

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pela candidata
Lourdes I. V. do Amaral e aprovada
pela Comissão Julgadora.

11/12/70

LOURDES I. V. DO AMARAL



mf. Fatima S. Mercina

Am13g

GERMINAÇÃO E DORMÊNCIA EM SEMENTES EM DESENVOLVIMENTO DE
Bixa orellana L.: ASPECTOS FISIOLÓGICOS E ESTRUTURAIS

CAMPINAS

1990

Am13g

13351/BC

Proj. Et
neg.

Imp.

LOURDES I.V. DO AMARAL

m. t. aut.

GERMINAÇÃO E DORMÊNCIA EM SEMENTES EM DESENVOLVIMENTO DE
Bixa orellana L.: ASPECTOS FISIOLÓGICOS E ESTRUTURAIIS

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

30/9/10/521

Orientadora: Prof^a Dr^a MARIA DE FÁTIMA D.A. PEREIRA

m. t. aut.

CAMPINAS

1990

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

DEDICO

À minha mãe Nevinha, por tudo o que eu sou, pelo exemplo de luta e dignidade.

Ao meu esposo Luís pelo estímulo, carinho e compreensão.

OFEREÇO

À minha filha Marta pela alegria e suavidade.

À meu pai Itiberê pelo carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria de Fátima D. A. Pereira, pela orientação precisa, pelo exemplo de profissionalismo e dignidade, pela amizade, carinho, bem como pelo estímulo e dedicação com que acompanhou a execução desta tese em todas as suas etapas, o meu agradecimento especial.

Ao Prof. Dr. Ângelo Luis Cortelazzo pela amizade, interesse, entusiasmo e sobretudo pela valiosa orientação durante a execução do trabalho de citoquímica e citofísica e por ocasião da pré-banca.

Ao Prof. Dr. Ivany F. M. Válio e à Profa. Dra. Marlene A. Schiavinato pelas enriquecedoras sugestões dadas por ocasião da pré-banca.

À Dra. Mara A. de Lucio, do Laboratório de Genética da Reprodução (CAISM-UNICAMP) pela utilização do microscópio de fluorescência.

À Profa. Dra. Marília de Moraes Castro, do Departamento de Botânica, pela amizade e contribuições preciosas de anatomia vegetal.

Ao Dr. Odair Bovi, da Seção de Plantas Aromáticas do Instituto Agronômico de Campinas, pelo fornecimento de sementes maduras de Bixa orellana.

Ao Davi Rosalen, estudante de agronomia da Escola Superior de Agronomia Luis de Queirós (ESALQ), por permitir a utilização da plantação de urucum, para estudos de desenvolvimento das sementes.

Ao meu esposo Luis A. Lessa pelo amor, compreensão e valiosa ajuda durante a realização deste trabalho.

A todos os meus irmãos e sobrinhos pelo amor, apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. João A. Pereira, à D. Angelina, ao André e à Eliana pelo carinho e cortesia a mim dedicados.

Aos meus amigos e colegas do Departamento de Fisiologia Vegetal, pela carinhosa amizade e compreensão.

Aos professores e funcionários do Departamento De Fisiologia Vegetal pelo apoio e amizade durante este trabalho.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Biologia Celular pelo auxílio prestados.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

O que você faz é uma gota no oceano;
Porém, é isso que dá sentido à sua vida.

A. Schweitzer

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
1. Material Vegetal.....	17
2. Viabilidade.....	17
3. Embebição.....	17
4. Teor de umidade.....	18
5. Germinação.....	19
5.1. Condições de germinação.....	19
5.2. Luz e escuro.....	19
5.3. Temperatura.....	19
5.4. Velocidade de germinação.....	20
5.5. Critério de germinação.....	20
6. Caracterização dos estádios de desenvolvimento.....	20
7. Escarificação mecânica.....	21
8. Escarificação química.....	21
9. Escarificação térmica.....	21
10. Lavagem das sementes.....	22
11. Análise estatística.....	22
12. Análise "in situ".....	23
12.1. Fixação.....	23
12.2. Processamento pós-fixação.....	24
12.3. Desparafinização.....	24

12.4. Métodos de análise gerais e citoquímicos.....	24
12.4.1. Safranina e azul astra (SA) para uma visualização geral.....	24
12.4.2. Azul de toluidina a pH 4,0 (AT) para a detecção de radicais aniônicos e metacromasia.....	25
12.4.3. Xylidine Ponceau a pH 2,5 (XP) para a detecção de radicais catiônicos.....	25
12.4.4. Método do P.A.S para a detecção de polissacarídeos neutros.....	25
12.4.5. Floroglucinol para a detecção de lignina.....	26
12.4.6. Reagente de Schiff para a detecção de lignina.....	26
12.4.7. Ferricianeto férrico.....	27
12.4.8. Sulfato ferroso para detecção de taninos.....	27
12.4.9. Sudan IV para detecção de materiais graxos em geral (cutícula, cutina e suberina).....	27
12.4.10. Iodeto de potássio iodado (reagente de lugol) e H ₂ SO ₄ a 72% para a detecção de celulose.....	27
12.5. Métodos de análise citofísicos.....	28
12.5.1. Fluorescência natural.....	28

12.5.2. Fluorescência induzida por aniline blue para detecção de calose.....	28
12.5.3. Análise de birrefringência.....	28
12.5.4. Cores de birrefringência.....	29
12.5.5. Digestão com NaOH a 4% para remoção de hemiceluloses.....	29
12.5.6. Digestão com H ₂ SO ₄ a 72% para a remoção de celulose.....	29
RESULTADOS.....	31
1. Caracterização dos estádios de desenvolvimento das sementes.....	31
2. Absorção de água pela semente.....	33
2.1. Sementes em desenvolvimento.....	33
2.2. Efeito da escarificação.....	33
3. Germinação.....	36
3.1. Sementes em desenvolvimento.....	36
3.2. Relação entre germinação, acúmulo de matéria seca e teor de umidade das sementes e desenvolvimento.....	36
3.3. Efeito de luz e escuro.....	40
3.4. Efeito de temperatura.....	40
3.5. Efeito da lavagem das sementes.....	43
4. Escarificação mecânica.....	43
5. Escarificação química.....	48
6. escarificação térmica.....	48
7. Efeito da escarificação na estrutura da testa.....	55

8. Análise "in situ".....	58
8.1. Safranina e azul astra (SA).....	58
8.2. Azul de toluidina	60
8.3. Xylidine Ponceau.....	60
8.4. Método do PAS.....	60
8.5. Reativo de Schiff para lignina.....	66
8.6. Ferricianeto férrico.....	66
8.7. Sulfato ferroso.....	66
8.8. Sudan IV.....	70
8.9. Lugol e H ₂ SO ₄	70
8.10. Fluorescência natural.....	70
8.11. Azul de anilina.....	73
8.12. Microscopia de polarização.....	73
8.13. Digestão com NaOH.....	75
8.14. Digestão com H ₂ SO ₄	75
DISCUSSÃO.....	80
RESUMO.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

INTRODUÇÃO

A semente de uma angiosperma se desenvolve a partir de um óvulo fertilizado. Quando madura, a semente usualmente consiste de um embrião, resultado da fertilização da oosfera no saco embrionário e um dos núcleos do tubo polínico; de um endosperma, que se origina da fusão de dois núcleos polares no saco embrionário com o outro núcleo do tubo polínico ou de um perisperma, que se desenvolve a partir do nucelo e a testa, formada por um ou por dois tegumentos que circundam o óvulo (Esau, 1977; Cutter, 1978).

O embrião consiste de um eixo embrionário e um ou mais cotilédones. O eixo é formado pela radícula, pelo hipocótilo no qual os cotilédones estão ligados e pelo ápice. (Kozlowski & Gunn, 1972).

Os cotilédones de sementes endospérmicas são foliáceos, pois não funcionam como reserva como em Ricinus communis (Esau, 1977). Em sementes não endospérmicas, como em Phaseolus vulgaris (Banks & Muir, 1980), Canavalia ensiformis e C. gladiata, (Cortelazzo, 1989) os cotilédones são o local de deposição de material de reserva e constituem quase toda a massa da semente.

O perisperma, derivado inteiramente do tecido nucelar materno não se desenvolve e é rapidamente absorvido quando o embrião é formado, exceto em algumas espécies como Yuca (Bewley & Black, 1986) e beterraba açucareira (Artschwager, 1927).

As sementes podem ser classificadas em endospérmicas ou não endospérmicas em relação à presença ou ausência, na semente madura, de um endosperma bem desenvolvido. Alguns endospermas são relativamente maciços e são a principal fonte de reserva, dentro da semente madura, como em cereais, Ricinus communis, palmeira e leguminosas endospérmicas como feno grego e acácia meleira (Bewley & Black, 1986).

Endospermas com alta capacidade de retenção de água podem ter dupla função: fornecer reservas para o embrião e regular o balanço de água do mesmo durante a germinação (Bewley & Black, 1986).

As principais substâncias de reserva nas sementes são carboidratos, lipídios e proteínas. O amido é o carboidrato de reserva mais comumente encontrado nas sementes, embora hemiceluloses, amilóides e oligossacarídeos da série rafinose possam estar presentes, podendo inclusive ser o principal carboidrato de reserva. O amido é formado por dois homopolissacarídeos de glicose: amilose e amilopectina. A amilose é um polímero de cadeia linear de glicoses com ligações $\alpha 1,4$. Na amilopectina além das ligações $\alpha 1,4$, existem ligações $\alpha 1,6$, a cada intervalo de 10 resíduos, produzindo uma molécula ramificada. O amido é depositado em organelas subcelulares chamados grãos de amido ou amiloplastos. Estes grãos são semi-cristalinos e exibem birrefringência em forma de cruz de malta, sob luz polarizada (Banks & Muir, 1980):

Os grãos de amido têm um formato predominantemente esférico como em Canavalia (Cortelazzo, 1989), angular em milho e elípti-

co em feijão. A forma do grão é em grande parte determinada pelo conteúdo de amilose. Quanto maior for a sua quantidade, mais esférico é o grão (Bewley & Black, 1986).

As proteínas de reserva são geralmente classificadas em função de sua solubilidade. Em cereais, as mais abundantes são prolaminas, solúveis em soluções alcólicas, como por exemplo em milho, sorgo e painço ou as glutelinas, solúveis em soluções ácidas ou básicas diluídas, como em trigo, arroz e aveia. Em leguminosas, as globulinas representam a maior parcela das proteínas de reserva e são solúveis em solução salina. Como exemplo desta categoria, pode ser citada a faseolina em Phaseolus vulgaris, glicinina em Glycine max e canavalina de Canavalia sp. A principal função destas proteínas seria a de fornecer aminoácidos ou nitrogênio para as plântulas (Pernollet & Mossé, 1983).

A testa é formada pelo tegumento ou tegumentos do óvulo, como já foi mencionado anteriormente. Sua principal função é proteger o embrião do ambiente externo, contra ataques de microorganismos ou insetos, danos mecânicos, dessecação e auxiliar na dispersão. Porém em alguns casos, a casca do fruto ou até mesmo o endosperma exerce este papel, como em Amaryllidaceae, cariopses de cereais, aquênios de algumas compostas e sâmara de freixo e olmeiro (Kozlowski & Gunn, 1972).

A estrutura da testa da semente varia muito em relação às características específicas do óvulo, tais como número e espessamento dos tegumentos e padrão de vascularização, e às alterações que ocorrem nos tegumentos durante a maturação. Em algumas espé-

cies os dois tegumentos contribuem para a formação da testa como em algodão (Cutter, 1978; Joshi et al., 1967 in: Kozlowski & Gunn, 1972), Ricinus communis e Brassica (Esau, 1977). Em outros casos como nas Cucurbitaceae e muitas leguminosas como em Phaseolus e Glycine o óvulo também é bitêmico, mas apenas o tegumento externo participa do desenvolvimento da testa e o interno degenera (Cutter, 1978).

A testa da maioria das sementes impermeáveis, principalmente em leguminosas, apresenta características anatômicas especiais, geralmente a nível do tegumento externo, que conferem rigidez ao tecido. Comumente ocorre uma camada paliçádica com macroesclereídeos e abaixo desta, osteosclereídeos (Rolston, 1978). Segundo Cutter (1978) osteosclereídeos em forma de ampulheta são um caráter distintivo da família das Leguminosae.

As paredes das células, que compõe os tecidos rígidos da testa de muitas sementes são espessadas devido à deposição de celulose sobre a parede primária e a incrustações por lignina na matriz celulósica (Esau, 1977). Em algodão e Sida, por exemplo, a barreira ao fluxo de água deve-se a grandes depósitos de lignina ao nível da camada paliçádica (Reeves & Valle, 1932; Egley et al., 1986).

A celulose forma o material estrutural básico das paredes celulares nas plantas superiores. Uma molécula de celulose é composta por uma longa cadeia linear de resíduos de glicose com ligações $\beta 1,4$ (Aspinall, 1980). Estas moléculas estão arranjadas em micelas de natureza cristalina, que conferem birrefringência, sob

luz polarizada, às paredes celulares. As micelas consistem de cadeias paralelas de resíduos de glicose que se mantêm a uma distância permanente e característica entre si. Entre duas micelas ocorrem espaços microfibrilares que podem ou não ser preenchidos por lignina (Fahn, 1969).

Outras substâncias ou estruturas especiais podem estar envolvidas na composição da testa. Em muitas espécies a impermeabilidade à água está correlacionada com cutículas espessas ou depósitos de cera externos a esta estrutura como em Prosopis spiciigera e P. stephaniana (Trivedi et al., 1979), Prosopis tamarugo (Habit, 1981 in: Valenti et al., 1986), Halimium halimifolium (Peña et al., 1988), suberina entre as células da camada paliçádica como em Cercidium floridum (Scott et al., 1962), presença de "linha lúcida" em Melilotus alba (Hamly, 1932), pectato de cálcio em Gymnocladus dioica (Raleigh, 1930), tipo de abertura micropilar (Rolston, 1978), calose em Sesbania punicea e S. bispinosa (Bevilacqua et al., 1987) e Trifolium (Bhalla & Slattery, 1984) e fenóis como em Halimium halimifolium (Peña et al., 1987) e em variedades de testa rígida de Glycine max (Harris, 1987).

Em outras espécies como em Acacia auriculiformis o espessamento da camada de macroesclereídeos mais uma cutícula espessa têm pouca importância no grau de impermeabilização à água. Por outro lado, o aumento de dormência ocorre logo após à dispersão das sementes concomitante a uma diminuição drástica do seu conteúdo de água (Pukittayacamee & Hellum, 1988).

No processo de endurecimento da testa a taxa e o grau de dessecação da semente são de fundamental importância, já que esta rigidez e impermeabilidade aumenta à medida que o conteúdo de água da semente decai (Bewley & Black, 1982).

Durante a fase de maturação o conteúdo de água da semente é de grande importância. O dessecação constitui um evento integrante do processo do desenvolvimento da maioria das sementes. De fato, o desenvolvimento só se completa quando a semente está com baixos teores de umidade. Possivelmente o dessecação tem um papel fundamental na interrupção dos processos de desenvolvimento essenciais para a germinação, pois a reidratação de sementes quiescentes conduz à germinação (Bewley & Black, 1986).

O desenvolvimento da semente em relação à resistência ao dessecação pode ser dividido em duas partes. Segundo Kermode e Bewley (1986), durante os eventos associados com o desenvolvimento, a semente passa de um período intolerante ao dessecação, que corresponde às fases de divisão celular, expansão das células e deposição de materiais de reserva, para um período tolerante ao dessecação, que corresponde à fase de redução do metabolismo até atingir o seu grau de dessecação máximo. Em soja por exemplo, o acúmulo de matéria seca requer níveis adequados de água para que haja expansão celular e metabolismo de assimilados para produzir proteínas e óleo (Egli, 1990).

De uma maneira geral, o desenvolvimento da semente e a maturação estão associados a uma perda global no seu conteúdo de água. Para muitas sementes a maturidade fisiológica é atingida,

quando o seu conteúdo de água decai para 50-60% (Tekrony *et al.*, 1979 in: Adams & Rinne, 1981; Rosenberg & Rinne, 1986). Em Zea mays, a semente não germina até que o conteúdo de água do endosperma tenha caído para 30% (Neill *et al.*, 1987). Isto significa que os processos fisiológicos da produção da semente terminaram, embora a semente não esteja completamente madura (Adams & Rinne, 1981).

Muitos estudos sugerem que o período de dessecação precoce causa uma alteração no padrão de síntese protéica dentro dos cotilédones e endosperma da semente como um todo (Kermode & Bewley, 1986). Mas o dessecação prematuro de sementes em desenvolvimento durante os estádios de tolerância ao dessecação não afeta a expressão do genoma, embora afete a passagem normal da atividade transcricional de um período de desenvolvimento para um período germinativo em Ricinus communis (Kermode *et al.*, 1989a).

Tem sido demonstrado que a desidratação não é um pré-requisito para a germinação, pois em algumas espécies, embriões de sementes destacadas da planta mãe em diferentes estádios de desenvolvimento são capazes de germinar (Walbot *et al.*, 1972; Obendorf *et al.*, 1980; Adams & Rinne, 1981; Figueiredo & Pereira, 1985; Welbaum & Bradford, 1989). O mesmo se verifica em sementes secas prematuramente de maneira artificial, como em milho (Neill *et al.*, 1987) e Phaseolus vulgaris cv Goiano Precoce (Figueiredo & Pereira, 1990). Em Ricinus communis secagem prematura, durante a fase de tolerância ao dessecação, seguido de reidratação capacita as sementes a germinar, quando destacadas da plan-

ta mãe (Kermode & Bewley, 1989). Aparentemente a capacidade e a velocidade de germinação aumentam à medida que a semente avança em direção à maturidade (Obendorf et al., 1980; Adams & Rinne, 1981; Figueiredo & Pereira, 1985).

Embora estudos com embriões isolados sejam utilizados para elucidar os fatores envolvidos no término do desenvolvimento das sementes, esta abordagem apresenta certas limitações. Os processos de dessecação natural ocorrem quando o embrião está contido dentro da semente como um todo, permitindo assim uma série de interações entre o embrião e os tecidos que o envolvem, não apenas durante a embebição subsequente mas também durante o período de dessecação. Assim, o embrião não adquire independência completa do ambiente da semente, mesmo na fase de desidratação completa. O dessecação e a reidratação do embrião, dentro da semente inteira, devem ser pré-requisitos para a completa cessação do metabolismo do desenvolvimento e seu reinício na germinação e crescimento (Kermode et al., 1989b).

Quando a semente da maioria da espécies está completamente madura o teor de água é extremamente baixo. Em feijão por exemplo, o conteúdo de água cai drasticamente de cerca de 80% para 10% (Walbot et al., 1972).

As atividades fisiológicas nas sementes alteram-se com o conteúdo de água. A transição de um estado anidro para outro completamente hidratado nos organismos, ocorrem em estádios discretos que são importantes, pois relacionam os mecanismos de deterioração das sementes e danos durante estresses ambientais

(Vertucci, 1989).

