

ELAINE CRISTINA CABRINI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONDIÇÃO ACÍDICA
E DA TIOURÉIA NA QUEBRA DA DORMÊNCIA DE
SEMENTES DE *Stylosanthes humilis* H.B.K.**

Tese 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
2005**

Aos meus pais
Sebastião Antonio Cabrini (in memoriam)
e Irene Cabrini

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre.

A minha mãe, pelo apoio incondicional.

Ao meu irmão e demais familiares, pelo incentivo e carinho constantes.

Aos irmãos de caminhada da Casa de Oração Allan Kardec.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pelos ensinamentos básicos que me deram suporte para iniciar o curso de Pós-Graduação.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), por proporcionar os meios para a realização do curso de Pós-Graduação.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Professor Raimundo Santos Barros, pelos ensinamentos.

Aos professores do Depto de Biologia Vegetal e Deptos relacionados ao curso de Fisiologia Vegetal – UFV, e em especial, Fábio Murilo DaMatta, Marco Aurélio Pedron e Silva e Fernando Luíz Finger, pela amizade, ensinamentos e bons momentos compartilhados.

Aos amigos especiais: Agnaldo Rodrigues de Melo Chaves, Alan Carlos Costa, Aline Rocha, Ana Maria Mapeli, Daniel Nogueira Martins, Franciscleudo Bezerra da Costa, Gustavo Menezes Resque de Oliveira, Leonardo Augusto Zebral Rodrigues, Leonardo da Silva Garcia, Roberto Lisboa Cunha, Viviane de Oliveira Santos, pela amizade, companheirismo, união, ajuda valiosa e por tornar a caminhada mais fácil.

A Silvana Costa Ferreira, que se tornou muito mais que amiga, uma irmã.

Aos colegas de laboratório, pela amizade e ajuda, em especial, Dimas Mendes Ribeiro, Tales Graciano Coelho, Cláudio P. Ronchi e Adriano Nascimento Simões.

Aos amigos conquistados em Viçosa: Ana Lúcia, Andréia, Ângela, Breno, Bruno, Carmem, Cassiano, Cláudio Azevedo, Cláudio Nolasco, Daniel Nolasco, Danilo, Dayana, Edgley, Eliane, Érica, Eulene, Fábio, Frank, Gilberto, Heslene,

Hugo, Laura, Leandro (Alemão), Márcio, Mônica, Natália, Nilbe, Nilson, Reniuls, Roberta, Rogério, Sidney, Silvane, pelos momentos de alegria e descontração.

Aos funcionários do Depto de Biologia Vegetal da UFV, em especial, Antônio Teixeira Cordeiro, Carlos Raimundo Alves de Souza, Elizabeth Alves Pena, Geraldo João da Silva, José Antônio Bhering, José Antônio das Graças Cornélio, José Maria Soares, Maria Mercês de Souza Gomes, Oswaldo dos Santos Filho, Reginaldo Custódio dos Santos e Rita de Cássia da Silva.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Elaine Cristina Cabrini, filha de Sebastião Antonio Cabrini e Irene Cabrini, nasceu em Mirandópolis, Estado de São Paulo, no dia 07 de junho de 1974. Coursou Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, período 1999-2002. Em 2003, iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa.

RESUMO

CABRINI, Elaine Cristina, M. S., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2005. **Avaliação do efeito da condição acídica e da tiouréia na quebra da dormência de sementes de *Stylosanthes humilis* H.B.K.** Orientador: Raimundo Santos Barros. Conselheiros: Fernando Luíz Finger e Rolf Puschmann

A quebra da dormência fisiológica de sementes escarificadas de estilósante (*Stylosanthes humilis* H.B.K.), leguminosa forrageira tropical, de ciclo anual, foi promovida por soluções de pH muito baixo (2,0 e 2,5) e de tiouréia. O tempo mínimo de exposição das sementes dormentes escarificadas à água, pH 2,0, requerido para promoção de germinação acima de 80%, foi 6 h; em solução de tiouréia, à concentração 100 mol m^{-3} , mostrou-se inferior a 12 h. O início do processo germinativo antecedeu o início da produção de etileno na maioria dos tratamentos empregados. A germinação estimulada pela condição acídica não foi inibida pelos inibidores da biossíntese e da ação de etileno, apenas observando-se uma leve redução por ação de aminoetoxivinilglicina (AVG), em solução-tampão McIlvaine, pH 2,5. Em atmosfera livre de etileno, observou-se apreciável número de sementes germinadas, ainda que tratadas com AVG mais Co^{2+} ; os níveis de etileno mostraram-se baixos após a liberação do regulador previamente fixado na solução de perclorato de mercúrio. Aparentemente, os baixos pH(s) *per se* promoveram a quebra de dormência das sementes. Os inibidores da biossíntese e da ação de etileno também não exerceram qualquer efeito, quando aplicados em conjunto com soluções de tiouréia, exceto por um leve efeito do ácido abscísico. Embora sementes dormentes tratadas com tiouréia produzissem etileno em nível elevado, mesmo que associada aos inibidores da biossíntese e da ação de etileno, e sob atmosfera livre de etileno, aparentemente, o etileno não se mostrou necessário nos momentos iniciais do processo germinativo, desde que uma germinação alta já havia ocorrido antes da emissão do fitorregulador gasoso.

ABSTRACT

CABRINI, Elaine Cristina, M. S., Universidade Federal de Viçosa, February 2005.

Evaluation of the effect of acidic condition and thiourea on the dormancy breakage of seeds of *Stylosanthes humilis* H.B.K. Adviser: Raimundo Santos Barros. Advisory Committee: Fernando Luíz Finger and Rolf Puschmann

The breakage of physiological dormancy of scarified seeds of Townsville stylo (*Stylosanthes humilis* H.B.K.), a tropical forage legume of annual cycle, was promoted by solutions of very low pH (2,0 and 2,5) and by thiourea. The shortest time of exposure of scarified dormant seeds to water, pH 2,0, required for a germination above 80% was 6 h. Under thiourea (100 mol m^{-3}), it showed lower than 12 h. The start of the germination preceded the onset of ethylene production in most of the assays. Germination stimulated by acidic condition was not inhibited by the inhibitors of ethylene biosynthesis and action, only being observed a slight reduction by 2-aminoethoxyvinylglycine (AVG) in McIlvaine buffer solution, pH 2,5. Under an ethylene-free atmosphere, an appreciable germination occurred in seeds inhibited by AVG plus Co^{2+} ; high ethylene levels were shown following liberation of the regulator from the mercuric perchlorate solution. It is suggested that the low pH(s) *per se* promoted seed dormancy breakage. Inhibitors of the ethylene biosynthesis and action did not cause any effect when applied together with thiourea solution, except for a slight effect of abscisic acid. Although dormant seeds treated with thiourea produced ethylene at a high level, even if supplied with inhibitors of ethylene biosynthesis and action, and under an ethylene-free atmosphere. Apparently ethylene was not required during the initial moments of germination, since it started before the emanation of the gaseous regulator.

CONTEÚDO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS	4
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	5
3.1 Material vegetal, condições de cultivo e preparo dos ensaios.....	5
3.2 Efeito de soluções de baixos pH(s) e da tiouréia sobre quebra de dormência	6
3.3 Tempo mínimo de exposição a soluções de baixo pH e à tiouréia.....	6
3.4 Cinética de germinação de sementes	6
3.5 Inibição da síntese e da ação de etileno	7
3.6 Produção de etileno pelas sementes dormentes e não-dormentes	8
3.7 Cinética de produção de etileno relacionada à germinação das sementes dormentes...	9
3.8 Sensibilidade das sementes ao etileno	9
3.9 Quantificação de etileno	10
3.10 Delineamento experimental	10
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
4.1 Efeito de soluções de baixos pH(s) e da tiouréia sobre quebra de dormência	11
4.2 Efeito do tempo de exposição das sementes aos agentes quebradores de dormência .	12
4.3 Cinética de germinação de sementes	15
4.4 Efeito de inibidores da biossíntese e da ação de etileno em relação aos baixos pH(s) e à tiouréia	19
4.5 Produção de etileno pelas sementes dormentes e não-dormentes	24
4.6 Sensibilidade das sementes ao etileno	27
4.7 Cinética de produção de etileno em relação à germinação das sementes.....	33
5 CONCLUSÕES	45
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

Stylosanthes humilis H.B.K. (estilosante) é uma forrageira tropical, de ciclo anual e que produz grande quantidade de sementes, as quais possuem tegumentos relativamente impermeáveis e, quando recém-colhidas, também exibem dormência fisiológica (Cameron 1967). O último tipo de adaptação não é bem documentado na literatura, possivelmente porque o número de sementes dispersas no solo é suficiente para garantir a reposição das plantas na população, ou a dormência das sementes é quebrada por vários fatores naturais (Vieira e Barros 1994). A barreira tegumentar das sementes de estilosante é facilmente rompida por escarificação física e química (Araújo *et al* 2000). A dormência fisiológica de sementes de estilosante pode ser completa ou parcialmente quebrada por ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA, composto liberador de etileno no interior da célula), benziladenina e ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) (Burin *et al* 1987, Vieira e Barros 1994, Barros e Delatorre 1998), precursor imediato do etileno em sua rota biossintética, ou qualquer outro fator que induza a produção de etileno.

Soluções ácidas mostram-se eficazes na quebra da dormência de sementes de estilosante (Frigeri 1998, Pelacani 2001). Adkins *et al* (1985, 1988) observaram que ácidos orgânicos, soluções diluídas de HCl e ácido malônico foram eficientes em quebrar a dormência de sementes de aveia-selvagem (*Avena fatua* L.), em virtude de sua habilidade de agirem como ácidos fracos, diminuindo o pH do meio de germinação. Sais neutros dos respectivos ácidos não se mostraram eficazes na quebra de dormência dessas sementes. Cohn *et al* (1987) observaram que ácidos monocarboxílicos protonados foram eficientes em quebrar a dormência de sementes de arroz-vermelho (*Oryza sativa* L.). A relação entre o pH e a atividade fisiológica das substâncias, no caso de arroz-vermelho, foi atribuída, principalmente, ao equilíbrio entre as formas carregadas e não-carregadas dos ácidos, em comparação ao pH ácido por si mesmo (Cohn 1989). A embebição de sementes dormentes de arroz em soluções de baixo pH (2,0 ou menor), antes de serem levadas a germinar em água pura, estimulou a germinação (Roberts 1963). O autor sugere que o estímulo seria devido a um aumento na concentração de íons H^+ disponíveis. Os baixos pH(s) do meio de germinação poderiam estar atuando de diversos modos na quebra de dormência: atuariam na acidificação interna dos tecidos embrionários (Footitt e Cohn

1992); promoveriam um relaxamento das paredes celulares, predispondo o tecido ao crescimento (Bewley e Black 1994); promoveriam o vazamento de inibidores, como o ácido abscísico (AAB), para fora das células; ou, ainda, estariam atuando como fator de estresse, estimulando, assim, a biossíntese de etileno nos tecidos, causando a promoção da germinação das sementes dormentes (Frigeri 1998, Pelacani 2001).

A dormência fisiológica de sementes de estilósante foi superada pelo uso de soluções ácidas, produzidas por sistemas tanto tamponantes quanto não-tamponantes (Frigeri 1998, Pelacani 2001). As soluções ácidas não intensificaram os efeitos promovidos pelo CEPA na germinação de sementes dormentes de estilósante, indicando que as soluções de baixos pH(s) poderiam estar agindo via biossíntese de etileno (Pelacani 2001). Sob condição de baixo pH, a produção de etileno foi significativamente reduzida pelos inibidores da biossíntese de etileno, porém, a germinação das sementes não foi afetada na mesma intensidade (Pelacani 2001), indicando uma necessidade de reavaliar-se se a condição ácida levaria à quebra de dormência das sementes via produção de etileno.

Soluções de tiouréia também mostram-se eficazes na quebra de dormência de sementes de estilósante (Burin *et al* 1987, Vieira e Barros 1994, Delatorre *et al* 1997). O estímulo causado pela tiouréia em sementes de estilósante mostrou-se superior ao causado por CEPA ou por benziladenina, sendo similar ao estímulo causado pela aplicação conjunta desses reguladores (Vieira e Barros 1994). Ballard e Buchwald (1971) também observaram o efeito positivo da tiouréia na germinação de sementes dormentes de estilósante, exibindo uma ação rápida, com uma estreita escala de concentrações eficientes em promover a germinação. Além disso, os autores observaram que o nível de tiouréia requerido para quebrar a dormência freqüentemente diminuiu com o avanço da idade pós-colheita. Adkins *et al* (1985) também obtiveram quebra de dormência das sementes de aveia-selvagem (*Avena fatua* L.) em resposta a tiouréia. Hsiao *et al* (1984) concluíram que o etileno ou a tiouréia substituiria o efeito de GA₃ na quebra de dormência de sementes de alface (*Lactuca sativa*). Supõe-se que a tiouréia atue sobre o metabolismo de lipídios, altere o mecanismo respiratório, interaja com o AAB, cancelando alguns de seus efeitos inibitórios, influencie o mecanismo de entrada de potássio no eixo embrionário e possa complexar-se com íons cobre, interferindo em reações enzimáticas que requerem esse elemento como cofator (Mayer e Poljakoff-Mayber 1984). Em estilósante, há indicações de que a tiouréia estimula

a germinação de sementes, por meio da produção de etileno (Burin *et al* 1987, Vieira e Barros 1994, Delatorre *et al* 1997). Em presença de íons cobalto, inibidor da oxidase do ACC, Delatorre (1994) observou que não houve inibição da germinação causada pela tiouréia. O fato sugere a necessidade de um re-exame sobre as relações entre a tiouréia e o etileno na quebra da dormência das sementes de estíloso.

Sabe-se que o etileno é produzido em quantidades-traço pela maioria das plantas superiores e que está envolvido no controle dos processos de crescimento e desenvolvimento, desde a germinação até a senescência (K pczy ski e K pczy ska 1997). Em muitas espécies, a inibição da germinação, devida à dormência ou condições de estresse, pode ser completamente ou parcialmente revertida pelo etileno. Desde que muitas espécies produzem etileno durante a germinação e que alguns fatores que quebram a dormência também estimulam a produção de etileno, supõe-se que a produção desse gás, no início da imbibição, possa contribuir para a quebra de dormência em sementes de algumas espécies (Matilla 2000). Tanto sementes dormentes quanto sementes não-dormentes são capazes de produzir etileno; porém, o nível produzido por sementes dormentes está abaixo do limiar necessário para a germinação (K pczy ski e K pczy ska 1997, Pelacani 2001). A persistência da dormência pode estar relacionada à dificuldade do embrião em produzir etileno em níveis necessários à quebra da dormência ou à baixa sensibilidade do tecido ao regulador (Matilla 2000).

A inibição da germinação por inibidores da biossíntese e da ação de etileno sugere a dependência do regulador na germinação de sementes de algumas espécies. Embora a grande maioria das sementes produza etileno durante o processo germinativo, não existe prova definitiva de que o gás aja como um fitohormônio na cadeia de eventos da germinação (Abeles 1986), ou se é consequência da própria germinação antes de se constituir em requerimento para o processo (Fu e Yang 1983). Matilla (2000) empregou três critérios para correlacionar-se a germinação com a produção de etileno. São eles: (1) um aumento paralelo ou antecipado da produção de etileno pela semente, com o progresso da germinação; (2) a inibição da germinação por AVG e Co^{2+} , respectivamente inibidores da sintase e da oxidase do ACC, e por norbornadieno, inibidor da ação do etileno; (3) os efeitos dos inibidores devem ser superados com etileno ou com ACC. Assim, o presente trabalho foi proposto com o intuito de esclarecerem-se as relações existentes entre o efeito

estimulatório da germinação de sementes dormentes de estílosante promovido por soluções de baixo pH e de tiouréia com a biossíntese de etileno.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram reavaliar os efeitos de condições acídicas e da tiouréia na quebra de dormência de sementes de *Stylosanthes humilis* e verificar se eles ocorrem via produção de etileno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal, condições de cultivo e preparo dos ensaios

As sementes de estilosante foram obtidas de plantas cultivadas continuamente em casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (20° 45' S e 42° 15' W, 648 m de altitude), Minas Gerais, Brasil, em vasos plásticos com capacidade de 3,0 dm³, contendo duas partes de solo tipo latossolo vermelho-amarelo, uma parte de areia e uma parte de esterco bovino curtido. A adubação foi de 0,5 g por vaso de N-P-K (25-5-20), aplicados por cobertura, em três parcelas, durante o ciclo de vida da planta. As plantas eram irrigadas diariamente, de forma a manter-se o solo próximo à capacidade de campo. Como o estilosante é uma espécie de dia curto (Cameron e 't Mannetje 1977), nos meses do ano com dias mais longos (dezembro a março), as plantas eram cobertas com uma empanada preta, para reduzir-se o fotoperíodo para 8 h diárias. Os frutos eram coletados periodicamente, levados para o laboratório e armazenados em sacos de papel. Dessa forma, sementes com diferentes idades pós-colheita, ou seja, apresentando diferentes graus de dormência, estavam sempre disponíveis.

Para a realização dos ensaios, os frutos eram previamente debulhados, por fricção entre duas superfícies emborrachadas e, em seguida, as sementes eram escarificadas por leve fricção entre duas lixas d'água nº 150. Após escarificação, as sementes eram imersas em hipoclorito de sódio 0,5%, durante 10 min, lavadas com água destilada e enxugadas em papel absorvente.

Os tratamentos consistiram de soluções tampão McIlvaine e água destilada sob diversos pH(s), variando de 2,0 a 7,0 e de soluções de tiouréia (pH 7,0), todos contendo Tween 80 0,05%. As sementes eram infiltradas com as soluções, por aplicação de vácuo, por um período de 4 min, com um intervalo de 3 min, sem vácuo, e de mais 3 min de vácuo (Vieira e Barros 1994). Após infiltração, eram transferidas para placas de Petri (90 mm de diâmetro) ou frascos Erlenmeyer de 50 cm³ de capacidade, contendo, ao fundo, duas camadas de papel filtro Whatman nº 1. Os conjuntos placas de Petri e frascos Erlenmeyer com os papéis de filtro, eram previamente semi-esterilizados em estufa, a 105 °C, por 4 h. Após infiltração, as sementes eram transferidas para placas de Petri ou frascos Erlenmeyer, contendo 10 e 3,0 cm³ das soluções-teste, respectivamente. Os frascos Erlenmeyer eram vedados com seladores de borracha, a fim de se acompanhar a produção de etileno. As

placas e os frascos Erlenmeyer, contendo as sementes e as soluções-teste, eram mantidos no escuro em câmaras de crescimento noite/dia (Forma Scientific, Inc, Ohio, USA), sob temperatura controlada de 30 °C, por um período de três a cinco dias, durante o qual era registrado, diariamente, o número de sementes germinadas. Uma semente era considerada germinada quando apresentava protrusão radicular de cerca de 3,0 mm de comprimento.

3.2 Efeito de soluções de baixos pH(s) e da tiouréia sobre quebra de dormência

A germinação promovida por baixos pH(s) foi testada expondo-se as sementes dormentes de estíloso a soluções-tampão de McIlvaine (10 mol m^{-3}) e à água destilada com pH(s) variando de 2,0 a 7,0, por um período de 120 h. Em todos os experimentos relacionados ao pH, as soluções foram renovadas após 12 h de sua aplicação inicial, uma vez que as sementes de estíloso modificam o pH do meio de germinação (Frigeri 1998, Pelacani 2001). As soluções de tiouréia (pH 7,0) foram, também, administradas às sementes dormentes por um período de 24 h, para promover a quebra da dormência (Delatorre *et al* 1997).

