

DIMAS MENDES RIBEIRO

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DORMENTES DE *Stylosanthes*
humilis H.B.K. PROMOVIDA PELO ACÚMULO DE ETILENO EM
AMBIENTE FECHADO

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
2003

DIMAS MENDES RIBEIRO

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DORMENTES DE *Stylosanthes humilis* H.B.K. PROMOVIDA PELO ACÚMULO DE ETILENO EM AMBIENTE FECHADO

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”

APROVADA: 25 de fevereiro de 2003

Prof. Wagner Campos Otoni

Prof. Nelson Delú Filho

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro

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

Prof. Raimundo Santos Barros
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo e à Universidade Federal de Viçosa, que proporcionou os meios para a realização do Curso de Mestrado.

Aos professores, funcionários e colegas.

CONTEÚDO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1 Material vegetal e condições de cultivo	5
2.2 Condução dos experimentos	5
2.3 Manipulação do etileno	6
2.4 Quantificação do etileno	7
2.5 Quebra da dormência das sementes com etileno	8
2.6 Germinação de sementes dormentes em relação ao acúmulo de etileno	8
2.7 Volume de frascos e número de sementes em relação à germinação de sementes dormentes.....	8
2.8 Estímulo da germinação de sementes dormentes por sementes não-dormentes	9
2.9 Produção autocatalítica de etileno	9
2.10 Germinação em atmosfera livre de etileno	10
2.11 Germinação de sementes em relação à capacidade de biossíntese de etileno	10
2.12 Efeito dos inibidores da biossíntese do etileno em sementes sob atmosfera livre de etileno	11
2.13 Cinética de fixação do etileno por solução de perclorato e sensibilidade das sementes ao regulador.....	12
2.14 Delineamento experimental	13
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
3.1 Efeito da aplicação e do acúmulo de etileno	14
3.2 Volume dos frascos e número de sementes em relação à germinação das sementes dormentes	17
3.3 Estímulo da germinação de sementes dormentes por sementes	

não- dormentes.....	20
3.4 Produção autocatalítica de etileno	21
3.5 Germinação das sementes em atmosfera livre de etileno	24
3.6 Germinação de sementes em relação à capacidade de biossíntese de etileno	26
3.7 Exclusão e bloqueio da biossíntese de etileno simultâneos.....	29
3.8 Cinética de fixação do etileno por solução de perclorato de mercúrio ...	32
3.9 Sensibilidade das sementes ao etileno	36
4 CONCLUSÕES	39
5 REFERÊNCIAS	40

RESUMO

RIBEIRO, Dimas Mendes, M. S., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro 2003.
Germinação de sementes dormentes de *Stylosanthes humilis* H.B.K. promovida pelo acúmulo de etileno em ambiente fechado. Orientador: Raimundo Santos Barros. Conselheiros: Fernando Luíz Finger e Rolf Puschmann

Sementes dormentes escarificadas de estilósante (*Stylosanthes humilis* HBK), leguminosa tropical forrageira anual, germinaram em ambiente fechado devido ao acúmulo de etileno por elas produzido. O etileno acumulado fez aumentar a germinação e intensificou a sua produção. A adição de etileno à atmosfera interna dos frascos Erlenmeyers selados, às concentrações 0,5 mmol m⁻³ ou menores, promoveu um aumento na produção de etileno, em comparação ao etileno adicionado, caracterizando um efeito autocatalítico do regulador gasoso. A remoção do etileno da atmosfera dos frascos por solução de perclorato de mercúrio levou a diminuição da emissão do regulador gasoso pelas sementes dormentes e não-dormentes e também da germinação. Os inibidores da biossíntese do etileno, 2-aminoeto-xilvilglicina mais Co(NO₃)₂, bloquearam completamente a germinação das sementes dormentes, mas não das não-dormentes, possivelmente devido ao etileno residual produzido por estas. A combinação das duas técnicas, isto é, remoção do etileno da atmosfera dos frascos simultaneamente à embebição das sementes com a solução dos inibidores, promoveu uma inibição completa da produção de etileno por sementes dormentes e não-dormentes e da germinação. Com a Injeção de etileno na atmosfera dos frascos Erlenmeyer, a germinação das sementes não-dormentes foi estimulada sob concentrações bem menores do que as requeridas para a germinação das sementes dormentes, indicando que a sensibilidade ao regulador gasoso foi bem maior nas sementes não-dormentes.

ABSTRACT

RIBEIRO, Dimas Mendes, M. S., Universidade Federal de Viçosa, February 2003.
Germination of dormant seeds of *Stylosanthes humilis* H.B.K. as promoted by ethylene accumulation in closed environment. Adviser: Raimundo Santos Barros. Committee members: Fernando Luíz Finger and Rolf Puschmann

Scarified dormant seeds of Townsville stylo (*Stylosanthes humilis* HBK), an annual tropical forage legume, germinated in closed environments in response to ethylene accumulation. This accumulation, caused an increased germination and also in ethylene production. Injection of ethylene, at concentrations 0.5 mmol m^{-3} or less into sealed Erlenmeyer flasks promoted an ethylene increase in their internal atmospheres, as compared to ethylene injected, demonstrating an autocatalytic production. In an ethylene-free atmosphere obtained with a mercuric perchlorate solution, emanation of the gaseous regulator from dormant and non-dormant seeds was drastically decreased as was also total germination. Germination of dormant seeds, but not of non-dormant ones, was completely blocked by ethylene biosynthesis inhibitors 2-aminoethoxyvinylglycine (AVG) plus $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, likely due to the residual ethylene produced by non-dormant seeds. When both techniques were used, e.g., by removing ethylene from the flask atmosphere and simultaneously imbibing seeds in AVG plus Co^{2+} solution, neither germination of nor ethylene production by dormant and non-dormant seeds occurred. Ethylene injected into this system promoted germination of non-dormant seeds at much lower concentrations than those required for germination of dormant seeds, demonstrating that in non-dormant seeds sensitivity to the gaseous regulator was higher than in dormant seeds.

1 INTRODUÇÃO

Sementes de estilosante (*Stylosanthes humilis* HBK), uma leguminosa tropical forrageira anual, apresentam dois mecanismos reguladores da germinação, a barreira tegumentar e a endodormência. A barreira tegumentar pode ser rompida por altas temperaturas (Holm 1972) e por escarificação mecânica (Burin et al 1987) ou ácida (Araújo et al 2000). A endodormência reduz-se gradualmente com o avanço da idade pós-colheita; aos seis meses de idade, a perda da dormência se acentua e aos 12-15 meses, as sementes germinam completamente (Vieira e Barros 1994). Em sementes recém-colhidas, a endodormência pode ser completa ou parcialmente quebrada pelo ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA, Ethrel), composto liberador de etileno no interior da célula, benziladenina e pelo ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), precursor imediato do etileno em sua rota biossintética (Burin et al 1987, Vieira e Barros 1994, Barros e Delatorre 1998). O etileno, portanto, seria um dos princípios requeridos para a germinação das sementes de estilosante. Isso foi confirmado pela observação de que as maiores taxas de produção de etileno em sementes não-dormentes coincidiu com o aumento da germinação. Além disso, a quebra da dormência das sementes de estiosante pelo ACC foi acompanhada por intensificação na produção de etileno (Pelacani 2001).

O etileno está associado à quebra da dormência de sementes de diversas espécies (van Staden 1973, Adkins e Ross 1981, Whitehead e Sutcliffe 1995, Kpczy ski et al 1996). Contudo, essas informações foram baseadas em testes de germinação conduzidos em sistemas fechados nos quais a atividade metabólica das sementes pode alterar significativamente a concentração de gases como o etileno e CO₂ (Keys et al 1975). Em *Chenopodium album*, Machabée e Saini (1991) observaram um comportamento diferencial na germinação das sementes dormentes confinadas em ambientes fechados, em comparação às sementes embebidas em placas de petri não-seladas. No primeiro caso, a germinação foi muito maior que nas placas; portanto, o estímulo para a germinação seria provocado pelo enclausuramento das sementes. Cardoso e Felipe (1987) também verificaram que a germinação das sementes de maxixe (*Cucumis anguria*), enclausuradas em frascos Erlenmeyer sob luz branca, foi muito maior que nas sementes em placas de

petri. Colocando-se um pequeno recipiente de vidro com solução de perclorato de mercúrio, substância fixadora de etileno, dentro dos frascos, a germinação das sementes do maxixe foi grandemente diminuída para valores próximos aos obtidos em placas de petri. O etileno, então, estaria envolvido no processo de germinação, naquelas condições. Em sementes de alface 'Grand Rapids', tanto a germinação como a produção de etileno aumentaram significativamente em sementes confinadas em frascos selados. Por outro lado, mantendo-se as sementes sob um sistema aberto de fluxo contínuo de ar, Negm et al (1972) observaram uma redução tanto da germinação, como da produção de etileno, sugerindo que o confinamento alterou a atividade metabólica daquelas sementes. Em condições de laboratório, tem-se também observado que o confinamento de sementes dormentes de estilosante embebidas promove um aumento significativo na germinação. Por seu turno, a germinação das sementes em placas de petri ou em frascos Erlenmeyer abertos mostra-se muito pequena ou nula. Como em todos esses casos o etileno foi naturalmente requerido para a quebra da dormência, o seu acúmulo em ambientes fechados poderia estar promovendo a germinação, hipótese que, ainda hoje, carece de quantificação. Em condições de ambiente fechado, a 2-aminoeto-xivinilglicina (AVG), um dos inibidores da biossíntese do etileno, tem falhado em bloquear completamente a germinação das sementes não-dormentes de *Arachis hypogea* (Hoffman et al 1983), *Amaranthus caudatus* (K pczy ski e Karssen 1985), *Chenopodium album* (Machabée e Saini 1991) e *Stylosanthes humilis* (Pelacani 2001). Portanto, torna-se difícil correlacionar o requerimento do etileno com o processo de germinação, sob condições de enclausuramento.

Em condições naturais, o etileno requerido para a quebra da dormência das sementes poderia provir do seu acúmulo no solo, resultante da atividade microbiana, ou ser biossintetizado pela própria semente (Egley 1980, Schonbeck e Egley 1981). Assim, uma possível explicação para a germinação das sementes dormentes em ambientes fechados seria que, dentro da população de sementes dormentes, algumas exibiriam uma pequena capacidade de biossintetizar etileno (Pelacani 2001); o acúmulo do gás nessas condições promoveria a germinação. O etileno acumulado na atmosfera dos frascos poderia ainda catalisar a sua própria biossíntese em outras sementes, resultando num efeito amplificado. Até o presente, ainda não se determinou o efeito do acúmulo de etileno dessa natureza na

germinação de sementes dormentes e, principalmente, as conseqüências sobre uma possível autocatálise, em ambiente fechado. Em frutos climatéricos mantidos em ambientes fechados, por exemplo, o fato é bastante comum; apenas um único fruto em amadurecimento é capaz de promover um efeito em cascata, levando ao amadurecimento de outros frutos, o que tem resultado em prejuízos consideráveis (Risse e Hatton 1982). Yang (1985) e Sitrit et al (1986) verificaram que a exaustão do ar de dentro das câmaras, nas quais os frutos climatéricos estavam confinados, levava a uma diminuição no amadurecimento dos frutos, sugerindo que o acúmulo do etileno seria responsável pela intensificação do amadurecimento. Portanto, é possível que o etileno emanado pelas próprias sementes de estilosante e de outras espécies mencionadas e acumulado na atmosfera de ambientes confinados intensifique a germinação das sementes.

Pelacani (2001) observou que a eficácia dos inibidores da biossíntese do etileno, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ e AVG, sobre a germinação das sementes não-dormentes de estilosante foi menor em frascos Erlenmeyer vedados do que em placa de petri, devido, provavelmente, também, ao acúmulo de etileno. Isso indica que a germinação das sementes enclausuradas seria pouco afetada pelos inibidores da biossíntese do etileno, em comparação à germinação das sementes em ambientes abertos. Gallardo et al (1994) observaram que a AVG não afetou a germinação das sementes não-dormentes de *Circer arietinum* mantidas em caixas plásticas. Os autores propuseram que um mínimo de etileno por ventura biossintetizado pelas sementes seria suficiente para promover a germinação das sementes não-dormentes

Vieira e Barros (1994) observaram um incremento na resposta das sementes de estilosante ao Ethrel com o avanço da idade pós-colheita das sementes. Os autores sugeriram que a sensibilidade das sementes ao regulador aumentou ao longo do período de armazenamento pós-colheita. Esashi et al (1978) verificaram que uma das causas da dormência fisiológica das sementes de *Xanthium pennsylvanicum* seria a baixa sensibilidade dos tecidos internos das sementes ao etileno. A capacidade de resposta das sementes de estilosante ao etileno talvez, então, exerça um papel controlador na quebra da dormência. Assim, não só a capacidade de biossíntese, mas também a sensibilidade (conforme definição de Trewavas 1981, 1982) das sementes ao etileno estariam associadas à germinação.

A investigação do papel desses dois fatores, capacidade biossíntese e sensibilidade, na germinação de sementes em ambientes confinados seria bastante interessante, pois o sistema é simples, o etileno seria acumulado e poder-se-ia inferir sobre a sensibilidade de sementes dormentes e não-dormentes em condições em que os dois tipos de semente exibiriam um metabolismo supostamente diferente (Machabeé e Saini 1991).