Quanto à longevidade das sementes, três fatores são muito importantes: água, temperatura e oxigênio (Roberts & Ellis, 1989).

Com respeito à resposta à água, as sementes podem ser classificadas em ortodoxas e recalcitrantes (Roberts, 1973). As sementes ortodoxas podem ser secas sem danos a teores muito baixos de umidade, 5% ou menos, com base em peso fresco (Labouriau, 1983). Já as sementes recalcitrantes devem reter um conteúdo de umidade relativamente alto, para manter sua viabilidade máxima. Estas sementes não toleram dessecação excessivo e perdem sua viabilidade em pouco tempo, mesmo quando estocadas em condições de umidade (Bewley & Black, 1982).

A embebição é um processo primário essencial durante a germinação das sementes. É um processo passivo e ocorre devido às diferenças no potencial de água das sementes e aquele do meio externo (Houben, 1966 in: Shaykewich & Williams, 1971), não tendo particular relação com a viabilidade das sementes (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975).

A entrada de água na semente é determinada por três fatores: composição das sementes, permeabilidade da testa da semente ou do fruto à água e disponibilidade de água no ambiente, na fase líquida ou gasosa (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975). A testa das sementes têm uma resistência maior ao fluxo de água do que as partes internas, especialmente antes de se tornar completamente hidratada (Shaykewich & Williams, 1971). Em relação à capacidade

de retenção de água foi verificado em soja que o eixo embrionário exibe uma capacidade maior de reter água do que os cotilédones ou a testa. Isto pode ser explicado devido a diferenças de composição química entre as várias partes da semente (Mc Donald et al., 1988).

A sobrevivência da semente durante a embebição é outro aspecto relevante. A rápida absorção de água por sementes secas pode resultar em danos por embebição (Powell & Matthews, 1978 in: Roberts & Ellis, 1989). Embora o fenômeno seja particularmente pronunciado quando as sementes estão totalmente imersas, pode ocorrer também em testes de germinação (Ellis et al. 1982 in: Roberts & Ellis, 1989).

A testa das sementes de muitas leguminosas protege o embrião da ruptura celular e da lavagem de substâncias intracelulares durante a embebição (Duke & Kakefuda, 1981; Duke et al., 1986). Em soja a rápida embebição induz a um aumento de lavagem destas substâncias e em consequência a um decréscimo na sua viabilidade. A presença da epiderme, nesta espécie, reduz a lavagem de materiais intracelulares durante embebição rápida ou lenta. Por outro lado os outros tecidos da testa só protegem a semente contra os efeitos da embebição rápida (Duke et al. 1986). A eliminação destas substâncias é explicada por alterações que ocorrem ao nível das membranas celulares quando a semente é desidratada. Se o conteúdo de água cai para teores abaixo de 20%, a estrutura das membranas ao nível das moléculas de lipídios passa de um arranjo em camada dupla para um arranjo hexagonal. Mas as-

sim que a semente inicia seu processo de reidratação, a semente volta a apresentar o arranjo normal em camada dupla e isto ocorre em poucos minutos ou mesmo segundos. Este período corresponde a uma maior saída de solutos (Levitt, 1980).

Assim, em condições normais sempre há uma liberação de colóides, de gases adsorvidos e uma rápida eliminação de solutos como açúcares, ácidos orgânicos, íons, aminoácidos e proteínas (Bewley & Black, 1986), na fase inicial de embebição. Mas este fenômeno tende a estabilizar com o restabelecimento da integridade da membrana (Simon, 1974). Além disso, a semente requer outros processos biofísicos e bioquímicos para a sua germinação, como ativação de várias enzimas e vários passos metabólicos (Mayer e Shain, 1974 in: Simon et al., 1976) e finalmente o alongamento da raiz e rupturas da testa.

Para que estes processos ocorram normalmente a semente deve ser mantida em condições adequadas de temperatura e gases, especialmente oxigênio.

As sementes de diferentes espécies requerem diferentes regimes de temperatura para germinar. Para Zea mays a temperatura ótima para germinação é próxima de 35°C, embora sementes desta espécie possam germinar a partir de 8°C. Para Hordeum sativum a temperatura mínima para germinação é 5°C, mas a temperatura ótima é em torno de 25°C (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975). Silene, Ajuga (Thompson, 1970 in: Simon et al., 1976), Cucumis sativum e Phaseolus aureus são sementes sensíveis ao frio e não germinam em temperaturas abaixo de 11-12°C (Simon et al., 1976). Em Gossypium

barbadense, as sementes germinam em temperaturas acima de 15°C até 30°C. Temperaturas abaixo de 15°C ou acima de 30°C são prejudiciais nesta espécie, sendo que temperatura de 45°C impede completamente a germinação (Abdelmagid & Osman, 1977). Em Vigna radiata, as sementes germinam mais rápido a 40°C, quando a água não é fator limitante, embora as taxas de alongamento da radícula sejam mais rápidas em temperaturas mais baixas (Fyfield & Gregory, 1989). Agrostemma e Sinapis alba (Simon et al., 1976) são resistentes ao frio, e germinam bem em temperaturas próximas a 5°C, embora a velocidade de germinação seja menor do que a temperaturas mais altas.

Além das espécies que têm a sua germinação promovida em temperaturas constantes, existem outras em que a germinação ocorre em regimes de alternância de temperatura como Agrostis alba (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975) e Vitis vinifera (Pereira & Maeda, 1986).

A germinação das sementes requer gasto de energia, que é obtida pelas células vivas através de processos de oxidação. Muitos autores demonstraram que certas sementes têm a sua germinação promovida em presença de O₂ acima daquela encontrada na atmosfera normal (20%). Por exemplo, sementes de Daucus carota e Rumex crispus não germinam no escuro a menos que a concentração de O₂ seja aumentada (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975). Em Beta vulgaris cv Britta o aumento do teor de O₂ no meio promove a sua germinação. (Klein e Pereira, 1986). Por outro lado, Typha latifolia e Cynodon dactylon germinam melhor em concentrações de O₂ abaixo de

20% (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975).

Existem sementes que mesmo viáveis não germinam, embora as condições de água, gases (O_2) e temperatura estejam aparentemente adequadas. Estas sementes são denominadas dormentes e precisam de tratamentos especiais para germinar. A dormência pode ser devida a vários fatores, tais como impermeabilidade do tegumento à água e a gases, imaturidade do embrião, presença de inibidores ou ausência de promotores de germinação, ou exigências especiais de luz ou temperatura (Bewley & Black, 1982).

Entre os vários tipos de dormência, a impermeabilidade do tegumento à água é bastante comum, principalmente nas leguminosas arbóreas, embora ocorra em muitas outras famílias (Rolston, 1978). Em relação à quebra da dormência de sementes impermeáveis vários tratamentos podem ser utilizados. É frequente o uso de substâncias químicas, tais como solventes orgânicos (álcool, acetona) que removem a camada cerosa da semente de muitas leguminosas ou ácidos fortes, como o ácido sulfúrico concentrado, que é efetivo para sementes de testa rígida, como por exemplo, Melilotus alba (Hamly, 1932), Sesbania punicea e S. bispinosa (Graaf & Van Staden, 1983), Atriplex repanda (Hernandez, 1978), Gymnocladus dioicus (Frett & Dirr, 1979), Gleditschia triacantos (Heit, 1942 in: Liu et al., 1981), Tetrapleura tetraptera (Odoemena, 1988). O mecanismo de ação destes ácidos não está ainda muito claro, mas envolve provavelmente decomposição química de componentes das paredes celulares (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975). Também é bastante comum a utilização de água fervente,

pois oferece bons resultados para leguminosas como Sesbania punicea (Graaf & Van Staden, 1983) e Gleditschia triacantos (Heit, 1942 in: Liu et al., 1981). Aquecimento a seco, também é adequado para reduzir impermeabilidade de muitas sementes como Medicago lupulina (Sidhu, 1971 in: Maun, 1977) e Rhus javanica (Washitani, 1988). Existe ainda um terceiro método, também muito utilizado, a escarificação mecânica, desenvolvido por Hughes em 1915, que consiste na abrasão da testa com superfícies rugosas, danos por objetos metálicos e outros (Rolston, 1978). Este método tem sido empregado em sementes Halimium halimifolium (Peña et al., 1988), Avena fatua (Raju et al., 1988), Tetrapleura tetraptera (Odoemena, 1988), Sesbania punicea e S. bispinosa (Graaf & Van Staden, 1983) e Sida spinosa (Egley, 1976). Excisão de partes da unidade de dispersão é eficaz para monocotiledôneas como em Hordeum vulgare (Lenoir et al., 1986) e Paspalum notatum (West & Marousky, 1989). Segundo Hamly (1932), através da danificação da testa a água pode penetrar na semente, que estará então em condições de germinar.

A família Bixaceae é constituída por um único gênero, Bixa, nativo da América Tropical, de porte arbustivo e extensamente cultivada (Joly, 1975). Este gênero possui pouquíssimas espécies, como por exemplo B. orellana (urucum), que é uma espécie economicamente importante com potencial para a indústria farmacêutica e de alimentos.

O fruto desta planta é uma cápsula deiscente, que se abre em 2 valvas (Leon, 1968 in: Rivera & Flores, 1983), urceolada, bilobada, equinada (Barroso, 1978), embora existam linhas genéticas sem a presença de "espinhos" (Rodriguez & Enriquez, 1983).

Esta espécie possui sementes crassas, obovóides, cotilédonos foliáceos (Barroso, 1978) e endosperma nuclear (Chopra & Kaur, 1965). Elas possuem um arilo pastoso, cuja cor varia do laranja ao marrom escuro (Joly, 1975). Este arilo contém vários carotenóides, entre os quais α -bixina, β -bixina, α -norbixina e β -norbixina (Reith, 1971).

Estes carotenóides são o principal objeto de estudo da maioria dos trabalhos executados com esta espécie, pois podem ser um substituto interessante para os corantes sintéticos prejudiciais à saúde humana. Por outro lado, poucos trabalhos foram realizados com as sementes propriamente ditas, especialmente em relação à sua fisiologia e anatomia.

Rivera & Flores (1983) estudaram a estrutura da semente em relação a sua germinação e concluíram que estas sementes germinam através da "taça" do hilo na região proximal do rudimento seminal.

Chopra & Kaur (1965) analisaram a embriogênese e estrutura das sementes maduras e concluíram que, em relação à testa, o tegumento externo se especializa na produção de carotenóides e o tegumento interno se espessa muito, passando a apresentar o padrão característico das leguminosas arbóreas (Rolston, 1978).

Kiok (1978) realizou uma análise bioquímica das sementes maduras e do corante para verificar a ocorrência de compostos fenólicos na semente. O único fenol encontrado por esta pesquisadora foi o ácido salicílico.

Assim, devido a grande importância econômica e aos inúmeros aspectos pouco explorados do desenvolvimento das sementes de Bixa orellana, o presente trabalho teve como objetivo verificar, nas sementes maduras recém colhidas desta espécie, qual é o mecanismo de dormência e quais os tratamentos mais adequados para quebrá-la.

Foi também determinada a etapa do desenvolvimento em que as sementes adquirem capacidade de germinar e quando se estabelece a dormência, através de estudos fisiológicos e estruturais da testa das mesmas. Para a análise estrutural utilizaram-se métodos anatômicos, citoquímicos e citofísicos.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - **Material vegetal:** O acompanhamento do desenvolvimento das sementes de Bixa orellana (urucum) foi feito a partir da antese, através da marcação das flores com etiquetas devidamente datadas. Os frutos foram coletados em plantas localizadas no Campus da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queirós (ESALQ), em Piracicaba, São Paulo.

Para estudos das condições de germinação e mecanismo de dormência foram utilizadas sementes maduras fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

2 - **Viabilidade:** Para determinar a viabilidade das sementes utilizou-se o teste do tetrazólio (Delouche et al. 1962). As sementes foram cortadas lateralmente e imersas em solução de cloreto de 2,3,5, trifeniltetrazólio (TTC) a 1%. Os frascos contendo a solução com as sementes foram mantidas no escuro, a 30°C, durante 24 horas. Foram analisadas 4 repetições de 25 sementes.

3 - **Embebição:** A absorção de água pelas sementes, tanto maduras como em desenvolvimento, foi estimada através do aumento de peso após embebição por diferentes períodos, com base no peso fresco inicial, determinado em balança analítica. As sementes foram pesadas em 4 grupos de 25.

A relação utilizada foi:

$$\frac{\text{peso fresco final} - \text{peso fresco inicial}}{\text{peso fresco inicial}} \times 100$$

O aumento da permeabilidade à água também foi avaliado através de observação visual do aumento de volume das sementes submetidas a tratamentos de escarificação térmica e química.

4 - Teor de umidade: O teor de umidade das sementes em cada estágio de desenvolvimento, foi determinado após secagem das sementes em estufa a 80°C por 48 horas. Foi também utilizado um método de secagem rápida, através de aparelho de infra-vermelho, com intensidade previamente padronizada, durante 90 minutos, quando se tornou necessário obter caracterizações imediatas dos estágios de desenvolvimento, baseadas em peso seco e teor de umidade.

O teor de água na semente foi calculado a partir da relação:

$$\frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso fresco}} \times 100$$

5 - Germinação

5.1 - Condições de germinação: Para estudos de germinação utilizaram-se placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Estas placas, forradas com papel de filtro umedecido, foram esterilizadas em estufa a 105°C por 3 horas. As sementes foram colocadas para germinar nestas placas, contendo solução de nistatina (100U/ml) e mantidas em câmara de germinação sob luz contínua proveniente de 4 lâmpadas fluorescentes brancas ($320\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$) e temperatura constante de 25°C, exceto nos experimentos em que foi necessário alterar estas condições. Para cada experimento foram utilizadas 4 repetições de 25 sementes. A duração dos experimentos variou de acordo com os tratamentos.

5.2 - Luz e escuro: Para o tratamento de luz, as sementes foram mantidas em câmara de germinação a 25°C sob luz branca contínua proveniente de 4 lâmpadas fluorescentes brancas ($320\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$). Para o tratamento de escuro, as placas de Petri, contendo as sementes, foram recobertas com 4 sacos de polietileno de cor preta, e mantidas na mesma câmara.

5.3 - Temperatura: As sementes foram expostas a temperaturas constantes de 15, 20, 25, 30 e 35°C durante 15 dias, em câmara de germinação com luz contínua.

Foram também utilizados regimes de temperatura alternada de 20-25°C e 25-30°C por períodos de 12 horas em cada temperatura.

5.4 - Velocidade de germinação: A velocidade de germinação das sementes foi estimada através do cálculo do tempo médio de germinação (Labouriau, 1983), de acordo com a seguinte expressão:

$$\bar{t} = \sum n_i t_i / \sum n_i$$

$$s_t^2 = \sum n_i (t_i - \bar{t})^2 \cdot (-1 + \sum n_i)^{-1}$$

$$s = \sqrt{s_t^2}$$

onde:

t_i = tempo de germinação

n_i = % de germinação no tempo t_i

\bar{t} = tempo médio de germinação

s_t^2 = variância

s = desvio padrão

5.5 - Critério de germinação: A emergência da radícula de dentro dos envoltórios da sementes foi o critério adotado para determinar o término do processo germinativo (Labouriau, 1983).

6 - Caracterização dos estádios de desenvolvimento: O acompanhamento do desenvolvimento das sementes foi feito a partir da antese, através da marcação das flores com etiquetas devidamente datadas. Para determinação dos estádios de desenvolvimento foram retiradas amostras de 5 frutos em intervalos de 15 dias. Nestas amostras foram observadas características como coloração de frutos e sementes, comprimento, teor de umidade, peso fresco e seco. Estas características foram utilizadas para agrupar as sementes em estádios de desenvolvimento fisiológico sucessivos desde a sua formação até a maturação.

7 - **Escarificação Mecânica:** O tegumento das sementes maduras, secas, foi cortado lateralmente com bisturi, ou foi lixado com lixa grossa para madeira.

8 - **Escarificação química:** As sementes foram imersas em ácido sulfúrico P.A por 5, 10, 15 e 20 minutos, com agitação ocasional. Os recipientes contendo o ácido com as sementes foram colocados em banho de gelo para evitar o aquecimento, pois os carotenóides reagem com o ácido liberando calor. A seguir estas sementes foram lavadas em água corrente, durante 24 horas.

As sementes que não germinaram com os tratamentos de escarificação química foram seccionadas lateralmente e submetidas ao teste do tetrazólio.

9 - **Escarificação Térmica:**

9.1 - As sementes foram imersas em água quente ($98^{\circ}\text{C}\pm 2$) por 30, 60 e 90 segundos, resfriadas com água a $18^{\circ}\text{C}\pm 2$ e colocadas para germinar.

9.2 - Sementes embebidas foram colocadas em estufa, a 80°C por 15 minutos, sendo então transferidas para geladeira a 10°C por 30 minutos. A seguir as sementes foram colocadas para germinar.

9.3 - Sementes secas foram colocadas em estufa a 100°C por 1, 3, 5, 10 e 15 minutos. A seguir foram esfriadas à temperatura ambiente (20-25°C) e finalmente colocadas para germinar.

9.4 - Sementes embebidas, cortadas e intactas foram colocadas em estufa, à temperatura de 50°C por 1 e 2 horas, sendo então transferidas para câmara de germinação onde foram mantidas até o final do experimento.

A viabilidade e a permeabilidade das sementes submetidas aos tratamentos de escarificação térmica foram verificadas conforme os procedimentos já descritos anteriormente.

10 - Lavagem das sementes: Sementes cortadas e intactas foram mantidas sob água corrente durante 3, 6, 12 e 24 horas. E a seguir levadas à câmara de germinação.

11 - Análise Estatística: A análise estatística foi feita utilizando-se a análise de variância simples, seguido do método de Tukey, para comparação entre mais de duas médias, o teste t para comparação entre duas médias e análise fatorial para duas ou mais variáveis (Pimentel Gomes, 1982).

12 - Análise "in situ"

12.1 - Fixação: Sementes maduras e nos diversos estádios de desenvolvimento foram submetidas aos seguintes processos de fixação:

12.1.1 - Fixação em solução de formol, ácido acético e etanol 50% na proporção de 5:5:90 v/v/v (FAA 50), durante 24 horas (Johansen 1940) para a posterior realização de diversos métodos de análise "in situ".

12.1.2 - Fixação em formaldeído a 4%, durante 24 horas a 5°C, seguindo-se várias lavagens em água destilada, durante 15 minutos (Lillie 1948 in: Clark 1981; Kiernan 1981), para a posterior detecção de proteínas e polifenóis.

12.1.3 - Fixação em solução de etanol absoluto e ácido acético na proporção de 3:1 v/v por 40 minutos, seguindo-se várias lavagens com água destilada (Lison, 1960), para a posterior detecção de polissacarídeos neutros e grupos carbonila.

