**. London: Edward Arnold. 216 p
- CHIZHOVA SI, PAVLOVA VV, PRUSAKOVA LD (2005) Absciscic acid content and growth of spring barley plants treated with triazoles. **Russian J Plant Physiol** 52:108-114
- DANTIGNY P, MARÍN S, BEYER M, MAGAN NARESH (2007) Mould germination: data treatment and modeling. **Intern J Food Microb** 114:17-24
- DE RUEDA PM, GALLARDO M, MATILLA AJ, SÁNCHEZ-CALLE IM (1995) Preliminary characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase properties from embryonic axes of chick-pea (*Cicer arietinum* L.) seeds. **J Exp Bot** 46:695-700
- DELATORRE CA, BARROS RS (1996) Germination of dormant seeds of *Stylosanthes humilis* as related to heavy metal ions. **Biol Plant** 38:269-274
- DELATORRE CA, BARROS RS, VIEIRA HD (1997) Germinação de sementes de *Stylosanthes humilis* em resposta a tiouréia. **Rev Bras Fisiol Veg** 9:49-53
- EGLEY GH, DALE JE (1970) Ethylene, 2-chloroethylphosphonic acid, and witchweed germination. **Weed Sci** 18:586-589
- EPLEE RE (1975) Ethylene: a witchweed seed germination stimulant. **Weed Sci** 23:433-436
- FERNÁNDEZ-MACULET JC, YANG SF (1992) Extraction and partial characterization of the ethylene-forming enzyme from apple fruit. **Plant Physiol** 99:751-754

- FLETCHER RA, SOPHER CR, VETTAKKORUMAKANKAV NN (2000) Regulation of gibberellins is crucial for plant stress protection. *In: Plant Growth Regulators in Agriculture and Horticulture – Their role and commercial uses*. The Haworth Press: New York. p 71-87
- FRIGERI RBC (1998) **Efeito do pH na germinação de sementes dormentes de *Stylosanthes humilis* H.B.K.** Viçosa UFV. 56 p (Tese de Mestrado)
- GALLARDO M, DELGADO MM, SÁNCHEZ-CALLE IM, MATILLA AJ (1991) Ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conjugation in thermoinhibited *Cicer arietinum* L. seeds. **Plant Physiol** 97:122-127
- GALLARDO M, DE RUEDA PM, MATILLA A, SANCHEZ-CALLE IM (1994) The relationships between ethylene production and germination of *Cicer arietinum* seeds. **Biol Plant** 36:201-207
- GROSSMANN K, HÄUSER CH, SAUERBREY E, FRITSCH H, SCHMIDT O, JUNG J (1989) Plant growth retardants as inhibitors of ethylene production. **J Plant Physiol** 134: 538-543
- HOFFMAN NE, YANG SF (1982) Identification of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid as a major conjugate of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor in higher plants. **Biochem Biophys Res Commun** 104: 765-770
- HOFSTRA G, KRIEG LC, FLETCHER RA (1989) Uniconazole reduces ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and increases spermine levels in mung bean seedlings. **J Plant Growth Regul** 8:45-51
- KENDE H (1993) Ethylene biosynthesis. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 44:283-307
- KĘPCZYŃSKI J (1986) Inhibition of *Amaranthus caudatus* seed germination by polyethylene glycol-6000 and abscisic acid and its reversal by ethephon or 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **Physiol Plant** 67: 588-591
- KĘPCZYŃSKI J, BIHUN M, KĘPCZYŃSKA E (2006) Implication of ethylene in the release of secondary dormancy in *Amaranthus caudatus* L. seeds by gibberellins or cytokinin. **Plant Growth Regul** 48:119-126
- KĘPCZYŃSKI J, KĘPCZYŃSKA E (1997) Ethylene in seed dormancy and germination. **Physiol Plant** 101: 720-726