Este trabalho objetivou quantificar as relações entre o etileno emanado por sementes dormentes de *Stylosanthes humilis* e acumulado na atmosfera de ambientes fechados com a sua germinação. Propôs-se, ainda a examinar um possível efeito autocatalítico do etileno acumulado naquelas condições. O papel relativo da capacidade das sementes em biossintetizar o etileno e da sua sensibilidade ao regulador gasoso no processo de germinação foi também estudado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas sementes de estilósante obtidas de plantas cultivadas continuamente em vasos plásticos de 3,0 dm³, em casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (20° 45' S, 42° 15' W), Minas Gerais. O substrato era composto de duas partes de solo e uma parte de esterco bovino curtido e recebia adubação de cobertura de, aproximadamente, 15 g por vaso de NPK (25-5-20), parcelada em duas aplicações, durante o estado vegetativo das plantas. A irrigação era feita de maneira a manter-se a umidade do solo dos vasos próxima à capacidade de campo. Os frutos produzidos eram colhidos periodicamente e armazenados em sacos de papel, em condições de laboratório. Em razão de a espécie comportar-se como planta de dia-curto (Cameron e 'tMannetje 1976), nos meses do ano com dias mais longos (dezembro a março), as plantas eram cobertas com uma empanada preta, reduzindo-se o período luminoso para 8 h diárias, para promoção da floração.

2.2 Condução dos experimentos

Os frutos eram debulhados por fricção entre duas superfícies emborrachadas. As sementes assim obtidas eram escarificadas por meio de leve fricção em lixas finas (lixas d' água nº 150) e submetidas a uma semi-esterilização, por imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,5%, por 10 min, e lavadas exaustivamente com água destilada. Em seguida, as sementes eram enxugadas com papel absorvente e transferidas para placas de petri de vidro (90 mm de diâmetro) ou para frascos Erlemneyer de 10 a 125 cm³ de capacidade, contendo, ao fundo, duas camadas de papel filtro Whatman nº 1. As placas e os frascos, juntamente com o papel filtro, eram previamente semi-esterilizados em estufa, a 105 °C, por 4 h. As placas de petri, com 50 sementes, recebiam 10 cm³ da solução de germinação (HCl-KOH 10 mol m⁻³, pH 7,0) ou das soluções de ACC (níveis entre 0,001 a 1,0 mol m⁻³) ou AVG (0,1 mol m⁻³) mais Co(NO₃)₂ (1,0 mol m⁻³). Os frascos Erlemneyer, com 10 a 100 sementes, recebiam de 1,0 a 4,0 cm³ das soluções e eram vedados com seladores de borracha. O conjunto era mantido no escuro em câmaras de crescimento

noite/dia, de temperatura controlada (Forma Scientific, Inc., Ohio, USA), a 30 °C, por um período de quatro a cinco dias. Em todos os experimentos, a germinação era registrada diariamente, sendo a protrusão da radícula ($\pm 3,0$ mm de comprimento) o critério adotado para considerar-se uma semente germinada.

2.3 Manipulação do etileno

O etileno utilizado nos experimentos era produzido colocando-se 4,0 cm³ de solução de KOH 25% ao fundo de um frasco de vidro de aproximadamente 2,0 dm³, hermeticamente fechado. Através de um selador de borracha adaptado na tampa do frasco era injetado 1,0 cm³ de Ethrel (1,84 kmol m⁻³). O frasco era mantido em estufa a 75 °C por, no mínimo, 15 min, para que a reação entre o Ethrel e a solução de KOH se processasse (Abeles et al 1992). Em seguida, injetava-se nitrogênio gasoso na atmosfera do frasco, para que a pressão criada no interior do frasco facilitasse a retirada das amostras. A atmosfera do frasco era homogeneizada por agitação magnética. O etileno (quantificado por cromatografia a gás, ver abaixo) coletado do frasco era injetado nos frascos Erlemneyer através dos seladores de borracha com uma seringa plástica, vedada ao ar.

Para produzir-se uma atmosfera livre de etileno no interior dos frascos de 50 cm³, uma tampa semi-flexível de polipropileno (26,0 mm de diâmetro e 6,0 mm de altura), invertida, forrada com três camadas de papel filtro, era inserida nos frascos sobre o forro de papel de filtro e recebia solução de perclorato de mercúrio 250 mol m⁻³ (0,3 a 1,0 cm³), sendo as sementes distribuídas ao seu redor (figura 1). O etileno fixado pela solução de perclorato era quantificado por cromatografia a gás, após sua liberação, pela aplicação de igual volume de solução de NaCl 4,0 kmol m⁻³ (Abeles 1973).

A atmosfera dos frascos Erlenmeyer era homogeneizada, ocasionalmente, por meio de bombeamento do ar interno com uma seringa com agulha longa perfurando o selador. Para estimar-se a quantidade de etileno dentro dos frascos, seu volume livre era obtido pela diferença entre a sua capacidade total e do conjunto de volumes do papel filtro, do selador de borracha, da solução-teste, da solução de perclorato e da tampa de polipropileno.



Figura 1. Sistema usado para produzir-se uma atmosfera livre de etileno. As sementes distribuídas ao redor da tampa de polipropileno invertida eram embebidas em solução de germinação. O efeito combinado da atmosfera livre de etileno e dos inibidores da biossíntese era obtido substituindo-se o meio de germinação por solução de AVG mais Co^{2+} . Os frascos permaneciam abertos por 24 h e, em seguida, eram selados

2.4 Quantificação do etileno

O etileno era quantificado segundo metodologia descrita por Saltveit e Yang (1987). Em todos os experimentos, eram coletadas amostras de $1,0 \text{ cm}^3$ da atmosfera livre dos frascos Erlenmeyer, com auxílio de uma seringa vedada ao ar, de $1,0 \text{ cm}^3$ de volume livre (agulhas 29 G1/2"). Em experimentos a serem continuados, a pressão no interior dos recipientes era equilibrada pela injeção de igual volume de ar, após cada retirada das amostra das atmosfera dos frascos. As amostras eram injetadas em um 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 era o dinitrogênio, em fluxo de $30 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$; os fluxos do hidrogênio e do ar sintético (22% O_2 em N_2) eram mantidos em 30 e $320 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, respectivamente. As temperaturas da coluna, do injetor e do detetor eram mantidas em 60, 110 e 150°C .

A determinação do etileno era feita comparando-se as áreas das amostras obtidas em integrador HP 3395 A com áreas de picos de uma mistura padrão de etileno de concentração conhecida.

2.5 Quebra da dormência das sementes com etileno

Para investigarem-se os efeitos do etileno na quebra da dormência das sementes, o gás, às concentrações 0 a $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$, era injetado na atmosfera dos frascos selados de 25 cm^3 de capacidade, contendo 25 sementes dormentes embebidas no meio de germinação. A germinação era acompanhada até o quinto dia.

2.6 Germinação de sementes dormentes em relação ao acúmulo de etileno

Uma relação entre a produção de etileno por sementes dormentes e o tempo de acúmulo com sua possível germinação foi investigada, mantendo-se os frascos Erlenmeyer selados por tempo variável de 0 a 120 h, após o início da embebição das sementes na solução de germinação. Após cada tempo de enclausuramento, o etileno acumulado na atmosfera dos frascos era quantificado. Em seguida, os frascos eram abertos e, juntamente com os frascos do controle (permanentemente abertos) e todos os demais frascos em que o tempo de enclausuramento já transcorreria anteriormente, tinham o ar exaurido por ventilação e exaustão forçadas em capela, por 10 min. Os frascos de 25 cm^3 de capacidade e as placas de petri receberam 2,0 e $10,0 \text{ cm}^3$ de solução de germinação. As sementes germinadas, de um total de 25 por frasco e de 50 por placa de petri, eram contadas diariamente até o quinto dia do ensaio.

2.7 Volume dos frascos e número de sementes em relação à germinação de sementes dormentes

Para avaliar-se se o etileno emanado a partir das sementes dormentes afetaria o estado de dormência de outras sementes, isto é, se o efeito seria amplificado, foram conduzidos ensaios, fixando-se um número constante de 50 sementes em frascos Erlenmeyer vedados de capacidade entre 10 e 125 cm^3 . Os frascos receberam entre 1,0 e $4,0 \text{ cm}^3$ do meio de germinação, a depender de sua capacidade.

Em complementação ao ensaio acima, sementes dormentes, em número entre 10 e 100, foram mantidas em frascos Erlenmeyer vedados de 50 cm³ de capacidade, contendo 3,0 cm³ do meio de germinação.

Em todos os ensaios relativos a esta secção, o etileno acumulado nas atmosferas dos frascos selados era quantificado no quarto dia de embebição das sementes, sendo a germinação acompanhada até o final do experimento.

2.8 Estímulo da germinação de sementes dormentes por sementes não-dormentes

Buscando-se investigar se sementes não-dormentes em germinação afetariam a germinação de sementes dormentes, via acúmulo de etileno, as tampas de polipropileno, forradas com duas camadas de papel de filtro, foram inseridas dentro dos frascos Erlenmeyers de 50 cm³ de capacidade e recebiam 25 sementes dormentes e 1,0 cm³ da solução de germinação. Ao redor das tampas foram distribuídas sementes não-dormentes, em número entre 10 e 100, embebidas em 3,0 cm³ do meio de germinação. No quarto dia do curso do experimento, o etileno acumulado na atmosfera dos frascos foi quantificado, sendo a germinação registrada diariamente até aquele dia.

2.9 Produção autocatalítica de etileno

Para investigar-se a capacidade do etileno em regular a sua própria biossíntese em sementes de estilosante, 25 sementes dormentes foram embebidas em 2,0 cm³ da solução de germinação em frascos Erlenmeyer fechados de 25 cm³. Outro grupo de frascos Erlenmeyer de mesmo volume recebeu um número idêntico de sementes dormentes, que se encontravam embebidas em solução de AVG mais Co²⁺. Após 24 h de embebição, o ar dentro dos frascos foi exaurido por ventilação e exaustão forçadas, em capela, por 10 min. Em seguida, os frascos foram selados e o etileno, às concentrações entre 0 e 5.10⁻³ mol m⁻³, foi injetado na sua atmosfera. O etileno na atmosfera dos frascos foi quantificado no quinto dia após embebição das sementes, sendo a germinação registrada diariamente.

A capacidade do etileno em regular a sua própria biossíntese nas sementes foi inferida subtraindo-se os níveis de etileno quantificado ao final do experimento

dos níveis de etileno injetado, ao início do ensaio, na atmosfera dos frascos que receberam a solução de germinação ou a solução de AVG mais Co^{2+} .

2.10 Germinação em atmosfera livre de etileno

A resposta de sementes de estílosante à atmosfera sem etileno foi avaliada por meio da remoção do regulador nos frascos selados pela solução de perclorato de mercúrio. A solução ($1,0 \text{ cm}^3$) era colocada em tampas de polipropileno inseridas dentro dos frascos Erlenmeyer de 50 cm^3 de capacidade (figura 1). Cinquenta sementes dormentes e não-dormentes em frascos distintos foram distribuídas ao redor das tampas. No quarto dia de ensaio, o etileno fixado pela solução de perclorato foi liberado, injetando-se solução de NaCl sobre a solução de perclorato, ocasião em que a germinação foi avaliada. O etileno por ventura acumulado na atmosfera dos frascos foi quantificado antes (sempre zero) e logo após a adição de solução de NaCl.

Para investigar-se se o etileno fixado pela solução de perclorato, durante a germinação das sementes, seria capaz de estimular a germinação posterior das sementes, as tampas de polipropileno inseridas dentro de frascos Erlenmeyer de 50 cm^3 de capacidade receberam $0,75 \text{ cm}^3$ do meio de germinação (controle) ou da solução de perclorato de mercúrio. Durante o curso do experimento (terceiro dia), foram adicionados às tampas mais $0,75 \text{ cm}^3$ do meio de germinação ou de solução de perclorato ou de NaCl, através dos septos de borracha, utilizando-se, no processo, de uma seringa com agulha longa. O etileno acumulado na atmosfera dos frascos foi quantificado no quinto dia após embebição das sementes. A germinação foi registrada diariamente até o término do experimento.

2.11 Germinação de sementes em relação à capacidade de biossíntese de etileno

Para buscar-se uma possível relação entre a quebra da dormência e a capacidade de biossíntese de etileno, 25 sementes dormentes foram dispostas em tampas de polipropileno contendo duas camadas de papel filtro e $1,0 \text{ cm}^3$ do meio de germinação. Outras 25 sementes dormentes foram distribuídas ao redor das tampas inseridas dentro dos frascos Erlenmeyer de 50 cm^3 de capacidade e estavam embebidas em $3,0 \text{ cm}^3$ da solução de ACC, às concentrações entre 0 e $1,0 \text{ mol m}^{-3}$.

Numa tentativa de comprovarem-se os resultados obtidos no ensaio acima, 25 sementes dormentes foram colocadas nas tampas de polipropileno inseridas dentro dos frascos Erlenmeyer de 50 cm³ de capacidade e receberam 1,0 cm³ da solução de ACC, em níveis crescentes. Outras 25 sementes dormentes distribuídas ao redor das tampas estavam embebidas apenas na solução de germinação (3,0 cm³).

Em complementação aos ensaios anteriores, 25 sementes dormentes foram colocadas nas tampas de polipropileno inseridas dentro dos frascos de 50 cm³ de capacidade e receberam 1,0 cm³ da solução controle ou da solução de ACC (1,0 mol m⁻³). As outras 25 sementes dormentes, distribuídas ao redor das tampas, estavam embebidas na solução de germinação (3,0 cm³) ou em solução de AVG mais Co²⁺.

Em todos os experimentos referentes à capacidade de biossíntese, a germinação foi avaliada até o quarto dia após o selamento dos frascos, ocasião em que o etileno acumulado na atmosfera dos frascos vedados foi também quantificado.