12.1.4 - Fixação em solução aquosa de formaldeído a 4% e sulfato ferroso a 2%, durante 48 horas, seguindo-se 6 lavagens de 15 minutos cada uma, para a detecção de taninos (Johansen, 1940).

corante. A contracoloração foi feita com azul astra a 1% durante 1 minuto. A seguir, os cortes foram lavados com água destilada para retirar o excesso de corante. As lâminas assim coradas foram então desidratadas em série crescente de etanol, xilol durante 10 minutos e montadas em bálsamo do Canadá (Johansen, 1940).

12.4.2 - Azul de toluidina a pH 4,0 (AT) para a detecção de radicais aniônicos e metacromasia: Procedeu-se à coloração dos cortes fixados em FAA 50 pelo AT a 0.025% em tampão McIlvaine (77,1ml de Na_2PO_4 0,2M e 122,9ml de ácido cítrico 0,1M) a pH 4,0 durante 15 minutos e a temperatura ambiente, seguindo-se 3 banhos rápidos em água destilada, secagem ao ar, xilol durante 10 minutos e montagem em bálsamo do Canadá (Vidal 1970).

12.4.3 - Xylidine Ponceau a pH 2,5 (XP) para a detecção de radicais catiônicos: As sementes foram coradas durante 15 minutos a temperatura ambiente com solução aquosa de ácido acético a 3% e xylidine Ponceau a 0,1%, seguindo-se lavagem em ácido acético a 3% por 30 minutos, e água destilada durante 5 minutos. A desidratação foi feita em etanol a 95% e a 100% (5 minutos cada), seguindo-se banho em xilol durante 10 minutos e montagem em bálsamo do Canadá (Vidal, 1970).

12.4.4 - Método do P.A.S para a detecção de polissacarídeos e glicoproteínas: Os cortes fixados em etanol-acético foram oxidados durante 10 minutos em ácido periódico a 0.05%, la-

vados em água, imersos em reativo de Schiff (Lillie 1954) durante 8 minutos, imersos em água sulfurosa (18 partes de água destilada, 1 parte de HCl 1N e 1 parte de metabissulfito de sódio a 10%), desidratados em etanol com concentrações crescentes até 100% e montados em bálsamo do Canadá (Maia 1979).

Como controle deste método, lâminas contendo os cortes analisados foram imersas em reativo de Schiff sem terem sido oxidadas em ácido periódico, procedendo-se às demais etapas como descrito no parágrafo anterior.

12.4.5 - Floroglucinol para a detecção de lignina: As lâminas contendo os cortes fixados em FAA 50, foram imersas em solução de floroglucina a 1% em etanol a 95% , durante 2 horas e a seguir HCl diluído em 3 partes de água destilada. As lâminas foram montadas em água, lutadas com esmalte e observadas em microscópio "Zeiss" para ser verificado o aparecimento da cor púrpura (O'Brien & Mc Cully, 1981).

12.4.6.- Reagente de Schiff para a detecção de lignina: Os cortes fixados em etanol-acético foram colocados em reagente de Schiff por um período de 1 hora. A seguir foram lavados com metabissulfito de sódio a 5% em solução de ácido clorídrico a 1%, montados em água e lutados com esmalte (O'Brien, & Mc Cully, 1981).

12.4.7 - Ferricianeto férrico: Os cortes, fixados em formol a 4%, foram tratados durante 10 minutos com solução contendo 10ml de ferricianeto de potássio a 1%, 75ml de cloreto férrico a 1% e 15ml água destilada. A seguir foram lavados com ácido acético a 1%. Por fim foram imersos em água, recobertos com lamínula, lutados com esmalte (Lison, 1960).

12.4.8 - Sulfato ferroso para detecção de taninos: Os materiais fixados em formaldeído e sulfato ferroso, após a inclusão em parafina, corte com 8 um de espessura e desparafinização, foram montados em bálsamo do Canadá, para a visualização de ácido tânico (Johansen, 1940).

12.4.9 - Sudan IV para a detecção de materiais graxos em geral (cutícula, cutina e suberina): As lâminas foram colocadas em Sudan IV glicerinado durante a noite e a seguir recobertas com lamínula e lutadas com esmalte (Johansen, 1940).

12.4.10 - Iodeto de potássio iodado (reagente de lugol) e H_2SO_4 a 72% para detecção de celulose: Os materiais fixados em FAA 50 receberam uma gota de lugol e a seguir foram recobertos com lamínula e observados sob microscópio "Zeiss" para localização de celulose, que apresenta coloração castanha. Após a detecção de celulose colocou-se uma gota de H_2SO_4 a 72% entre lâmina e lamínula (Johansen, 1940).

12.5 - Métodos de análise citofísicos:

12.5.1 - Fluorescência natural: Cortes de materiais fixados em FAA 50 após desparafinização, foram imersos em óleo não fluorescente durante um mínimo de 24 horas, seguindo-se montagem com lamínula e vedação com esmalte. A seguir, foram observados em microscópio "Zeiss" de fluorescência, com filtro de excitação com $\lambda = 450-490\text{nm}$ e filtro de barragem com $\lambda = 510-520\text{nm}$ para a observação da fluorescência natural.

12.5.2 - Fluorescência induzida por aniline-blue para detecção de calose: Os materiais fixados em FAA 50 foram corados com aniline-blue a 0.005% em solução de K_2HPO_4 0.15M, montados em água, vedados com esmalte e observados em microscópio de fluorescência. O controle foi feito com cortes que receberam somente solução de K_2HPO_4 (Jensen, 1962 in: Bevilacqua *et al.*, 1987).

12.5.3 - Análise da birrefringência: Cortes desparafinizados, obtidos após diversos métodos de fixação foram imersos por 2 horas e montados em água destilada, sendo a seguir observados em microscópio Pol Zeiss com analisador e polarizador cruzados, para a observação de birrefringência da testa, paredes celulares em geral e grãos de amido.

12.5.4 - Cores de birrefringência: Para essas observações procedeu-se como em 12.5.3, acoplando-se ao microscópio o compensador vermelho de 1ª ordem, com direção de propagação a 45° em relação ao polarizador e analisador e introduzindo um retardo óptico conhecido, com $\lambda = 551\text{nm}$. As diferentes cores de birrefringência foram visualizadas com o giro da platina do microscópio a partir da soma ou subtração dos retardos ópticos introduzidos pelos materiais.

12.5.5. - Digestão com NaOH a 4X para remoção de hemiceluloses: Os materiais fixados com FAA 50 foram colocados em NaOH a 4% durante 5 minutos, a aproximadamente 20°C, para a remoção de hemiceluloses (Egley, 1986). A seguir os cortes foram lavados com água destilada, recobertos com lamínula e lutados com esmalte. As observações foram feitas em microscópio "Pol Zeiss", conforme descrito nos itens 12.5.3 e 12.5.4..

12.5.6 - Digestão com H₂SO₄ para remoção de celulose: Os materiais fixados em FAA 50 receberam uma gota de H₂SO₄ a 72% (Johansen, 1940), durante 15 segundos e a seguir foram lavados em água destilada, recobertos com lamínula e observados em microscópio "Pol Zeiss", conforme descrito nos itens 12.5.3 e 12.5.4.

RESULTADOS

1 - Caracterização dos estádios de desenvolvimento das sementes:

Para avaliar o comportamento das sementes em desenvolvimento com relação à capacidade de germinação, foi necessário agrupá-las em estádios de desenvolvimento de acordo com índices de idade fisiológica que caracterizassem o maior número possível de fases pelas quais passam as sementes durante o desenvolvimento.

Foram distinguidos 7 estádios com base nas características morfológicas das sementes e frutos, peso seco e fresco das sementes e frutos e teor de umidade das sementes. Os resultados são mostrados na tabela 1.

O teor de umidade das sementes decresceu à medida que o seu desenvolvimento aumentou até apresentar um valor muito baixo no último estágio (E7), quando as sementes já estavam completamente maduras.

Analisando o peso seco das sementes, observou-se que durante os 4 estádios iniciais foi ocorrendo um aumento gradual de matéria seca até atingir o ponto máximo de acúmulo no estágio E4. A partir daí não ocorreu mais nenhum acúmulo até a fase final de desenvolvimento.

TABELA 1 - Caracterização dos estádios de desenvolvimento das sementes de Bixa orellana (L). Os valores numéricos representam a média \pm limite de confiança de 100 sementes ou de 10 frutos.

EST. DESENV.	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
COMP. SEM. (cm)	0.53 \pm 0.03	0.60 \pm 0.05	0.59 \pm 0.05	0.60 \pm 0.05	0.56 \pm 0.06	0.58 \pm 0.04	0.57 \pm 0.05
COMP. FRUTO (cm)	4.80 \pm 0.30	6.20 \pm 0.30	5.70 \pm 0.30	6.00 \pm 0.40	5.70 \pm 0.30	5.20 \pm 0.60	5.30 \pm 0.50
PF SEM. (mg)	21.10 \pm 1.18	50.50 \pm 4.50	60.50 \pm 0.25	73.90 \pm 3.63	52.90 \pm 3.61	33.90 \pm 0.75	25.90 \pm 0.86
PS SEM. (mg)	3.00 \pm 0.27	8.80 \pm 0.34	13.90 \pm 0.88	26.30 \pm 1.40	24.90 \pm 1.00	25.00 \pm 0.57	23.20 \pm 0.89
PF FRUTO (g)	4.70 \pm 0.80	8.90 \pm 1.30	7.90 \pm 1.22	10.50 \pm 1.35	5.00 \pm 2.99	3.20 \pm 0.23	3.40 \pm 0.32
PS FRUTO (g)	0.68 \pm 0.14	1.25 \pm 0.22	1.53 \pm 0.14	2.09 \pm 0.17	2.20 \pm 0.20	2.24 \pm 0.19	2.41 \pm 0.02
CARACTERÍSTICA DA SEMENTE	obovóide; vermelho pálido; brilhante	obovóide; vermelho pálido; brilhante	obovóide; vermelho pálido; brilhante	obovóide; vermelho; brilhante	cuneiforme; vermelho intenso; opaca	cuneiforme; vermelho intenso; opaca	cuneiforme; vermelho intenso; opaca
CARACTERÍSTICA DO FRUTO	ovalado; verde; endocarpo branco	ovalado; verde; endocarpo branco	ovalado; verde; endocarpo branco	ovalado; verde com regiões alaranjadas; endocarpo branco com regiões marrons	ovalado; verde amarelado com regiões marrons; endocarpo marrom com algumas regiões brancas	ovalado; marrom claro; endocarpo totalmente marrom	ovalado; marrom escuro; endocarpo totalmente marrom
DEISC. FRUTO	fechado	fechado	fechado	fechado	fechado	ápice aberto	aberto
TEOR. UMID. (%)	85.50 \pm 0.50	82.40 \pm 0.98	77.00 \pm 1.37	64.41 \pm 1.68	52.90 \pm 1.32	26.40 \pm 0.20	10.40 \pm 0.48

2 - Absorção de água pela semente:

2.1 - Sementes em desenvolvimento: A análise da absorção de água por sementes embebidas foi feita durante 24 horas, sendo os resultados mostrados na figura 1. Observa-se que nas primeiras 6 horas houve uma embebição rápida das sementes. No período seguinte, das 6 às 12 horas, ocorreu uma embebição mais lenta, porém não significativa estatisticamente em relação ao período anterior. E após este período não houve praticamente nenhuma embebição até o final do experimento.

Observa-se também que nos 3 primeiros estádios praticamente não ocorreu embebição. Nos estádios E4 e E5 a porcentagem de embebição foi significativamente maior em relação aos anteriores, mas não houve diferença estatística entre estes dois estádios de desenvolvimento. No estádio E6 houve uma embebição maior, significativa estatisticamente em relação aos estádios anteriores, exceto em relação ao estádio E5. No último estádio de desenvolvimento (E7) não ocorreu praticamente embebição.

2.2 - Efeito da escarificação: A análise da absorção de água pelas sementes maduras, escarificadas mecanicamente e intactas, foi feita durante 24 horas, sendo os resultados mostrados na figura 2. Observa-se que a embebição das sementes intactas foi muito baixa se comparada com as sementes escarificadas. Nestas últimas verifica-se que houve uma embebição rápida, nas primeiras 6 horas. Das 6 às 12 horas houve uma embebição mais lenta, sem

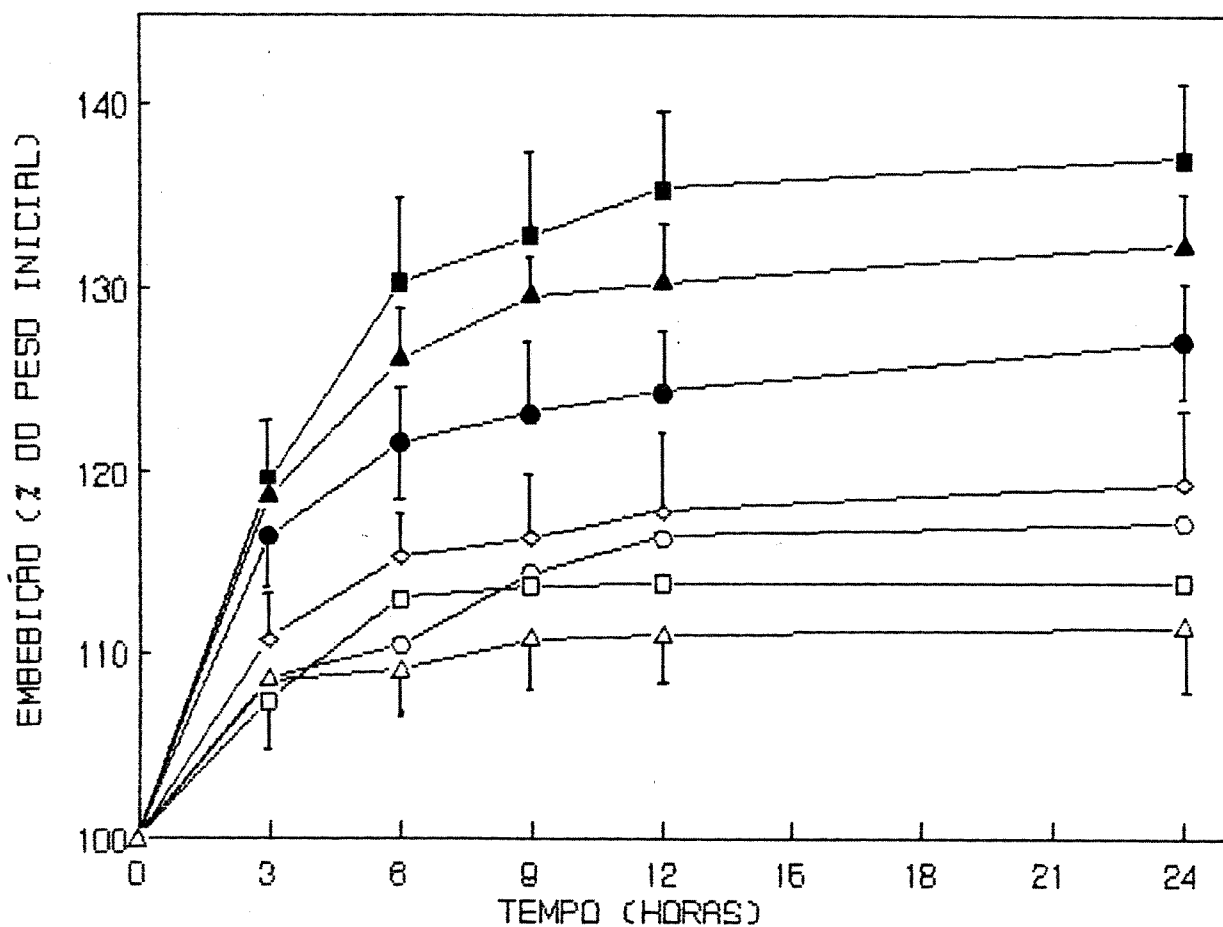


FIGURA 1 - Absorção de água por sementes em desenvolvimento de Bixa orellana, durante 24 horas, em porcentagem de aumento de peso em relação ao peso fresco inicial. Barras verticais representam o intervalo de confiança da média a nível de 5%.

▲ ESTÁDIO E1 □ ESTÁDIO E2 ○ ESTÁDIO E3 ● ESTÁDIO E4
 ▲ ESTÁDIO E5 ■ ESTÁDIO E6 ◇ ESTÁDIO E7

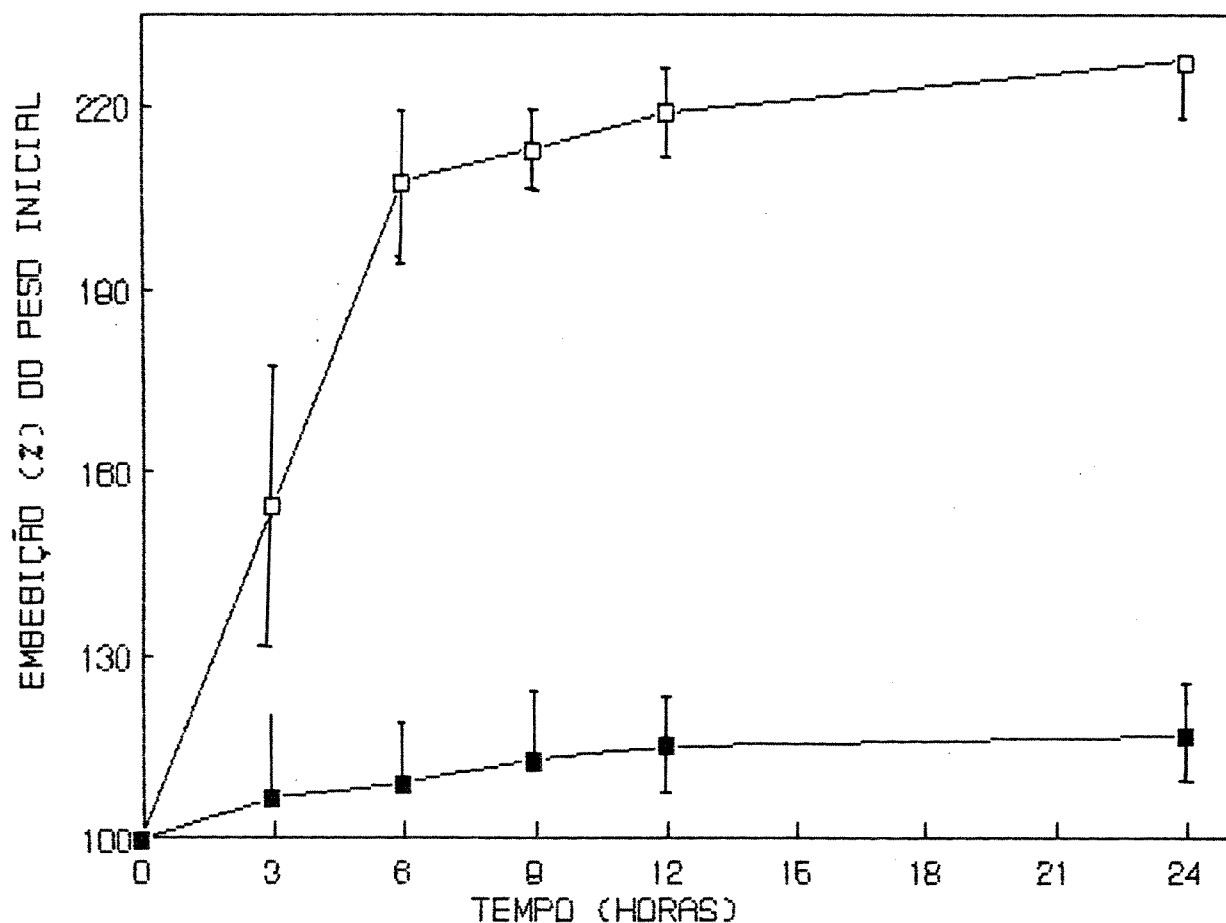


FIGURA 2 - Absorção de água por sementes maduras escarificadas manualmente e intactas de *Bixa orellana*, durante 24 horas, em porcentagem de aumento de peso em relação ao peso fresco inicial. Barras verticais representam o intervalo de confiança da média a nível 5%.