3.3 Tempo mínimo de exposição a soluções de baixo pH e à tiouréia

O tempo mínimo de exposição das sementes dormentes necessário para promoção da germinação foi determinado expondo-se as sementes por intervalos de 2 a 72 h, a soluções de McIlvaine e à água sob pH(s) 2,0, 2,5 e 7,0. A exposição à solução de tiouréia foi examinada nos tempos de 2 a 24 h. Após cada período de exposição, as sementes eram lavadas em água destilada, reinfiltradas sob vácuo, transferidas para solução-controle (H_2O , pH 7,0) e levadas novamente para câmara de germinação, onde permaneceram até o final do período experimental.

3.4 Cinética de germinação de sementes

A cinética de germinação das sementes foi determinada em sementes dormentes tratadas em soluções de McIlvaine e em água destilada sob diferentes pH(s) e de tiouréia, com acompanhamento da germinação nos períodos de 2 a 120 h, em placas de Petri e em frascos Erlenmeyer selados com seladores de borracha, durante o período experimental. Um controle com solução de CEPA ($10^{-1} \text{ mol m}^{-3}$) serviu para avaliar-se o comportamento

das sementes dormentes em resposta ao etileno. A germinação foi registrada em cada horário estipulado. As taxas de germinação das sementes, em cada tratamento, foram determinadas por meio da estimativa das derivadas primeiras de curvas ajustadas que descreveram a germinação acumulada ao longo do tempo (Calbo *et al* 1989). O tempo inicial do processo de germinação foi obtido pela extrapolação da parte ascendente das curvas ajustadas até o eixo do x.

3.5 Inibição da síntese e da ação de etileno

Sementes dormentes de estilósante foram expostas a soluções-tampão de McIlvaine, e à água destilada nos pH(s) 2,0, 2,5 e 7,0 e à solução de tiouréia, contendo alguns inibidores da biossíntese de etileno, a saber: íons cobalto (Gallardo *et al* 1994), os quais foram fornecidos na forma de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, à concentração de $1,0 \text{ mol m}^{-3}$; AVG (Babiker *et al* 1994), a $0,1 \text{ mol m}^{-3}$; AAB (K pczyk ski 1986), a $0,001 \text{ mol m}^{-3}$. A inibição da ação fisiológica do etileno foi testada com íons Ag^+ (Knee 1992), fornecidos na forma de tiosulfato de prata. A solução era preparada no momento de utilização, misturando-se quatro partes de tiosulfato de sódio com uma parte de nitrato de prata, à concentração de $0,5 \text{ mol m}^{-3}$ (Reid *et al* 1980).

Os inibidores foram dissolvidos em solução-tampão McIlvaine e água destilada, sob pH 7,0. As sementes permaneceram incubadas nessas soluções de inibidores por um período de 24 h, quando, então, foram lavadas em água destilada, reinfiltradas e transferidas para a solução-tampão McIlvaine e água destilada, sob os respectivos pH(s), e também para a solução de tiouréia, pH 7,0, todas contendo também os inibidores.

Para avaliar-se a resposta das sementes de estilósante aos inibidores da biossíntese de etileno em atmosfera livre do fitorregulador, sessenta sementes dormentes foram incubadas em soluções de inibidores da biossíntese, ácido aminooxiacético (AOA) (Broun e Mayak 1981), a 10 mol m^{-3} , mais íons cobalto (Gallardo *et al* 1994), à concentração de $1,0 \text{ mol m}^{-3}$, em pH 7,0, por 24 h. Após o período de incubação, 50 sementes não-germinadas eram transferidas e distribuídas ao redor de uma tampa invertida de polipropileno (26,0 mm de diâmetro e 6,0 mm de altura) inserida dentro dos frascos Erlenmeyer, contendo as mesmas soluções de inibidores sob os respectivos pH(s) baixos, ou tiouréia. As tampas de polipropileno inseridas dentro dos frascos, contendo, ao fundo, duas camadas de papel

filtro Whatman nº 1, receberam 0,2 cm³ de solução de perclorato de mercúrio (250 mol m⁻³) produzindo-se, assim, uma atmosfera livre de etileno (Ribeiro 2003). No quarto dia do início do período experimental, o etileno fixado pela solução de perclorato de mercúrio foi liberado, por meio da injeção 0,5 cm³ de solução de KCl (10⁻³ mol m⁻³) sobre a solução de perclorato de mercúrio (Abeles 1973). Eram feitos o acompanhamento da germinação e a quantificação do etileno a cada 24 h, até que se completassem 120 h.

3.6 Produção de etileno pelas sementes dormentes e não-dormentes

Para quantificar-se o etileno emanado, sementes dormentes e não-dormentes foram mantidas em frascos Erlenmeyer, contendo, ao fundo, duas camadas de papel filtro Whatman nº 1 e 3,0 cm³ de solução-controle (água destilada, pH 7,0), preparadas com Tween 80 a 0,05%. Os conjuntos frascos Erlenmeyer, contendo, ao fundo, duas camadas de papel filtro Whatman nº 1, eram previamente semi-esterilizados em estufa, a 105 °C, por 4 h. Os frascos Erlenmeyer, contendo as sementes e a solução-controle, eram vedados com seladores de borracha, e mantidos no escuro em câmaras de crescimento noite/dia (Forma Scientific, Inc, Ohio, USA), sob temperatura controlada de 30 °C, por um período de três dias. A atmosfera dos frascos era, ocasionalmente, homogeneizada por meio do bombeamento com uma seringa de agulha longa perfurando o selador. A produção de etileno por sementes dormentes e não-dormentes foi acompanhada no intervalo de 2 a 72 h. Acompanhou-se também a germinação, que foi correlacionada com a emissão do etileno.

Sementes dormentes foram expostas às soluções tampão de McIlvaine e água, em pH 2,0, 2,5 e 7,0 e à solução de tiouréia. O experimento foi conduzido sob duas condições: um sistema no qual os frascos eram selados no início do período experimental, mas, eram abertos e tinham o ar exaurido, sob ventilação forçada, em capela, por 10 min, a cada horário de observação, e outro sistema, no qual os frascos permaneceram selados por todo o período experimental, denominados sistemas ‘com’ e ‘sem’ exaustão, respectivamente. Para fins de estimativa do etileno produzido pelas sementes, o volume livre dos frascos era obtido pela diferença entre a sua capacidade total e do conjunto de volumes do papel de filtro, do selador de borracha e da solução-teste.

3.7 Cinética de produção de etileno relacionada à germinação das sementes dormentes

A cinética de produção de etileno foi determinada em sementes dormentes tratadas com soluções de McIlvaine e com água destilada sob pH 2,0, 2,5 e 7,0 e de tiouréia, com acompanhamento da produção de etileno nos períodos de 2 a 120 h, em frascos Erlenmeyer. A germinação foi também registrada a cada horário estipulado. As taxas de produção de etileno pelas sementes, em cada tratamento, foram determinadas por meio da estimativa das derivadas primeiras de curvas ajustadas que descreveram a germinação acumulada ao longo do tempo (Calbo *et al* 1989). O tempo inicial do processo de germinação e de produção de etileno foi obtido pela extrapolação da parte ascendente das curvas ajustadas, até o eixo do x.

3.8 Sensibilidade das sementes ao etileno

Com a finalidade de verificar se a condição acídica e a tiouréia tornavam as sementes mais sensíveis ao etileno, sementes dormentes foram mantidas em placas de Petri (150 mm de diâmetro) com soluções de McIlvaine e água, pH(s) 2,5 e 7,0 e com solução de tiouréia, por 1 h. Decorrido esse tempo, 50 sementes não-germinadas foram lavadas em água destilada e transferidas para frascos Erlenmeyer, contendo água pura, pH 7,0. Os frascos foram selados e feitas adições de etileno às suas atmosferas, às concentrações de 0, 10^{-6} e 10^{-4} mol m³. As injeções foram feitas com auxílio de seringas descartáveis *ultra-fine* (agulhas 29 G ½ "). Os frascos eram mantidos na câmara de germinação, registrando-se a germinação por um período de cinco dias.

O etileno utilizado neste experimento foi produzido colocando-se solução de KOH 25% ao fundo de um frasco de vidro hermeticamente fechado. Através de um selador de borracha adaptado à tampa do frasco, foi injetado 1,0 cm³ de CEPA (1,84 kmol m⁻³). O frasco foi mantido em estufa, a 75 °C, por 60 min, para que a reação física entre o CEPA e a solução de KOH se processasse (Abeles *et al* 1992). Em seguida, injetou-se nitrogênio gasoso na atmosfera do frasco, desde que a pressão criada no interior do frasco facilita a retirada das amostras. A atmosfera do frasco era homogeneizada por agitação magnética. O etileno (quantificado por cromatografia gasosa, ver abaixo) coletado do frasco era injetado nos frascos Erlenmeyer através do selador de borracha com uma seringa plástica, vedada ao ar.

3.9 Quantificação de etileno

O etileno foi quantificado seguindo-se, basicamente, a técnica descrita por Saltveit e Yang (1987). A atmosfera interna dos frascos Erlenmeyer era ocasionalmente homogeneizada com auxílio de uma seringa de 3,0 cm³, provida de agulha longa. Amostras de 1,0 cm³ da atmosfera dos frascos foram retiradas, utilizando-se de seringas descartáveis *ultra-fine* (agulhas 29 G ½"), vedadas ao ar. No sistema permanentemente selado, a fim de equilibrar-se a pressão no interior dos frascos, injetou-se igual volume de ar, após cada retirada de amostra.

As amostras coletadas da atmosfera dos frascos (1,0 cm³) foram injetadas em um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5890, série II (USA), equipado com detetor de ionização de chama e coluna de aço inoxidável (1,0 m x 6,0 mm), empacotada com Porapak-N (80-100 mesh). O gás de arraste foi o dinitrogênio, com fluxo de 30 cm³ min⁻¹; os fluxos do hidrogênio e do ar sintético 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 feita comparando-se as áreas das amostras obtidas em integrador Hewlett-Packard 3395A (USA) acoplado ao cromatógrafo, com áreas de picos de uma mistura padrão de etileno de concentração conhecida.

3.10 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi inteiramente casualizado. Os experimentos de quebra de dormência e de germinação de sementes tiveram a unidade experimental composta por 50 sementes, com cinco repetições por tratamento. As porcentagens de germinação eram transformadas em arco-seno (% G/100)^{1/2}, para serem submetidas ao tratamento estatístico e as diferenças entre as médias dos tratamentos eram avaliadas pelo teste de Scott e Knott (1974), em nível de 5% de significância.

Os experimentos sobre quantificação de etileno emanado das sementes tiveram a unidade experimental constituída de um frasco Erlenmeyer selado, com 50 cm³ de capacidade, com 50 sementes, com 5 repetições por tratamento. As diferenças de médias entre tratamentos foram avaliadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito de soluções de baixos pH(s) e da tiouréia sobre quebra de dormência

Em ambos os meios de germinação, água destilada e solução-tampão de McIlvaine, testados sob diferentes pH(s), observou-se a quebra de dormência das sementes de estilósante sob pH(s) inferiores a 3,0. As soluções em pH 2,0 promoveram maior germinação, alcançando 88% e 83% em água destilada e solução-tampão McIlvaine, respectivamente (Fig 1). Frigeri (1998) e Pelacani (2001) já haviam observado que a diminuição do pH do meio de germinação, promovia a quebra de dormência de sementes de estilósante. Cohn *et al* (1987) observaram que sementes de arroz- vermelho apresentaram germinação acima de 40% depois do contato com ácidos monocarboxílicos, em pH 3,0. O aumento na germinação de sementes dormentes com a diminuição do pH foi observado em sementes de braquiário (*Brachiaria brizantha* cv Mandaru), tratadas com solução-tampão McIlvaine (Vieira *et al* 1999) e em sementes de aveia-selvagem, tratadas com os ácidos malônico, cítrico e outros ácidos orgânicos, especialmente em pH 2,0 (Adkins *et al* 1985, 1988). Os autores sugeriram que o modo de ação dos ácidos orgânicos se deve à habilidade de agirem como ácidos fracos, diminuindo o pH do meio.

A dormência fisiológica das sementes de estilósante também foi quebrada com solução de tiouréia, sendo a concentração de 100 mol m^{-3} a mais eficaz em promover a germinação (Fig 2). Concentrações menores que 100 mol m^{-3} não foram tão eficazes em quebrar a dormência das sementes, e acima dessa concentração, parece ter havido um efeito tóxico, desde que a germinação mostrou-se praticamente nula. Ballard e Buchwald (1971) já haviam observado que a escala eficaz de concentrações de tiouréia que quebra a dormência de sementes é estreita. Adkins *et al* (1984) observaram que concentrações de tiouréia acima de 100 mol m^{-3} inibiram a germinação e o crescimento das plântulas. A tiouréia estimulou a germinação de sementes de *Xanthium pensylvanicum* Wallr, quando aplicada em concentrações crescentes, de 3,0 até 30 mol m^{-3} (Esashi *et al* 1979). Em sementes de *Cicer arietinum* L., a tiouréia induziu uma rápida germinação, porém não foram produzidas plantas viáveis (Rodrigues *et al* 1983). Dessa forma, em algumas espécies, altas concentrações de tiouréia e derivados de uréia, os quais facilitam a germinação, podem ter efeitos tóxicos, conduzindo a uma diminuição na viabilidade das

plântulas. Essa fitotoxicidade poderia estar relacionada ao efeito inibitório da tiouréia sobre a síntese de DNA e de proteínas (Rodrigues *et al* 1983). A tiouréia parece agir semelhantemente às citocininas (Aldasoro *et al* 1981; Rodrigues *et al* 1983), porém há indicações de que sua ação possa se dar via estímulo da síntese de etileno, em sementes de *Xanthium pensylvanicum* Wallr (Esashi *et al* 1979) e em sementes de estilosante (Delatorre *et al* 1997, Burin *et al* 1987, Vieira e Barros 1994).

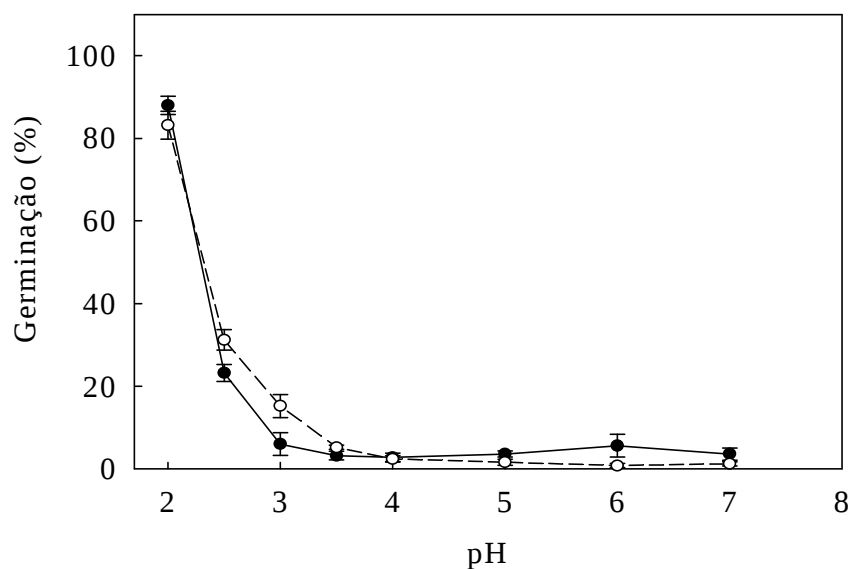


Figura 1 – Efeito do pH do meio de germinação, água (—) e solução-tampão de McIlvaine (---), sobre a quebra de dormência de sementes de estilosante, de 97 dias de idade pós-colheita. Foi feita a troca de solução 12 h após início do período experimental. Média de cinco repetições $\pm$ erro da média

A concentração de tiouréia de 100 mol m^{-3} (Fig 2) e os pH(s) 2,0 e 2,5 (Fig 1), os quais promoveram os maiores índices de germinação das sementes de estilosante foram selecionados para a efetuação dos experimentos posteriores.

4.2 Efeito do tempo de exposição das sementes aos agentes quebradores de dormência

A fim de se determinar o tempo mínimo de exposição das sementes aos agentes quebradores de dormência necessário para promover uma germinação apreciável, sementes

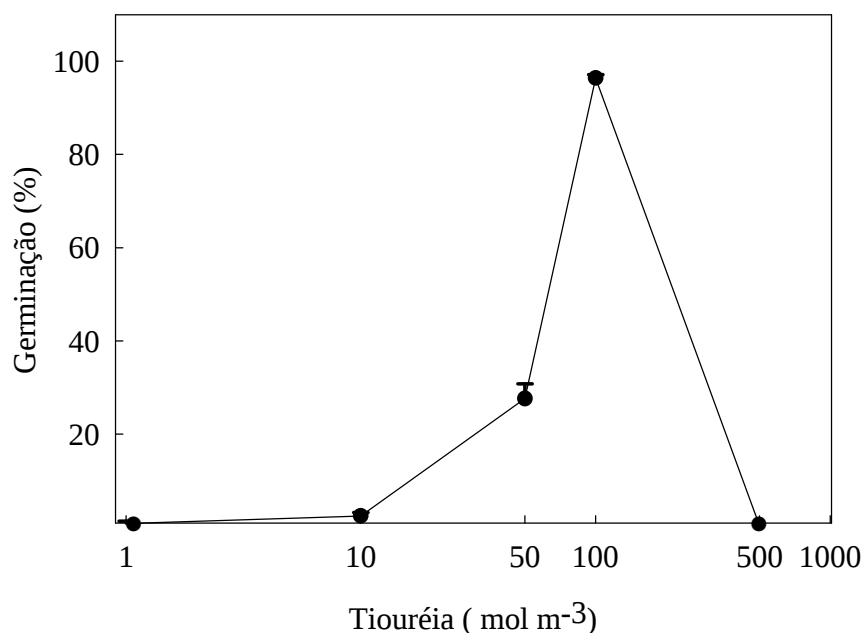


Figura 2 – Efeito da tiouréia em diferentes concentrações sobre a quebra de dormência de sementes de estilosante, de 97 dias de idade pós-colheita. Média de cinco repetições $\pm$ erro da média

dormentes foram expostas a soluções de pH 2,0 e 2,5, entre intervalos de tempo de 2 a 72 h e, à solução de tiouréia, 100 mol m⁻³, entre intervalos de tempo de 2 a 24 h. Observou-se que houve um aumento na germinação com o aumento do tempo de exposição das sementes aos agentes quebradores de dormência (Figs 3 e 4), ocorrendo diferenças quanto ao intervalo de tempo requerido para alcançar-se a germinação máxima, dentro de cada tratamento.

Nas sementes tratadas com solução de tiouréia, observou-se um aumento na germinação concomitante com o aumento do tempo de exposição. Com 12 horas de exposição, ocorreu, aproximadamente, 96% de germinação das sementes dormentes (Fig 4). Diferentemente, Delatorre *et al* (1997) observaram que o tempo mínimo para estimular a germinação, causado pela tiouréia, foi inferior a 12 h de exposição.