Confrontando-se a germinação das sementes colocadas dentro das tampas com a germinação das sementes distribuídas ao seu redor, nos diversos tratamentos com e sem os inibidores da germinação, foi possível inferir-se sobre a relação entre a quebra da dormência e a capacidade de biossíntese de etileno.

2.12 Efeito dos inibidores da biossíntese do etileno em sementes mantidas sob atmosfera livre de etileno

Estudou-se, também, o efeito simultâneo da remoção do regulador gasoso da atmosfera dos frascos Erlenmeyer e do bloqueio da biossíntese do etileno na germinação e na produção de etileno pelas sementes dormentes e não-dormentes. Cinquenta sementes dormentes e não-dormentes, em frascos diferentes, foram embebidas, por um período de 24 h, em 3,0 cm³ da solução de germinação (controle) ou em solução de AVG mais Co²⁺, para permitir que os inibidores atingissem os tecidos-alvo antes da aplicação de qualquer outro tratamento. Em seguida, tampas de polipropileno já inseridas dentro de frascos Erlenmeyer de 50 cm³ de capacidade receberam 1,0 cm³ de solução de perclorato de mercúrio ou de solução de germinação e os frascos foram imediatamente selados (figura 1). A germinação e a produção de etileno (quantificado logo após a adição de NaCl sobre

a solução de perclorato) pelas sementes foram analisados no quinto dia após selamento dos frascos.

2.13 Cinética de fixação do etileno por solução de perclorato e sensibilidade das sementes ao regulador

Para determinar-se o curso da remoção do etileno pela solução de perclorato de mercúrio, as tampas de polipropileno foram inseridas dentro de frascos Erlenmeyer de 50 cm³ de capacidade e recebiam 0,3 cm³ de solução de perclorato. Cinquenta sementes dormentes e não-dormentes embebidas em solução de AVG mais Co²⁺, em frascos diferentes, foram distribuídas ao redor das tampas. No tratamento-controle, os frascos Erlenmeyer receberam solução de AVG mais Co²⁺, sem quaisquer sementes ao redor das tampas de polipropileno. Etileno, à concentração de 5.10⁻³ mol m⁻³, foi injetado nos frascos 24 h após o selamento. O etileno da atmosfera dos frascos foi quantificado a diversos intervalos de tempo, após a adição do gás.

Da curva de fixação de etileno pela solução de perclorato de mercúrio foram estimados os níveis do gás na atmosfera dos frascos ao longo do tempo. Esse ensaio também deu suporte à determinação da sensibilidade ao etileno em sementes dormentes e não-dormentes.

Para determinar-se a intensidade de resposta ao etileno, sementes dormentes e não-dormentes foram embebidas em solução de AVG mais Co²⁺. Após 24 h de embebição das sementes na solução inibidora, tampas de polipropileno inseridas dentro dos frascos Erlenmeyer de 50 cm³ de capacidade receberam 0,3 cm³ de solução de perclorato de mercúrio (figura 1). Em seguida, os frascos foram selados e o etileno, às concentrações entre 0 a 5.10⁻³ mol m⁻³, foi injetado na atmosfera interna deles. A quantificação do regulador gasoso na atmosfera dos frascos Erlenmeyer foi feita no quinto dia após o início da embebição das sementes, sendo a germinação acompanhada ao longo de todo experimento. Adotando-se o nível limiar de etileno necessário para eliciar a germinação das sementes dormentes e não-dormentes (Firn 1986), tentou-se avaliar qual grupo de sementes apresentou maior sensibilidade ao regulador.

2.14 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado nos experimentos sobre a germinação de sementes, sobre os efeitos do etileno e sobre a produção do gás pelas sementes foi inteiramente casualizado. A unidade experimental era composta por um número variado de sementes (dependendo do ensaio), com cinco repetições por tratamento. Os resultados de porcentagem de germinação eram transformados em arco-seno ($\% G/100$)^{1/2}, para que seguissem uma distribuição normal. As diferenças entre médias de germinação foram avaliadas pelo teste de Scott e Knott (1974), em nível de 5% de significância. No caso de comparação entre duas médias, foram empregados os teste *F* e *t*, também em nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da aplicação e do acúmulo de etileno na quebra da dormência

Observou-se um aumento progressivo da germinação das sementes dormentes de estilosante com o incremento nos níveis de etileno adicionado, implicando em um requerimento etilênico na quebra da dormência de sementes de estilosante (figura 2). A quebra da dormência fisiológica por etileno foi também observada por Egley (1980), em sementes de *Xanthium pennsylvanicum*, por Machabée e Saini (1991), em sementes de *Chenopodium album*, por Whitehead e Sutcliff (1995), em sementes *Cyclopia intermedia* e por Kpczy ski et al (1996), em sementes de *Amaranthus retroflexus*. O modo de ação do etileno na quebra da dormência e sobre o controle da germinação de sementes ainda é pouco conhecido. Abeles (1986) sugeriu que em sementes dormentes de alface 'Grand Rapids', o etileno estimularia a expansão radial das células do hipocótilo, facilitando, assim, o crescimento do embrião. A regulação da respiração e da absorção de água pelas sementes também têm sido consideradas (Esashi et al 1990, Kpczy ski e Karssen 1985). Hasegawa et al (1995) acreditam que o etileno atuaria estimulando a atividade da sintase da -cianoalanina, que converte HCN para -cianoalanina e que estaria envolvida na regulação da quebra da dormência e na germinação das sementes de *Xanthium pennsylvanicum*. Pode-se notar, que as informações sobre o modo de ação do etileno na quebra da dormência e sobre a germinação de sementes são muito fragmentadas e, em contraste a outros processos fisiológicos, a regulação da expressão de genes por etileno durante a germinação não tem sido suficientemente investigada.

Desde que as sementes dormentes de estilosante germinaram em resposta ao etileno (figura 2) e sabendo-se que algumas de suas sementes dormentes produzem o regulador gasoso (Pelacani 2001), é possível que o etileno produzido por elas, acumulando-se em ambientes fechados, leve à quebra da dormência. Uma relação positiva entre a produção de etileno e germinação de sementes dormentes foi observada aumentando-se o período de selamento dos frascos Erlenmeyer (tabela 1). Uma vez que a germinação em placas de petri ou em frascos abertos foi

nula, tanto o aumento da germinação como da produção de etileno foram resultados do enclausuramento das sementes.

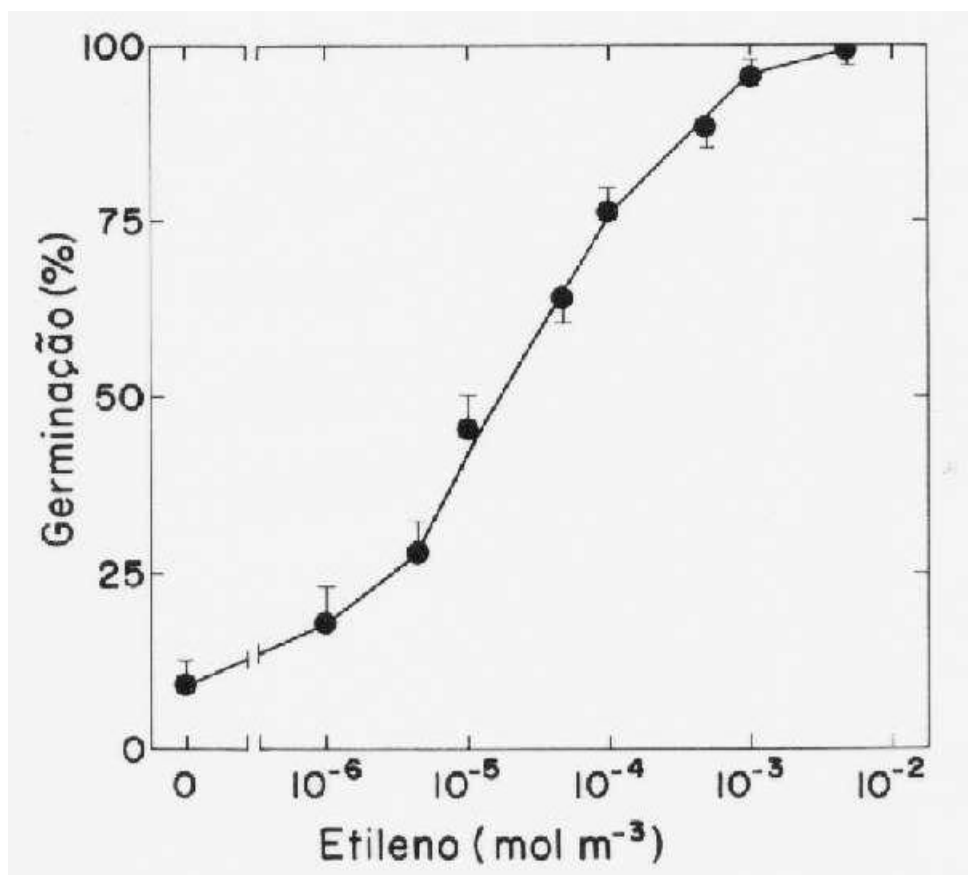


Figura 2. Resposta das sementes dormentes (92 dias de idade pós-colheita) ao etileno. A germinação das sementes foi registrada diariamente até o quinto dia. As barras representam o erro padrão da média. A relação entre a germinação e os níveis de etileno foi descrita pela equação $y = 1,7x^3 - 24,5x^2 + 86,5x + 9,6$; $r^2 = 0,99$

Observa-se também, na tabela 1, que a partir de 72 h de enclausuramento das sementes dormentes, ocorreu uma estabilização na produção de etileno e na germinação das sementes, que se manteve em torno de 20%. De fato, a atividade metabólica dos tecidos das sementes dormentes em ambiente fechado pode levar a mudanças na concentração de etileno na atmosfera dos frascos (Saini et al 1989, Machabée e Saini 1991). A porcentagem de germinação relativamente baixa das sementes dormentes confinadas em ambiente fechado (máximo, em torno de 30%) parece ter sido imposta pela baixa capacidade de biossíntese de etileno pelas

sementes (tabela 1, ver também Figuras 3 e 4). Isto foi suportado, em parte, pelo fato de que o confinamento de sementes dormentes em conjunto com sementes não-dormentes aumentou a germinação das dormentes além dos 30%, como resultado do aumento da concentração de etileno (ver figura 5). Além disto, o ACC aumentou significativamente a germinação das sementes dormentes (ver tabelas 5, 6 e 7). Portanto, a resposta das sementes dormentes ao etileno, naturalmente emanado e acumulado na atmosfera dos frascos, indica que cada semente dentro de um mesmo lote requer um nível limiar do regulador gasoso para quebrar a dormência, abaixo do qual, a germinação não ocorre. Como as sementes dormentes parecem ter uma baixa capacidade de biossintetizar etileno, a germinação das sementes dormentes, em ambiente fechado, não alcançou 100%, como pode ocorrer com frutos climatéricos (Yang e Hoffman 1984).

Tabela 1. Efeito do período de selamento dos frascos sobre a germinação de sementes dormentes (42 dias de idade pós-colheita) e sobre o acúmulo de etileno nas suas atmosferas internas

Período de selamento (h)	Germinação (%)	Etileno (nmol frasco ⁻¹)
Placa de petri	0,0 -	-
0 (frascos abertos)	0,0 d	0,0 c
12	0,0 d	0,0 c
24	4,0 ± 1,7 c	0,09 ± 0,02 b
48	10,4 ± 1,6 b	0,49 ± 0,14 b
72	19,2 ± 2,3 a	1,21 ± 0,20 a
96	20,0 ± 2,1 a	1,24 ± 0,13 a
120	21,6 ± 2,0 a	1,27 ± 0,15 a

- Não determinado. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade. A germinação foi registrada até o quinto dia

Em frutos climatéricos mantidos em ambientes fechados é bastante comum o fato de o etileno emanado por alguns deles em amadurecimento estimular o

amadurecimento de outros frutos, promovendo, também, um incremento significativo na produção de etileno. Yang (1985) e Sitrit et al (1986) observaram redução no amadurecimento dos frutos climatéricos com a exaustão do ar de dentro das câmaras, indicando que o etileno emanado, acumulando-se na atmosfera das câmaras seria responsável pela intensificação do amadurecimento. Portanto, o fato de o etileno emanado por frutos climatéricos, acumulando-se em ambientes fechados, estimular o amadurecimento dos frutos vicinais não é novo. Mas, em sementes, esse fenômeno não tem sido devidamente examinado.

3.2 Volume dos frascos e número de sementes em relação à germinação das sementes dormentes

Numa tentativa de concentrar-se o etileno emanado das sementes e, assim, examinar-se uma possível relação entre a produção de etileno e a quebra da dormência, inseriu-se um número constante de 50 sementes em frascos de volumes decrescentes e também aumentou-se o número de sementes dormentes em frascos de 50 cm³ de capacidade. A redução no volume dos frascos contendo o mesmo número de sementes promoveu um aumento na germinação e na quantidade de etileno emanado pelas sementes (figura 3). A germinação e o acúmulo de etileno foi muito maior nos frascos de menor volume empregado. Então, o acúmulo do regulador gasoso na atmosfera dos frascos selados estimulou a germinação das sementes vicinais, promovendo também um incremento na produção de etileno. Isso contribui para reforçar a sugestão de Saini et al (1986) de que a atividade metabólica das sementes de alface termoinibidas seria suficiente para modificar a concentração de etileno na atmosfera dos frascos selados, levando a um incremento na germinação.