□ SEMENTES CORTADAS

■ SEMENTES INTACTAS

aumento significativo. E nas últimas 12 horas praticamente não houve nenhuma embebição, confirmando o padrão obtido anteriormente.

3 - Germinação:

3.1 - Sementes em desenvolvimento: A germinação das sementes nos diversos estádios de desenvolvimento foi analisada, sendo os resultados mostrados na figura 3. Não ocorreu germinação nos 3 primeiros estádios E1, E2 e E3, não tendo sido, por isso, representados. As sementes passaram a germinar a partir do estádio E4, sendo que neste estádio e no estádio 5 a germinação atingiu o máximo. No estádio E6 a germinação foi inferior àquela apresentada nos estádios anteriores (E4 e E5), mas foi superior estatisticamente a do estádio E7, quando as sementes já estavam completamente maduras. Nesta última fase a germinação foi muito baixa.

O tempo médio de germinação das sementes em desenvolvimento demonstrou que as sementes no estádio E4 apresentaram velocidade de germinação mais lenta do que em todos os outros estádios, onde ocorreu germinação. Já entre os estádios posteriores não houve diferença significativa na velocidade de germinação das sementes (tabela 2).

3.2 - Relação entre germinação, acúmulo de matéria seca e teor de umidade das sementes em desenvolvimento: Pela figura 4 pode ser verificado um aumento gradual de matéria seca à medida

12.2 - **Processamento pós-fixação:** Após a fixação, as sementes foram desidratadas em álcool butílico terciário com concentrações crescentes, segundo Johansen (1940), com algumas modificações no que diz respeito aos tempos de permanência do material em cada solução alcóolica. As sementes permaneceram em álcool butílico a 70% por 3 meses, exceto aquelas destinadas ao teste para detecção de taninos, cujo tempo foi aquele descrito por Johansen (1940). No restante do processo de desidratação foram necessárias 48 horas de intervalo entre cada troca de álcool. As sementes foram então incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo rotativo "R. Jung Heidelberg" em cortes transversais ou longitudinais com espessura de 8 μ m.

12.3 - **Desparafinização:** A desparafinização das lâminas seguiu os métodos usuais, utilizando xilol, álcool-xilol 1:1 (v/v), metanol-clorofórmio 1:1 (v/v), hidratação em álcool etílico em série decrescente de concentração (de 100 a 70%) e água destilada (Johansen 1940).

12.4 - **Métodos de análise gerais e citoquímicos:**

12.4.1 - **Safranina e azul astra (SA) para uma visualização geral:** Os cortes fixados em FAA 50 e hidratados em série etanólica até etanol a 50%, foram corados com safranina a 4% em solução alcóolica a 50%, por 4 minutos. A seguir os cortes foram lavados 3 ou 4 vezes em água destilada para tirar o excesso de

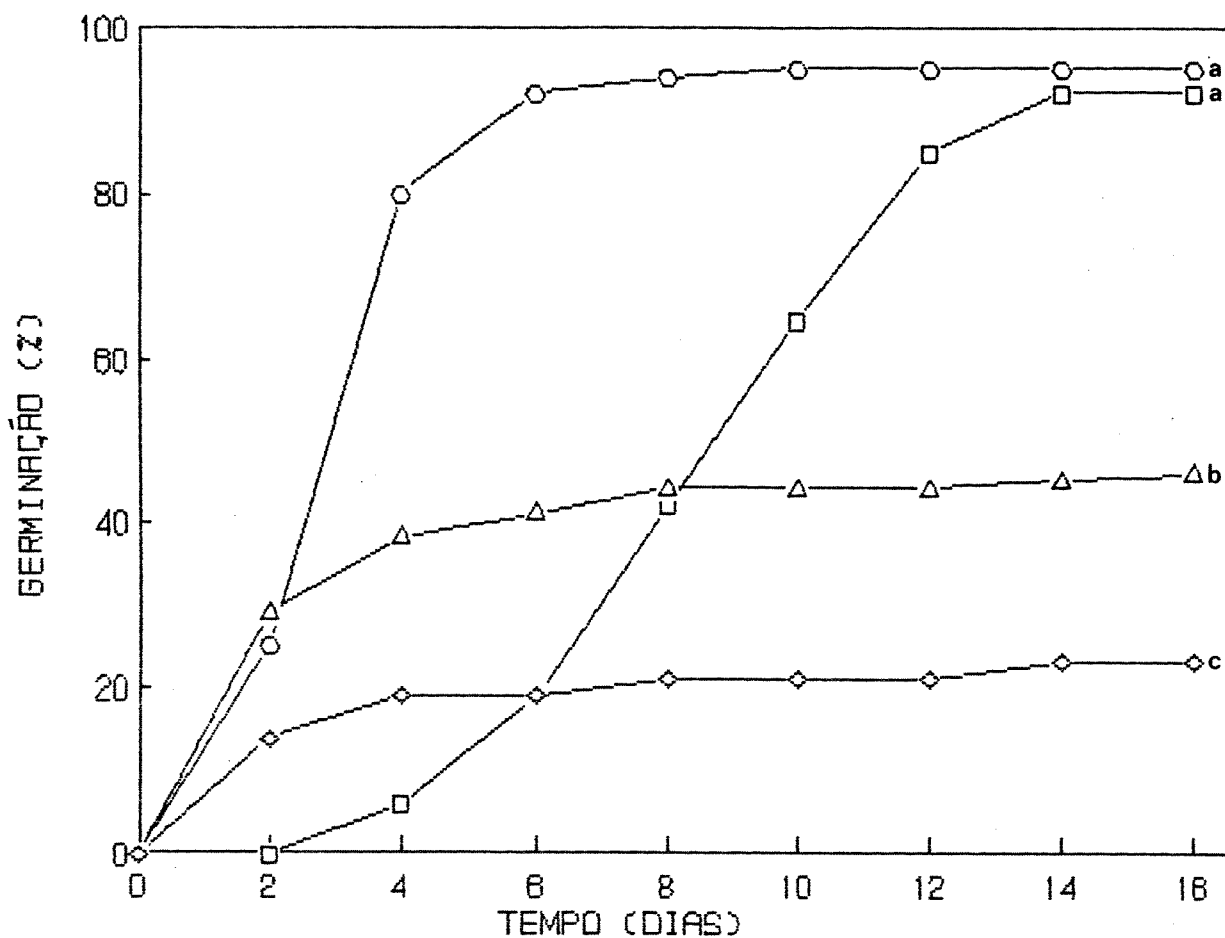


FIGURA 3 - Porcentagem de Germinação de sementes em desenvolvimento de Bixa orellana, mantidas a 25°C e luz contínua. Letras diferentes representam diferenças significativas a nível de 5%, no último dia de experimento.

□ ESTÁDIO E4 ○ ESTÁDIO E5 Δ ESTÁDIO E6 ◇ ESTÁDIO E7

TABELA 2 - Tempo médio de germinação de sementes de Bixa orellana nos diferentes estádios de desenvolvimento.

EST. DESENV.	TEMPO MÉDIO (DIAS)	ERRO PADRÃO
4	8.43	0.47
5	3.81	0.28
6	3.09	0.55
7	3.05	0.34

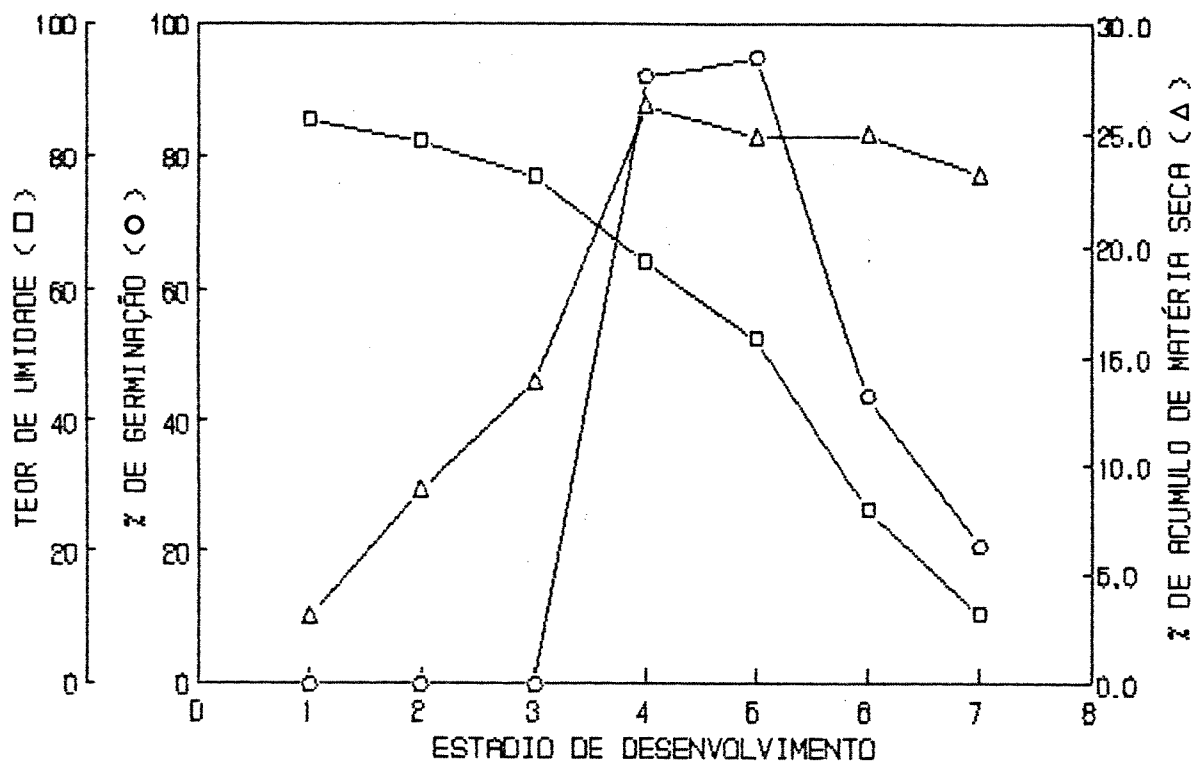


FIGURA 4 - Porcentagem de germinação (o--o), porcentagem de acúmulo de matéria seca (△--△) e teor de umidade em porcentagem (□--□) de sementes em desenvolvimento de B. orellana.

que as sementes em desenvolvimento se desidratam, atingindo o máximo no estágio E4, embora o conteúdo de água ainda seja alto. A redução maior do conteúdo de água ocorre do estágio E7 (10.4%), apesar de já ser baixo no estágio anterior (E6).

Em relação à germinação, nos estádios analisados, verifica-se que ela ocorre a partir do momento em que o acúmulo de matéria seca é máximo e ainda existe uma quantidade relativamente alta de água na semente. A germinação é máxima nos estádios E4 e E5, tendo a sua porcentagem reduzida em E6. A redução é ainda maior no estágio E7, quando os teores de umidade são baixos, mas o acúmulo de matéria seca já atingiu o seu valor máximo.

3.3 - Efeito de luz e escuro: O efeito da luz e escuro sobre a germinação foi analisado, sendo os resultados mostrados na figura 5. Pelos dados verifica-se que não houve diferença significativa entre as sementes mantidas sob luz e escuro contínuos. Os dois tratamentos apresentaram uma taxa de germinação muito baixa.

3.4 - Efeito da temperatura: O efeito de diferentes temperaturas na germinação de urucum foi analisado, sendo os resultados mostrados na figura 6. Para sementes escarificadas, temperaturas acima de 25°C foram mais efetivas na germinação desta espécie. A temperatura de 15°C mostrou-se inadequada para germinação das sementes, pois a porcentagem de germinação foi muito baixa, sendo que só ocorreu germinação no décimo sexto dia de incubação.

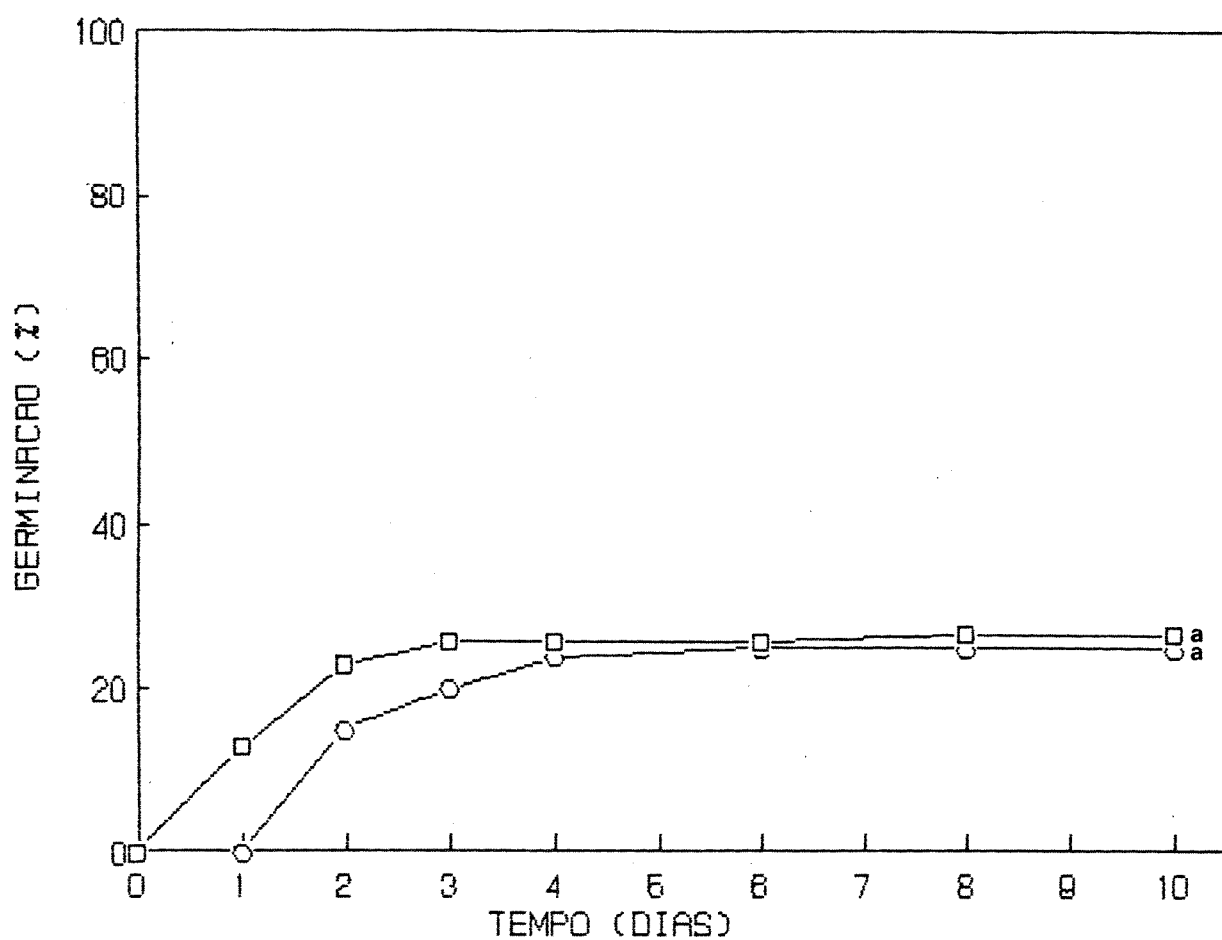


FIGURA 5 - Efeito do tratamento de luz e escuro na germinação de sementes intactas de Bixa orellana, mantidas a 25°C. Letras diferentes representam diferenças significativas a nível de 5%, no último dia de experimento.

□ LUZ ○ ESCURO

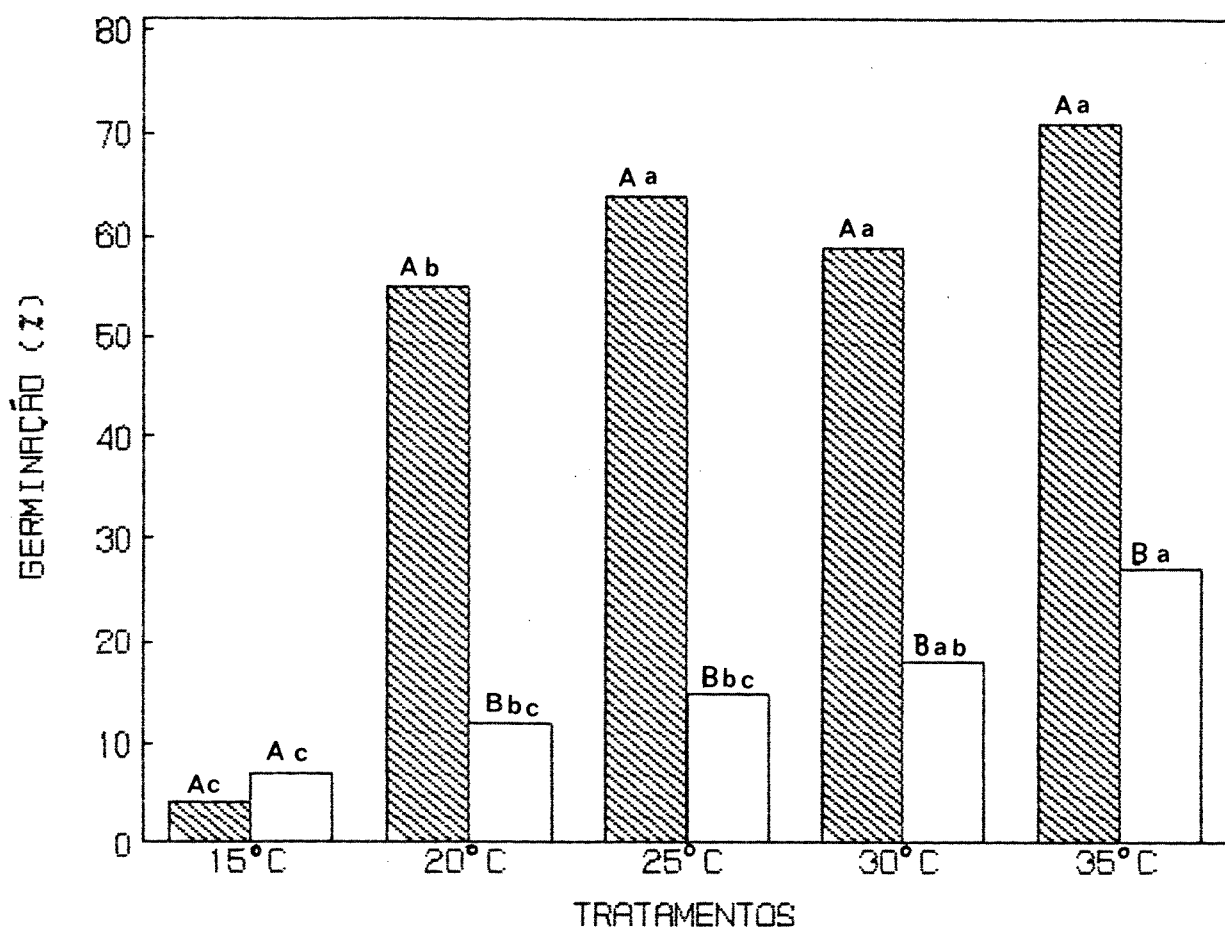


FIGURA 6 - Efeito de diferentes temperaturas na germinação das sementes de Bixa orellana escarificadas e intactas, mantidas sob luz contínua. Letras maiúsculas: comparação do efeito da escarificação. Letras minúsculas: comparação do efeito da temperatura.