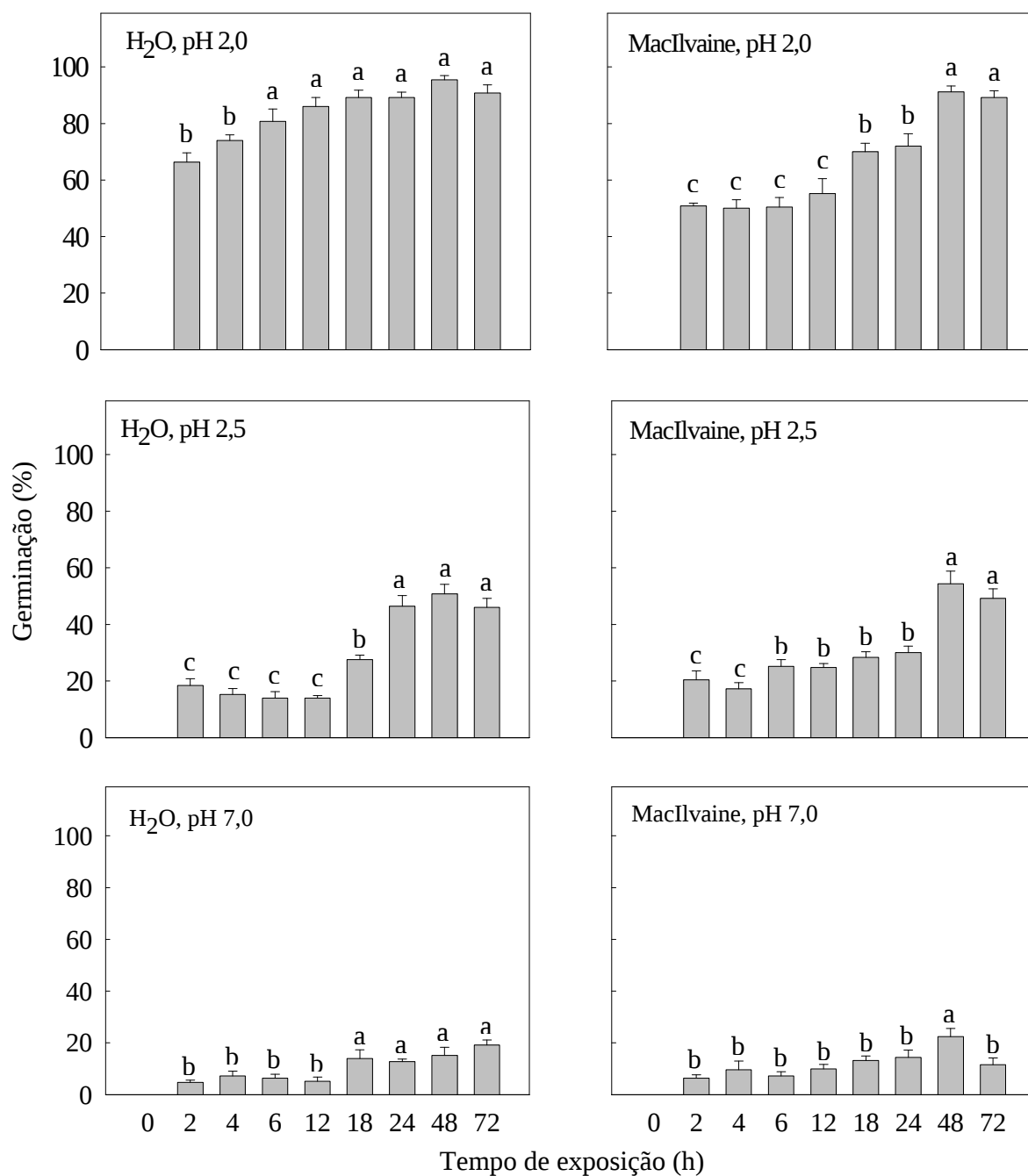


Figura 3 – Efeito do tempo de exposição a soluções de diferentes pH(s) sobre a germinação de sementes dormentes de estilosante, de 110 dias de idade pós-colheita. Média de cinco repetições $\pm$ erro da média. As médias seguidas de mesma letra, dentro de um mesmo tratamento, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de significância, pelo teste de Scott-Knott

Observou-se que as sementes embebidas em água destilada, pH 2,0, alcançaram cerca de 87% de germinação em apenas 6 h de exposição ao agente, enquanto sob pH 2,5, o tempo mínimo de exposição para se alcançar a germinação máxima foi de 24 h (Fig 3). As sementes tratadas com solução-tampão McIlvaine, tanto sob pH 2,0, quanto sob pH 2,5, necessitaram de um tempo maior de exposição para promover a germinação, quando comparadas com sementes embebidas em água destilada (Fig 3). Pelacani (2001) também observou que sementes embebidas em solução-tampão McIlvaine necessitam de um tempo maior para germinarem, indicando que o aumento da taxa de germinação dependeu da manutenção das sementes em soluções ácidas.

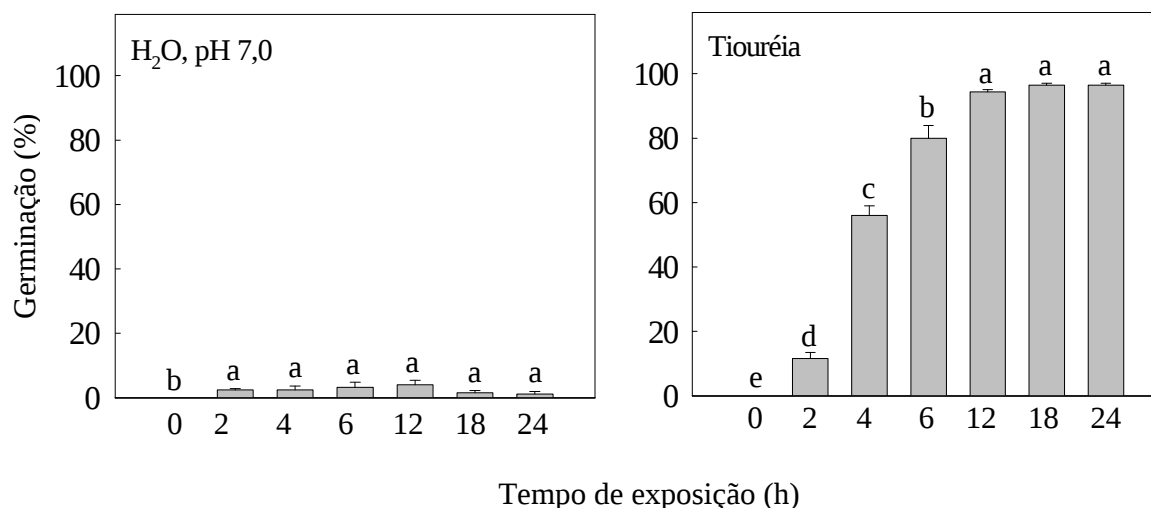


Figura 4 - Efeito do tempo de exposição à solução de tiouréia (100 mol m^{-3}) sobre a germinação de sementes dormentes de estilosante, de 102 dias de idade pós-colheita. Média de cinco repetições $\pm$ erro da média. As médias seguidas de mesma letra, dentro de um mesmo tratamento, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de significância, pelo teste de Scott-Knott

4.3 Cinética de germinação de sementes

O comportamento da germinação de sementes dormentes de estilosante, expostas a soluções de baixo pH e a soluções de tiouréia, foi descrito ajustando-se as funções de Gompertz que melhor representassem a cinética de germinação (Calbo *et al* 1985). Isso possibilitou a comparação entre a germinação estimulada por soluções de baixos pH(s) e de

tiouréia com a germinação de sementes dormentes expostas à solução-controle e à solução de CEPA. Das curvas de germinação integradas ao longo do tempo, foram estimadas as derivadas primeiras para obtenção das taxas de germinação (Causton 1983). Igualando-se a zero a derivada segunda, obtiveram-se os tempos correspondentes às taxas máximas, e quando houve estabilização da germinação, determinou-se o tempo de sua saturação. A extrapolação da parte ascendente da curva até o eixo do x permitiu estimar-se o tempo inicial do processo de germinação das sementes. Os parâmetros obtidos pelos procedimentos citados foram usados para construção da Tabela 1.

O estudo da cinética de germinação de sementes dormentes foi feito em placas de petri e em frascos Erlenmeyer fechados. As sementes foram expostas à água destilada e solução tampão McIlvaine, nos pH(s) 2,0, 2,5 e 7,0 e, também, às soluções de tiouréia e de CEPA. As curvas de germinação acumulada apresentaram-se de forma sigmoidal (Figs 5.1 a 5.5), característica de germinação normal e geralmente positiva, em que a maioria das sementes germina na primeira metade do período de germinação (Bewley e Black 1994).

Nas curvas de germinação das sementes, pode-se observar que em sementes mantidas em água destilada, pH 2,0, a germinação iniciou-se após 2 h de incubação e se completou por volta de 6 h, em placas de petri, enquanto houve um atraso no tempo nas sementes mantidas em frascos Erlenmeyer, que só se completou após 18 h de incubação (Figs 5.1 e 5.3). A germinação de sementes mantidas em solução-tampão de McIlvaine, em pH 2,0, apresentou comportamento semelhante ao das sementes mantidas em água destilada, tanto em placas de petri quanto em frascos Erlenmeyer, com início de germinação após 2 h de embebição e completando-se após 18 h de incubação (Figs 5.2 e 5.4). Os resultados corroboram aqueles observados por Delatorre (2001), nos quais a germinação das sementes expostas à solução-tampão foi estimulada pelo maior tempo de exposição ao tratamento, como também pôde ser observado no experimento anterior (Fig 3). Em termos de germinação acumulada, o pH 2,0 da água destilada ou da solução-tampão McIlvaine estimulou germinação superior a 80%, tanto em placas de petri quanto em frascos Erlenmeyer. Observou-se que as taxas máximas de germinação de sementes dormentes expostas ao pH 2,0, tanto em água destilada quanto em solução-tampão McIlvaine, mostraram-se maiores e foram alcançadas em tempos menores que aquelas nas soluções-controle e na solução de CEPA, indicando que o baixo pH do meio antecipou a

germinação das sementes dormentes (Tabela 1). De modo geral, pode-se observar que o tempo para a germinação atingir a taxa máxima nas sementes dormentes expostas ao pH 2,0, foi alcançado em torno de 1 e 2 h, em placas de petri e frascos Erlenmeyer, respectivamente, confirmando os resultados de Frigeri (1998), uma vez que houve aceleração no processo de germinação das sementes expostas à solução acídica.

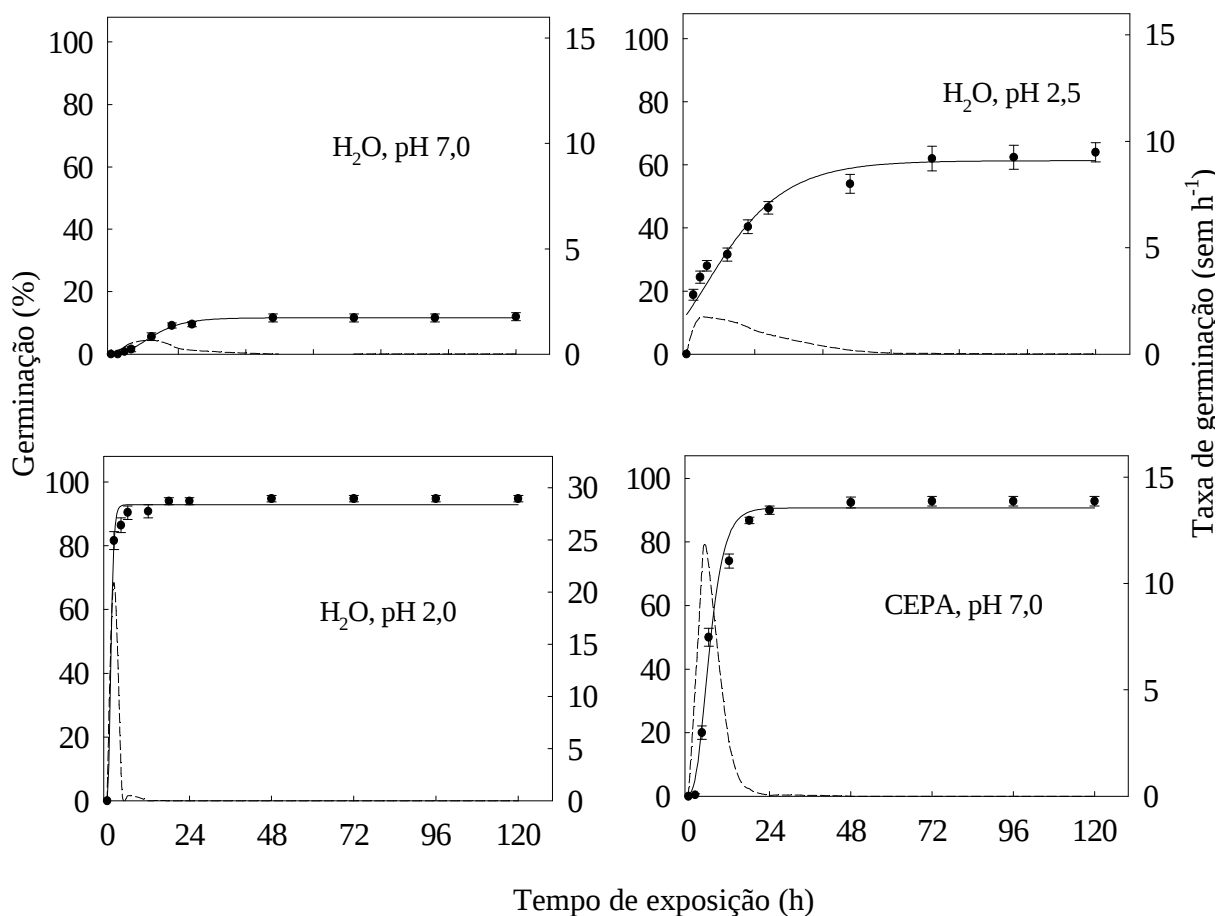


Figura 5.1 – Germinação acumulada (—) e taxa de germinação (---) de sementes dormentes de *estilosante*, em placas de petri, com idade pós-colheita de 102 dias, em meio não-tamponado. Foi feita renovação da solução decorridas 12 h do início do período experimental. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

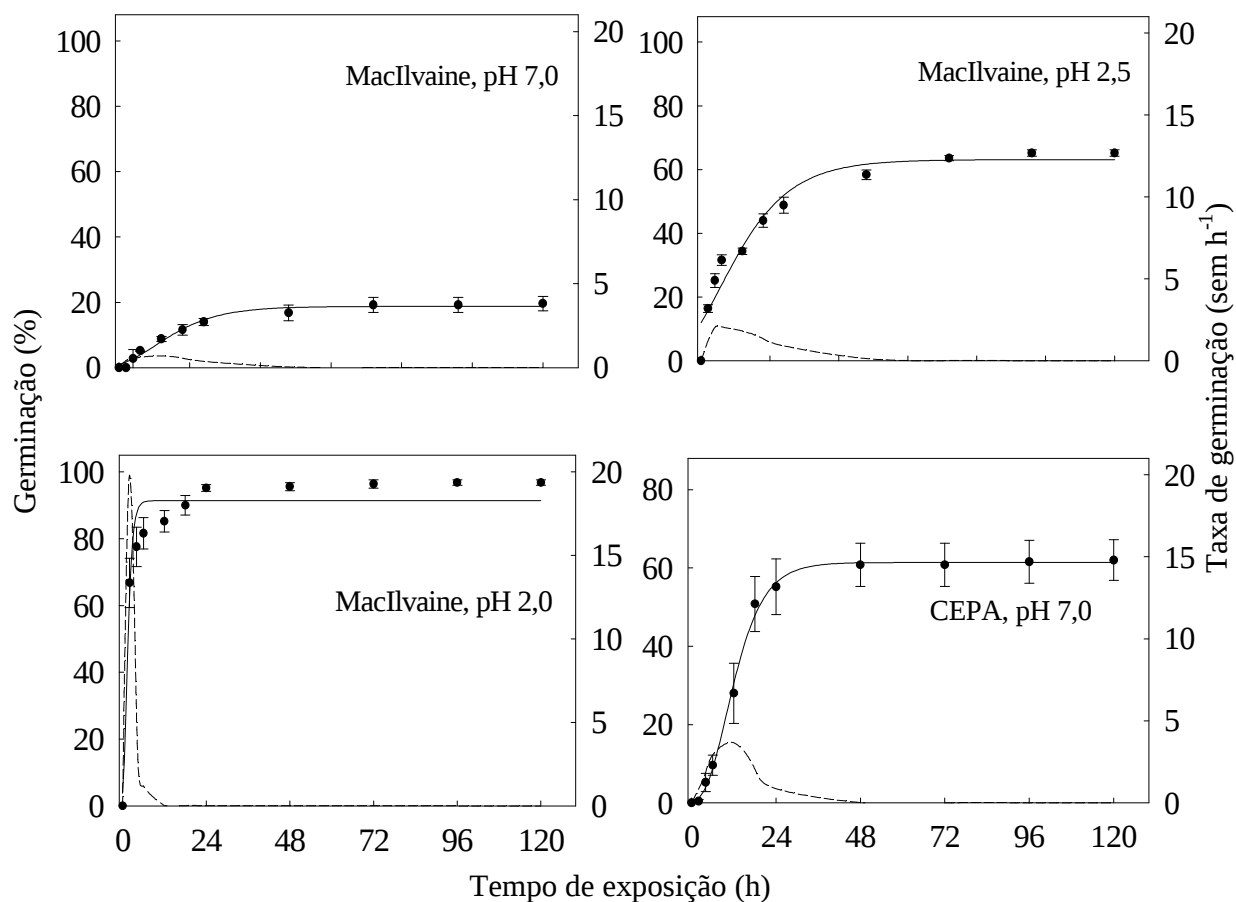


Figura 5.2 – Germinação acumulada (—) e taxa de germinação (---) de sementes dormentes de *Stilpnanthus*, com idade pós-colheita de 102 dias, em placas de petri, em tampão McIlvaine. Foi feita renovação da solução decorridas 12 h após o início do período experimental. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

A germinação estimulada em sementes tratadas com solução de tiouréia em placas de petri e em frascos Erlenmeyer apresentou o mesmo comportamento em ambos meios de manutenção, com o início da germinação após 2 h de embebição, um aumento acentuado em torno de 12 h e completando-se dentro de 18 h (Fig 5.5). A taxa máxima de germinação das sementes tratadas com solução de tiouréia mostrou-se significativamente maior que aquela das sementes tratadas com solução de CEPA, porém não foram observadas diferenças em relação ao tempo de ocorrência da taxa máxima (Tabela 1). Em relação à germinação acumulada, a solução de tiouréia estimulou a germinação acima de 90% (Fig

5.5). As sementes mantidas em sistema continuamente fechado, durante o período experimental, embebidas em água pH 2,5 e 7,0, apresentaram um atraso no início do processo de germinação em relação ao sistema aberto (Tabela 1).