- KÖLLER W (1987) Isomers of sterol synthesis inhibitors: fungicidal effects and plant growth regulator activities. **Pest Sci** 18:129-147
- KRAUS TE, MURR DP, FLETCHER RA (1991) Uniconazole inhibits stress-induced ethylene in wheat and soybean seedlings. **J Plant Growth Reg** 10:229-234
- LABORIAU LG (1983) **A germinação das sementes**. Washington, OEA. 174 p
- LEHLE FR, PUTNAM AR (1982) Quantification of allelopathic potential of sorghum residues by novel indexing of Richard's function fitted to cumulative cress seed germination curves. **Plant Physiol** 69:1212-1216
- LIZADA MCC, YANG SF (1979) A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **Anal Biochem** 100: 140-145
- LOCKE JM, BRYCE JH, MORRIS PC (2000) Contrasting effects of ethylene perception and biosynthesis inhibitors on germination and seedling growth of barley (*Hordeum vulgare* L.) **J Exp Bot** 51:1843-1849
- LOGAN DC, STEWART GR (1991) Role of ethylene in the germination of the hemiparasite *Striga hermonthica*. **Plant Physiol** 97:1435-1438
- LOGAN DC, STEWART GR (1995) Thidiazuron stimulates germination and ethylene production in *Striga hermonthica* – comparison with the effects of GR-24, ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **Seed Sci Res** 5:99-108
- LOVATO MB, MARTINS PS, LEMOS FILHO JP (1994) Germination in *Stylosanthes humilis* populations in the presence of NaCl. **Aust J Bot** 42:717-723
- MÅGE F, POWELL L (1990) Inhibition of stratification and germination of apple seeds by paclobutrazol. **HortScience** 25:577
- MANSOUR R, LATCHÉ A, VAILLANT V, PECH J-C, REID MS (1986) Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in ripening apple fruits. **Physiol Plant** 66: 495-502
- MAPELI AM (2005) **Quebra da dormência de sementes de *Stylosanthes humilis* H.B.K. por íons alumínio e férrico**. Tese de Mestrado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 65 p
- MARSHALL JG, RETLEDGE RG, BLUMWALD E, DUMBROFF EB (2000) Reduction in turgid water volume in jack pine, white spruce and black spruce in response to drought and paclobutrazol. **Tree Physiol** 20:701-707

- MARTIN-REMESAL C, GÓMEZ-JIMÉNEZ MC, MATILLA AJ (2000) ACC-N-Malonyltransferase activity during zygotic embryogenesis and germination of chick-pea seeds. **Seed Sci Res** 10: 71-76
- MIN X-J, BARTHOLOMEW DP (1996) Effect of plant growth regulators on ethylene production, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity, and initiation of inflorescence development of pineapple. **J Plant Growth Reg** 15:121-128
- PEAKSIMPLE (2005) **Manual do Peaksimple II**. São Paulo, SP. 51 p
- PELACANI CR, BARROS RS, RIBEIRO DM, FRIGERI RBC (2005 a) Breaking dormancy of *Stylosanthes humilis* seeds with low pH solutions. **Acta Physiol Plant** 27:387-393
- PELACANI CR, RIBEIRO DM, BARROS RS, FRIGERI RBC (2005 b) Germination of dormant seeds of *Stylosanthes humilis* as affected by organic acids. **Seed Sci Technol** 33:105-113
- PINHEIRO FJA (2004) **Quebra da dormência de sementes de *Stylosanthes humilis* H.B.K. por compostos selênicos**. Tese de Doutorado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 86 p
- PRESSMAN E, SHAKED R (1988) Germination of annual celery (*Apium graveolens*) seeds: inhibition by paclobutrazol and its reversal by gibberellins and benzyladenine. **Physiol Plant** 73:323-326
- RADEMACHER W (2000) Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 51:501-531
- RAMAGLI LS, RODRIGUES LV (1985) Quantitation of microgram amounts of protein in two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. **Electrophoresis** 6: 559-563
- RIBEIRO DM, BARROS RS (2004) Germination of dormant seeds of *Stylosanthes humilis* as promoted by ethylene accumulation in closed environments. **Braz J Plant Physiol** 16:83-88
- RIBEIRO DM, BARROS RS (2006) Sensitivity to ethylene as a major component in the germination of seeds of *Stylosanthes humilis*. **Seed Sci Res** 16:37-45
- RICHARDS FJ (1959) A flexible growth function for empirical use. **J Exp Bot** 10:290-300