□ SEMENTES INTACTAS

▨ SEMENTES ESCARIFICADAS

O tempo médio de germinação demonstrou que sementes escarificadas expostas a 20°C e 35°C apresentaram uma velocidade de germinação muito lenta se comparada com os tratamentos de 25 e 30°C (tabela 3), apesar da temperatura de 35°C apresentar uma porcentagem final de germinação igual estatisticamente a estes tratamentos (figura 6). Também a velocidade de germinação das sementes a 15°C foi mais baixa do que a apresentada pelas sementes expostas a outras temperaturas (tabela 3).

Em sementes intactas verificou-se que a maior porcentagem de germinação ocorreu a 35°C. A 30°C foram obtidos valores intermediários e porcentagens mais baixas a 25°C (figura 6). No entanto, a germinação ocorreu mais rapidamente a 25°C, sendo seguida por 30°C. A velocidade mais baixa ocorreu a 35°C (tabela 3).

Temperaturas alternadas de 20-25°C e 25-30°C não foram efetivas para elevar a taxa de germinação acima daquelas promovidas por temperaturas constantes (figura 7). Comparando-se os dois tratamentos de temperatura alternada verificou-se que sementes expostas a 20-25°C foram mais lentas para germinar do que sementes submetidas a 25-30°C (tabela 4).

3.5 - Efeito da lavagem da sementes: A figura 8 mostra que a lavagem das sementes não teve efeito na germinação, tanto em sementes intactas como escarificadas, pois a porcentagem de germinação entre os vários tempos de lavagem, para cada grupo de sementes (escarificadas e intactas) não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa.

TABELA 3 - Tempo médio de germinação de sementes maduras, escarificadas e intactas de Bixa orellana submetidas a diferentes temperaturas. Os valores numéricos representam a média \pm erro padrão de 100 sementes

TEMPERATURAS CONSTANTES	TEMPO MÉDIO (DIAS)	
	ESCARIFICADAS	INTACTAS
15°C	16.00	16.00*
20°C	7.78 \pm 0.76	10.17 \pm 0.90
25°C	4.88 \pm 0.41	5.73 \pm 0.77
30°C	4.16 \pm 0.43	7.50 \pm 1.04
35°C	8.16 \pm 0.57	10.07 \pm 0.60

* Não foi possível calcular o erro padrão

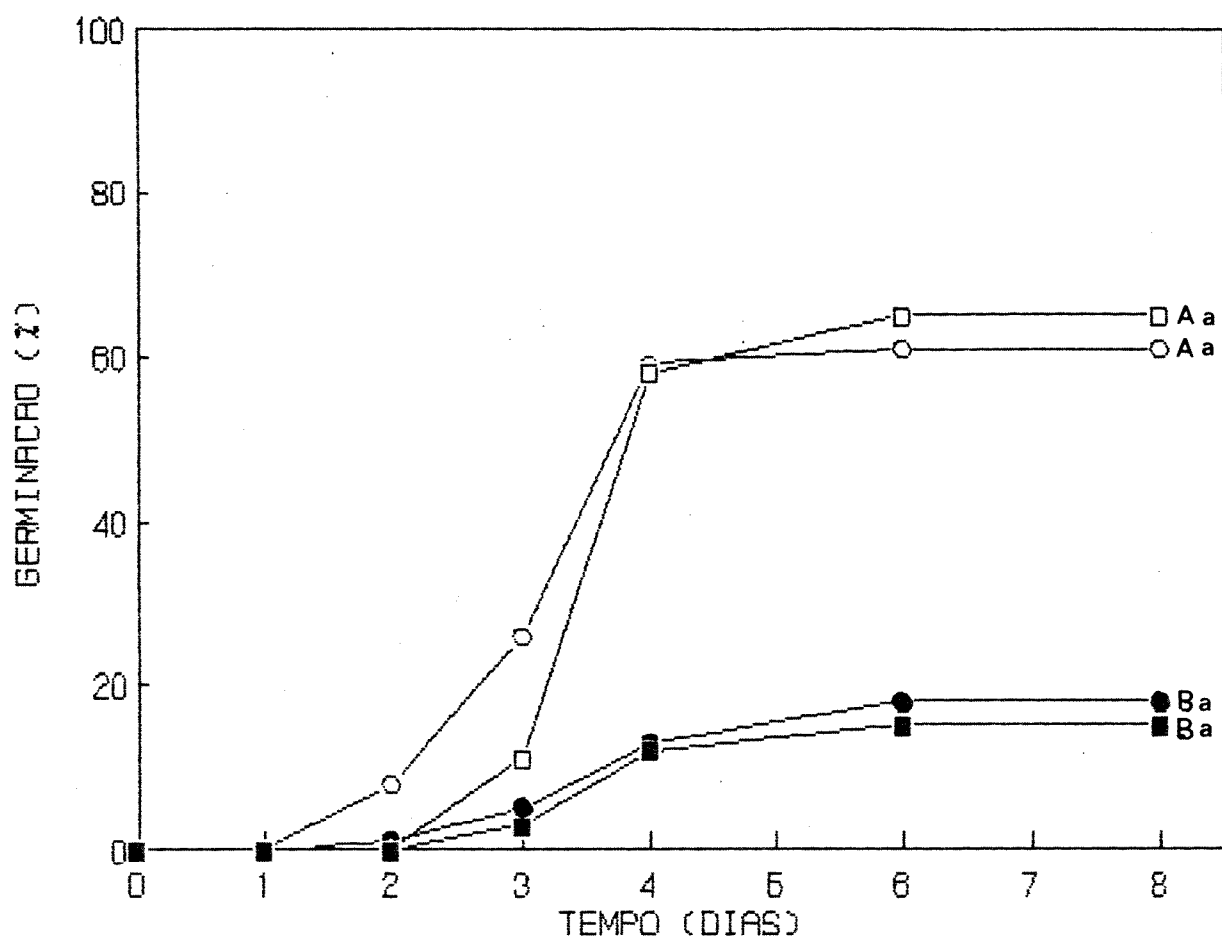


FIGURA 7 - Efeito de temperaturas alternadas na germinação de sementes de Bixa orellana escarificadas e intactas, mantidas sob luz contínua. Letras maiúsculas: comparação do efeito da escarificação. Letras minúsculas: comparação do efeito de temperatura.

□ 25-20°C (CORTADAS)

○ 25-30°C (CORTADAS)

■ 25-20°C (INTACTAS)

● 25-30°C (INTACTAS)

TABELA 4 - Tempo médio de germinação de sementes maduras de Bixa orellana submetidas a diferentes temperaturas alternadas.

TEMPERATURAS ALTERNADAS	TEMPO MÉDIO (DIAS)	ERRO PADRÃO
25-20°C	5,87	0,12
25-30°C	5,08	0,16

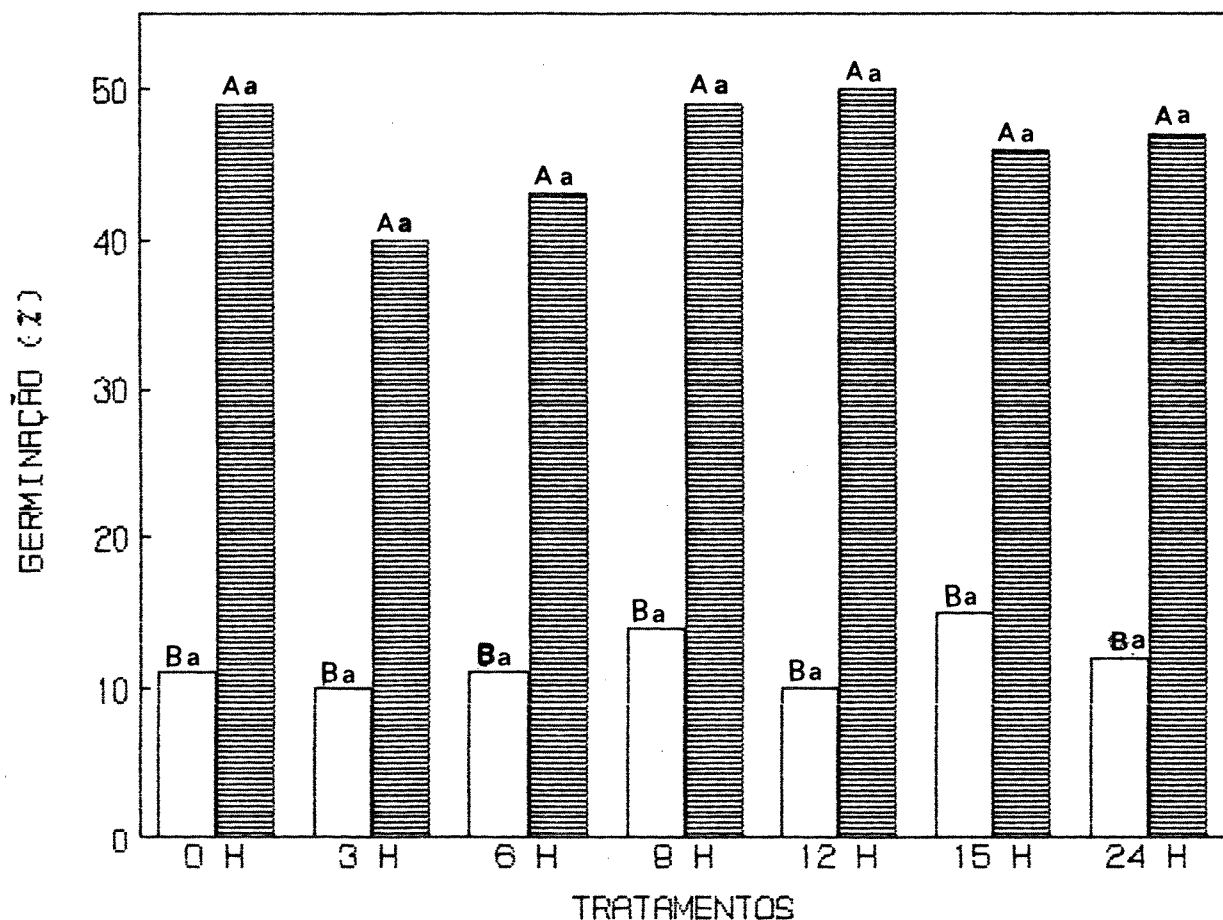


FIGURA 8 - Efeito de lavagem contínua em água corrente na germinação de sementes de Bixa orellana escarificadas e intactas, mantidas a 25°C e luz contínua. Letras maiúsculas: comparação do efeito da escarificação. Letras minúsculas: comparação do efeito da lavagem.

□ SEMENTES INTACTAS

▨ SEMENTES ESCARIFICADAS

4 - Escarificação mecânica: Os resultados da escarificação mecânica na germinação de sementes de urucum são mostrados na figura 9. As sementes seccionadas lateralmente ou lixadas tiveram sua germinação promovida. Contudo, comparando-se os dois tratamentos de escarificação mecânica, verifica-se que não houve diferença significativa na porcentagem de germinação de sementes seccionadas lateralmente ou lixadas.

5 - Escarificação química: O efeito da escarificação química sobre a germinação das sementes é mostrado na tabela 5. Verifica-se que os tempos de imersão em ácido sulfúrico concentrado mais efetivos foram 15 e 20 minutos. Os tempos de 5 e 10 minutos de imersão não foram efetivos na quebra da dormência em relação ao controle.

Verifica-se que a partir de 5 minutos há um aumento na permeabilidade das sementes, sendo que 15 e 20 minutos foram os mais eficientes. Contudo a eficácia em nenhum dos tratamentos foi máxima. Quanto à viabilidade das sementes não houve uma diminuição da viabilidade à medida em que se aumenta o tempo de imersão no ácido.

6 - Escarificação térmica:

6.1 - O efeito do tratamento com água fervente (30, 60 e 90 segundos) foi analisado e os resultados mostrados na tabela 6. Verifica-se que não houve diferença significativa entre os trata-

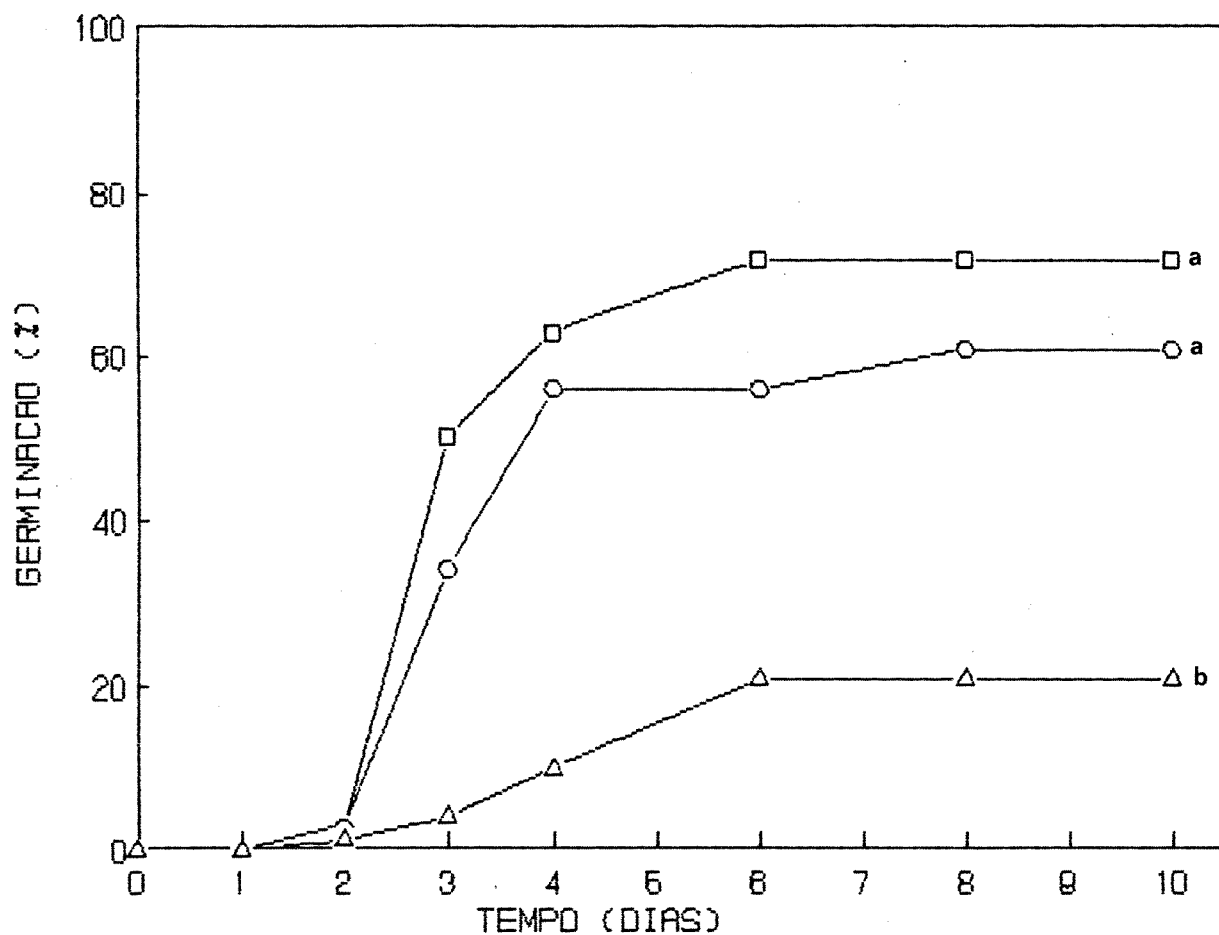


FIGURA 9 - Efeito da escarificação mecânica na germinação de sementes maduras de Bixa orellana, mantidas a 25°C e luz contínua. Letras diferentes representam diferenças significativas a nível de 5% no último dia de experimento.

□ CORTADA ○ OLIxada △ CONTROLE

TABELA 5: Efeito da escarificação química (ácido sulfúrico concentrado) na germinação, permeabilidade e viabilidade de sementes de Bixa orellana. As sementes foram mantidas a 25°C e luz contínua por 10 dias, após tratamento. Letras diferentes representam diferenças significativas ao nível de 5%.

TEMPO DE EXPOSIÇÃO (minutos)	GERMINAÇÃO (%)	PERMEABILIDADE (%)	VIABILIDADE (%)
00	22b	25b	65a
05	30b	33b	60a
10	35ab	45b	63a
15	50a	60a	63a
20	46a	65a	55a

TABELA 6: Efeito da escarificação térmica com água quente ($98^{\circ}\text{C}\pm 2$) na germinação, permeabilidade e viabilidade de sementes de Bixa orellana. As sementes foram mantidas a 25°C e luz contínua por 10 dias, após ao tratamento. Letras diferentes representam diferenças significativas ao nível de 5%.

TEMPO DE EXPOSIÇÃO (SEGUNDOS)	GERMINAÇÃO (%)	PERMEABILIDADE (%)	VIABILIDADE (%)
00	15a	18a	65a
30	14a	37b	66a
60	18a	49c	55b
90	02b	69d	20c

mentos de 30 e 60 segundos e entre estes e o controle. Mas o tempo de 90 segundos foi deletério, pois causou uma redução drástica na porcentagem de germinação.

Observa-se também que houve um aumento significativo na permeabilidade das sementes, embora não tenham atingido o máximo.

A viabilidade foi alterada a 60 e 90 segundos, ocorrendo redução significativa em relação ao controle.

6.2 - O efeito do choque térmico, na germinação das sementes é mostrado na tabela 7. Verifica-se que não houve diferença significativa na porcentagem de germinação entre as sementes escarificadas e o controle. Nota-se que houve uma redução significativa na viabilidade das sementes submetidas ao choque térmico em relação ao controle.