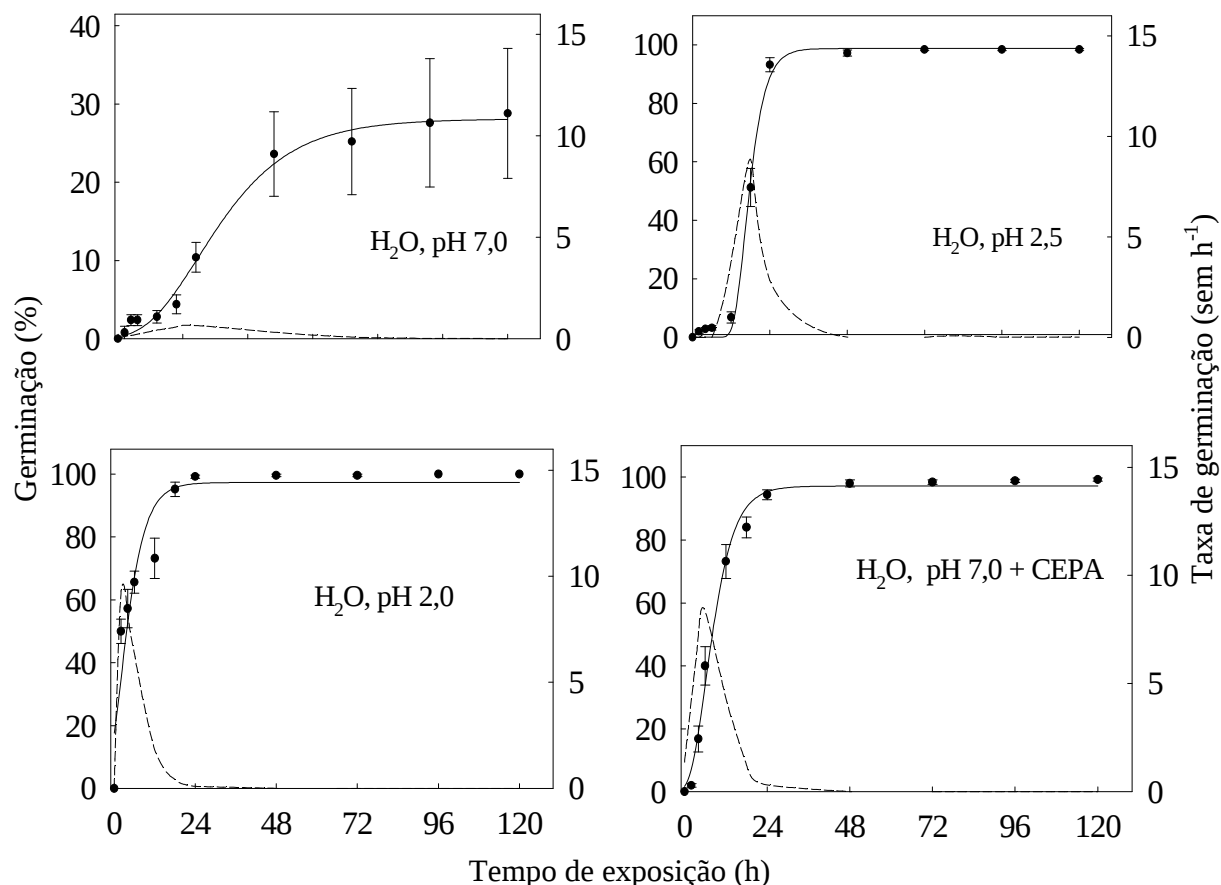


Figura 5.3 – Germinação acumulada (—) e taxa de germinação (---) de sementes dormentes de *Stilpnanthus*, com idade pós-colheita de 107 dias, em frascos Erlenmeyer, em meio não-tamponado. Foi feita renovação da solução decorridas 12 h após o início do período experimental. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

4.4 Efeito de inibidores da biossíntese e da ação de etileno em relação aos baixos pH(s) e à tiouréia

Com a finalidade de avaliar-se se soluções de baixos pH(s) e de tiouréia estariam promovendo a quebra da dormência das sementes de *Stilpnanthus* via estímulo da biossíntese

de etileno, alguns inibidores da biossíntese e da ação deste fitorregulador foram fornecidos às sementes dormentes de estilosante nas soluções dos diversos tratamentos.

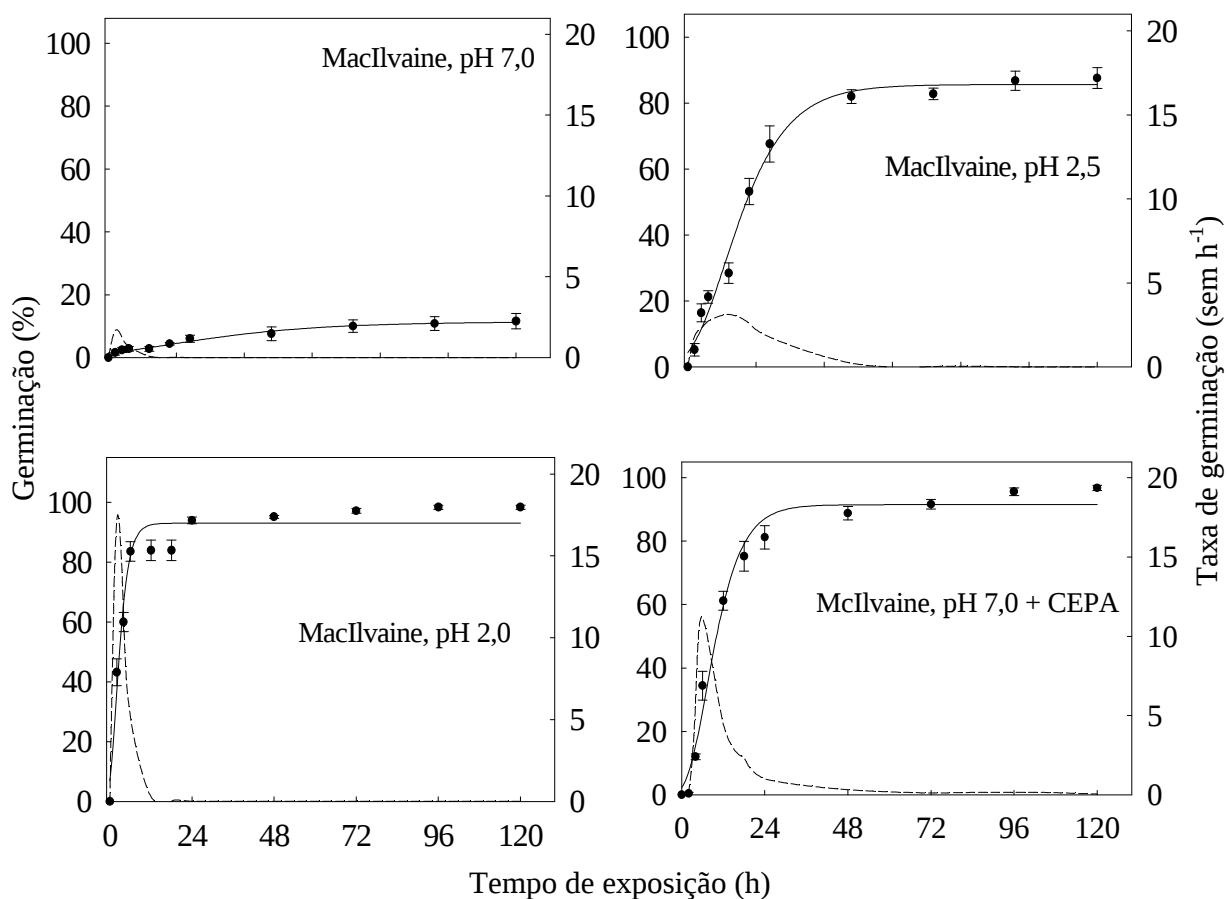


Figura 5.4 – Germinação acumulada (—) e taxa de germinação (---) de sementes dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de 107 dias, em frascos Erlenmeyer, em tampão McIlvaine. Foi feita renovação da solução decorridas 12 h após o início do período experimental. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

Em vista do fato de que soluções de AVG e AAB são eficientes em promover a inibição da biossíntese de etileno em pH 7,0, deixou-se de realizar o controle da inibição causada pelo AVG e AAB, naquele pH. De todos os inibidores testados, apenas o AVG em solução-tampão McIlvaine, pH 2,5, exerceu algum efeito inibitório. Embora as análises estatísticas mostrem que alguns inibidores mantiveram seus efeitos inibitórios (Tabela 2), observa-se que o efeito dos inibidores foi neutralizado pela condição acídica. Frigeri (1998)

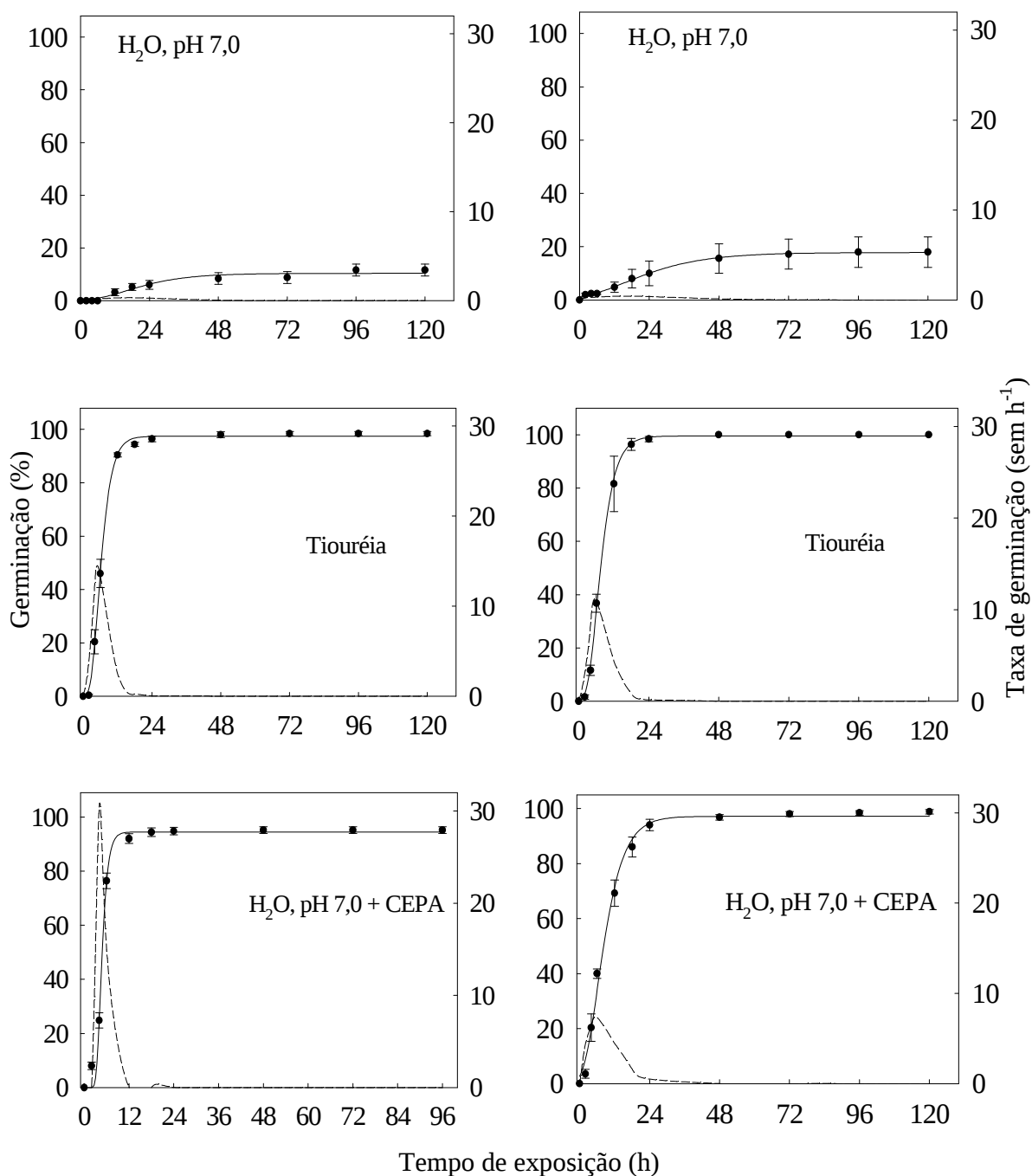


Figura 5.5 – Germinação acumulada (—) e taxa de germinação (---) de sementes dormentes de estilósante, com idade pós-colheita de 105 dias, em placas de petri (esquerda) e frascos Erlenmeyer (direita). Não foi feita renovação de solução durante o período experimental. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

Tabela 1 – Alguns parâmetros da cinética de germinação de sementes dormentes de estilosante de aproximadamente 105 dias de idade pós-colheita tratadas com soluções de baixo pH e de tiouréia. Foi feita a renovação da solução decorridas 12 h após o início experimental

Tratamento	Tempo inicial (h)	Taxa máxima (semente h ⁻¹)	Tempo de taxa máxima (h)	Limiar de saturação (h)
Placas de Petri				
H ₂ O pH 7,0	3	1	10	38
H ₂ O pH 2,5	1	2	6	41
H ₂ O pH 2,0	1	20	1	6
H ₂ O pH 7,0 + CEPA	1	11	5	22
McIlvaine pH 7,0	3	1	10	46
McIlvaine pH 2,5	1	2	6	65
McIlvaine pH 2,0	1	20	1	9
McIlvaine pH 7,0 + CEPA	2	4	10	24
H ₂ O pH 7,0 *	6	0,32	16	48
Tiouréia pH 7,0 *	2	14	5	18
H ₂ O pH 7,0 + CEPA *	2	32	5	12
Frascos Erlenmeyer				
H ₂ O pH 7,0	7	1	25	72
H ₂ O pH 2,5	11	10	16	34
H ₂ O pH 2,0	1	9	2	18
H ₂ O pH 7,0 + CEPA	2	8	6	24
McIlvaine pH 7,0	1	2	2	72
McIlvaine pH 2,5	3	3	11	47
McIlvaine pH 2,0	1	17	2	24
McIlvaine pH 7,0 + CEPA	2	6	7	18
H ₂ O pH 7,0 *	5	0,43	16	67
Tiouréia pH 7,0 *	2	11	6	18
H ₂ O pH 7,0 + CEPA *	2	7	6	24

* Sem troca de solução

e Pelacani (2001) também testaram inibidores da biossíntese e da ação do etileno associados a soluções de baixos pH(s) e, de maneira geral, observaram que os inibidores foram capazes de inibir a germinação estimulada pela condição acídica, sob pH(s) 2,0 (Frigeri 1998) e 3,0 (Frigeri 1998, Pelacani 2001). Provavelmente, essa incoerência de resultados se deva aos efeitos drásticos do pH 2,0 ou, ainda, à diferença significativa da idade pós-colheita das sementes utilizadas nos diferentes experimentos, uma vez que

aquelas autoras observaram que as sementes se tornavam mais sensíveis ao tratamento ácido com o avanço da idade pós-colheita. Frigeri (1998) utilizou sementes com 36 dias de idade pós-colheita e, neste experimento, foram utilizadas sementes de 86 dias. Adkins *et al* (1985) verificaram que as sementes de aveia-selvagem apresentaram maior sensibilidade aos ácidos cítrico, succínico, fumárico, málico, pirúvico e láctico com o avanço da idade pós-colheita. Em sementes dormentes de arroz-vermelho, observou-se que o aumento da idade pós-colheita propiciou maior sensibilidade das sementes aos ácidos monocarboxílicos, sob pH 3,0 (Cohn *et al* 1987).

Embora Delatorre *et al* (1997) sugerissem que a tiouréia estimula a germinação de sementes de estilozante via produção de etileno, pode-se observar que, mesmo com os inibidores da biossíntese e da ação de etileno, a tiouréia foi capaz de estimular a germinação de sementes dormentes de estilozante (Tabela 3). Apenas quando empregada com AAB, houve uma leve redução no efeito estimulatório da tiouréia (Tabelas 3 e 4).

Buscando-se detectar alguma relação entre o estímulo causado pela tiouréia e a biossíntese de etileno, fez-se um experimento usando-se inibidores da biossíntese do etileno associados à tiouréia. Pode-se observar que ocorreu uma resposta semelhante àquela do tratamento contendo somente inibidor associado a tiouréia, ocorrendo ainda, uma menor germinação em relação ao tratamento empregando-se apenas solução de tiouréia (Tabela 4). Provavelmente, o AAB inibiu bastante o efeito do CEPA e, parcialmente o efeito da tiouréia, uma vez que Delatorre *et al* (1997) observaram um efeito aditivo sobre a germinação, quando tiouréia foi aplicada em conjunto com CEPA. O efeito inibitório do AAB sobre o estímulo causado pela tiouréia foi também observado por Delatorre (1994).

Para promover-se a inibição da biossíntese de etileno em atmosfera livre do fitoregulador, um experimento utilizando-se AOA e Co^{2+} , empregados em conjunto com soluções de baixos pH(s) ou de tiouréia, foi realizado, a fim de se determinarem seus efeitos na germinação das sementes dormentes. A atmosfera livre de etileno foi conseguida com o uso de solução de perclorato de mercúrio fornecida nas tampas de polipropileno inseridas dentro dos frascos Erlenmeyer, os quais foram posteriormente selados. Como pode ser observado na Tabela 5, soluções de baixos pH(s) e de tiouréia continuaram exercendo seus efeitos estimulatórios, mesmo na presença de inibidores da biossíntese de etileno sob uma atmosfera livre deste fitoregulador. Após 72 h do início experimental, foi

feita aplicação de solução de KCl sobre a solução de perclorato de mercúrio, a fim de se liberar o etileno aprisionado naquela solução. A quantificação do etileno na atmosfera dos frascos foi feita diariamente, e nenhum etileno foi registrado antes da liberação do fitorregulador. Decorridas 24 h da aplicação do sal, o etileno emanado pelas sementes dormentes foi quantificado (Tabela 5). Observou-se um aumento concomitante na produção de etileno com a diminuição do pH do meio de germinação, além de um aumento na germinação, após a liberação do etileno. Pelacani (2001) observou uma correlação entre a germinação e a produção de etileno pelas sementes, em pH 3,0. Evidências indicam que o etileno possa estar envolvido na quebra de dormência das sementes de estilósante, como foi sugerido por Burin *et al* (1987), Delatorre *et al* (1997), Vieira e Barros (1994) e Pelacani (2001). Os resultados aqui obtidos indicam que o baixo pH por si só estaria estimulando a quebra de dormência das sementes ou que o etileno seria requerido em quantidades tão diminutas que não pôde ser detectado, antes da liberação, pelo método empregado.

A produção de etileno pelas sementes tratadas com solução de tiouréia mostrou-se elevada. Entretanto, há evidências de que o etileno não é necessário nos momentos iniciais da germinação, uma vez que se observou uma alta porcentagem de germinação antes da liberação do fitorregulador (Tabela 5).

4.5 Produção de etileno pelas sementes dormentes e não-dormentes

A emissão de etileno e a germinação de sementes dormentes e não-dormentes incubadas em solução-controle, e de sementes dormentes tratadas com soluções de baixo pH e com solução de tiouréia, em recipiente submetido ou não à exaustão da atmosfera do frasco Erlenmeyer, após cada retirada de amostra, é mostrada nas Figs 6.1 a 6.3. Observou-se que sementes dormentes, mantidas em sistema submetido à exaustão da atmosfera do frasco, iniciaram a produção de etileno antes das sementes dormentes mantidas em sistema continuamente selado. Sementes não-dormentes mantidas em sistema continuamente fechado, apresentaram uma tendência de estabilização no acúmulo de etileno em relação às sementes mantidas no sistema sem exaustão, a partir de 48 horas de embebição (Fig 6.1). Os resultados observados corroboram aqueles encontrados por Pelacani (2001).