Em frutos climatéricos, não só o fato de o etileno emanado dos frutos maduros estimular o amadurecimento de outros frutos, em ambientes fechados, mas também o mecanismo de como o etileno elicia o fenômeno tem sido bem caracterizado. Gray et al (1992) observaram que o estímulo do etileno ao amadurecimento dos frutos ocorre pela coordenação na expressão de genes que são responsáveis por uma variedade de processos, incluindo-se a intensificação na taxa de respiração, a produção autocatalítica de etileno, a degradação de clorofila, a

conversão de amido para açúcar e o aumento na atividade de enzimas de degradação da parede celular.

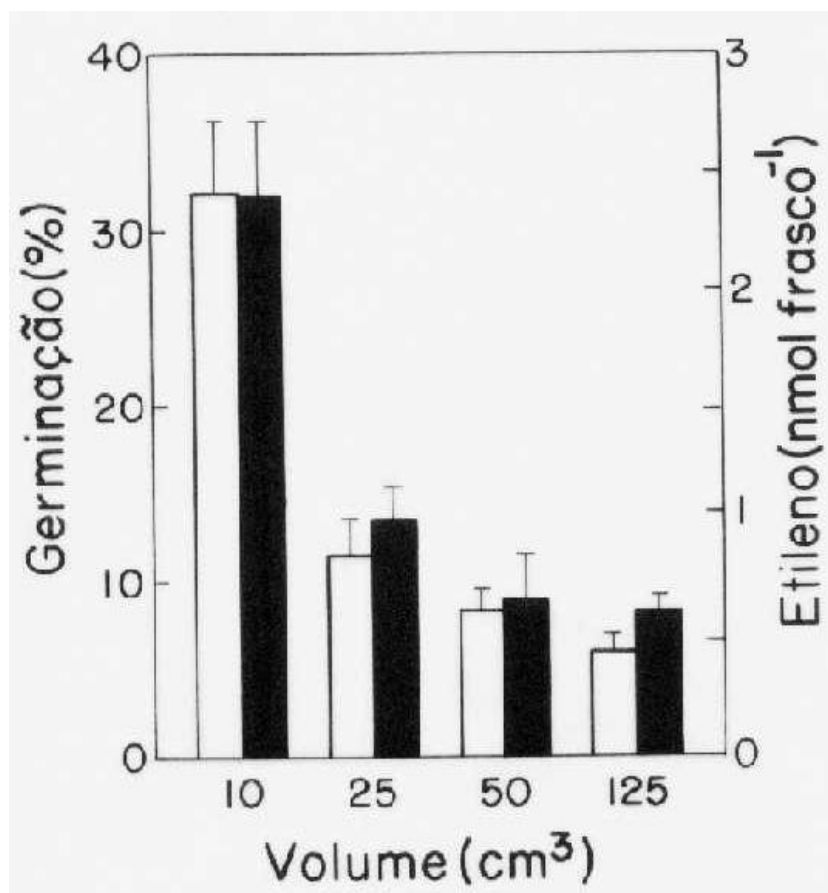


Figura 3. Efeito do tamanho dos frascos sobre a germinação e produção de etileno pelas sementes dormentes (17 dias de idade pós-colheita). O etileno () acumulado na atmosfera dos frascos foi quantificado no quarto dia de embebição das sementes, sendo a germinação () acompanhada até o final do experimento. As barras representam o erro padrão da média

A proporção de sementes germinadas e a quantidade absoluta de etileno emanado por cada semente aumentaram com o aumento no número de sementes enclausuradas (figura 4). Então, o etileno emanado pelas sementes dormentes, acumulando-se na atmosfera dos frascos, estimulou a sua própria biossíntese em outras sementes, resultando em um efeito amplificado na germinação.

A atmosfera dos solos pode conter etileno, resultante da atividade microbiana, em nível acima do limiar para eliciar a germinação das sementes dormentes (Egley 1980, Schonbeck e Egley 1981).

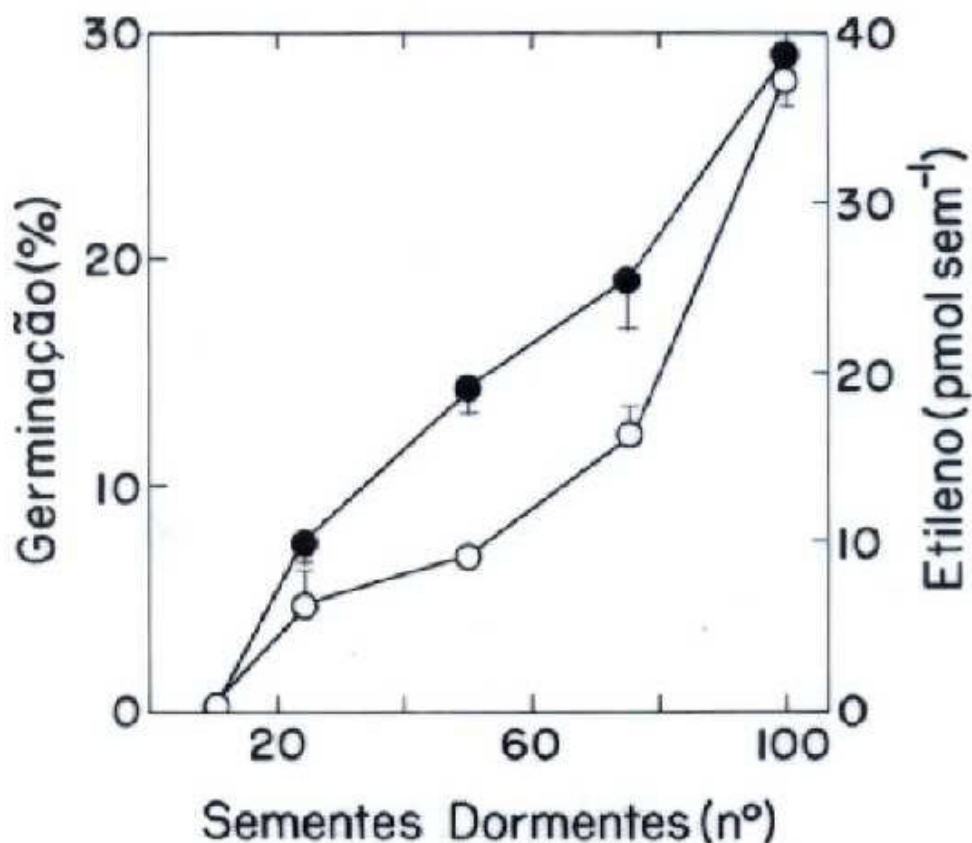


Figura 4. Efeito do número de sementes dormentes (12 dias de idade pós-colheita) sobre a sua própria germinação e sobre a produção de etileno. O etileno (●) acumulado na atmosfera dos frascos foi quantificado no quarto dia de embebição das sementes, sendo a germinação (○) acompanhada até o final do experimento. As barras representam o erro padrão da média

Nas figuras 3 e 4, observa-se que o acúmulo de etileno e a quantidade absoluta do regulador na atmosfera dos frascos selados aumentaram com o incremento na germinação. Portanto, o etileno emanado por algumas sementes dormentes parece ter intensificado a sua própria síntese em outras sementes de uma maneira autocatalítica. A capacidade do etileno em regular a sua própria biossíntese tem sido muito bem estudada em frutos climatéricos e em flores (Yang e

Hoffman1984, Jiang 1994), porém em sementes, o fato tem sido muito pouco explorado.

3.3 Estímulo da germinação de sementes dormentes por sementes não-dormentes

Para examinar-se se as sementes não-dormentes em germinação afetaria a germinação das sementes dormentes, via acúmulo de etileno, manteve-se constante o número de sementes dormentes nas tampas de polipropileno dentro dos frascos e variou-se o número de sementes não-dormentes ao redor das tampas. Observou-se que quanto maior o número de sementes não-dormentes maior a germinação das sementes dormentes e a quantidade total de etileno acumulado na atmosfera dos frascos (figura 5).

A germinação das sementes não-dormentes se manteve em torno de 80%, enquanto nas dormentes a germinação aumentou em paralelo com aumento na quantidade total de etileno acumulado nos frascos, resultante do maior número de sementes não-dormentes germinadas. Uma vez que o meio de germinação das sementes dormentes e não-dormentes era separado por uma barreira física (tampa de polipropileno), apenas um princípio emanado pelas sementes não-dormentes e difundindo-se pela atmosfera do frasco poderia ter afetado a germinação das sementes dormentes. Saini et al (1989) e Machabée e Saini (1991) sugeriram que o etileno emanado de sementes dormentes poderia alterar a concentração do regulador na atmosfera do ambiente de confinamento aumentando a germinação das sementes. Em ambiente fechado também foi observado um incremento na germinação de sementes dormentes de estilosante que alcançou um limite máximo de germinação em torno de 30% (tabela 1, figuras 3 e 4). Por outro lado, quando 25 sementes dormentes foram confinadas, em ambiente fechado, junto com 100 sementes não-dormentes, a germinação das dormentes aumentou significativamente alcançando um limite máximo de 48%, como resultado do maior acúmulo de etileno. Parece, então, que as sementes dormentes possuem uma baixa capacidade de biossintetizar etileno.

Nota-se também na figura 5 que sob o mesmo nível de etileno a germinação das sementes não-dormentes foi sempre maior que nas dormentes, especialmente sob as baixas concentrações. Sugere-se, então, que as sementes não-dormentes

são bem mais sensíveis ao etileno do que as sementes dormentes. As causas da dormência das sementes de estilosante podem, então, estar ligadas não só à baixa capacidade de biossíntese do regulador mas também à baixa sensibilidade das sementes ao etileno.

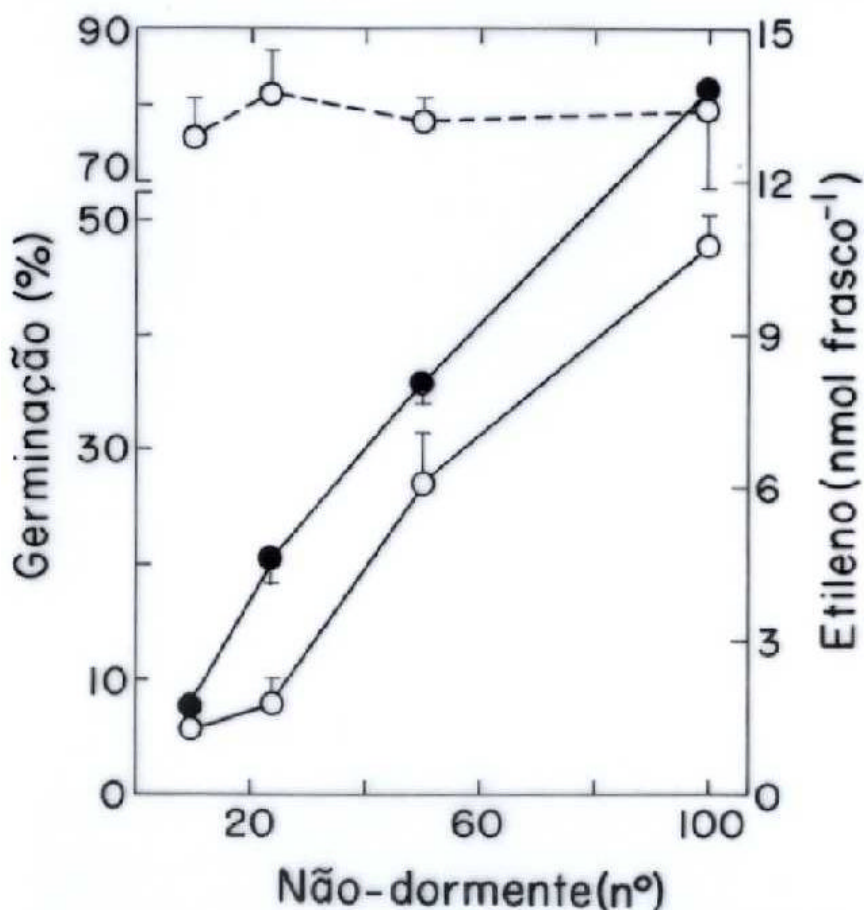


Figura 5. Efeito do número de sementes não-dormentes (287 dias de idade pos-colheita) sobre a germinação das sementes dormentes (7 dias de idade pós-colheita). A germinação das sementes dormentes (—○—) e não-dormentes (- -○- -) foi registrada diariamente até o quarto dia. O etileno acumulado na atmosfera dos frascos (—●—) foi quantificado ao final do ensaio. As barras representam o erro padrão da média

3.4 Produção autocatalítica de etileno

A germinação das sementes dormentes escarificadas de estilosante foi intensificada quando confinadas em ambiente fechado (tabela 1). Por seu turno, a

germinação das sementes em placas de petri ou em frascos Erlenmeyer abertos mostrou-se muito pequena ou nula. O estímulo para a germinação das sementes de estilosante foi provocado pelo acúmulo de etileno na atmosfera do ambiente de confinamento. Isso também foi observado com sementes dormentes de *Chenopodium album*, por Machabée e Saini (1991), que atribuíram o acúmulo de etileno ao metabolismo das sementes. Portanto, sementes dormentes de estilosante germinando em frascos Erlenmeyer selados produziram etileno que, sob acumulação fez aumentar a germinação e intensificou a produção de etileno. Esse efeito autocatalítico de produção de etileno foi observado aumentando-se o número de sementes embebidas no interior dos frascos de mesmo volume (figura 3) ou diminuindo-se o tamanho dos frascos, mantendo-se constante o número de sementes embebidas (figura 4) e também pela remoção do etileno da atmosfera dos frascos por solução de perclorato de mercúrio (ver tabelas 3 e 4). Para examinar-se a capacidade do etileno em regular a sua própria biossíntese em sementes dormentes de estilosante, etileno em níveis crescentes foi injetado na atmosfera dos frascos Erlenmeyer nos quais as sementes estavam embebidas em solução de germinação (HCl-KOH, pH 7,0), ou em solução de AVG mais Co^{2+} .