Quanto à permeabilidade, verifica-se por esta mesma tabela, que há um aumento significativo neste parâmetro para as sementes escarificadas se comparadas com o controle (tabela 7).

6.3 - O efeito da temperatura de 50°C, por períodos de 1 e 2 horas, na germinação é mostrado na figura 10. Verifica-se que em sementes intactas a temperatura de 50°C é ineficaz na promoção de germinação nos dois tempos de exposição em relação ao controle, pois não houve diferença significativa na porcentagem de germinação entre os dois grupos. Também em sementes escarificadas meca-

TABELA 7: Efeito do choque térmico (80^o/10^oC) na germinação, permeabilidade e viabilidade de sementes de Bixa orellana. As sementes foram mantidas a 25^oC e luz contínua por 10 dias, após ao tratamento. Letras diferentes representam diferenças significativas ao nível de 5%.

TEMPO DE EXPOSIÇÃO (MINUTOS)	GERMINAÇÃO (%)	PERMEABILIDADE (%)	VIABILIDADE (%)
00/00	25a	28b	70a
30/15	19a	41a	41b

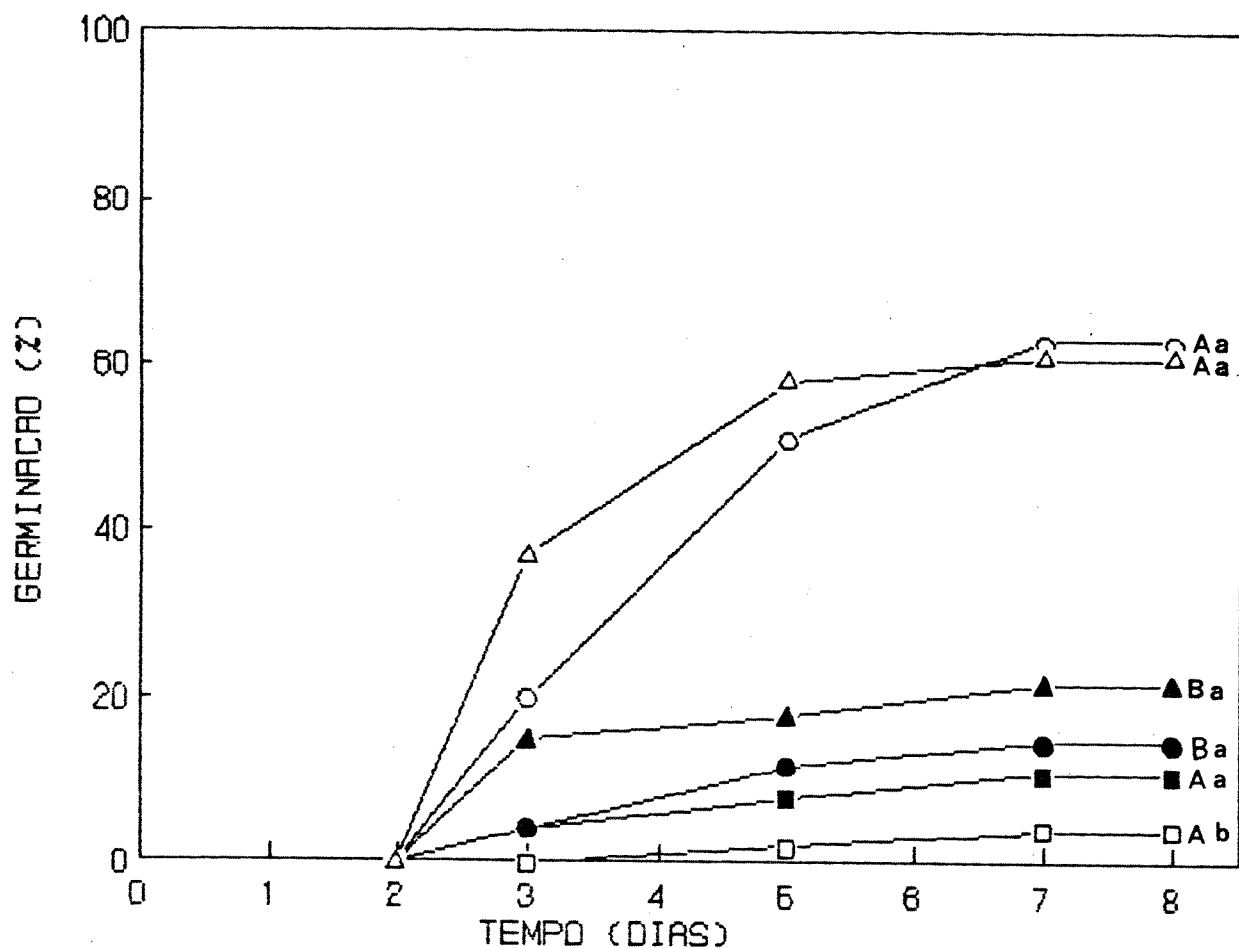


FIGURA 10 - Efeito da temperatura de 50°C durante 1 ou 2 horas na germinação das sementes de Bixa orellana escarificadas e intactas, mantidas posteriormente a 25°C e luz contínua. Letras maiúsculas: efeito da escarificação. Letras minúsculas: efeito da exposição a 50°C.

○ 1 HORA (CORTADA) □ 2 HORAS (CORTADA) Δ CONTROLE (CORTADA)
 ● 1 HORA (INTACTA) ■ 2 HORAS (INTACTA) ▲ CONTROLE (INTACTA)

nicamente o tratamento de 1 hora a 50°C foi ineficaz para promover a germinação acima daquelas apresentada por sementes cortadas e mantidas continuamente a 25°C. Contudo, exposição de 1 hora não causou redução na viabilidade das sementes, pois a porcentagem de germinação foi igual à do controle. Por outro lado, sementes cortadas expostas a 50°C por 2 horas tiveram sua viabilidade drasticamente afetada, apresentando uma porcentagem de germinação muito abaixo das sementes cortadas mantidas continuamente a 25°C.

6.4 - Os resultados do efeito da exposição de sementes secas à temperatura de 100°C é mostrado na tabela 8. Exposições de 1, 3 e 5 minutos não promoveram a germinação se comparados com o controle. Mas a exposição de 10 minutos causou uma queda significativa na porcentagem de germinação.

O tratamento de 10 minutos causou uma perda de viabilidade das sementes, mas não foi efetiva para causar um aumento da permeabilidade das mesmas se comparadas com o controle e os outros tempos de exposição (tabela 8).

7 - Efeito da escarificação na estrutura da testa: As sementes maduras (E7) submetidas ao tratamento com ácido sulfúrico por 15 minutos e coradas com safranina e azul astra (SA) apresentaram rupturas na região superior das células paliçádicas, com desgastes laterais. Além disso o lúmen tornou-se exposto e ocorreram algumas rupturas na porção mais basal das mesmas (figura 11) se comparadas às do controle (figura 12).

TABELA 8: Efeito da escarificação térmica (100°C a seco) na germinação, permeabilidade e viabilidade de sementes de Bixa orellana. As sementes foram mantidas a 25°C por 10 dias sob luz contínua, após o tratamento. Letras diferentes representam diferenças significativas ao nível de 5%.

TEMPO DE EXPOSIÇÃO (minutos)	GERMINAÇÃO (%)	PERMEABILIDADE (%)	VIABILIDADE (%)
00	30a	43a	64a
01	25a	42a	62a
03	26a	43a	63a
05	30a	49a	66a
10	10b	50a	39b

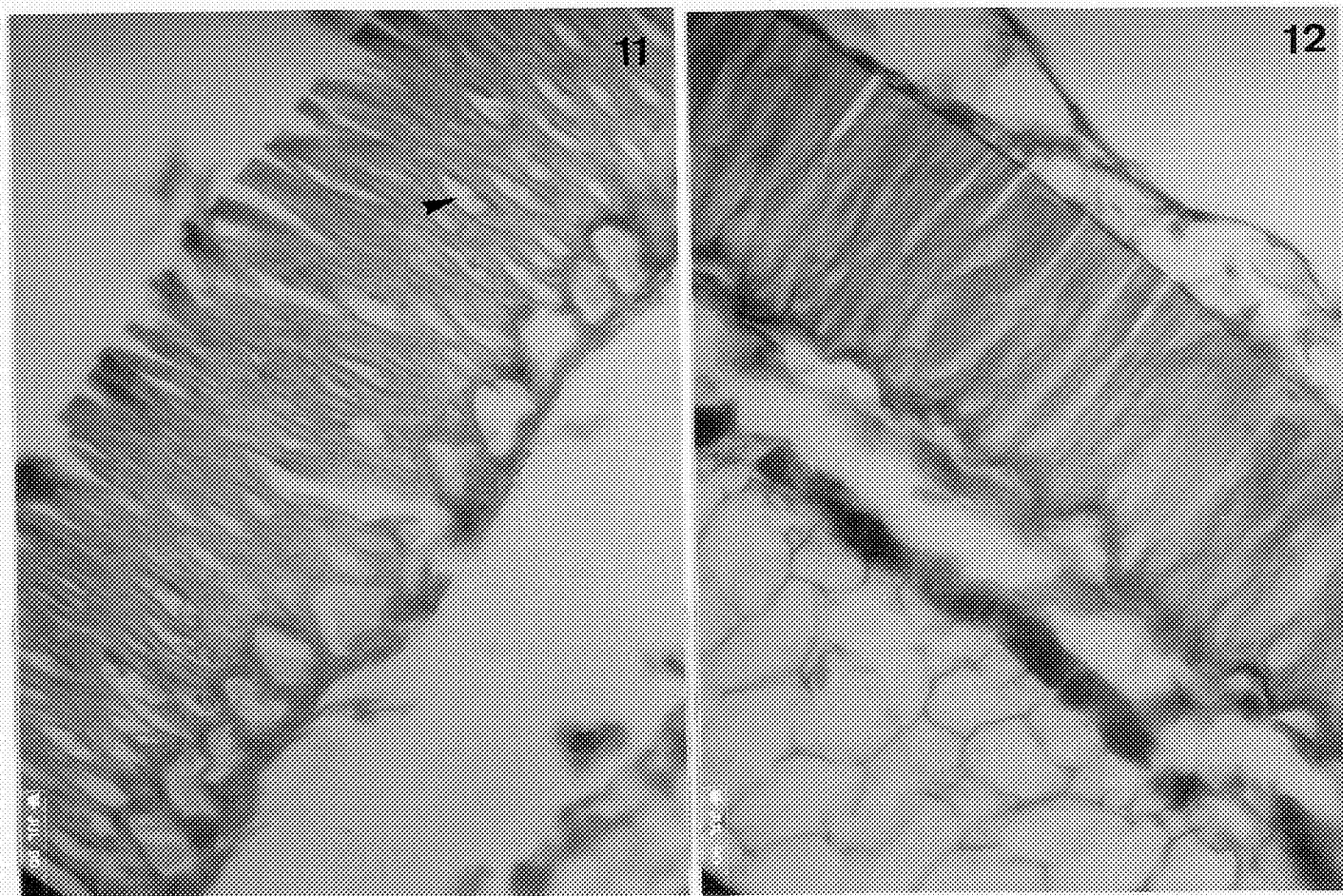


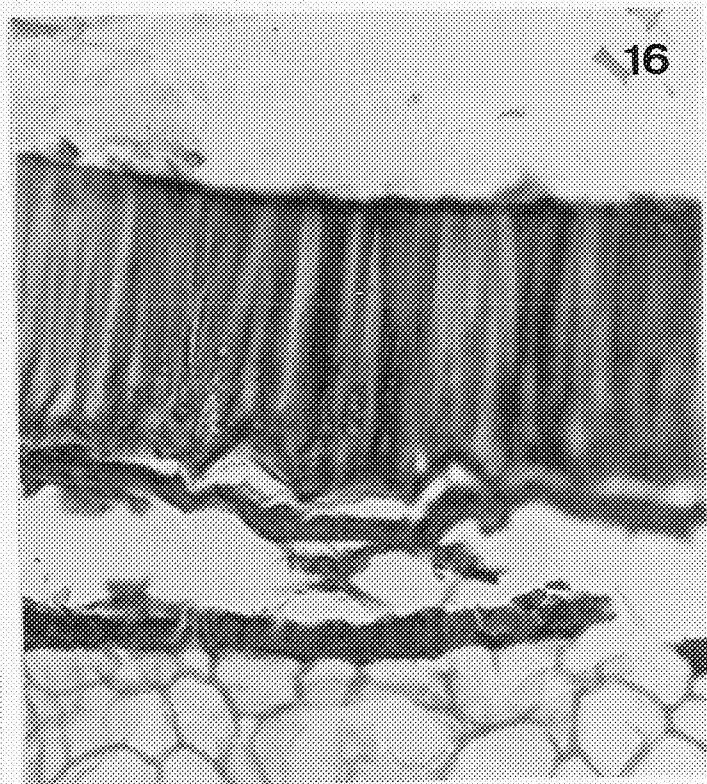
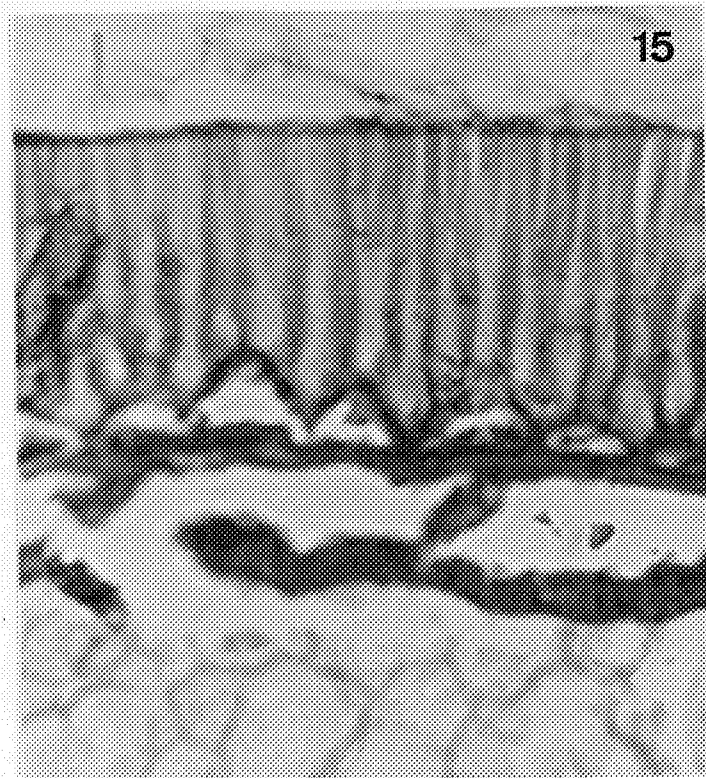
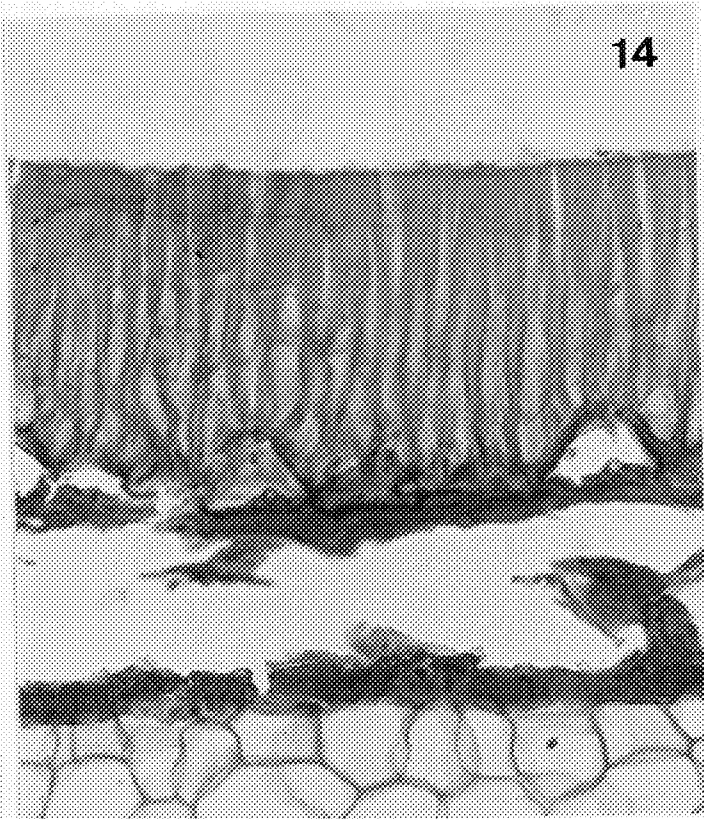
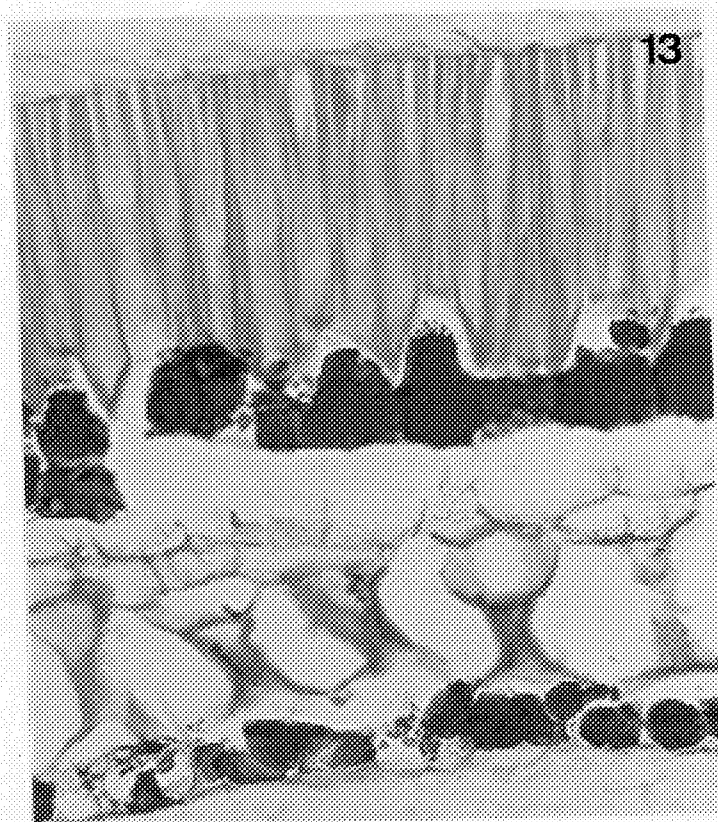
FIGURA 11-12: Cortes transversais da testa de sementes de B. prellana corados com SA. Aumento: 460X. Fig.1: Testa da semente escarificada com ácido sulfúrico. Podem ser notadas rupturas, desgastes laterais e lúmen exposto (▲). Fig.2: Testa da semente não escarificada apresentando as estruturas da palicada mais íntegras.