Tabela 2 - Efeito dos inibidores da biossíntese e da ação de etileno, associados à condição acídica, sobre a quebra da dormência de sementes de estilosante, de aproximadamente 86 dias de idade pós-colheita. Após 24 h de incubação na solução de inibidores, pH 7,0, as sementes eram lavadas, infiltradas e transferidas para soluções de baixos pH(s) contendo os inibidores

Tratamentos	Germinação (%)					
	pH 2,0		pH 2,5		pH 7,0	
	24 h	120 h	24 h	120 h	24 h	120 h
H ₂ O	78,4 ± 2,3	92,8 ± 1,0 a	61,2 ± 3,1	94,4 ± 0,8 a	0,4 ± 0,4	7,2 ± 1,9 a
Co ²⁺	0,0 ± 0,0	94,4 ± 1,9 a	0,0 ± 0,0	97,6 ± 0,8 a	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 b
Ag ⁺	0,0 ± 0,0	97,6 ± 0,8 a	0,0 ± 0,0	94,8 ± 2,0 a	0,0 ± 0,0	4,4 ± 0,8 a
AVG	0,0 ± 0,0	96,4 ± 0,8 a	0,0 ± 0,0	84,8 ± 3,0 b	-	-
AAB	2,0 ± 1,5	96,4 ± 1,3 a	1,2 ± 0,8	98,0 ± 1,0 a	-	-
McIlvaine	86,8 ± 3,5	93,6 ± 2,5 b	78,0 ± 2,4	95,6 ± 1,2 a	0,0 ± 0,0	10,4 ± 2,6 a
Co ²⁺	0,0 ± 0,0	99,2 ± 0,5 a	0,0 ± 0,0	91,6 ± 0,8 a	0,0 ± 0,0	1,6 ± 1,0 b
Ag ⁺	0,0 ± 0,0	88,8 ± 1,4 c	0,0 ± 0,0	95,2 ± 1,5 a	0,0 ± 0,0	2,4 ± 1,2 b
AVG	0,0 ± 0,0	98,8 ± 0,5 a	0,4 ± 0,4	56,4 ± 1,3 c	-	-
AAB	8,8 ± 1,2	98,4 ± 1,2 a	2,8 ± 0,5	82,0 ± 3,0 b	-	-

As soluções contendo os inibidores foram preparadas dissolvendo-se o inibidor diretamente na solução de baixo pH. As concentrações empregadas foram: Co²⁺ 1 mol m⁻³; Ag⁺ 0,5 mol m⁻³; AVG 0,1 mol m⁻³ e AAB 0,001 mol m⁻³. As médias seguidas de mesma letra, dentro de cada coluna, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

Tabela 3 - Efeito dos inibidores da biossíntese e da ação de etileno fornecidos na solução de tiouréia sobre a quebra da dormência de sementes de estilosante, de aproximadamente 86 dias de idade pós-colheita. Após 24 h de incubação na solução de inibidores (indicado pelas setas), as sementes eram lavadas, infiltradas e transferidas para soluções de tiouréia contendo os inibidores

Tratamentos		Germinação (%)	
		24 h	120 h
H ₂ O	H ₂ O	0,4 ± 0,4	6,8 ± 1,2 c
H ₂ O	Tiouréia	0,4 ± 0,4	98,0 ± 0,6 a
Co ²⁺	Co ²⁺ + Tiouréia	0,0 ± 0,0	94,8 ± 1,7 a
Ag ⁺	Ag ⁺ + Tiouréia	0,0 ± 0,0	95,6 ± 0,9 a
AVG	AVG + Tiouréia	0,0 ± 0,0	98,8 ± 0,8 a
AAB	AAB + Tiouréia	4,4 ± 1,9	62,8 ± 6,7 b

As soluções contendo os inibidores foram preparadas dissolvendo-se o inibidor diretamente na solução de tiouréia (100 mol m⁻³), pH 7,0. As concentrações empregadas foram: Co²⁺ 1 mol m⁻³; Ag⁺ 0,5 mol m⁻³; AVG 0,1 mol m⁻³ e AAB 0,001 mol m⁻³. As médias seguidas de mesma letra, dentro da coluna, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

Em sementes dormentes, no sistema sem exaustão, a produção de etileno foi iniciada por volta de 18 h, enquanto em sementes não-dormentes, a produção de etileno se iniciou por volta de 12 h do início do período experimental. O acúmulo do etileno mostrou-se significativamente maior em sementes não-dormentes que em sementes dormentes, nos sistemas com e sem exaustão; porém, no sistema com exaustão, esse acúmulo foi maior (Fig 6.1). O início da germinação em sementes dormentes, em ambos sistemas, se deu antes do início da produção de etileno. Nas sementes não-dormentes, o início da germinação, em ambos sistemas, se deu paralelamente ao início da produção de etileno (Fig 6.1). Aumentos na produção de etileno, durante o processo germinativo, foram observados por Kpczy ski e Karssen (1985), Whitehead e Sutcliffe (1995) e Rodriguez-Gacio e Matilla (2001), em sementes de *Amaranthus caudatus*, *Cyclopia* spp e *Brassica rapa*, respectivamente.

Tabela 4 – Efeito do AAB e CEPA fornecidos na solução de tiouréia sobre a quebra da dormência de sementes de estilosante, de aproximadamente 98 dias de idade pós-colheita. Após 24 h de incubação na solução de inibidores (indicado pelas setas), as sementes eram

Tratamentos		Germinação (%)	
		24 h	120 h
H ₂ O	H ₂ O	8,4 ± 1,9	16,4 ± 1,9 d
H ₂ O	Tiouréia	3,6 ± 1,5	97,2 ± 0,5 a
H ₂ O	CEPA	6,8 ± 2,4	53,6 ± 3,4 c
AAB	AAB + Tiouréia	1,6 ± 0,4	78,8 ± 5,0 b
AAB	AAB + CEPA + Tiouréia	12,0 ± 1,7	77,2 ± 2,2 b

lavadas, infiltradas e transferidas para soluções de tiouréia contendo o inibidor e/ou CEPA

As médias seguidas de mesma letra, dentro da coluna, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

As sementes tratadas com soluções de baixo pH apresentaram, de maneira geral, a germinação antecedendo a produção de etileno (Figs 6.2 e 6.3). As exceções foram: sementes tratadas em água destilada, pH 7,0, em sistema sem exaustão (Fig 6.3), e sementes tratadas em água destilada, pH 2,0, em que a produção de etileno antecedeu a germinação, em ambos sistemas (Fig 6.2 e 6.3). Os resultados reforçam a hipótese que o baixo pH por si só estaria agindo na quebra de dormência das sementes de estilosante. O baixo pH do meio poderia estar acidificando os tecidos, desencadeando dessa forma, o processo germinativo, como foi proposto por Footitt e Cohn (1992), para sementes de arroz-vermelho.

4.6 Sensibilidade das sementes ao etileno

Trewavas (1982) sugeriu que a sensibilidade dos tecidos vegetais aos reguladores de crescimento seria um fator limitante ao crescimento e desenvolvimento das plantas, variando ela continuamente durante o ciclo de vida. O autor definiu a sensibilidade baseado em duas hipóteses: primeiro, os reguladores de crescimento não conseguem desempenhar um papel estritamente hormonal e, segundo, muitos dos eventos de crescimento e desenvolvimento ocorrem sem que haja mudanças nos níveis dos reguladores, mas um

aumento na intensidade de resposta dos tecidos (Trewavas 1982). A determinação da capacidade de resposta de um tecido a um regulador baseia-se em um modelo de curva de

Tabela 5 - Efeito dos inibidores da biossíntese de etileno associados à condição acídica, em atmosfera livre do fitorregulador, sobre a quebra da dormência de sementes de estilosate, de aproximadamente 153 dias de idade pós-colheita. Após 24 h de incubação na solução de inibidores, pH 7,0 (indicado pelas setas), as sementes eram lavadas, infiltradas e transferidas para soluções de baixos pH(s) contendo os inibidores.

Tratamento		Germinação (%)				Etileno Acumulado (mol sem ⁻¹)
		24 h	48 h	72 h	96 h	96 h
H ₂ O						
AOA + Co ²⁺	AOA + Co ²⁺ + Perclorato, pH 2,0	0,8 ± 0,8	49,6 ± 2,1 a	56,4 ± 5,9 a	85,6 ± 1,5 a	7,6 ± 1,1a
AOA + Co ²⁺	AOA + Co ²⁺ + Perclorato, pH 2,5	0,8 ± 0,5	27,6 ± 1,3 b	41,6 ± 3,7 b	62,0 ± 2,2 b	3,8 ± 0,6 b
AOA + Co ²⁺	AOA + Co ²⁺ + Perclorato, pH 7,0	0,8 ± 0,5	0,8 ± 0,5 cB	0,8 ± 0,5 cB	21,2 ± 9,4 cB	3,3 ± 0,6 bB
McIlvaine						
AOA + Co ²⁺	AOA + Co ²⁺ + Perclorato, pH 2,0	1,6 ± 0,4	51,2 ± 5,0 a	63,6 ± 4,2 a	92,0 ± 1,8 a	4,7 ± 1,1a
AOA + Co ²⁺	AOA + Co ²⁺ + Perclorato, pH 2,5	1,2 ± 0,8	43,2 ± 1,8 b	49,6 ± 1,5 b	81,2 ± 2,0 b	2,9 ± 0,5 a
AOA + Co ²⁺	AOA + Co ²⁺ + Perclorato, pH 7,0	0,8 ± 0,5	0,8 ± 0,5 c	0,8 ± 0,5 c	21,2 ± 9,8 c	3,3 ± 0,6 a
Tiouréia						
AOA + Co ²⁺	AOA + Co ²⁺ + Perclorato, pH 7,0	0,0 ± 0,0	83,6 ± 3,1 A	86,0 ± 1,8 A	99,2 ± 0,5 A	608,5 ± 406,5 A

As médias seguidas de mesma letra, dentro de uma mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos com soluções de baixo pH, e letras maiúsculas indicam diferenças para o tratamento com solução de tiouréia

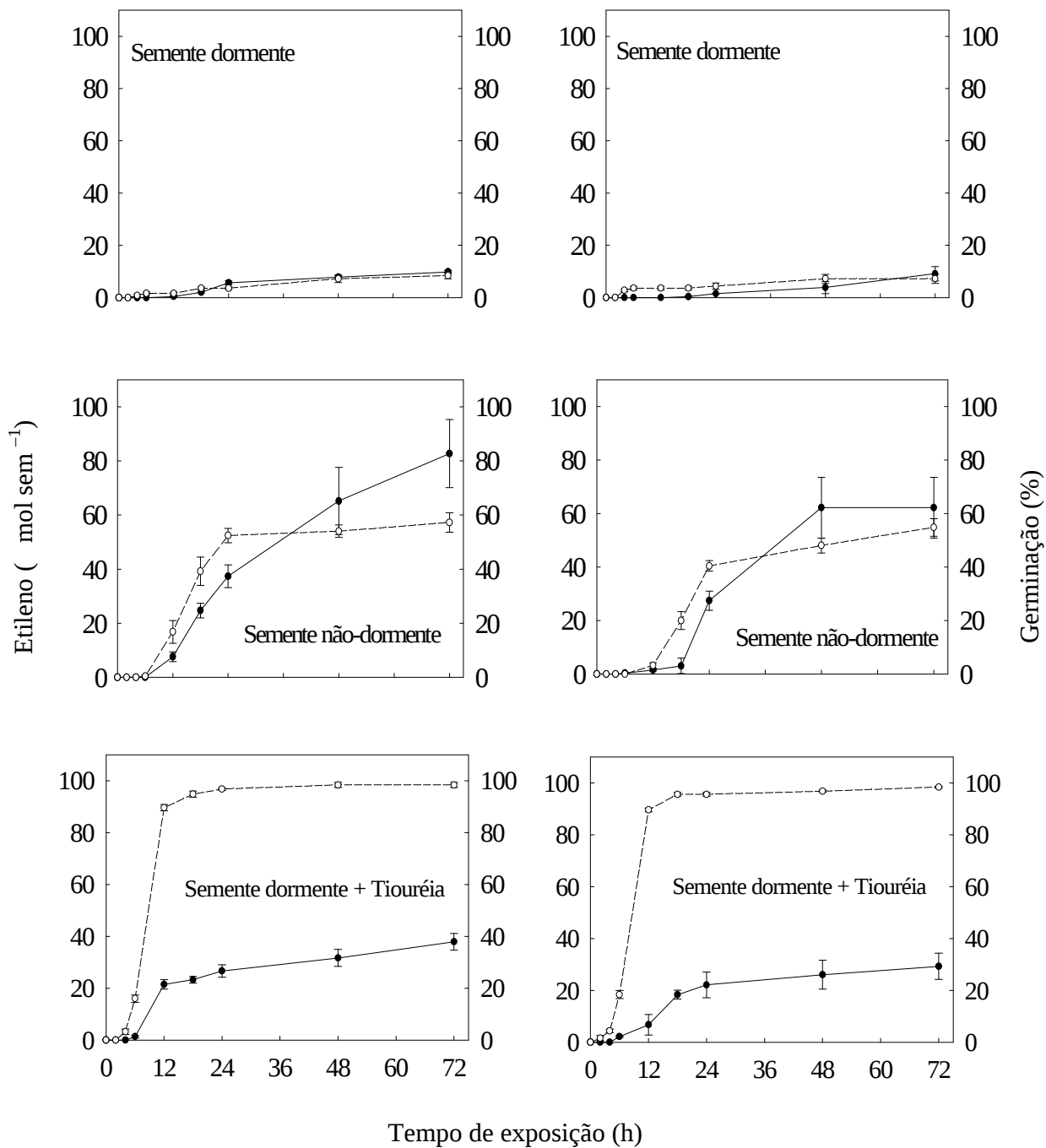


Figura 6.1 – Produção de etileno (—) e germinação (---) em sementes dormentes e não-dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de 100 e 353 dias, respectivamente. Sistema com exaustão (esquerda) e sistema sem exaustão (direita). Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

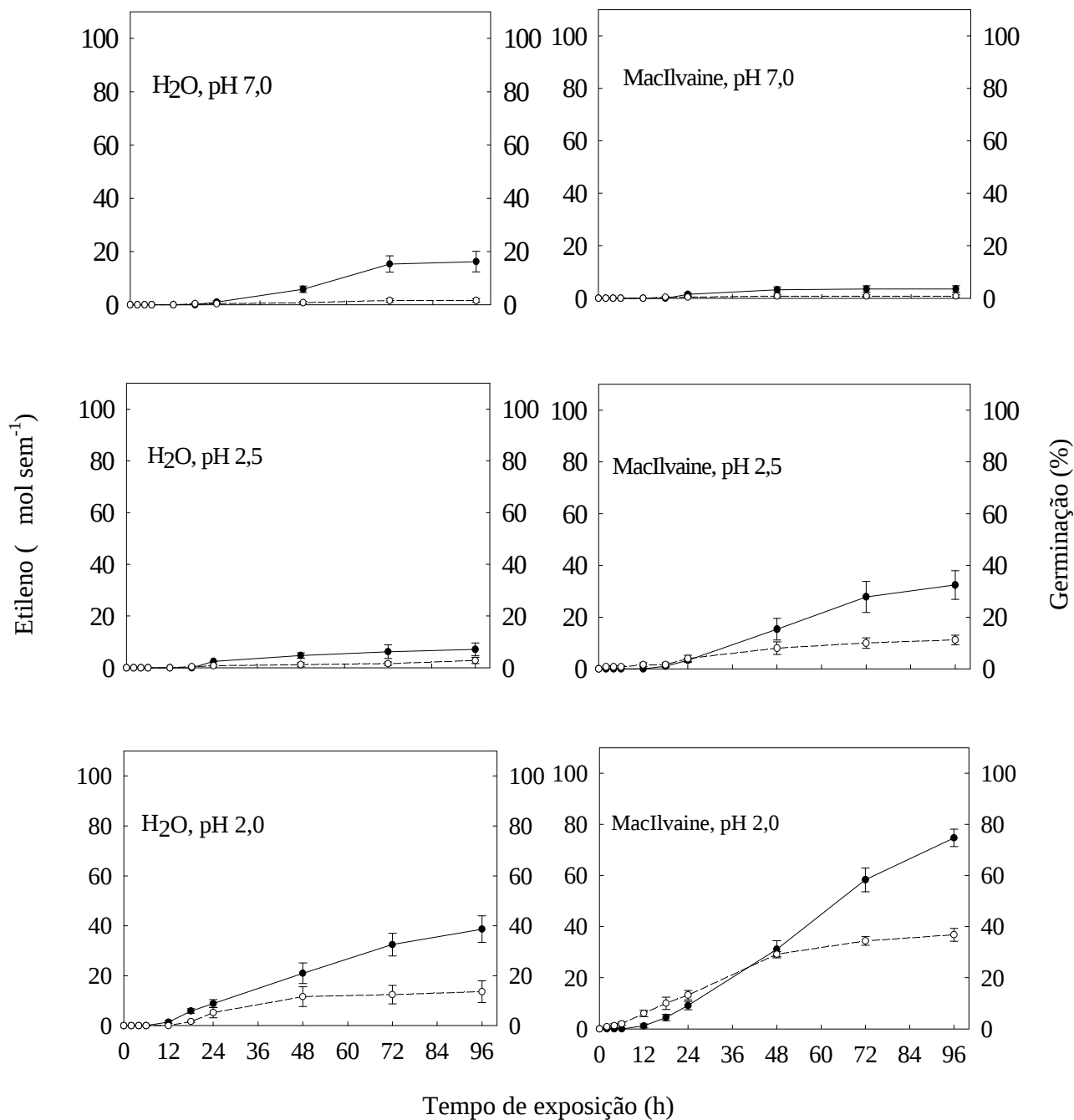


Figura 6.2 – Produção de etileno (—) e germinação (---) em sementes dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de 8 dias, em sistema com exaustão de ar. Foi feita renovação da solução decorridas 12 h do início do período experimental. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

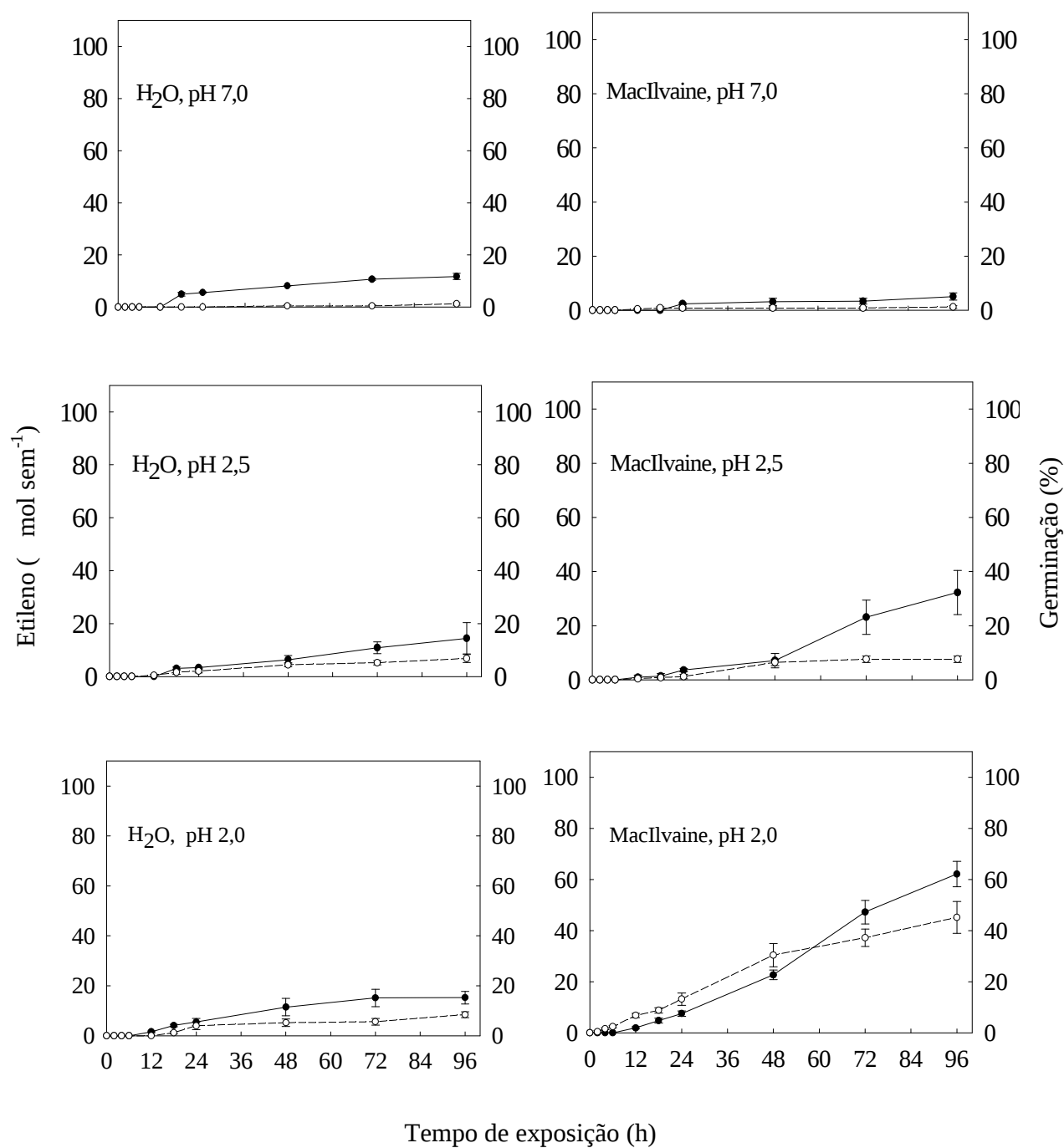


Figura 6.3 – Produção de etileno (—) e germinação (---) em sementes dormentes de estilósante, com idade pós-colheita de 8 dias, em sistema sem exaustão de ar. Foi feita renovação da solução decorridas 12 h do início do período experimental. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

resposta do tecido estudado em função da dose do regulador. Existem diferentes maneiras de se avaliar a sensibilidade do tecido em função da curva dose-resposta. De acordo com Firn (1986), cinco parâmetros podem ser utilizados para avaliar-se a sensibilidade de um tecido aos reguladores de crescimento: a magnitude da resposta máxima que pode ser alcançada; a resposta máxima alcançada relativa à resposta sem o regulador adicionado; a concentração mínima do regulador requerida para alcançar-se uma resposta significativa; a concentração do regulador requerida para alcançar-se uma resposta máxima, e a concentração do regulador capaz de produzir metade da resposta máxima.