Quando as sementes dormentes de estilosante foram embebidas em solução de AVG mais Co^{2+} , não se observou diferença significativa (teste t $p \leq 0,05$) nos níveis de etileno injetado na atmosfera dos frascos Erlenmeyer em relação ao etileno observado ao final do experimento (tabela 2). Isso indica que não ocorreu síntese de etileno nas sementes tratadas com AVG mais Co^{2+} . Por outro lado, quando as sementes dormentes foram mantidas em meio de germinação, a produção de etileno pelas sementes foi estimulada pelo regulador gasoso até a concentração de $10^{-4} \text{ mol m}^{-3}$. Descontando-se a quantidade absoluta de etileno acumulado nos frascos do controle, isto é, o nível do gás naturalmente emanado pelas sementes na atmosfera dos frascos, dos níveis de etileno quantificado ao final do experimento observou-se que o acúmulo do gás foi 15,1; 8,9; 6,1; 2,1 e 1,7 vezes maior em relação às quantidades de etileno injetado nos frascos, 10^{-6} , $5 \cdot 10^{-6}$; $1 \cdot 10^{-5}$; $5 \cdot 10^{-5}$ e $10^{-4} \text{ mol m}^{-3}$, respectivamente. Esses resultados sugerem que o etileno, em baixos níveis, foi capaz de regular a sua própria biossíntese em sementes dormentes de estilosante. Etileno, à concentração de $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}$ ou maiores, não estimulou a produção autocatalítica de etileno. Esse resultado foi o oposto ao observado em flores de

cravo 'Chimera' e 'Epomeo', cujo sistema autocatalítico de produção de etileno foi estimulado por altas concentrações do regulador (Van Doorn et al 1992). Porém, sob altos níveis de etileno, o fenômeno pode também ter ocorrido, mas a baixa quantidade de etileno produzido pelas sementes pode haver-se diluído sob os altos níveis do gás empregado. Alternativamente o etileno sob altas concentrações poderia estar inibindo a sua própria biossíntese (Taylorson 1979, Southwich et al 1986).

Tabela 2. Efeito do etileno adicionado à atmosfera das frascos sobre a germinação das sementes dormentes (controle: 92, inibidas: 48 dias de idade pós-colheta) e sobre o total de etileno acumulado na atmosfera dos frascos, em dois experimentos separados

Meio de incubação	Etileno injetado (mol m ⁻³)	Germinação (%)	Etileno acumulado (mol m ⁻³)	Razão injet/acum
pH 7,0 (controle)	0	9,8 ± 2,7 h	10,6.10 ⁻⁶ ± 2,8.10 ⁻⁶ *	-
	10 ⁻⁶	18,4 ± 3,0 g	25,7.10 ⁻⁶ ± 6,2.10 ⁻⁶ *	15,1
	5.10 ⁻⁶	28,0 ± 2,8 f	5,5.10 ⁻⁶ ± 0,4.10 ⁻⁶ *	8,88
	10 ⁻⁵	47,2 ± 4,7 e	7,2.10 ⁻⁵ ± 0,7.10 ⁻⁵ *	6,14
	5.10 ⁻⁵	64,8 ± 4,2 d	1,2.10 ⁻⁴ ± 0,2.10 ⁻⁴ *	2,13
	10 ⁻⁴	76,0 ± 3,3 c	1,9.10 ⁻⁴ ± 0,3.10 ⁻⁴ *	1,73
	5.10 ⁻⁴	88,8 ± 1,5 b	5,9.10 ⁻⁴ ± 0,8.10 ⁻⁴	1,16
	10 ⁻³	96,0 ± 2,2 a	0,9.10 ⁻³ ± 0,1.10 ⁻³	0,90
	5.10 ⁻³	98,8 ± 1,5 a	4,8.10 ⁻³ ± 0,2.10 ⁻³	0,95
AVG + Co ²⁺	0	0,0 B d	0	-
	10 ⁻⁶	0,0 B d	1,4.10 ⁻⁶ ± 0,1.10 ⁻⁶	1,40
	10 ⁻⁵	4,8 ± 1,76 c	1,0.10 ⁻⁵ ± 0,2.10 ⁻⁵	1,02
	10 ⁻⁴	68,4 ± 3,98 b	1,0.10 ⁻⁴ ± 0,06.10 ⁻⁴	0,98
	10 ⁻³	84,0 ± 3,35 a	0,9.10 ⁻³ ± 0,07.10 ⁻³	0,97

A germinação das sementes embebidas em solução inibidora foi registrada diariamente até o quarto dia e até o quinto dia nas sementes do controle. Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas por asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de t, em nível de 5% de probabilidade, entre a quantidade de etileno acumulado nos frascos e o nível de etileno injetado

Uma vez que sementes dormentes emanam baixos níveis de etileno, infere-se que o incremento na germinação das sementes dormentes em ambientes fechados ocorreu, em parte, via um processo autocatalítico de produção de etileno. Em vários tipos de tecidos e órgãos, o etileno é autocataliticamente produzido, como ocorre em frutos climatéricos (Yang e Hoffman 1984).

3.5 Germinação das sementes em atmosfera livre de etileno

Quando o etileno foi removido da atmosfera dos frascos Erlenmeyer pela solução de perclorato de mercúrio, a germinação das sementes dormentes (8%) e não-dormentes (58%) representou 50% e 76% dos seus respectivos controles (tabela 3). Resultados similares foram obtidos com sementes de *Xanthium pennsylvanicum* (Kato e Esashi 1975), alface 'Grand Rapids' (Rudnicki et al 1978) e *Cucumis anguria*, sob luz branca (Cardoso e Felipe 1987).

Tabela 3. Efeito da remoção do etileno da atmosfera dos frascos selados sobre a germinação e sobre a produção de etileno por sementes dormentes (32 dias de idade pós-colheita) e não dormentes (287 dias)

Tratamento	Germinação (%)	Etileno (nmol frasco ⁻¹)
Dormente		
Controle	16,0 ± 2,5 a	1,40 ± 0,19 a
Com perclorato	8,0 ± 1,1 b	0,82 ± 0,06 b
Não-dormente		
Controle	77,2 ± 3,8 a	8,98 ± 0,89 a
Com perclorato	58,8 ± 3,6 b	3,55 ± 0,24 b

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste *F*, em nível de 5% de probabilidade. A germinação foi registrada até o quarto dia do ensaio, ocasião em que o etileno liberado da solução de perclorato foi quantificado

Ao final do experimento (quarto dia), o etileno fixado pela solução de perclorato foi liberado. Nos frascos com solução de perclorato, a quantidade de etileno produzido pelas sementes dormentes e não-dormentes foi significativamente menor que nos

frascos sem perclorato. Assim, o etileno extra emanado pelas próprias sementes, sob atmosfera inalterada, acumulou-se nos frascos e pôde induzir a sua própria biossíntese (efeito autocatalítico) em outras sementes, intensificando a germinação.

Para examinar-se se o etileno fixado pela solução de perclorato seria capaz de estimular a germinação posterior das sementes, tampas de polipropileno inseridas dentro dos frascos Erlenmeyer, receberam solução de germinação (controle) ou solução de perclorato de mercúrio. No terceiro dia do curso do experimento, solução de germinação, de perclorato ou de NaCl foi adicionada às tampas através dos seladores de borracha, utilizando-se uma seringa (tabela 4).

Tabela 4. Efeito da remoção do etileno da atmosfera frascos selados e de sua subsequente liberação sobre a germinação e produção de etileno por sementes dormentes (14 dias de idade pós-colheita) e não dormentes (303 dias)

Tratamento	Germinação (%)	Etileno (nmol frasco ⁻¹)
Dormente		
Controle	6,0 ± 1,3 a	1,02 ± 0,12 a
Perclorato → perclorato	3,2 ± 0,8 b	0,39 ± 0,04 b
Perclorato → NaCl	6,4 ± 0,7 a	1,13 ± 0,14 a
Não-dormente		
Controle	66,4 ± 3,2 a	5,10 ± 0,27 a
Perclorato→perclorato	48,8 ± 3,7 b	2,21 ± 0,19 b
Perclorato→NaCl	63,2 ± 3,1 a	5,85 ± 0,18 a

Médias seguida de mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade. O etileno foi quantificado no quinto dia após a embebição das sementes. A germinação foi registrada diariamente até o final do ensaio

Quando a solução de perclorato foi mantida permanentemente no interior dos frascos selados (perclorato → perclorato), a germinação das sementes dormentes (3%) e não-dormentes (49%) foi significativamente menor em relação aos seus respectivos controles, 6% e 66% , respectivamente (tabela 4). A liberação do etileno

fixado na solução de perclorato (perclorato→NaCl) durante o curso do experimento promoveu um incremento na germinação das sementes não-dormentes e dobrou a germinação nas dormentes, isto é, restaurou a germinação a níveis do controle. O etileno acumulado na atmosfera dos frascos também aumentou significativamente, chegando também a valores dos controles. Portanto, o etileno fixado pela solução de perclorato durante a germinação das sementes e depois liberado pela solução de NaCl foi capaz de estimular a germinação posterior das sementes e promover uma produção autocatalítica.

3.6 Germinação de sementes em relação à capacidade de biossíntese de etileno

Procurou-se investigar uma possível relação entre quebra da dormência e a capacidade de biossíntese de etileno pelas sementes. Para isso, sementes dormentes embebidas em meio de germinação foram mantidas em tampas de polipropileno inseridas dentro dos frascos Erlenmeyer. Outras sementes foram dispostas ao redor das tampas e estavam embebidas em solução de ACC, em diversos níveis. Observou-se que, sob contato com o ACC, a germinação das sementes dormentes foi significativamente maior (teste F , $p \leq 0,05$) do que as embebidas em solução de germinação, embora sob os mesmos níveis de etileno (tabela 5). Pode-se sugerir então que a diferença de germinação foi devida à maior capacidade de biossíntese de etileno das sementes tratadas com ACC.

Os resultados do ensaio acima foram comprovados procedendo-se a uma inversão posicional das sementes, isto é, embebendo-se as sementes dentro das tampas de polipropileno com solução de ACC e mantendo-se as sementes distribuídas ao redor das tampas em solução de germinação. Observou-se um aumento progressivo na germinação tanto das sementes embebidas em solução de germinação como nas sementes mantidas em solução de ACC, com o aumento da concentração de ACC. Sob cada nível de etileno acumulado por frasco, a germinação das sementes sob solução de ACC foi maior em relação às sementes embebidas em solução de germinação (tabela 6). Isso, enfatiza a relação estreita entre a germinação das sementes e a sua capacidade de biossíntese de etileno.

Para estimarem-se as possíveis participações da capacidade de biossíntese e da produção autocatalítica de etileno na germinação, sementes dormentes distribuídas ao redor das tampas de polipropileno foram embebidas em solução de

germinação ou em solução de AVG mais Co^{2+} . No mesmo frasco Erlenmeyer, outras sementes dormentes foram colocadas dentro das tampas embebidas em solução de germinação ou em solução de ACC. Observou-se que a germinação das sementes embebidas em solução de germinação foi de 5% e das tratadas com solução de AVG mais Co^{2+} foi nula (tabela 7). Então, os inibidores da biossíntese do etileno foram capazes de bloquear por completo a germinação sementes dormentes de estilosante. Quando as sementes estavam embebidas em solução de ACC, a germinação foi (89%) significativamente maior em relação às sementes tratadas com os inibidores (43%) no mesmo frasco, mostrando que o etileno biossintetizado pelas sementes estimulou a quebra da dormência das sementes.

Tabela 5. Efeito do ACC e do acúmulo de etileno na atmosfera dos frascos selados sobre a germinação de sementes dormentes de estilosante de 43 dias de idade pós-colheita. Nas tampas, as sementes se encontravam sob o meio de germinação (HCl-KOH, pH 7,0)

Incubação Fora da tampa	Germinação (%)		Diferença		Etileno (nmol frasco ⁻¹)
	Fora da tampa	Na tampa	Fora	Tampa	
ACC (0, controle)	4,8 ± 1,5 A e	3,7 ± 1,0 A d	1,1		0,19 ± 0,09 d
ACC (10 ⁻³ mol m ⁻³)	12,8 ± 1,9 A d	4,3 ± 0,9 B d	10,9		0,56 ± 0,27 d
ACC (10 ⁻² mol m ⁻³)	41,6 ± 3,0 A c	10,4 ± 2,0 B c	31,2		2,34 ± 0,11 c
ACC (10 ⁻¹ mol m ⁻³)	77,6 ± 2,9 A b	44,8 ± 3,4 B b	32,8		10,69 ± 1,13 b
ACC (1,0 mol m ⁻³)	96,8 ± 1,5 A a	66,4 ± 3,7 B a	30,4		82,53 ± 4,39 a

A germinação das sementes foi avaliada diariamente até o quinto dia após a embebição das sementes. O etileno acumulado foi quantificado ao final do experimento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, nas linhas, não diferem entre si pelo teste *F*, em nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade

A germinação das sementes dormentes embebidas em solução de germinação (68%) correspondeu a 74% da germinação das sementes embebidas em ACC (92%) sob a mesma concentração de etileno no frasco (tabela 7). Por outro lado a germinação das sementes dormentes embebidas em solução de AVG mais

Co^{2+} (43%) correspondeu a 48% da germinação das sementes tratadas com ACC (89%), também sob a mesma concentração de etileno no frasco. Descontando-se a porcentagem de germinação entre o primeiro(74%) e o segundo (48%) caso, pode-se sugerir que 26% da germinação das sementes dormentes foi causado por um efeito autocatalítico ($85 - 69 = 16 \text{ nmol frasco}^{-1}$ de etileno extra).