B - Análise "in situ":

B.1 - Safranina e azul astra (SA): A testa das sementes coradas com SA, apresentou ao nível do tegma diversas estruturas morfológicamente distintas, que podem ser subdivididas em a) uma camada externa composta de células em forma de paliçádica; b) uma camada hipodérmica composta por células que provavelmente contêm taninos (corados em bordô); c) 3 camadas parenquimáticas; d) uma segunda camada hipodérmica formada por células em forma de ampulheta (osteosclereídeos) e e) uma camada interna de células que contêm taninos (figura 13). A partir do E2 as células do tegma já se encontravam completamente diferenciadas especialmente em relação à camada paliçádica (figura 13) se comparadas com aquelas do E1 (não ilustrada). A partir do E2 foi ocorrendo um espessamento ao nível das células paliçádicas e uma compressão em todas as camadas abaixo das mesmas. As células da paliçada apresentavam-se mais longas do que largas, sendo mais largas na região basal do que na distal, apresentando nesta porção a extremidade acuminada ou ligeiramente arredondada.

À medida que os estádios avançaram, notou-se um aumento de coloração pela safranina nas células paliçádicas, que se apresentaram cada vez mais resistentes aos cortes, o que provocou uma ruptura da camada parenquimática e dos osteosclereídeos nos estádios mais avançados (figuras 14-16).

FIGURA 13-16: Cortes transversais da testa de sementes em desenvolvimento de E. prellana corados com SA. Aumento: 460X. Fig.13: E2. A camada paliçádica apresenta-se corada em azul; a hipoderme com material corado em vermelho; as camadas parenquimáticas e osteosclereídeos corados em azul e a segunda hipoderme, com material corado em vermelho. Fig.14: E4. Nota-se o aparecimento da cor rosa entre as células da paliçada e o rompimento das camadas parenquimáticas e de osteosclereídeos. Fig.15: E5. Há um aumento da cor rosa entre as células paliçádicas. Fig.16: E7. A semente atinge a maturidade e ocorre uma deposição ainda maior de safranina na paliçada.



8.2 - Azul de toluidina: As paredes celulares da testa das sementes do E2 foram coradas pelo azul de toluidina, apresentando-se fortemente metacromáticas, indicando presença de material péctico (figura 17). Porém esta metacromasia diminuiu com o avanço da idade, sendo que a partir do E4 (não ilustrado), E5 (figura 18) e E7 (não ilustrado) as células da paliçada, coradas pelo azul de toluidina apresentaram-se mais azuladas e com regiões esverdeadas, principalmente em direção à parte mais interna da testa. Os materiais corados em verde, nas camadas da hipoderme, provavelmente sejam taninos (figura 17).

8.3 - Xylidine Ponceau: Apesar do baixo teor protéico mostrado pela coloração com XP na testa das sementes em todos os estádios de desenvolvimento analisados, os resultados indicam uma ligeira diminuição do material protéico a partir do E2 (figura 19) sendo que, em E7 praticamente não ocorreu resposta positiva ao corante na maior parte destas células (figura 21).

Nas células parenquimáticas do endosperma pode ser notado um acúmulo de material protéico a partir do E2 (figura 19). No E5 (figura 20) já pode ser observada uma grande quantidade de material corado, que foi sofrendo compactação até a maturação, em E7 (figura 21).

8.4 - Método do P.A.S: Ao nível da testa, durante o estágio mais imaturo (E1) as paredes das células paliçádicas apareceram pouco coradas pelo PAS. Os contornos das paredes eram finos, sem

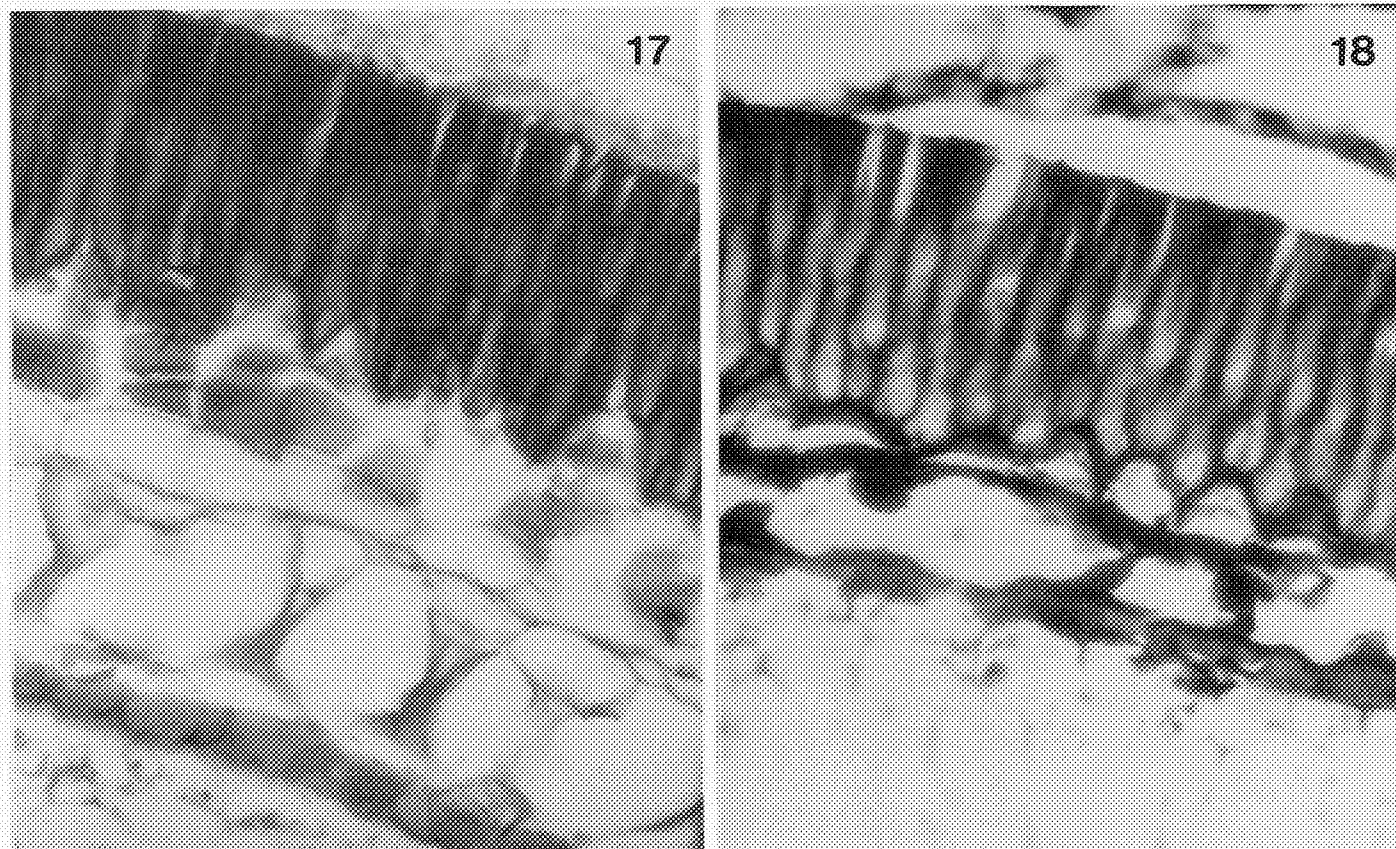
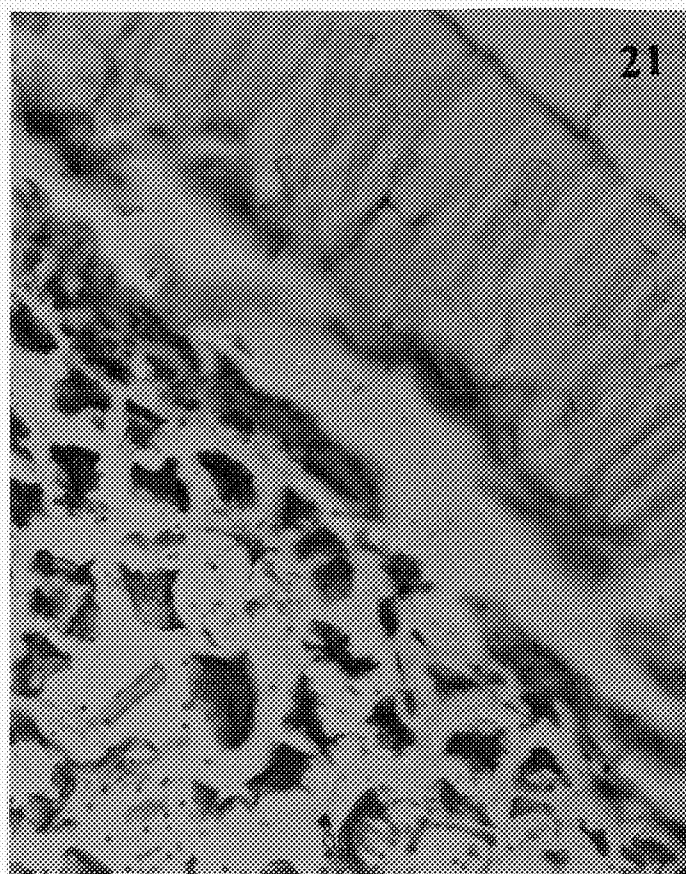
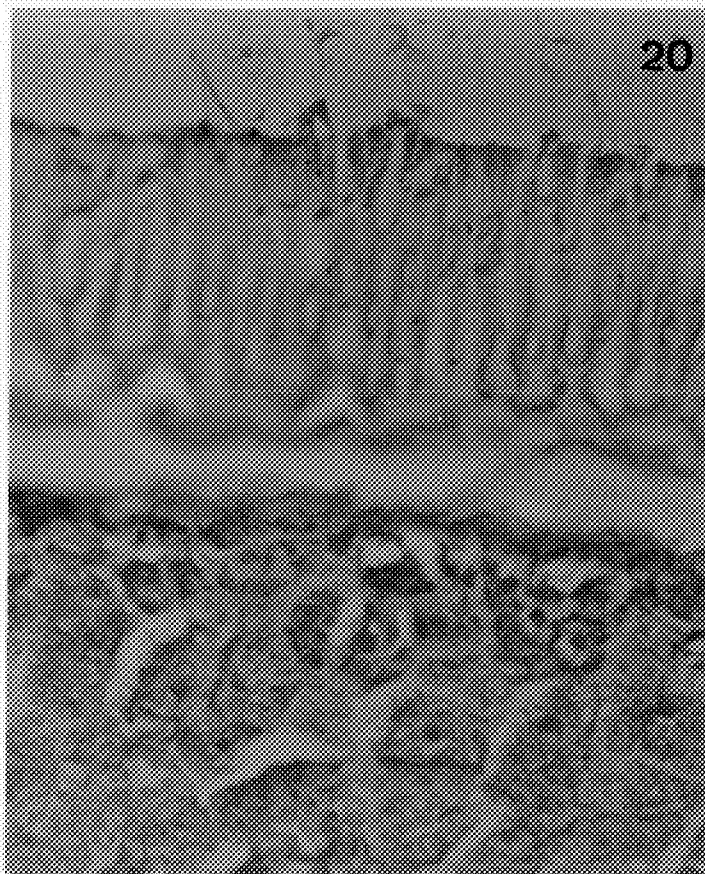


FIGURA 17-18: Cortes transversais da testa de sementes em desenvolvimento de B. prellana corados com AT. Aumento: 460X. Fig.17: E2. A camada paliçádica e os osteosclereídeos apresentam-se fortemente metacromáticos. As duas hipodermes aparecem coradas em verde. Fig.18: E5. Pode ser notada a diminuição da metacromasia na camada paliçádica. Ainda pode ser visualizado material corado em verde na segunda camada hipodérmica.

FIGURA 19-21: Cortes transversais de sementes em desenvolvimento de B. prellana corados com XP. Aumento: 370 X. Fig.19: E2. A camada paliçádica e o endosperma mostram-se pouco corados pelo XP. Fig.20: E5. A camada paliçádica apresenta-se menos corada com XP, mas pode ser visualizado um acúmulo de material corado no endosperma, que ainda se apresenta pouco compactado. Fig.21: E7. A camada paliçádica praticamente não é corada, mas o endosperma apresenta reação positiva ao XP, apresentando material protéico mais compactado.



qualquer espessamento. Verificou-se uma grande quantidade de pequenos grãos PAS positivos, tanto na camada palicádica como nas camadas mais internas da testa (figura 22). No estágio seguinte (E2), estes grãos praticamente desapareceram e a camada palicádica já estava bem definida (figura 23). No último estágio de desenvolvimento (E7), foi verificado que a parede se apresentava intensamente corada pelo PAS, especialmente as células palicádicas (fig.24), indicando um acúmulo de polissacarídeos neutros neste local.

Os cortes das sementes em desenvolvimento corados pelo PAS evidenciaram ao nível do endosperma a presença de polissacarídeos neutros nas paredes celulares e grânulos. Durante os primeiros estádios de desenvolvimento (E2), os grânulos corados eram pequenos, com forma elíptica e estavam presentes em pequenas quantidades. As paredes das células do endosperma ainda estavam pouco coradas (figura 25). Nos estádios E5 (figura 26) e E7 (figura 27) os grãos eram maiores, com formato mais arredondado e estavam presentes em grande número. As paredes celulares do endosperma apresentaram-se fortemente coradas. Os cortes utilizados como controle da reação praticamente não foram corados por este método (figura 28).

8.5 - Floroglucinol e HCl: Não ocorreu reação positiva para lignina (aparecimento da cor púrpura) a nível da testa. Já o tecido condutor apresentou-se corado em púrpura, no xilema (não ilustrado).

FIGURA 22-24: Cortes transversais da testa de sementes em desenvolvimento de B. prellana corados com PAS. Aumento: 460 X.

Fig.22: E1. Pode ser visualizada a camada paliçádica em formação, com paredes celulares não espessadas e a presença de grânulos PAS positivos. Fig.23: E2. A testa apresenta-se corada como um todo e a camada paliçádica bem definida. Ainda podem ser notadas alguns grânulos PAS positivos nesta camada (▲). Fig.24: E7. A camada paliçádica encontra-se intensamente corada, bem como as outras camadas da testa.