- RICHARDS JF (1969) The quantitative analysis of growth. In: STEWART FC (ed) **Plant Physiology**, Vol 5A. New York, Academic Press. 3-76 p
- SAEG (1997) **Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV**. Universidade Federal de Viçosa, MG
- SALTVEIT-JR ME, YANG SF (1987) Ethylene. In: Rivier L, Crozier A (eds) **Principles and Practice of Plant Hormone Analysis**, Vol 2. Academic Press, London. p 367-401
- SANTANA DG, RANAL MA (2004) **Análise da germinação: um enfoque estatístico**. Editora UnB, Brasília. 247 p
- SATOH S, ESASHI Y (1980 a) α -Aminoisobutyric acid: A probable competitive inhibitor of conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. **Plant Cell Physiol** 21: 939-949
- SATOH S, ESASHI Y (1980 b) D-amino-acid-stimulated ethylene production in seed tissues. **Planta** 149: 64-68
- SAUERBREY E, GROSSMANN K, JUNG J (1988) Ethylene production by sunflower cell suspensions. **Plant Physiol** 87:510-513
- SCOTT AJ, KNOTT M (1974) A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics** 30:507-512
- SONG WJ, XHOU WJ, JIN ZL, CAO DD, JOEL DM, TAKEUCHI Y, YONEYAMA K (2005) Germination response of *Orobanch* seeds subjected to conditioning temperature, water potential and growth regulator treatments. **Weed Res** 45: 467-476
- TARI I, MIHALIK E (1998) Comparison of the effects of white light and the growth retardant paclobutrazol on the ethylene production in bean hypocotyls. **Plant Growth Regul** 24: 67-72
- TARI I, NAGY M (1994) Enhancement of extractable ethylene at light/dark transition in primary leaves of paclobutrazol-treated *Phaseolus vulgaris* seedlings. **Physiol Plant** 90:353-357
- VIEIRA HD, BARROS RS (1994) Responses of seed of *Stylosanthes humilis* to germination regulators. **Physiol Plant** 92: 17-20
- WANG SY, STEFFENS GL (1985) Effect of paclobutrazol on water stress-induced ethylene biosynthesis and polyamine accumulation in apple seedling leaves. **Phytochemistry** 24:2185-2190

- WHITEHEAD CS, NELSON RM (1992) Ethylene sensitivity in germinating peanut seeds: the effect of short-chain saturated fatty acids. **J Plant Physiol** 139:479-483
- WHITEHEAD CS, SUTCLIFFE MA (1995) Effect of low temperatures and different growth regulators on seed germination in *Cyclopia spp.* **J Plant Physiol** 147:107-112
- YANG SF, HOFFMAN NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annu Rev Plant Physiol** 35: 155-189
- ZEHAR N, INGOUFF M, BOUYA D, FER A (2002) Possible involvement of gibberellins and ethylene in *Orobancha ramosa* germination **Weed Res** 42:454-469

7 ANEXOS

Tabela 1. Modelo descritivo da germinação de sementes não-dormentes (356 dias de idade pós-colheita) de estilosante tratadas com PBZ, em função do tempo

Tratamento	Coeficientes da função: $Y = ae-be^{-kt}$				t taxa max (h) $Y''=0, t = \ln b/k$	Taxa máx (sem h ⁻¹)
	a	b	K	r ²		
Controle	83,955	5,203	0,145	0,981	11,371	4,480
PBZ 0,5 mol m ⁻³	66,190	4,971	0,108	0,949	14,798	2,639
PBZ 1,0 mol m ⁻³	62,905	4,856	0,095	0,967	16,677	2,193

$$\text{Taxa de germinação: } Y' = (abk)/e^{kt} \cdot e^{-kt}$$

$$\text{Limiar de saturação: } t = (\ln b - \ln[(\ln(a/y))]) / k$$

Tabela 2. Modelo descritivo da germinação de sementes não-dormentes (296 dias de idade pós-colheita) de estilosante tratadas com paclobutrazol, e suas combinações com GA, CEPA e TU em função do tempo

Tratamento	Coeficientes da função: $Y = ae-be^{-kt}$				t taxa max (h) $Y''=0, t = \ln b/k$	Taxa máx (sem h ⁻¹)
	a	b	K	r ²		
Controle	81,921	13,706	0,374	0,984	6,995	11,279
PBZ 0,5 mol m ⁻³	62,932	5,972	0,185	0,931	9,662	4,282
PBZ 0,5 + GA ₃	68,659	17,095	0,302	0,920	9,414	7,617
PBZ 0,5 + CEPA	83,849	23,223	0,544	0,986	5,784	16,773
PBZ 0,5 + TU	89,822	20,799	0,578	0,992	5,254	19,087
PBZ 1,0 mol m ⁻³	60,063	9,916	0,226	0,884	10,137	5,001
PBZ 1,0 + GA ₃	54,800	6,173	0,185	0,951	9,841	3,7286
PBZ 1,0 + CEPA	89,475	12,285	0,435	0,984	5,768	14,313
PBZ 1,0 + TU	89,834	17,722	0,589	0,981	4,877	19,480

$$\text{Taxa de germinação: } Y' = (abk)/e^{kt} \cdot e^{-kt}$$

$$\text{Limiar de saturação: } t = (\ln b - \ln[(\ln(a/y))]) / k$$