Com a finalidade de se verificar se a condição acídica e a tiouréia tornam as sementes mais sensíveis ao etileno, este fitorregulador foi injetado, na atmosfera de frascos Erlenmeyer, às concentrações de 0, 10^{-6} e 10^{-4} mol m⁻³. Inicialmente, as sementes foram mantidas em placas de petri, embebidas em água e em solução-tampão McIlvaine com pH 2,5 e em solução de tiouréia (100 mol m⁻³), por 1 h. Decorrido o tempo de incubação, 50 sementes não-germinadas eram lavadas em água destilada e transferidas para frascos Erlenmeyer, contendo água destilada, pH 7,0 e, então, eram feitas adições de etileno aos frascos. Observou-se que sob pH 2,5 e 7,0 em solução-tampão McIlvaine e em água destilada, houve um aumento na germinação de sementes com a injeção de etileno à concentração de 10^{-4} mol m⁻³, que também causou um aumento na germinação de sementes tratadas com solução de tiouréia (Fig 7). Não foram observados aumentos na sensibilidade dos tecidos ao regulador gasoso com o pré-tratamento em solução de pH 2,5 ou de tiouréia, uma vez que as sementes mantidas em pH 7,0 apresentaram o mesmo comportamento das sementes mantidas em pH 2,5 e em solução de tiouréia.

Hsiao *et al* (1984) observaram que o pré-tratamento com imersões em soluções de HCl 1N, pH 0,1, por um período de apenas 30 s, foi suficiente para as sementes de alface (*Lactuca sativa*) aumentarem sua sensibilidade ao tratamento subsequente com GA₃ e luz vermelha. O grau de sensibilidade mostrou-se negativamente relacionado ao valor do pH da solução de imersão e à duração da imersão em solução acídica. Apenas 1 h de exposição das sementes aos pré-tratamentos não foi suficiente para que as soluções pudessem exercer seus efeitos estimulatórios sobre a quebra de dormência de estilósante (Fig 7).

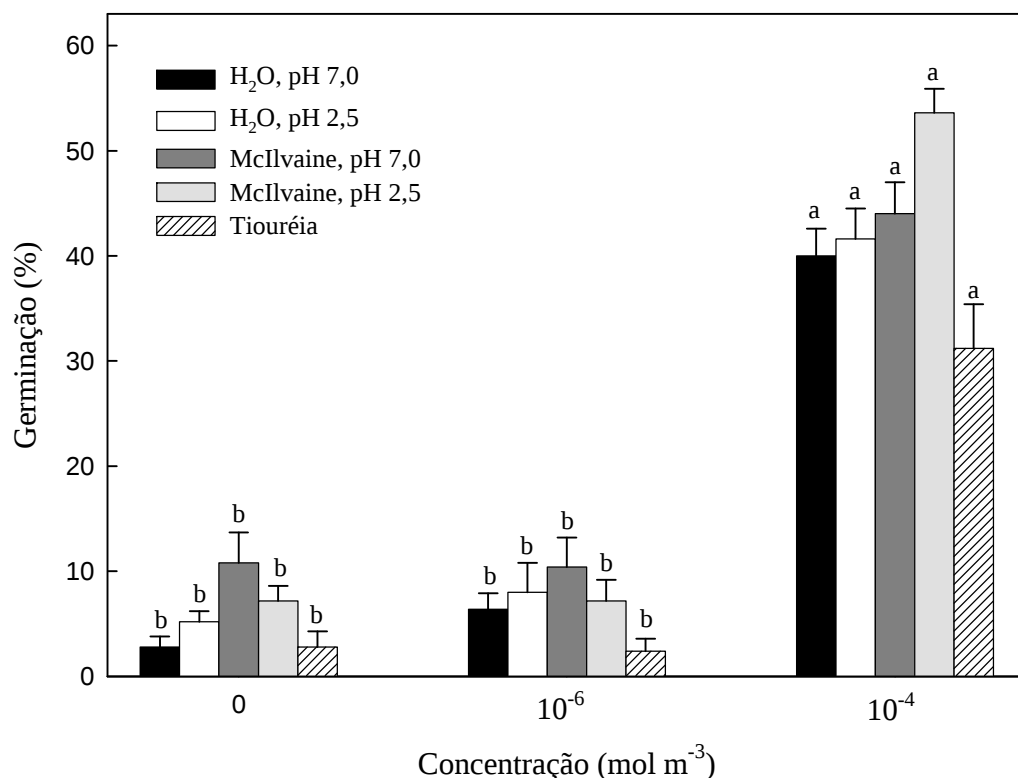


Figura 7 – Resposta ao etileno de sementes dormentes de estilante, com 139 dias de idade pós-colheita, mantidas em frascos selados, embebidas em água destilada, pH 7,0. As sementes foram embebidas em soluções de baixo pH e de tiouréia; após 1 h de embebição, as sementes foram lavadas e transferidas para frascos Erlenmeyer, os quais foram posteriormente selados, e injetou-se etileno às concentrações mostradas. As 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

4.7 Cinética de produção de etileno em relação à germinação das sementes

Tendo em vista a resposta de sementes dormentes a soluções ácidas e a solução de tiouréia, o comportamento da germinação das sementes foi descrito ajustando-se as funções de Gompertz que melhor representassem a cinética de germinação e a cinética de produção de etileno (Figs 8.1 a 8.6) (Calbo *et al* 1985). Isso possibilitou a comparação entre a germinação e a produção de etileno estimulada por soluções de baixos pH(s) e de tiouréia com a germinação e a produção de etileno por sementes dormentes e não-dormentes expostas à solução-controle. Das curvas de germinação e de produção de etileno integradas

ao longo do tempo, foram estimadas as derivadas primeiras para obtenção das taxas de germinação e taxas de produção de etileno (Causton 1983). Igualando-se a zero a derivada segunda, obtiveram-se os tempos correspondentes às taxas máximas, e quando houve estabilização da germinação e da produção de etileno, determinou-se o tempo de saturação. A extrapolação da parte ascendente da curva até o eixo do x permitiu estimar-se o tempo inicial do processo de germinação das sementes. Os parâmetros obtidos pelos procedimentos citados foram usados para construção das Tabelas 6 e 7. As curvas de germinação e de produção de etileno acumuladas apresentaram-se, de forma sigmoideal, em concordância com os resultados obtidos anteriormente (Figs 5.1 a 5.5).

A germinação acumulada e a quantidade de etileno produzido pelas sementes não-dormentes mostram-se maiores que aquelas de sementes dormentes (Fig 8.1), à semelhança dos resultados de Pelacani (2001). A taxa máxima de germinação de sementes não-dormentes ocorreu antes da observação da taxa máxima em sementes dormentes, em sistema com exaustão (Fig 8.1). A ocorrência das taxas máximas de produção de etileno se deu próximo a 22 h do início do período experimental, exceto nas sementes dormentes mantidas em sistema continuamente selado, no qual houve um atraso na ocorrência da taxa máxima de produção de etileno, que foi observada por volta de 58 h do início do período experimental (Fig 8.4).

A germinação acumulada em sementes dormentes, expostas a pH 2,0, tanto em água destilada, quanto em solução-tampão McIlvaine, foi a mais expressiva. A taxa máxima de germinação dessas sementes foi superior àquela dos demais tratamentos; entretanto, foi inferior a de sementes não-dormentes (4 sem h^{-1}), alcançadas após 13 h de embebição (Figs 8.1 a 8.3 e Tab 7). Houve correlação positiva entre a produção de etileno e germinação de sementes tratadas com pH 2,0, em sistema com e sem exaustão (Figs 8.2, 8.3, 8.5 e 8.6). De maneira geral, a taxa máxima de germinação ocorreu antes da taxa máxima de produção de etileno, exceto nas sementes embebidas em água destilada, pH 2,5, no sistema com exaustão e sob pH 7,0, no sistema sem exaustão, nos quais a taxa máxima de produção de etileno foi alcançada antes da taxa máxima de germinação (Tabs 6 e 7).

A extrapolação da parte ascendente da curva até o eixo do x permitiu estimar-se o tempo inicial do processo de germinação e de produção de etileno (Tabs 6 a 9). Nas sementes mantidas em solução-tampão McIlvaine, pH 2,0, observou-se que a germinação

iniciou-se antes da produção de etileno, sugerindo que o etileno não seria essencial para o início do processo de germinação de sementes dormentes. Dados obtidos em experimentos com inibidores da biossíntese e da ação do etileno (Tabs 4 a 7) mostraram que a germinação ocorreu mesmo em suas presenças e sob atmosfera livre do fitorregulador, indicando o que o próprio pH baixo poderia estar promovendo a quebra de dormência. Kpczyński *et al* (2003) propuseram que a quebra da dormência primária de sementes de *Amaranthus retroflexus* depende da síntese, ação e sensibilidade dos tecidos ao etileno. Logan e Stewart (1991) propuseram que estimulantes da germinação agem por estimular a síntese do etileno e este desencadearia mudanças bioquímicas que conduziriam a germinação. Machabée e Saini (1991) propuseram que o etileno poderia ser requerido em quantidades mínimas, e que quantidades residuais produzidas por sementes tratadas com AVG seriam suficientes para desencadear a germinação. Os resultados aqui obtidos também permitem inferir sobre um requerimento mínimo de etileno para desencadeamento do processo de germinação (Tab 5), uma vez que a germinação ocorreu mesmo na presença de inibidores da síntese de etileno e em atmosfera livre do fitorregulador.

O tempo de início do processo germinativo antecedeu àquele da produção de etileno em sementes dormentes tratadas com soluções de tiouréia (Tabs 6 e 8), indicando que o desencadeamento do processo germinativo não dependeu da produção de etileno nos seus momentos iniciais. As mesmas observações foram feitas em experimentos conduzidos com inibidores da biossíntese de etileno, em atmosfera livre do fitorregulador (Tab 5). Em sistema com exaustão, a produção de etileno pelas sementes tratadas com soluções de tiouréia foi maior do que em sistema continuamente fechado, embora a germinação observada em ambos sistemas fosse semelhante (Figs 7.1 e 7.4). Pode-se verificar ainda, que o tratamento com solução de tiouréia antecipou a ocorrência da taxa máxima de germinação no que se refere àquela de sementes não-dormentes, estando em concordância com os resultados de Delatorre *et al* (1997), em que o estímulo causado pela tiouréia ocorreu em período inferior a 12 h. O modo de ação da tiouréia parece relacionado com a ativação do transporte de K^+ e por facilitar o transporte de água e o alongamento celular dos tecidos da radícula de *Cicer arietinum* L., mesmo em presença de AAB (Aldasoro *et al* 1981). A tiouréia também fez aumentar o transporte de precursores radioativos de DNA e proteínas, embora fosse incapaz de aumentar sua incorporação em DNA e proteínas

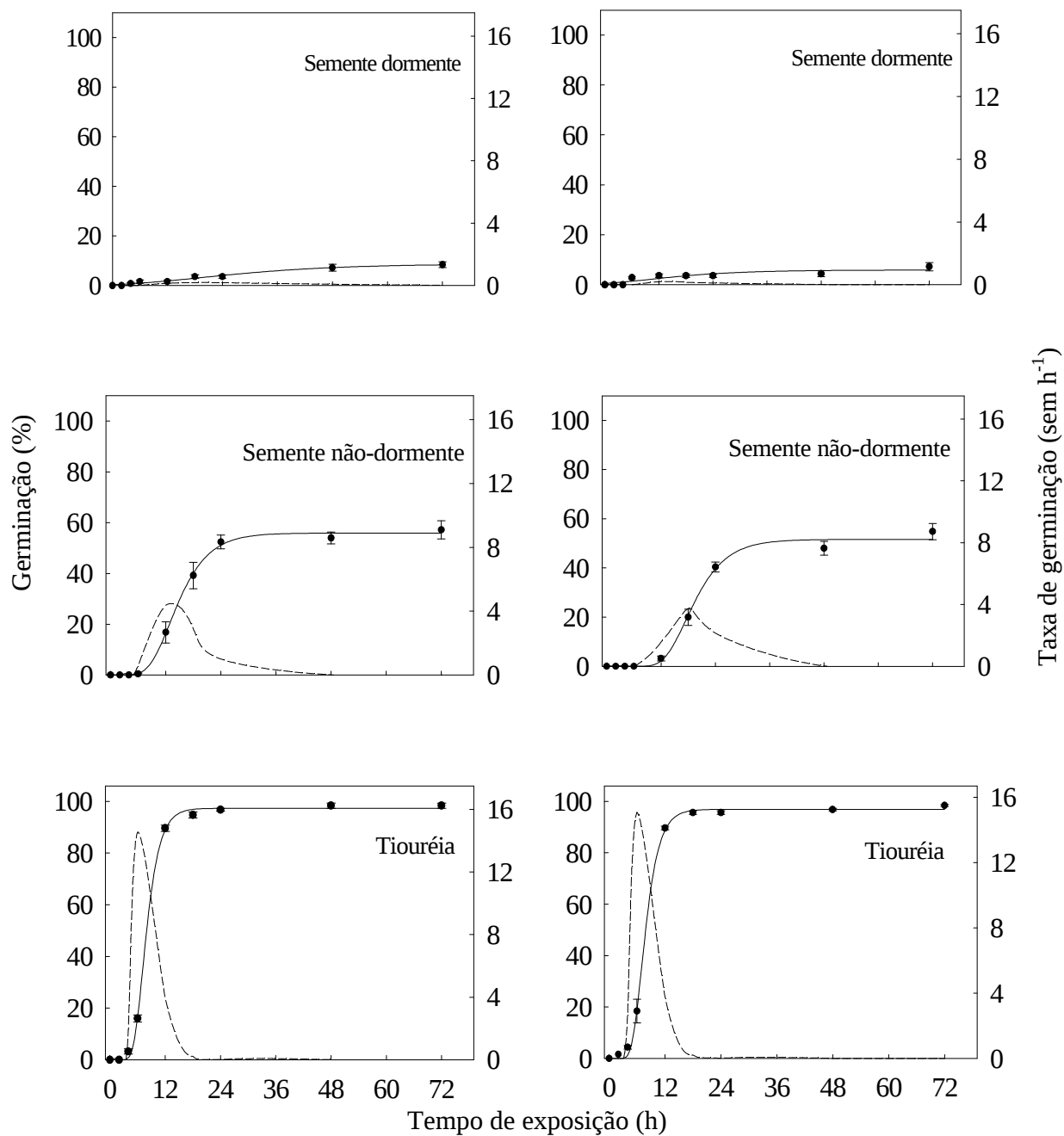


Figura 8.1 – Germinação acumulada (—) e taxa de germinação (---) de sementes dormentes e não-dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de 100 e 353 dias, respectivamente. Sistema com exaustão (esquerda) e sistema sem exaustão (direita). As sementes foram mantidas em água destilada ou solução de tiouréia, pH 7,0. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