Tabela 6. Efeito do ACC e do acúmulo de etileno na atmosfera dos frascos selados sobre a germinação de sementes dormentes de estilosante de 62 dias de idade pós-colheita. Fora das tampas, as sementes se encontravam sob o meio de germinação (HCl-KOH, pH 7,0)

Incubação Na tampa	Germinação (%)		Diferença		Etileno (nmol frasco ⁻¹)
	Fora da tampa	Na tampa	Tampa	Fora	
ACC (0, controle)	18,4 ± 3,9 A d	20,0 ± 2,9 A e	1,6		1,92 ± 0,23 d
ACC (10 ⁻³ mol m ⁻³)	29,6 ± 5,7 A c	40,8 ± 3,4 B d	11,2		3,74 ± 0,98 c
ACC (10 ⁻² mol m ⁻³)	38,4 ± 3,7 A c	60,8 ± 5,2 B c	22,4		5,16 ± 1,69 c
ACC (10 ⁻¹ mol m ⁻³)	52,0 ± 4,7 A b	81,6 ± 4,3 B b	29,6		14,88 ± 1,74 b
ACC (1,0 mol m ⁻³)	71,2 ± 3,9 A a	97,6 ± 2,0 B a	26,4		94,15 ± 9,89 a

A germinação das sementes foi avaliada diariamente até o quinto dia após a embebição das sementes. O etileno acumulado foi quantificado ao final. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, nas linhas, não diferem entre si pelo teste *F*, em nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade

A germinação das sementes embebidas em solução de AVG mais Co^{2+} foi nula. No mesmo frasco, a germinação das sementes mantidas em solução de germinação foi de 5% e o acúmulo de etileno por frasco foi de 0,2 nmol frasco⁻¹ (tabela 7). Quando sementes dormentes foram embebidas em solução de ACC, a germinação (89%) foi 17 vezes maior em relação a germinação das sementes mantidas em solução de germinação (5%) e a quantidade de etileno acumulado nos frascos foi 69 nmol frasco⁻¹, ou seja, 346 vezes maior em relação ao etileno acumulado (0,2 nmol frasco⁻¹) nos frascos do caso anteriormente descrito. Então, o

incremento de 17 vezes na germinação das sementes embebidas em solução de ACC foi devido a intensificação na capacidade de biossíntese de etileno.

Tabela 7. Efeito do ACC e de inibidores da biossíntese de etileno (AVG + Co²⁺) sobre a produção de etileno e sobre a germinação de sementes dormentes de estilosante de 35 dias de idade pós-colheita

Incubação		Germinação (%)		Etileno
Fora da tampa	Na tampa	Fora da tampa	Na tampa	(nmol frasco ⁻¹)
pH 7,0	pH 7,0 (controle)	4,0 ± 1,3 A c	4,6 ± 0,4 A b	0,71 ± 0,09 c
AVG + Co ²⁺	pH 7,0	0,0 A d	5,2 ± 1,5 B b	0,20 ± 0,06 d
pH 7,0	ACC	67,6 ± 4,1 B a	91,6 ± 3,0 A a	85,22 ± 6,98 b
AVG + Co ²⁺	ACC	43,2 ± 4,9 A b	89,0 ± 3,3 B a	69,54 ± 4,85 a

A germinação das sementes foi avaliada diariamente até o quarto dia após a embebição das sementes. O etileno acumulado foi quantificado ao final. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, nas linhas, não diferem entre si pelo teste *F*, em nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade

3.7 Exclusão e bloqueio da biossíntese de etileno simultâneos

Quando submetidas a uma atmosfera livre de etileno, a germinação das sementes dormentes foi de 5% e das não dormentes 76%, correspondendo a 54% e a 77% dos seus respectivos controles (tabela 8). A produção de etileno, naquelas condições, também foi significativamente menor em relação ao controle, confirmando os resultados da tabelas 3 e 4, que mostram a resposta das sementes de estilosante à atmosfera sem etileno. A germinação de sementes de maçã e o crescimento dos embriões também diminuiu com a remoção do etileno do ambiente de confinamento (Kpczy ski et al 1977). Quando AVG mais Co²⁺ estavam no meio de germinação, mesmo sem solução de perclorato, as sementes dormentes não germinaram e a produção de etileno foi nula, indicando mais uma vez que os inibidores foram capazes de bloquear completamente a biossíntese de etileno naquelas sementes. Entretanto, sob as mesmas condições, 32% das sementes não-

dormentes germinaram e a produção de etileno foi de $4,0 \text{ pmol sem}^{-1}$, sugerindo que os inibidores da biossíntese não foram tão eficientes no bloqueio da biossíntese de etileno nas sementes não-dormentes. Assim, uma pequena quantidade de etileno produzida pelas sementes parece ter sido suficiente para fazer aumentar significativamente a germinação das sementes não-dormentes que apresentaram, portanto, elevada intensidade de resposta ao regulador gasoso. Isso contribui para suportar a sugestão de K pczy ski e Karssen (1985) e Gallardo et al (1994) de que a germinação de sementes não-dormentes de *Amaranthus caudatus* e *Circer arietinum*, tratadas com AVG, seria eliciada por um nível muito baixo de etileno emanado das sementes.

Os inibidores da biossíntese e ação do etileno têm sido utilizados para indicar o requerimento de algumas espécies de sementes por etileno para germinarem (Matilla 2000). Entretanto, os inibidores da biossíntese do etileno têm falhado em prevenir satisfatoriamente a germinação em algumas sementes (Hoffman et al 1983, K pczy ski e Karssen 1985, K pczy sk 1986, Machabée e Saini 1991). Em poucos casos, como em sementes não-dormentes de *Striga hermontica*, os inibidores da biossíntese de etileno bloquearam por completo a germinação e a evolução do etileno pelas sementes (Logan e Stewart 1991). Em sementes não-dormentes de estilosante, os inibidores AVG mais Co^{2+} também foram ineficientes em prevenir completamente a germinação e a produção de etileno (tabela 8). Em alguns casos, a germinação das sementes não-dormentes, tratadas com AVG, correspondeu a 72% da germinação das sementes do controle (Pelacani 2001). Então, utilizando-se apenas os inibidores da biossíntese, não seria possível sugerir que o etileno constitui-se um fator essencial para a germinação das sementes não-dormentes de estilosante.

Fixando-se o etileno com solução de perclorato de mercúrio e simultaneamente embebendo-se as sementes em solução de AVG mais Co^{2+} , observou-se que as sementes dormentes e não-dormentes não sintetizaram etileno e a germinação das sementes foi nula (tabela 8). No controle, a germinação das sementes foi de 9,6% nas dormentes e 91% nas não-dormentes. A produção de etileno pelas sementes dormentes e não-dormentes foi de 16 e $185 \text{ pmol sem}^{-1}$, respectivamente. Isso mostra que o etileno foi requerido não somente para quebra da dormência, mas também para germinação das sementes de estilosante. No

entanto, o melhor meio para detectar-se se as sementes de estilosante dependem realmente de etileno para germinar seria a obtenção de plantas mutantes auxotróficas ou insensíveis. Por exemplo, já existem vários tipos de mutantes em que foi possível provar a essencialidade do etileno no amadurecimento dos frutos de tomateiro (Hamilton 1990, Oeller et al 1991).

Tabela 8. Efeito simultâneo da remoção do etileno da atmosfera dos frascos e do bloqueio da biossíntese sobre a germinação e sobre produção de etileno por sementes dormentes (18 dias de idade pós-colheita) e não-dormentes (303 dias)

Tratamentos	Germinação (%)	Etileno (pmol sem ⁻¹)
Dormente		
pH 7,0 - sem perclorato (controle)	9,6 ± 0,9 a	16,12 ± 2,04 a
pH 7,0 - com perclorato	5,2 ± 1,5 b	8,96 ± 2,38 b
AVG + Co ²⁺ - sem perclorato	0,0 c	0,0 c
AVG + Co ²⁺ - com perclorato	0,0 c	0,0 c
Não-dormente		
pH 7,0 - sem perclorato (controle)	91,2 ± 3,0 a	184,83 ± 7,36 a
pH 7,0 - com perclorato	76,0 ± 2,1 b	102,97 ± 10,21 b
AVG + Co ²⁺ - sem perclorato	32,0 ± 3,9 c	4,03 ± 0,63 c
AVG + Co ²⁺ - com perclorato	0,0 d	0,0 d

As tampas de polipropileno inseridas dentro dos frascos continham 1,0 cm³ da solução de HCl-KOH ou solução de perclorato. As sementes distribuídas ao redor das tampas foram embebidas em solução de HCl -KOH pH 7,0, 10 mol m⁻³ ou em solução contendo inibidores da biossíntese do etileno. No quinto dia do curso do experimento o etileno foi quantificado, sendo a germinação registrada diariamente até aquele dia. Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

Em resumo, os resultados da tabela 8 indicam que a embebição prévia das sementes de estilosante em solução de AVG mais Co²⁺, em conjunto com a remoção do etileno da atmosfera dos frascos, mostrou-se uma metodologia simples

e eficaz para determinar-se o requerimento por etileno das sementes não-dormentes durante o processo germinativo. Aparentemente, não existe motivo para essa técnica não funcionar com outras sementes que requerem etileno. Em um estudo com sementes de diversas espécies que produzem etileno, Lalonde e Saini (1992), utilizando inibidores da biossíntese e ação do etileno, demonstraram que das 10 espécies estudadas, somente *Tagetes erecta* exigiu etileno para germinar. Provavelmente, a lista de sementes que realmente requerem etileno para germinar poderia ser ampliada se a técnica proposta tivesse sido empregada.

3.8 Cinética de fixação do etileno por solução de perclorato de mercúrio

Para determinar-se o curso da remoção do etileno da atmosfera dos frascos pela solução de perclorato de mercúrio, tampas de polipropileno com solução de perclorato foram inseridas dentro dos frascos Erlenmeyer. Após 24 h de embebição das sementes em solução de AVG mais Co^{2+} os frascos foram selados e etileno em nível $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$, suficiente para quebrar completamente a dormência das sementes estilósante (ver figura 2), foi injetado na atmosfera dos frascos. O etileno foi rapidamente fixado pela solução de perclorato, e, em apenas 12 h, todo o etileno já havia sido praticamente removido da atmosfera do frasco (figura 6). A velocidade de fixação do etileno pela solução de perclorato foi a mesma tanto nos frascos sem sementes como nos frascos com sementes dormentes e com não-dormentes.

Na figura 7 observa-se que a fixação do etileno pela solução de perclorato de mercúrio foi descrita por uma equação exponencial negativa ($y = 5022e^{-8,14t}$). A solução de perclorato removeu rapidamente o etileno injetado na atmosfera dos frascos ($5 \cdot 10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$) e, em apenas 1 h, praticamente todo o etileno (99,75%) já se encontrava removido. As sementes não-dormentes (443 dias de idade pós-colheita) começaram a germinar 3 h após a adição de etileno à atmosfera dos frascos selados, e a germinação máxima atingida foi 57% em 24h. Por seu turno, a germinação das sementes dormentes (35 dias de idade), iniciou-se após 6 h e a máxima germinação naquele período foi de 23% (inserto da figura 7). Parece, então, que o etileno percebido pelas sementes já nos primeiros momentos de embebição foi suficiente para desencadear a germinação das sementes. Isso reforça a sugestão de Delatore (1994) de que as sementes dormentes de estilósante percebem o Ethrel logo no início, após exposição. Além disso, como a germinação das sementes não-

dormentes foi muito maior em relação as dormentes, sob a mesma concentração de etileno, a capacidade de resposta das sementes não-dormentes ao etileno mostrou-se muito maior do que das dormentes. A variação da capacidade de resposta de um material vegetal a um regulador de crescimento parece depender do número de moléculas receptoras da célula alvo (Trewavas 1982), ou melhor, a mudanças, na cadeia de transdução de sinais (Van Doorn et al 1992).