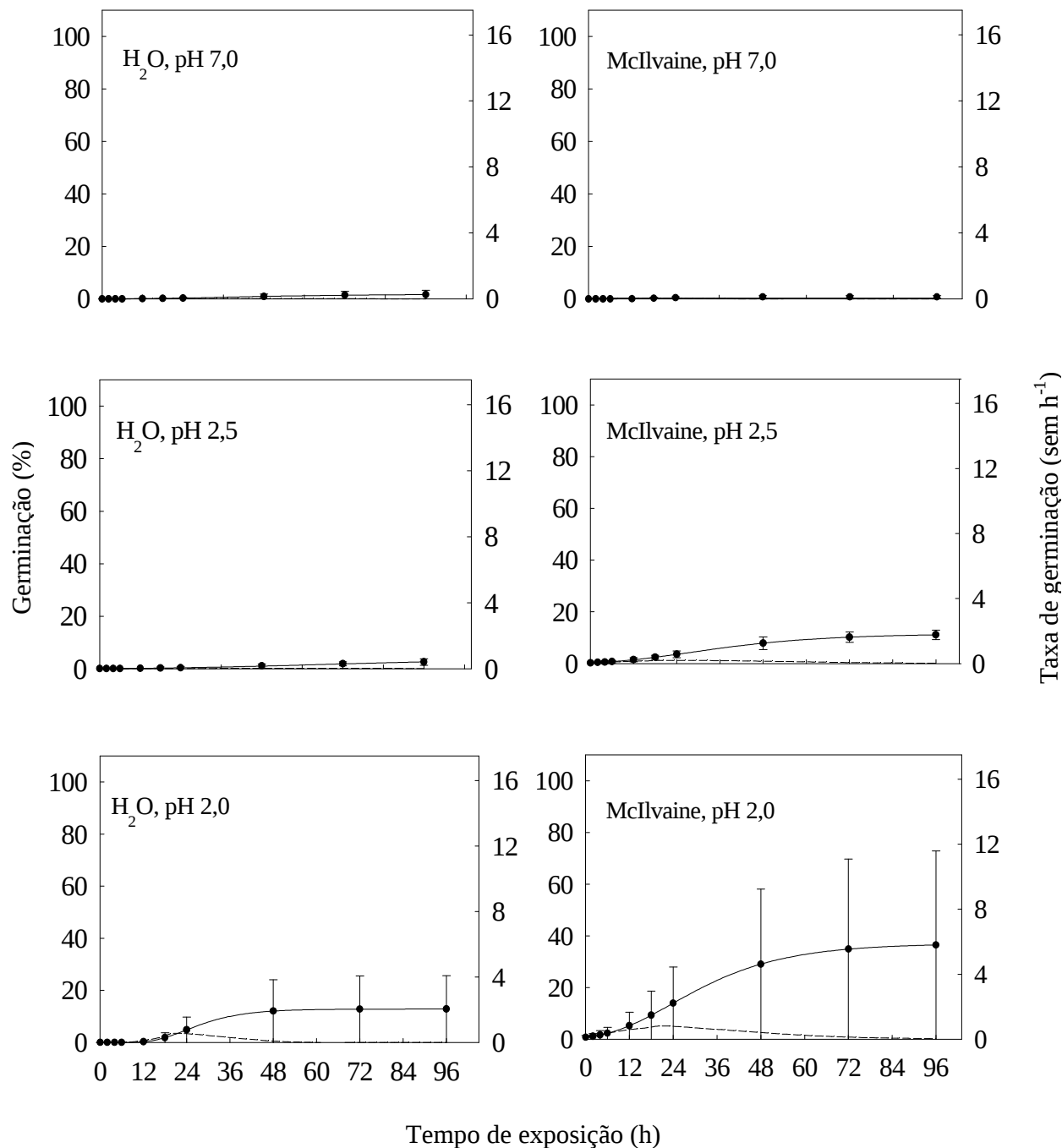


Figura 8.2 – Germinação acumulada (—) e taxa de germinação (---) de sementes dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de 8 dias, em sistema com exaustão. Foi feita renovação da solução decorridas 12 h do início do período experimental. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

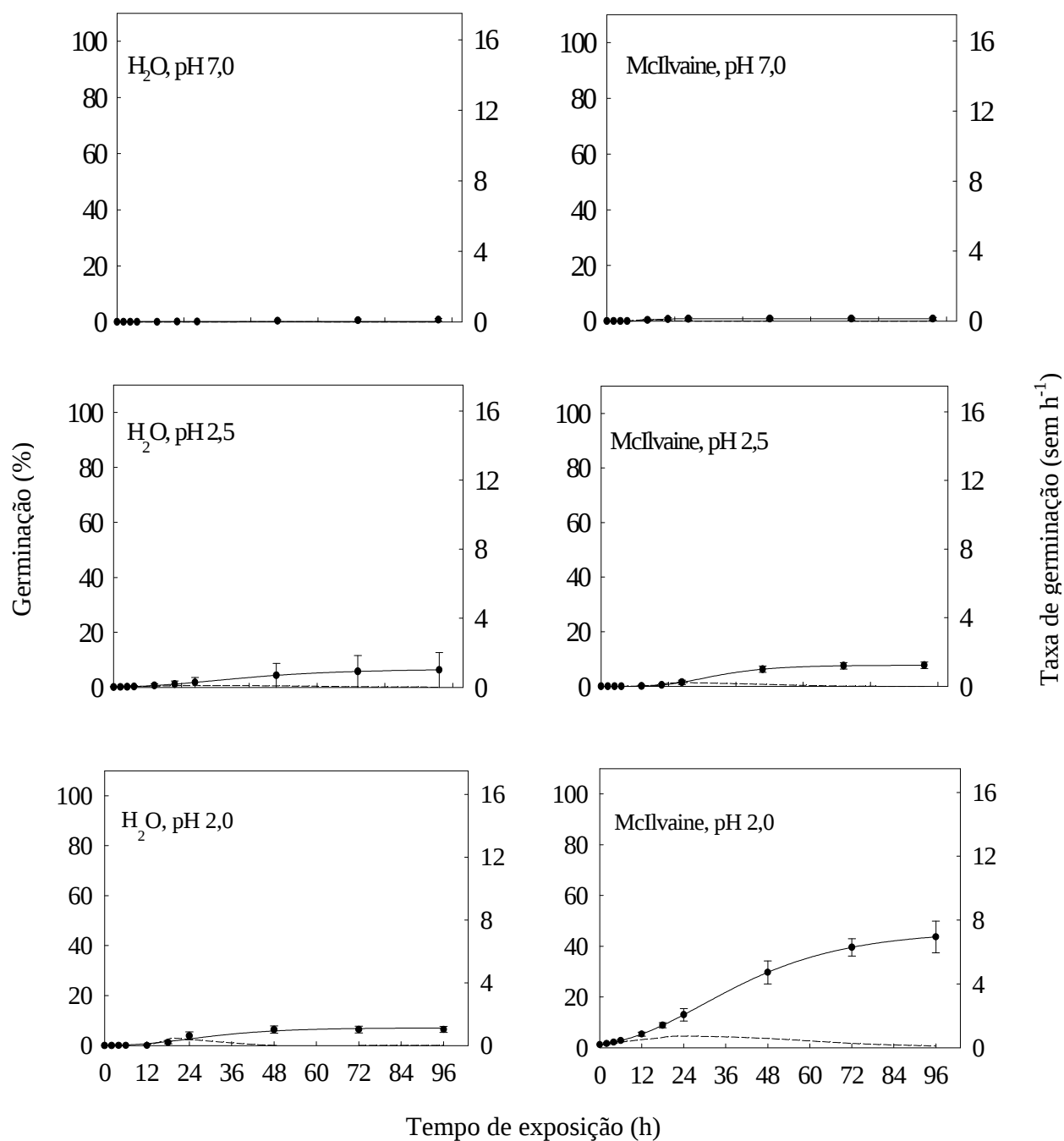


Figura 8.3 – Germinação acumulada (—) e taxa de germinação (---) de sementes dormentes de estilante, com idade pós-colheita de 8 dias, em sistema sem exaustão. Foi feita renovação da solução decorridas 12 h do início do período experimental. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

em ápices embrionários isolados de *Cicer arietinum* L. (Rodrigues *et al* 1983). Esashi *et al* (1979), propuseram que o efeito estimulatório da tiouréia e outros compostos nitrogenados se dá pela sua própria ação e não por intermédio do etileno.

Tabela 6 – Alguns parâmetros da cinética da germinação de sementes dormentes e não-dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de 100 e 353 dias, respectivamente, mantidas em água destiladas, pH 7,0

Tratamento	Tempo inicial (h)	Taxa máxima (semente h ⁻¹)	Tempo de taxa máxima (h)	Limiar de saturação (h)
Com Exaustão				
Semente dormente	3	0,19	19	48
Semente não-dormente	7	4,47	13	48
Tiouréia pH 7,0	5	17,82	7	18
Sem Exaustão				
Semente dormente	5	0,19	10	48
Semente não-dormente	12	3,77	17	36
Tiouréia pH 7,0	5	17,31	7	18

Tabela 7 – Alguns parâmetros da cinética de germinação de sementes dormentes de estilosante tratadas com soluções de baixo pH, com 7 de idade pós-colheita

Tratamento	Tempo inicial (h)	Taxa máxima (semente h ⁻¹)	Tempo de taxa máxima (h)	Limiar de saturação (h)
Com Exaustão				
H ₂ O pH 7,0	12	0,027	37	72
H ₂ O pH 2,5	10	0,034	59	72
H ₂ O pH 2,0	12	0,540	24	48
McIlvaine pH 7,0	12	0,036	19	48
McIlvaine pH 2,5	6	0,200	27	72
McIlvaine pH 2,0	6	0,791	23	72
Sem Exaustão				
H ₂ O pH 7,0	12	0,011	45	72
H ₂ O pH 2,5	8	0,115	29	72
H ₂ O pH 2,0	7	0,470	20	48
McIlvaine pH 7,0	7	0,085	11	36
McIlvaine pH 2,5	17	0,246	30	72
McIlvaine pH 2,0	5	0,748	29	-

Tabela 8 – Alguns parâmetros da cinética de produção de etileno por sementes dormentes e sementes não-dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de 100 e 353 dias, respectivamente

Tratamento	Tempo inicial (h)	Taxa máxima (mol sem ⁻¹ h ⁻¹)	Tempo de taxa máxima (h)	Limiar de saturação (h)
Com Exaustão				
Semente dormiente	14	0,27	21	36
Semente não-dormiente	8	2,29	21	48
Tiouréia pH 7,0	12	1,9	12	12
Sem Exaustão				
Semente dormiente	18	0,2	58	-
Semente não-dormiente	18	4,98	23	40
Tiouréia pH 7,0	8	1,6	12	24

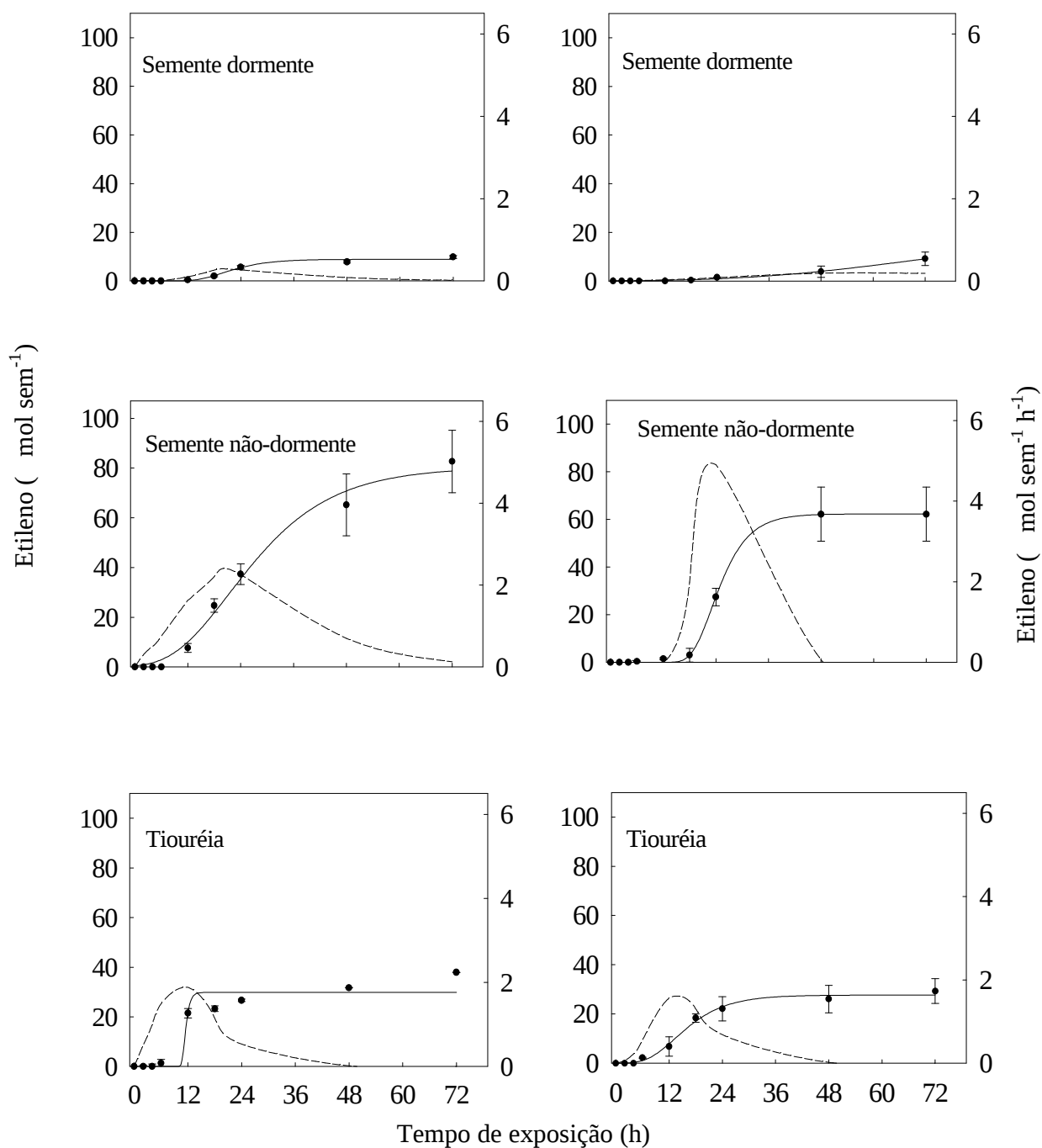


Figura 8.4 – Produção de etileno (—) e taxa de produção de etileno (---) em sementes dormentes e não-dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de 100 e 353 dias, respectivamente. Sistema com exaustão de ar (esquerda) e sistema sem exaustão de ar (direita). As sementes foram mantidas em água destilada ou solução de tiouréia, pH 7,0. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

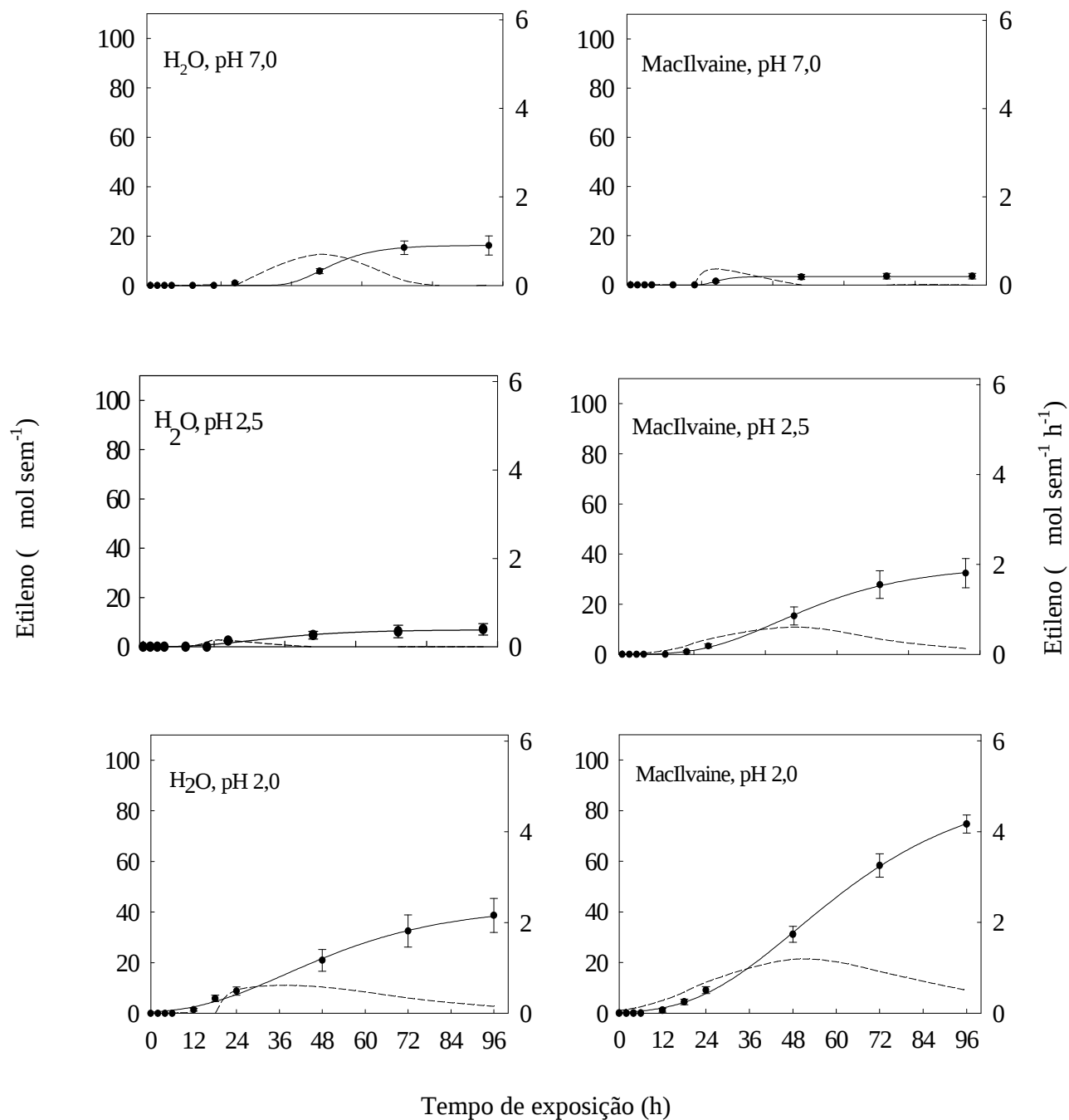


Figura 8.5 – Produção de etileno (—) e taxa de taxa de produção de etileno (---) por sementes dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de 8 dias, com exaustão de ar. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

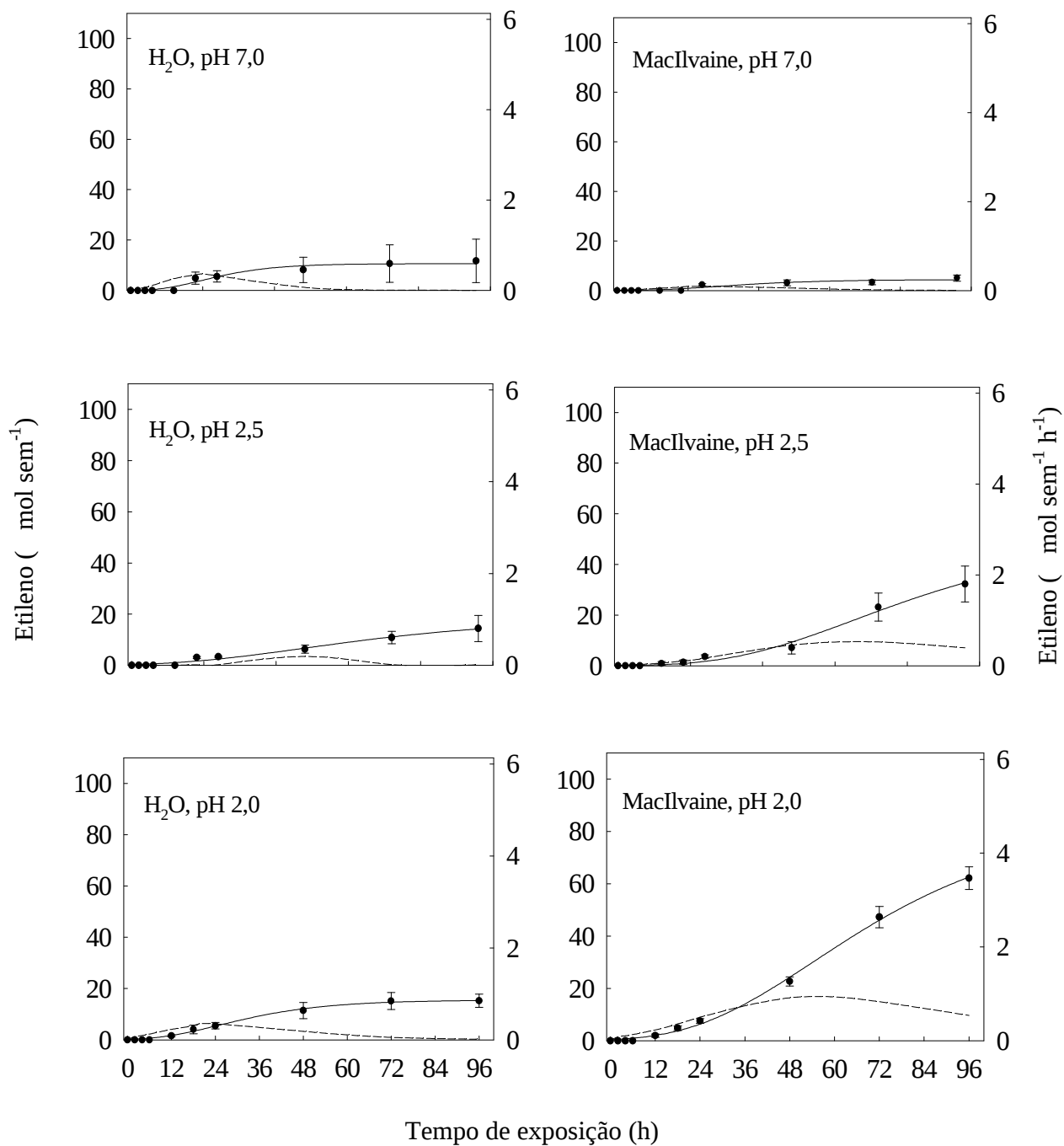


Figura 8.6 – Produção de etileno (—) e taxa de taxa de produção de etileno (---) em sementes dormentes de *stilpnanthus*, com idade pós-colheita de 8 dias, sem exaustão de ar. Média de 5 repetições $\pm$ erro da média

Tabela 9 – Alguns parâmetros da cinética de produção de etileno em sementes dormentes de estilosante tratadas com soluções de baixo pH, com 7 de idade pós-colheita

Tratamento	Tempo inicial (h)	Taxa máxima ($\text{mol sem}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	Tempo de taxa máxima (h)	Limiar de saturação (h)
Com Exaustão				
H ₂ O pH 7,0	34	0,70	48	72
H ₂ O pH 2,5	12	0,14	30	72
H ₂ O pH 2,0	12	0,58	38	72
McIlvaine pH 7,0	20	0,36	23	36
McIlvaine pH 2,5	20	0,61	44	72
McIlvaine pH 2,0	18	1,18	49	84
Sem Exaustão				
H ₂ O pH 7,0	8	0,35	19	40
H ₂ O pH 2,5	12	0,19	48	84
H ₂ O pH 2,0	8	0,34	25	52
McIlvaine pH 7,0	11	0,09	27	50
McIlvaine pH 2,5	28	0,52	66	-
McIlvaine pH 2,0	19	0,92	55	-

5 CONCLUSÕES

A dormência fisiológica das sementes de *Stylosanthes humilis* H.B.K. foi quebrada com soluções de baixo pH, tanto em sistema tamponante (McIlvaine), quanto por não-tamponante (água destilada). Soluções de tiouréia também mostraram-se eficazes na quebra de dormência.

O tempo mínimo de exposição das sementes dormentes ao tratamento ácido (pH 2,0) para promoção da germinação, foi de 6 h, em água destilada, e de 48 h, em solução tampão de McIlvaine. Sementes tratadas com soluções de tiouréia necessitam de um tempo de exposição inferior a 12 h.

A condição acídica e as soluções de tiouréia neutralizam os efeitos dos inibidores da biossíntese e da ação de etileno.

Observou-se uma aceleração no processo de germinação das sementes expostas à solução acídica. De maneira geral, a germinação iniciou-se antes da produção de etileno. Os resultados sugerem que o etileno não seria essencial para a germinação de sementes dormentes de estilósante, indicando o que o próprio pH pudesse promover a quebra de dormência.

A germinação de sementes dormentes expostas à solução de tiouréia não se mostrou associada à produção de etileno nos momentos iniciais do processo.

Os resultados permitem a elaboração de duas hipóteses: a não essencialidade do etileno para a quebra de dormência de sementes de estilósante, ou um requerimento mínimo do fitorregulador para desencadear o processo de germinação, abaixo do nível de detecção utilizado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeles FB (1973) **Ethylene in plant biology**. Academic Press, New York. 302 p
- Abeles FB (1986) Role of ethylene in *Lactuca sativa* cv 'Grand Rapids' seed germination. **Plant Physiol** 81: 780-7
- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit-Jr ME (1992) **Ethylene in plant biology**. 2nd ed. Academic Press, San Diego. 414 p
- Adkins SW, Simpson GM, Naylor JM (1985) The physiological basis of seed dormancy in *Avena fatua* III. Action of nitrogenous compounds. **Physiol Plant** 60: 227-33
- Adkins SW, Simpson GM, Naylor JM (1985) The physiological basis of seed dormancy in *Avena fatua* VII. Action of organic acids and pH. **Physiol Plant** 65: 310-6
- Adkins SW, Symons SJ, Simpson GM (1988) The physiological basis of seed dormancy in *Avena fatua* VIII. Action of malonic acid. **Physiol Plant** 72: 477-82
- Aldasoro JJ, Matilla A, Nicolás G (1981) Effect of ABA, fusaric acid and thiourea on germination and K⁺ and glucose uptake in chick-pea seeds at different temperatures. **Physiol Plant** 53: 139-45
- Araújo EF, Araújo RF, Silva RF, Gomes JM (2000) Avaliação de diferentes métodos de escarificação das sementes e dos frutos de *Stylosanthes viscosa* SW. **Rev Bras Sem** 22: 18-22
- Babiker AGT, Cai T, Ejeta G, Butler LG, Woodson WR (1994) Enhancement of ethylene biosynthesis and germination with thidiazuron and some selected auxins in *Striga asiatica* seeds. **Physiol Plant** 91: 529-36
- Ballard L, Buchwald T (1971) A viability test for seeds of townsville stylo using thiourea. **Aust J Exp Agr Anim Husb** 11: 207-10
- Barros RS, Delatorre CA (1998) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid-stimulated germination of dormant seeds of *Stylosanthes humilis* is inhibited by abscisic acid. **Seed Sci Technol** 26: 319-24
- Bewley JD, Black M (1994) **Seeds: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York, Plenum Press. 445 p
- Broun R, Mayak S (1981) Aminooxyacetic acid as an inhibitor of ethylene synthesis and senescence in carnation flowers. **Sci Hort** 15: 277-82

- Burin ME, Barros RS, Rena AB (1987) Chemical regulation of endogenous dormancy in seeds of *Stylosanthes humilis* H.B.K. **Turrialba** 37: 281-5
- Calbo AG, Silva WLC, Torres AC (1989) Ajuste de funções não lineares de crescimento. **Rev Bras Fisiol Veg** 1: 9-18
- Cameron DF (1967) Hardseededness and seed dormancy of Townsville lucerne (*Stylosanthes humilis*) selections. **Aust J Exp Agr Anim Husb** 7: 237-40
- Cameron DF, 't Mannetje L (1977) Effects of photoperiod and temperature on flowering of twelve *Stylosanthes* species. **Aust J Exp Agr Anim Husb** 17: 417-24
- Causton DR (1983) **A biologist's basic mathematics**. London, Edward Arnold, 216 p
- Cohn MA (1989) Factors influencing the efficacy of dormancy-breaking chemicals. In: Taylorson RB (ed) Recent advances in the development and germination of seeds. New York, Plenum Press, p 261-7
- Cohn MA, Chiles LA, Huges JA, Boullion KJ (1987) Seed dormancy in red rice VI. Monocarboxylic acids: a new class of pH-dependent germination stimulants. **Plant Physiol** 89: 879-82
- Delatorre CA (1994) **Regulação não-específica da germinação de sementes de *Stylosanthes humilis* H.B.K.** Viçosa, UFV, 83 p (Tese de Mestrado)
- Delatorre CA, Barros RS, Vieira HD (1997) Germinação de sementes de *Stylosanthes humilis* em resposta a tiouréia. **Rev Bras Fisiol Veg** 9: 49-53
- Esashi Y, Ohhara Y, Okazaki M, Hishinuma K (1979) Control of cocklebur seed germination by nitrogenous compounds: nitrite, nitrate, hydroxylamine, thiourea, azide and cyanide. **Plant Cell Physiol** 20: 349-61
- Firm RD (1986) Growth substance sensitivity: The need for clearer ideas, precise terms and purposeful experiments. **Physiol Plant** 67: 267-72
- Footitt S, Cohn MA (1992) Seed dormancy in red rice VIII. Embryo acidification during dormancy-breaking and subsequent germination. **Plant Physiol** 100: 1196-202
- Frigeri RBC (1998) **Efeito do pH na germinação de sementes dormentes de *Stylosanthes humilis* H.B.K.** Viçosa, UFV, 56 p (Tese de Mestrado)

- Fu JR, Yang SF (1983) Release of heat pretreatment-induced dormancy in lettuce seeds by ethylene or cytokinin in relation to the production of ethylene and the synthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during germination. **J Plant Growth Reg** 2: 185-91
- Gallardo M, De Rueda PM, Matilla AJ, Sánchez-Calle IM (1994) The relationships between ethylene production and germination of *Cicer arietinum* seeds. **Biol Plant** 36: 201-7
- Hsiao AI, Vidaver W, Quick WA (1984) Acidification, growth promoter, and red light effects on germination of skotodormant lettuce seeds (*Lactuca sativa*). **Can J Bot** 62: 1108-15
- Kpczyński 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: 588-91
- Kpczyński J, Karssen CM (1985) Requirement for the action of endogenous ethylene during germination of non-dormant seeds of *Amaranthus caudatus*. **Physiol Plant** 63: 49-52
- Kpczyński J, Kepczyńska E (1997) Ethylene in seed dormancy and germination. **Physiol Plant** 101: 720-6
- Kpczyński J, Kepczyńska E, Bihum M (2003) The involvement of ethylene in the release of primary dormancy in *Amaranthus retroflexus* seeds. **Plant Growth Reg** 39: 57-62
- Knee M (1992) Sensitivity of ATPases to silver ions suggests that silver acts outside the plasma membrane to block ethylene action. **Phytochemistry** 31: 1093-6
- Logan DC, Stewart GR (1991) Role of ethylene in the germination of the hemiparasite *Striga hermonthica*. **Plant Physiol** 97: 1435-8
- Machabée S, Saini HS (1991) Differences in the requirement for endogenous ethylene during germination of dormant and non-dormant seeds of *Chenopodium album* L. **J Plant Physiol** 138: 97-101
- Matilla AJ (2000) Ethylene in seed formation and germination. **Seed Sci Res** 10: 111-26
- Mayer AM, Poljakoff-Mayber A (1984) **The germination of seeds**. 4ed. Oxford, Pergamon Press, 270 p

- Pelacani CR (2001) **Relações entre o pH do meio de germinação e a produção de etileno em sementes de *Stylosanthes humilis* H.B.K.** Viçosa, UFV, 140 p (Tese de Doutorado)
- Reid MS, Paul JL, Farhoomand MB, Kofranek AM, Staby GL (1980) Pulse treatments with the silver thiosulfate complex extend the vase life of cut carnations. **J Amer Soc Hort Sci** 105: 25-7
- Ribeiro DM (2003) **Germinação de sementes dormentes de *Stylosanthes humilis* H.B.K. promovida pelo acúmulo de etileno em ambiente fechado.** Viçosa, UFV, 43 p (Tese de Mestrado)
- Roberts EH (1963) The effects of inorganic ions on dormancy in rice seed. **Physiol Plant** 16: 732-44
- Rodriguez D, Matilla A, Aldasoro J, Hernández-Nistal J, Nicolás G (1983) Germination of *Cicer arietinum* seeds and thiourea-induced phytotoxicity. **Physiol Plant** 57: 267-72
- Rodriguez-Gacio MC, Matilla AJ (2001) The last step of the ethylene biosynthesis pathway in turnip tops (*Brassica rapa*) seeds: alterations related to development and germination and its inhibition during desiccation. **Physiol Plant** 112: 273-9
- 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
- Scott AJ, Knott M (1974) A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics** 30:507-12
- Trewavas AJ (1982) Growth substance sensitivity: The limiting factor in plant development. **Plant Physiol** 55: 60-72
- Vieira HD, Barros RS (1994) Responses of seed of *Stylosanthes humilis* to germination regulators. **Physiol Plant** 92: 17-20
- Vieira HD, Silva RF, Barros RS (1999) pH and gibberellic acid overcome dormancy of seeds of *Brachiaria brizantha* cv Marandu. **Rev Bras Fisiol Veg** 11: 51-4
- Whitehead CS, Sutcliffe MA (1995) Effect of low temperatures and different growth regulators on seed germination in *Cyclopia* spp. **J Plant Physiol** 147: 107-12

ANEXO

Tabela 1A– Modelo descritivo do efeito do baixo pH do meio de germinação e da tiouréia sobre a germinação de sementes dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de aproximadamente 105 dias, em função do tempo (Figs 6.1 a 6.4). Foi feita renovação da solução decorridas 12 horas do início do experimento

Tratamento	Coeficientes da função: $Y = ae^{-be^{-kt}}$			R^2
	a	b	k	
Com Exaustão de ar				
H ₂ O pH 7,0	11,613	5,099	0,161	0,996
H ₂ O pH 2,5	61,334	1,588	0,077	0,939
H ₂ O pH 2,0	94,102	2,217	1,000	0,966
CEPA pH 7,0	90,000	5,678	0,346	0,989
McIlvaine pH 7,0	18,769	2,919	0,102	0,983
McIlvaine pH 2,5	63,123	1,660	0,089	0,944
McIlvaine pH 2,0	91,850	2,000	0,799	0,957
CEPA ph 7,0	61,408	5,458	0,171	0,997
Sem Exaustão de ar				
H ₂ O pH 7,0	28,089	4,712	0,063	0,992
H ₂ O pH 2,5	98,916	80,000	0,272	0,998
H ₂ O pH 2,0	97,283	1,713	0,256	0,915
CEPA pH 7,0	95,000	4,263	0,239	0,993
McIlvaine pH 7,0	11,375	2,071	0,400	0,973
McIlvaine pH 2,5	85,628	2,974	0,099	0,989
McIlvaine pH 2,0	93,064	2,597	0,503	0,962
CEPA pH 7,0	90,000	3,768	0,187	0,985

Taxa de produção de etileno: $Y' = (abk)e^{kt} \cdot e^{-be^{-kt}}$

Tabela 2A – Modelo descritivo do efeito da tiouréia sobre a germinação de sementes dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de 105 dias, em função do tempo (Fig 6.5)

Tratamento	Coeficientes da função: $Y = ae^{-be^{-kt}}$			R^2
	a	b	k	
Com Exaustão de ar				
H ₂ O pH 7,0	10,365	4,002	0,086	0,957
Tiouréia pH 7,0	97,436	7,663	0,388	0,999
CEPA pH 7,0	94,496	51,487	0,913	0,997
Sem Exaustão de ar				
H ₂ O pH 7,0	17,845	2,849	0,067	0,996
Tiouréia pH 7,0	99,537	6,549	0,301	0,999
CEPA pH 7,0	97,000	3,585	0,206	0,995

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

Tabela 3A – Modelo descritivo da germinação de sementes dormentes e não-dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de 100 e 353 dias, respectivamente, em função do tempo (Fig 6.6)

Tratamento	Coeficientes da função: $Y = ae^{-be^{-kt}}$			R^2
	a	b	k	
Com Exaustão de ar				
Semente dormente	8,731	3,114	0,058	0,979
Semente não-dormente	55,925	16,601	0,217	0,998
Tiouréia pH 7,0	97,346	35,174	0,497	0,999
Sem Exaustão de ar				
Semente dormente	5,845	2,427	0,089	0,810
Semente não-dormente	51,716	32,000	0,198	0,994
Tiouréia pH 7,0	96,892	29,863	0,486	0,999

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

Tabela 4A – Modelo descritivo da produção de etileno por sementes dormentes e não-dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de 100 e 353 dias, respectivamente, em função do tempo (Fig 8.1)

Tratamento	Coeficientes da função: $Y = ae^{-be^{-kt}}$			R^2
	a	b	k	
Com Exaustão de ar				
Semente dormente	9,647	5,000	0,077	0,972
Semente não-dormente	80,397	5,284	0,078	0,991
Tiouréia pH 7,0	33,572	5,000	0,159	0,957
Sem Exaustão de ar				
Semente dormente	26,399	5,981	0,024	0,993
Semente não-dormente	62,306	152,112	0,218	0,999
Tiouréia pH 7,0	27,692	8,358	0,158	0,992

Taxa de produção de etileno: $Y' = (abk)e^{kt} \cdot e^{-be^{-kt}}$

Tabela 5A – Modelo descritivo do efeito do baixo pH do meio de germinação e da solução de tiouréia sobre a germinação de sementes dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de 7 dias, em função do tempo (Figs 8.2 e 8.3)

Tratamento	Coeficientes da função: $Y = ae^{-be^{-kt}}$			R^2
	a	b	k	
Com Exaustão de ar				
H ₂ O pH 7,0	1,834	4,407	0,040	0,969
H ₂ O pH 2,5	4,000	3,895	0,023	0,954
H ₂ O pH 2,0	12,852	15,063	0,114	0,996
McIlvaine pH 7,0	0,803	9,544	0,122	0,977
McIlvaine pH 2,5	11,558	3,628	0,047	0,992
McIlvaine pH 2,0	36,995	3,935	0,058	0,998
Tiouréia pH 7,0	88,657	29,454	0,358	0,998
Sem Exaustão de ar				
H ₂ O pH 7,0	1,000	3,968	0,030	0,854
H ₂ O pH 2,5	6,628	4,061	0,047	0,983
H ₂ O pH 2,0	6,423	58,435	0,199	0,931
McIlvaine pH 7,0	0,917	17,000	0,252	0,938
McIlvaine pH 2,5	7,743	13,114	0,086	0,997
McIlvaine pH 2,0	46,022	3,656	0,044	0,995
Tiouréia pH 7,0	90,723	8,802	0,172	0,997

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

Tabela 6A – Modelo descritivo do efeito do baixo pH do meio de germinação e da tiouréia sobre a produção de etileno em sementes dormentes de estilosante, com idade pós-colheita de 7 dias, em função do tempo (Figs 8.5 a 8.6)

Tratamento	Coeficientes da função: $Y = ae^{-be^{-kt}}$			R^2
	a	b	k	
Com Exaustão de ar				
H ₂ O pH 7,0	16,279	289,899	0,117	0,998
H ₂ O pH 2,5	6,955	6,689	0,062	0,978
H ₂ O pH 2,0	42,378	4,513	0,040	0,996
McIlvaine pH 7,0	3,439	900,000	0,291	0,997
McIlvaine pH 2,5	35,461	7,940	0,048	0,999
McIlvaine pH 2,0	90,262	5,796	0,036	0,999
Tiouréia pH 7,0	70,833	4,727	0,081	0,985
Sem Exaustão de ar				
H ₂ O pH 7,0	10,633	5,764	0,090	0,958
H ₂ O pH 2,5	18,235	4,006	0,029	0,980
H ₂ O pH 2,0	15,543	4,568	0,061	0,995
McIlvaine pH 7,0	4,390	5,274	0,061	0,906
McIlvaine pH 2,5	49,484	6,780	0,029	0,990
McIlvaine pH 2,0	82,787	5,374	0,031	0,998
Tiouréia pH 7,0	88,512	7,468	0,096	0,998

Taxa de produção de etileno: $Y' = (abk)e^{kt} \cdot e^{-be^{-kt}}$