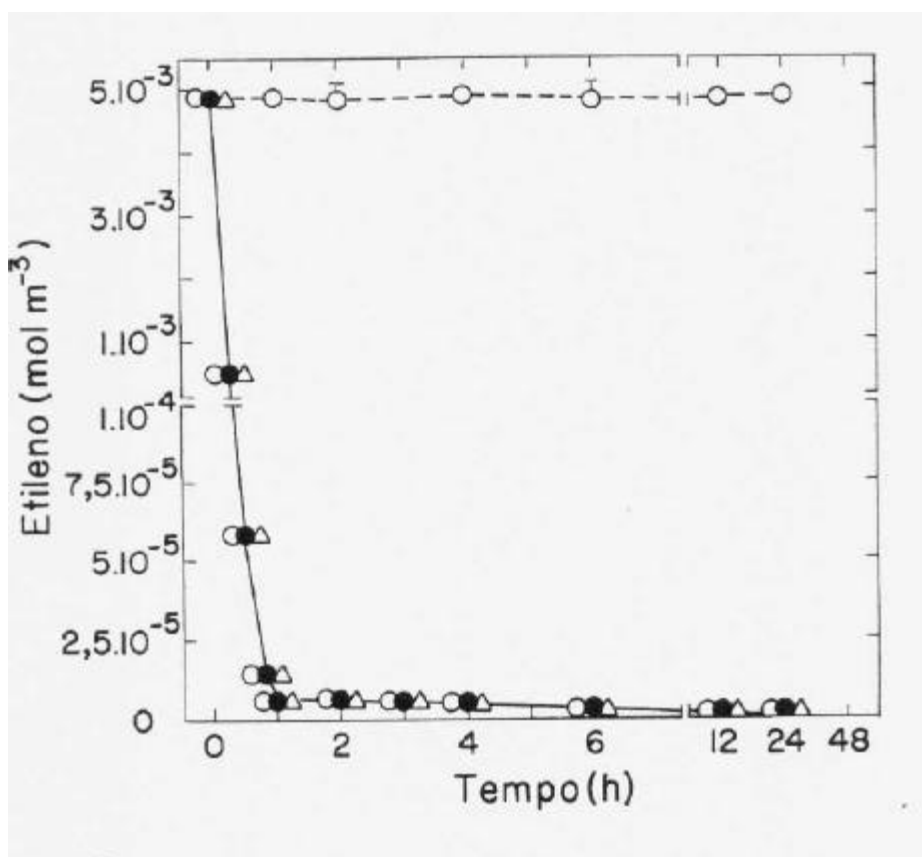


Figura 6. Remoção do etileno por solução de perclorato da atmosfera dos frascos. Frascos sem sementes (—○—), com sementes dormentes de 27 dias de idade pós-colheita (—△—) e com sementes não-dormentes de 375 dias de idade (—●—). Por comparação, injetou-se etileno na atmosfera dos frascos sem sementes e sem solução de perclorato (- -○- -). As barras representam o erro padrão da média

De acordo com Trewavas (1981, 1982) a resposta do material vegetal (célula, tecido, órgão, organismo) depende não somente de uma concentração mínima do regulador mas principalmente do nível de sensibilidade do material vegetal ao regulador. Por isso, procurou-se determinar, também, o período mínimo de

exposição das sementes ao etileno necessário para desencadear o processo germinativo. Nesse ensaio, uma tampa de polipropileno foi inserida nos frascos Erlenmeyer e recebeu solução de perclorato de mercúrio ($0,3 \text{ cm}^{-3}$) e as sementes dormentes e não-dormentes distribuídas ao seu redor, encontravam-se embebidas em solução de AVG mais Co^{2+} . Após o selamento dos frascos, injetou-se etileno, em nível de $5.10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$, na atmosfera dos frascos. As sementes permaneceram por tempo compreendido entre zero e 24 h sob atmosfera com etileno. Após cada tempo de enclausuramento, os frascos eram abertos e o ar do seu interior exaurido por ventilação forçada, em capela; as sementes permaneceram nos frascos até o final do experimento.

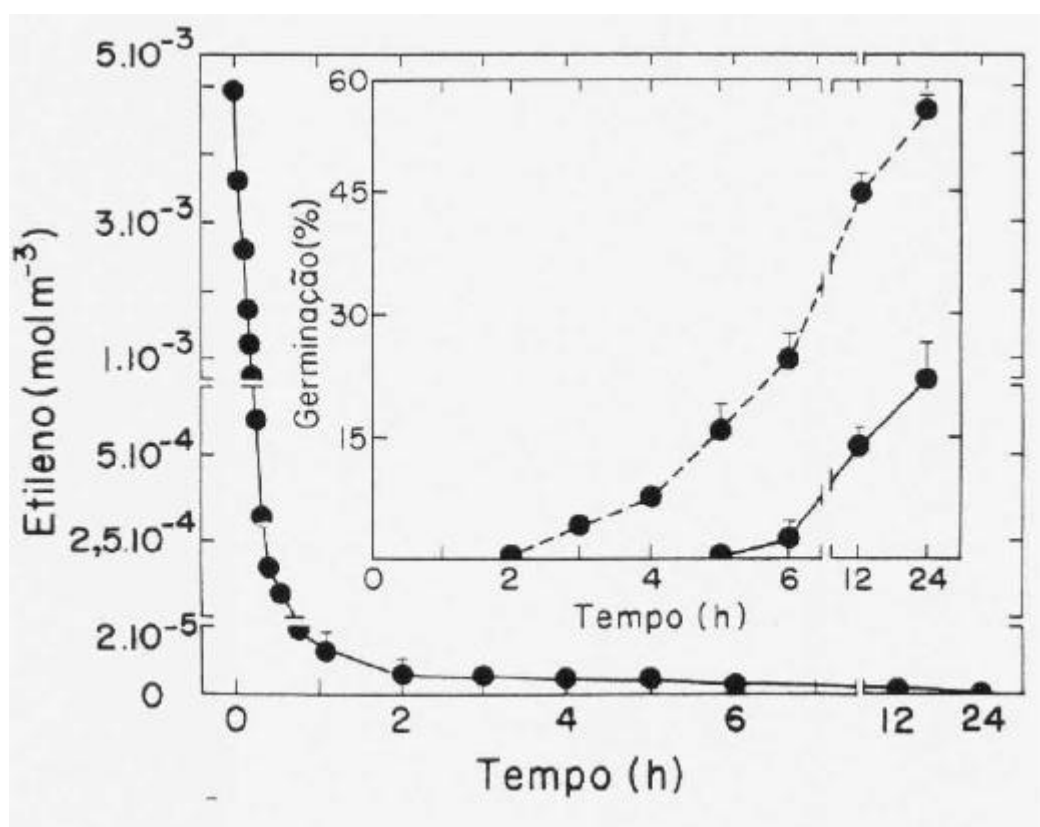


Figura 7. Remoção do etileno da atmosfera dos frascos por solução de perclorato. O etileno remanescente nos frascos (●) foi quantificado nos tempos entre 0 a 24 h. A relação entre os níveis de etileno e o tempo é representada por $y = 5022 e^{-8,14 t}$; $r^2 = 0,99$. Inserto: germinação das sementes dormentes de 35 dias de idade pós-colheita (—●—) e não-dormentes (- -●- -) de 443 dias de idade foi registrada em tempo entre 0 e 24 h. As barras representam o erro padrão da média

Tabela 9. Efeito do tempo de exposição ao etileno sobre a germinação das sementes dormentes (37 dias de idade pós-colheita) e não-dormentes (412 dias de idade)

Exposição ao etileno (h)	Etileno fixado (mol m ⁻³)	Etileno remanescente (mol m ⁻³)	Germinação (%)	
			Dormentes	Não-dormentes
0	$5,0 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-4}$	0,0	0,0
0,25	$4,4 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-4}$	$0,6 \cdot 10^{-3} \pm 0,4 \cdot 10^{-4}$	$25,2 \pm 3,22$	$52,6 \pm 1,23$
0,5	$4,8 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$	$0,1 \cdot 10^{-3} \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$	$23,9 \pm 2,21$	$56,6 \pm 3,48$
1	$4,9 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-4}$	$0,1 \cdot 10^{-4} \pm 0,1 \cdot 10^{-5}$	$26,1 \pm 1,45$	$52,3 \pm 2,14$
2	$5,0 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-4}$	$0,4 \cdot 10^{-5} \pm 0,3 \cdot 10^{-6}$	$22,8 \pm 4,13$	$58,1 \pm 3,25$
3	$5,0 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$	$0,3 \cdot 10^{-5} \pm 0,2 \cdot 10^{-6}$	$23,3 \pm 1,36$	$55,7 \pm 1,02$
4	$5,0 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-4}$	$0,2 \cdot 10^{-5} \pm 0,1 \cdot 10^{-6}$	$24,9 \pm 2,45$	$53,2 \pm 3,89$
6	$5,0 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-4}$	$0,1 \cdot 10^{-5} \pm 0,9 \cdot 10^{-6}$	$22,5 \pm 2,78$	$54,4 \pm 4,01$
12	$5,0 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$	$0,2 \cdot 10^{-6} \pm 0,01 \cdot 10^{-6}$	$26,4 \pm 3,86$	$57,5 \pm 2,47$
24	$5,0 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-4}$	0,0	$24,7 \pm 2,15$	$54,6 \pm 3,56$

A partir da integral da curva de fixação do etileno pela solução de perclorato (figura 7), estimou-se a quantidade de etileno fixado pela solução de perclorato em cada período de tempo e também a quantidade do regulador remanescente na atmosfera dos frascos. As tampas de polipropileno inseridas dentro dos frascos continham 0,3 cm³ da solução de perclorato. As sementes distribuídas ao redor das tampas foram embebidas em solução de AVG mais Co²⁺. A germinação foi registrada até o quinto dia. Observou-se diferença significativa na germinação das sementes dormentes e não-dormentes pelo teste de *F*, em nível de 5% de probabilidade, ao longo dos tempos de exposição à atmosfera com etileno

Após 15 min da injeção de etileno nos frascos, 88% dele haviam sido fixados pelo perclorato (tabela 9). A quantidade de etileno remanescente nos frascos $6 \cdot 10^{-4}$ mol m⁻³ (12%) seria o suficiente para incrementar a germinação das sementes dormentes e não-dormentes, caso as sementes não estivessem embebidas em solução de AVG mais Co²⁺ (ver figura 2). Entretanto, após 24 h, praticamente todo o etileno já havia sido removido pela solução de perclorato e a germinação das sementes dormentes e não-dormentes praticamente não se alterou. Então, um

tempo de exposição das sementes ao etileno de 15 min (no máximo) foi o suficiente para promover a germinação.

3.9 Sensibilidade das sementes ao etileno

A sensibilidade dos tecidos vegetais aos reguladores de crescimento constitui-se em um fator crítico na regulação do crescimento e desenvolvimento (Trewavas 1981). As definições de Trewavas (1982) sobre sensibilidade são baseadas em dois postulados: primeiro, os reguladores de crescimento não conseguem desempenhar um estrito papel hormonal; segundo, muitos dos eventos de crescimento e desenvolvimento ocorrem sem mudanças nos níveis dos reguladores, mas devido a um aumento na intensidade de resposta dos tecidos. Não há como medir-se diretamente a variação de sensibilidade dos tecidos aos reguladores de crescimento, mas pode-se determinar a concentração do regulador requerida para induzir uma resposta. A determinação da capacidade de resposta de um órgão ou tecido a um regulador baseia-se num modelo de curva de resposta do órgão ou tecido estudado, em função da dose do regulador. As diferentes maneiras de se avaliar a sensibilidade em função da curva dose-resposta pode produzir informações contraditórias. Portanto, em cada caso estudado, deve-se tomar de maneira criteriosa o parâmetro para avaliar-se a sensibilidade. Firn (1986) descreve cinco parâmetros que são usualmente utilizados para avaliar-se a sensibilidade: 1- a magnitude da resposta máxima que pode ser alcançada com a aplicação de regulador; 2- a resposta máxima alcançada relativa à resposta sem a adição do regulador; 3- a concentração mínima do regulador para iniciar-se uma resposta; 4- a concentração requerida de um regulador necessária para alcançar-se uma resposta máxima mensurável; 5- a concentração do regulador que produz metade da resposta máxima.

Para examinar-se se a sensibilidade das sementes ao etileno, sementes dormentes e não-dormentes foram embebidas em solução de AVG mais Co^{2+} . Após 24 h de incubação na solução inibidora, adicionou-se solução de perclorato às tampas de polipropileno inseridas dentro dos frascos. Em seguida, os frascos foram selados e etileno em níveis crescentes foi injetado na atmosfera deles. Na figura 8, observa-se que etileno em nível de $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}$ foi suficiente para desencadear uma germinação mensurável das sementes dormentes. Por seu turno, as sementes

não-dormentes começaram a germinar com a aplicação de etileno em nível de 10^{-5} mol m⁻³. A partir do nível limiar de etileno para eliciar a germinação das sementes dormentes e não-dormentes, observou-se um aumento gradual na germinação em ambos os grupos de sementes, com aumento na quantidade de etileno injetado. Sob todos os níveis de etileno, a germinação das sementes não-dormentes foi significativamente maior do que nas sementes dormentes. Isso mostra claramente que o etileno foi requerido tanto para quebrar da dormência como para a germinação das sementes de estilosante. Considerando-se o nível mensurável de etileno necessário para desencadear a germinação das sementes dormentes (5.10^{-4} mol m⁻³) e não-dormentes (10^{-5} mol m⁻³) como um parâmetro para avaliar-se a sensibilidade das sementes ao regulador, observou-se que as sementes não-dormentes foi cerca de 50 vezes mais sensíveis ao etileno do que as sementes dormentes. A maior sensibilidade das sementes não-dormentes ao etileno foi, também, mostrada na figura 5, em que quando confinadas juntas em ambiente fechado, situação em que a concentração de etileno é rigorosamente a mesma para ambos os tipos de sementes, a germinação das sementes não-dormentes foi muito maior do que das dormentes.

A dormência das sementes de estilosante foi quebrada em resposta ao etileno (figura 1) ou ao ACC (Vieira e Barros 1994; ver também tabelas 5, 6 e 7). A resposta das sementes dormentes ao ACC sugere que elas possuem uma baixa capacidade de biossintetizar etileno, que é aumentada com o avanço da idade pós-colheita, quando a dormência vai sendo quebrada naturalmente (Pelacani 2001). Por seu turno, os inibidores da biossíntese do etileno (AVG mais Co²⁺) não bloquearam completamente a germinação das sementes não-dormentes de estilosante (ver tabela 8). Parece que uma quantidade extremamente baixa de etileno produzido pelas sementes (4 pmol sem⁻¹; ver tabela 8) foi suficiente para eliciar a germinação das sementes não-dormentes como também foi sugerido por Machabée e Saini (1991) para sementes não-dormentes de *Chenopodium album* embebidas em solução com inibidores da biossíntese de etileno. Portanto, além da capacidade de síntese de etileno, a sensibilidade das sementes ao regulador constitui um ponto chave no controle da germinação da sementes de estilosante.

Em condições naturais, a sensibilidade das sementes ao etileno pode variar não apenas em resposta à idade das sementes, mas também, em função de fatores

ambientes. Schonbeck e Egley (1980, 1981) mostraram que altas temperaturas, luz e umidade do solo afetaram a sensibilidade das sementes de *Amaranthus retroflexus* ao etileno. Assim, o aumento da sensibilidade das sementes de estilósante ao etileno, com o avanço da idade pós-colheita poderia desempenhar um papel importante na regulação da germinação, sob as mais diversas condições naturais.

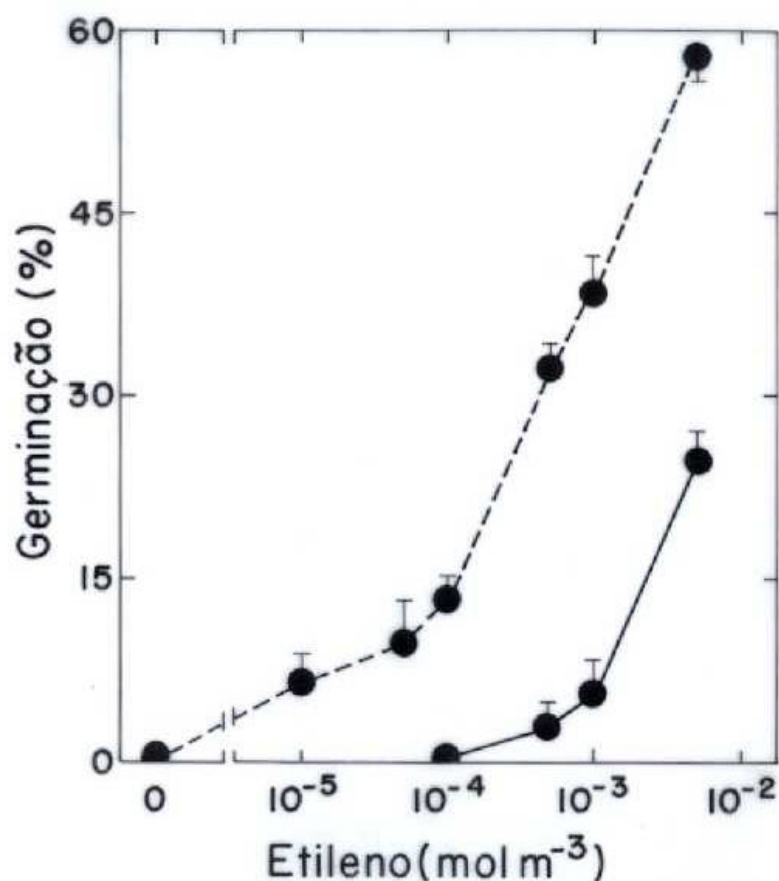


Figura 8. Efeito do etileno na germinação das sementes embebidas em solução de AVG mais Co^{2+} sob condições de atmosfera livre de etileno. A germinação das sementes dormentes de 361 dias de idade pós-colheita (—) e não-dormentes de 28 dias de idade (- - -) foi acompanhada até o quinto dia. As barras representam o erro padrão da média

4 CONCLUSÕES

Semelhantemente ao que ocorre com frutos climatéricos, sementes dormentes de estilosante produziram etileno que, quando acumulado em ambiente fechado, estimulou a germinação das sementes vicinais, promovendo também um efeito autocatalítico na produção de etileno. Diferentemente dos frutos climatéricos, no entanto, esse fenômeno mostrou-se limitado em sementes dormentes, devido não só à baixa capacidade das sementes em biossintetizar o etileno, como também à sua baixa sensibilidade ao regulador.

A remoção do etileno da atmosfera dos frascos selados, por uma solução de perclorato de mercúrio, ocorreu de forma extremamente rápida, obedecendo a uma curva exponencial negativa. Por isso, a germinação das sementes, sob atmosfera livre de etileno, possivelmente, deveu-se apenas ao etileno por elas biossintetizado. Nesse caso, durante a fixação do etileno pelo perclorato, parece não ter havido tempo suficiente para que ocorresse uma produção autocatalítica.

Uma quantidade extremamente baixa de etileno emanado pelas sementes não-dormentes foi suficiente para eliciar a sua germinação. Por isso, consequentemente as sementes não-dormentes germinaram ainda que embebidas em solução de AVG mais Co^{2+} , que não inibiu completamente a produção do gás, ao contrário do que ocorreu com as sementes dormentes. As sementes dormentes e não-dormentes embebidas em solução de AVG mais Co^{2+} não germinaram nem produziram etileno sob condições de atmosfera livre de etileno. Com esse sistema, pôde-se demonstrar que o etileno foi requerido não apenas para quebrar a dormência, como também para promover a germinação das sementes de estilosante. Assim, quando no sistema se injetou etileno, observou-se germinação em ambos os tipos de semente. Os níveis de etileno necessários para estimular a germinação foram bem maiores nas sementes dormentes, mostrando que as sementes não-dormentes foram bem mais sensíveis ao regulador gasoso. Portanto, ambas as características, capacidade de biossíntese e sensibilidade das sementes ao etileno, são de importância fundamental no processo germinativo das sementes de estilosante.

5 REFERÊNCIAS

- Abeles FB (1973) *Ethylene in plant biology*. Academic Press, New York. 302 p
- Abeles FB (1986) Role of ethylene in *Lactuca sativa* '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, Ross JD (1981) Studies in wild oat seed dormancy I. The role of ethylene in dormancy breakage and germination of wild oat seeds (*Avena fatua*). *Plant Physiol* 67:358-62
- Araújo EF, Araújo RF, Gomes JM (2000) Avaliação de diferentes métodos de escarificação das sementes e dos frutos de *Stylosanthes viscosa* SW. *Rev Bras Sementes* 22:18-22
- Barros RS, Delatorre CA (1998) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid-stimulated germination of *Stylosanthes humilis* seed is inhibited by abscisic acid. *Seed Sci Technol* 26:319-24
- Burin ME, Barros RS, Rena AB (1987) Chemical regulation of endogenous dormancy in seeds of *Stylosanthes humilis* H.B.K. *Turrialba* 37:281-5
- Cameron DF, 'tMannetje L (1976) Effects of photoperiod and temperature on flowering of twelve *Stylosanthes* species. *Aust J Exp Agr Anim Husb* 17:417-24
- Cardoso VJM, Felipe GM (1987) Endogenous ethylene and the germination of *Cucumis anguria* L. seeds. *Rev Bras Bot* 10:29-32
- Delatorre CA (1994) *Regulação não-específica da germinação de sementes de Stylosanthes humilis HBK*. Viçosa, UFV. 53 p (Tese de Mestrado)
- Egley GH (1980) Stimulation of common cocklebur (*Xanthium pensylvanicum*) and redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) seed germination by injections of ethylene into soil. *Weed Sci* 28:510-4
- Esashi Y, Matsuyama S, Hoshima M, Ashino H, Ishizawa K (1990) Mechanism of action of ethylene in promoting the germination of cocklebur seeds I. Osmoregulation. *J Plant Physiol* 17:537-50

- Esashi Y, Okasaki M, Yanai N, Hishinuma K (1978) Control of the germination of secondary dormant cocklebur seeds by various germination stimulants. *Plant Cell Physiol* 19:1497-1506
- Firn RD (1986) Growth substance sensitivity: The need for clearer ideas, precise terms and purposeful experiments. *Physiol Plant* 67:267-72
- Gallardo M, Muñoz de Rueda P, Mattila A (1994) The relationships between ethylene production and germination of *Circaea arvensis* seeds. *Biol Plant* 36:201-7
- Gray J, Picton S, Shabbeer J, Schuch W, Grierson D (1992) Molecular biology of fruits ripening and its manipulation with antisense genes. *Plant Mol Biol* 19:69-87
- Hamilton AJ, Lycett GW, Grierson D (1990) Antisense gene that inhibits synthesis of ethylene in transgenic plants. *Nature* 346:284-7
- Hasegawa R, Maruyama A, Nakaya M, Tsuda S, Esashi Y (1995) The presence of two types of 1-aminocyclopropane synthase in germinating seeds and their responses to ethylene. *Physiol Plant* 93:713-8
- Hoffman NE, Fu JR, Yang SF (1983) Identification and metabolism of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid in germinating peanut seeds. *Plant Physiol* 71:197-9
- Holm AM (1972) The effect of high temperature pretreatments on germination of Townsville stylo seed material. *Aust J Exp Agr Anim Husb* 13:190-2
- Jiang WB, Mayak S, Halevy AH (1994) The mechanism involved in ethylene-enhanced ethylene synthesis in carnation. *Plant Growth Regul* 14:133-8
- Kato H, Esashi Y (1975) Dormancy and impotency of cocklebur seeds I. CO₂, C₂H₄, O₂ and high temperature. *Plant Cell Physiol* 16:687-96
- Kpczyski 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. *Plant Physiol* 67:588-91
- Kpczyski J, Corbineau F, Côme D (1996) Responsiveness of *Amaranthus retroflexus* seeds to ethephon, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and gibberellic acid in relation to temperature and dormancy. *Plant Growth Regul* 20:259-65
- Kpczyski J, Karssen CM (1985) Requirement for the action of endogenous ethylene during germination of non-dormant seeds of *Amaranthus caudatus*. *Plant Physiol* 63:49-52

- Kpczyński J, Rudnicki RM, Braun JW, Khan AA (1977) Ethylene requirement for germination of partly after-ripened apple embryo. *Plant Physiol* 40:292-95
- Keys RD, Smith OE, Kumamoto J, Lyon JL (1975) Effects of gibberellic acid, kinetin and ethylene plus carbon dioxide on the thermodormancy of lettuce seed (*Lactuca sativa* 'Mesa 659'). *Plant Physiol* 56:826-9
- Lalonde S, Saini HS (1992) Comparative requirement for endogenous ethylene during seed germination. *Ann Bot* 69:423-8
- Lognan DC, Stewart GR (1991) Role of ethylene in the germination of the hemiparasite *Striga hermontica*. *Plant Physiol* 97:1435-8
- Machabée S, Saini HS (1991) Differences in the requirement for endogenous ethylene 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
- Negm FB, Smith OE, Kumamoto J (1972) Interaction of carbon dioxide and ethylene in overcoming thermodormancy of lettuce seeds. *Plant Physiol* 49:869-72
- Oeller PW, Wong LM, Taylor LP, Pike DA, Theologis A (1991) Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254:437-9
- Pelacani CR (2001) *Relações entre o pH do meio de germinação e a produção de etileno em sementes de Stylosanthes humilis HBK.* Viçosa, UFV. 140 p (Tese de Doutorado)
- Risse LA, Hatton TT (1982) Sensitivity of watermelons to ethylene during storage. *Hort Sci* 17:946-8
- Rudnicki RM, Braun JW, Khan AA (1978) Low pressure and ethylene seed germination. *Plant Physiol* 43:189-94
- Saini HS, Bassi PK, Spencer MS (1986) Use of ethylene and nitrate to break seed dormancy of common lambsquarters (*Chenopodium album*). *Weed Sci* 34:502-6
- Saini HS, Consolación ED, Bassi PK, Spencer MS (1989). Control processes in the induction and relief of thermoinhibition of lettuce seed germination. Actions of phytochrome and endogenous ethylene. *Plant Physiol* 90:311-5
- 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. pp 367-401

- Schonbeck MW, Egley GM (1980) Effects of temperature, water potential, and light on germination responses of redroot pigweed seeds to ethylene. *Physiol Plant* 65:1149-54
- Schonbeck MW, Egley GM (1981) Change in sensitivity of *Amaranthus retroflexus* L. seeds to ethylene during preincubation II. Effects of alternating temperature and burial in soil. *Plant Cell Environ* 4:237-42
- Scott AJ, Knott M (1974) A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics* 30:507-12
- Sitrit Y, Riov J, Blumenfeld A (1986) Regulation of ethylene biosynthesis in avocado fruit during ripening. *Physiol Plant* 81:130-5
- Southwick KL, Lamb N, Storey R, Mansfield DH (1986) Effects of ethephon and its decomposition products on germination of rice and watergrass. *Crop Sci* 26: 761-7
- Taylorson RB (1979) Response of weed seeds to ethylene and related hydrocarbons. *Weed Sci* 27: 7-10
- Trewavas AJ (1981) How do plant growth substances work ? *Plant Cell Environ* 4:203-28
- Trewavas AJ (1982) Growth substance sensitivity: The limiting factor in plant development. *Physiol Plant* 55:60-72
- Van Doorn WG, Woltering EJ, Reid MS, Wu M-J (1992) Reduced sensitivity to ethylene and delayed senescence in a group of related carnation cultivar. In Pech JC, Latché A Balagué C (eds) *Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. pp. 188-94
- Van Staden J, Olatoye ST, Hall MA (1973) Effect of light and ethylene upon cytokinin level in seed of *Spergula arvensis*. *J Exp Bot* 24:662-71
- Vieira HD, Barros RS (1994) Responses of seed of *Stylosanthes humilis* to germination regulators. *Physiol Plant* 92:17-20
- Whitehead CS, Sutcliffe MA (1995) Effect of low temperatures and different growth regulators on seed germination in *Cyclopia* ssp. *J Plant Physiol* 147:107-12
- Yang SF (1985) Biosynthesis and action of ethylene. *Hort Sci* 20:41-5
- Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35:155-89