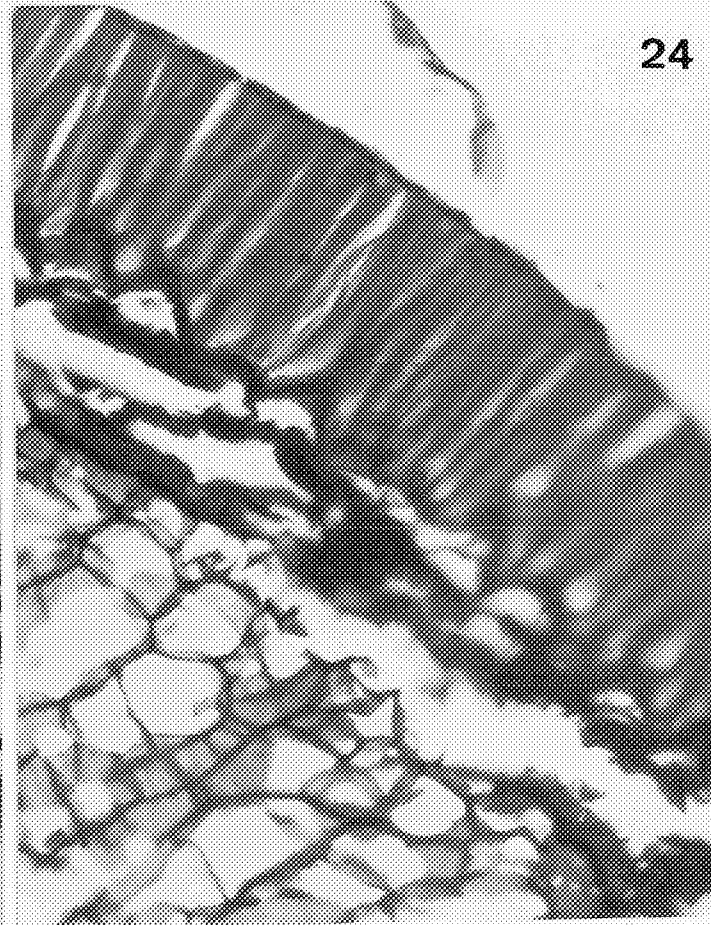
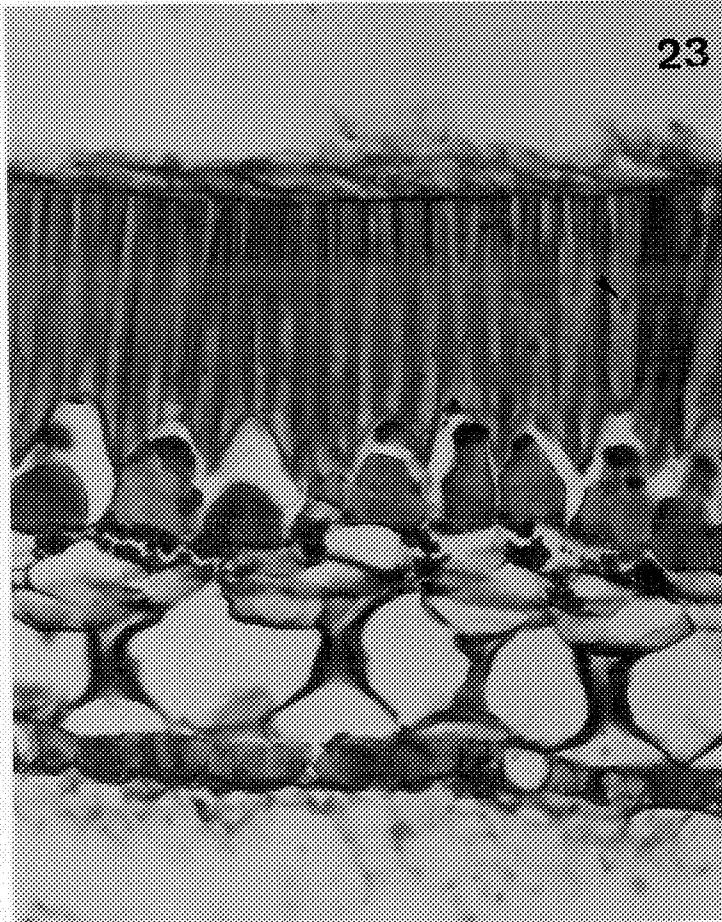
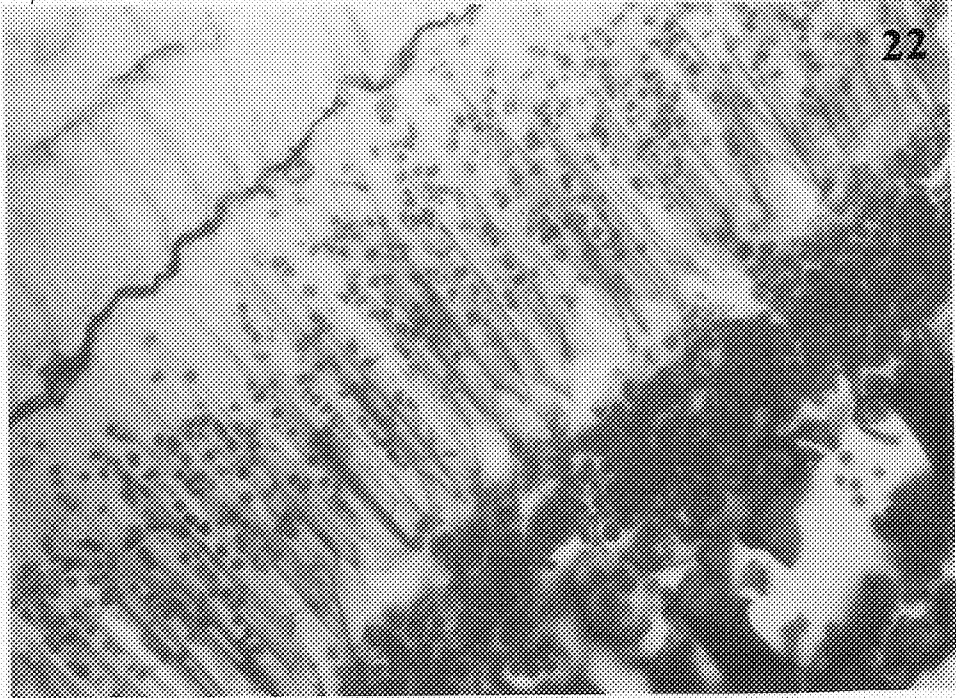
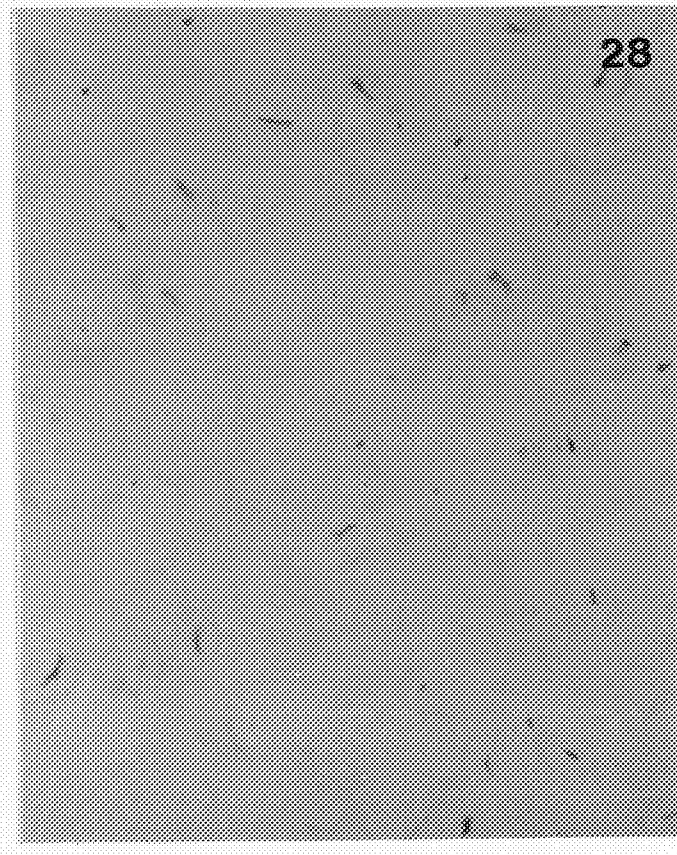
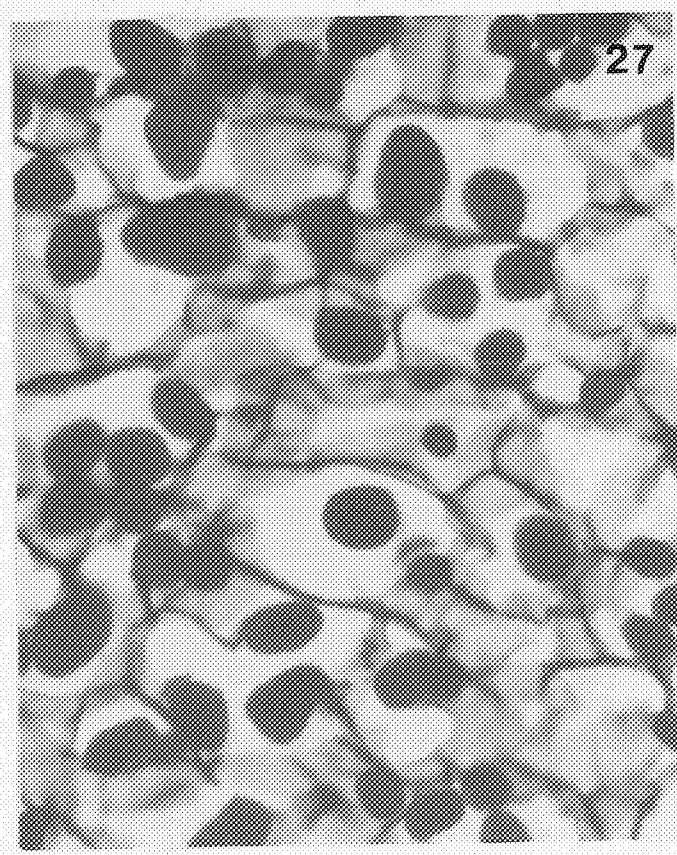
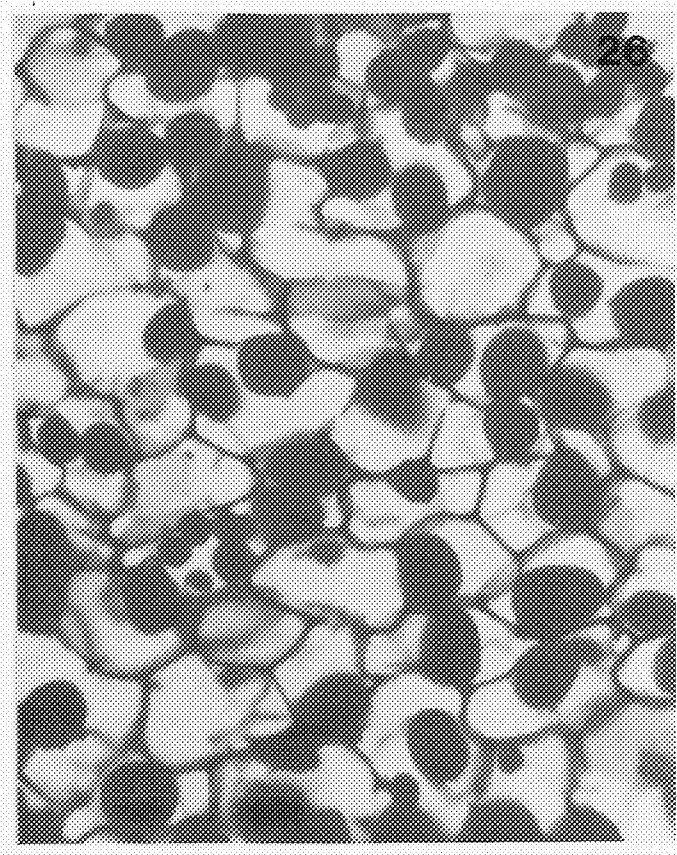
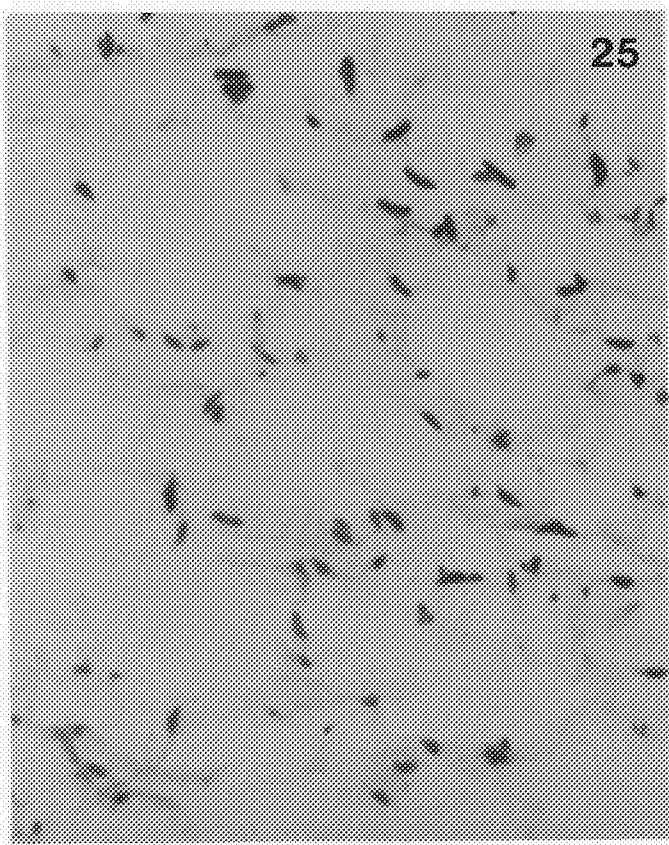


FIGURA 25-28: Cortes transversais do endosperma de sementes em desenvolvimento corados com PAS. Aumento: 460 X. Fig.25: E2. Pequenos grânulos de amido elípticos, dispersos pelo endosperma. Nota-se as paredes celulares em início de formação. Fig.26: E5. Grande quantidade de grãos de formato arredondado. Nota-se as paredes celulares completamente formadas. Fig.27: E7. Aspecto dos grãos e paredes celulares idênticos ao do E5. Fig.28: Controle. O material (E7) foi corado com reativo de Schiff, sem prévia oxidação. Nenhum grão corou.



B.6 - Reativo de Schiff para lignina: A camada de macrosclereídeos (paliçada) apresentou-se pouco corada com reativo de Schiff no estágio E1 (não ilustrado) e E2 (figura 29). Entretanto nos estádios mais avançados (E5) ela apareceu ligeiramente mais corada, se comparada aos estádios mais imaturos, com nítidos espessamentos, exceto na parte mais externa da testa (figura 30). Entretanto não foram verificadas diferenças entre o E5 e o E7 (não ilustrado).

B.7 - Ferricianeto férrico: As paredes das células da camada paliçada no E1 apresentaram-se pouco coradas. Foi notada a presença de material corado em castanho, provavelmente taninos. Neste estágio são visíveis as células do tegumento externo produtoras de corante. As células em forma de ampulheta já estão formadas (figura 31).

As células da camada em paliçada no E5 apresentaram-se coradas em azul escuro (figura 32). Esta coloração aumenta ligeiramente no E7 (figura 33). A parte superior da camada paliçada praticamente não corou pelo método (figuras 32 e 33), sugerindo a ausência de material redutor neste local.

B.8 - Sulfato ferroso: A fixação de sementes imaturas (E1) com sulfato ferroso para detecção de taninos comprovou a presença de material tânico nos cortes obtidos, já sugerida por outros métodos utilizados (figura 34).

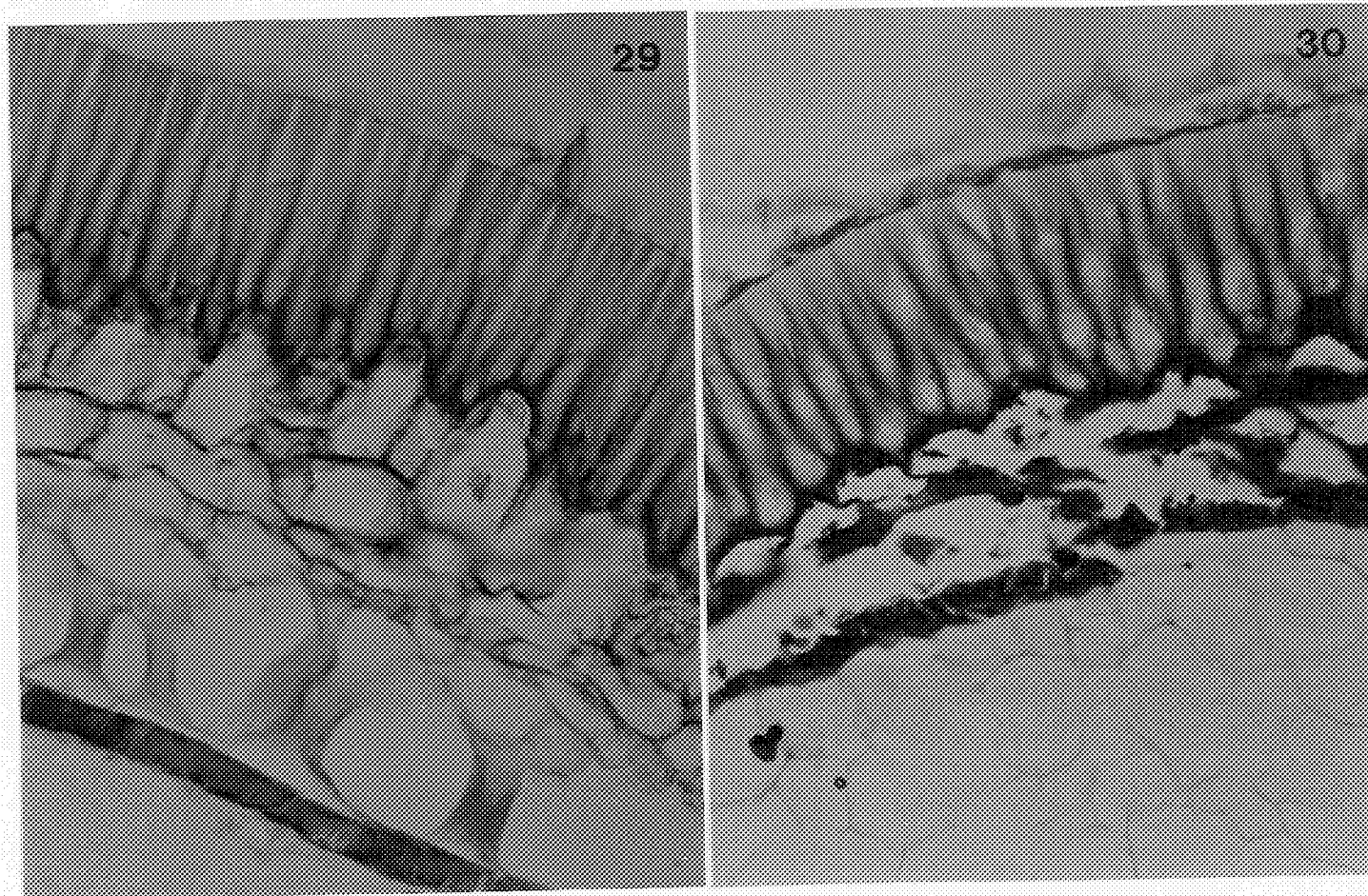
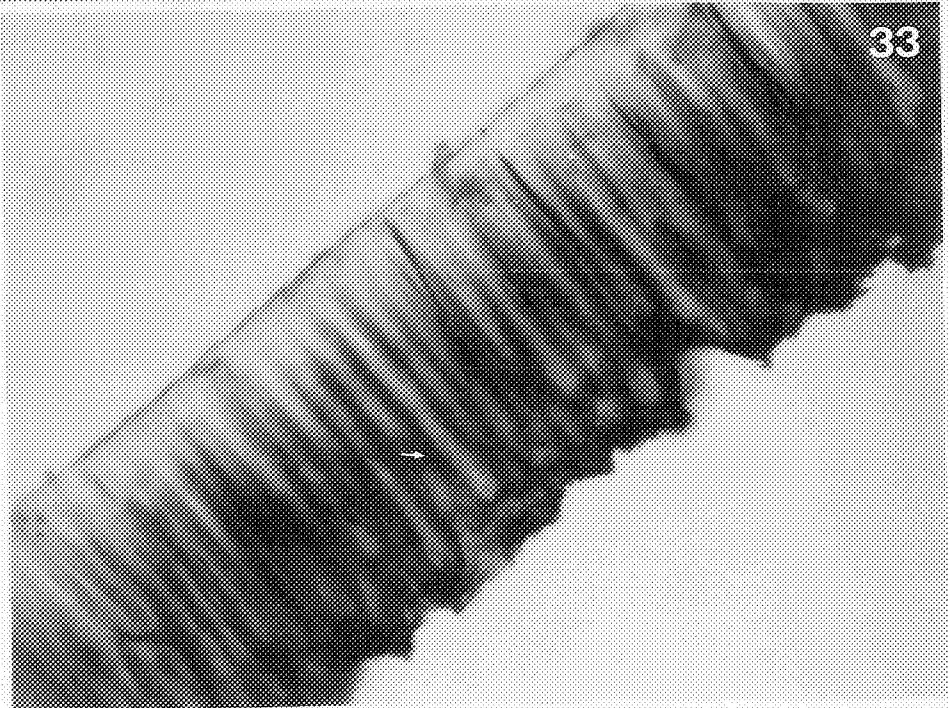
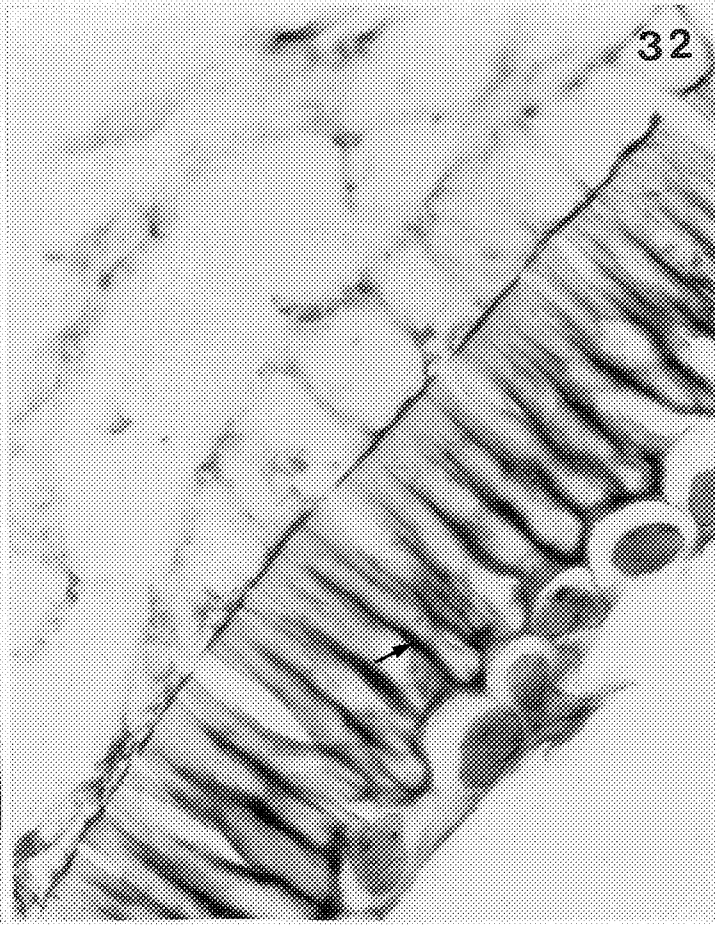
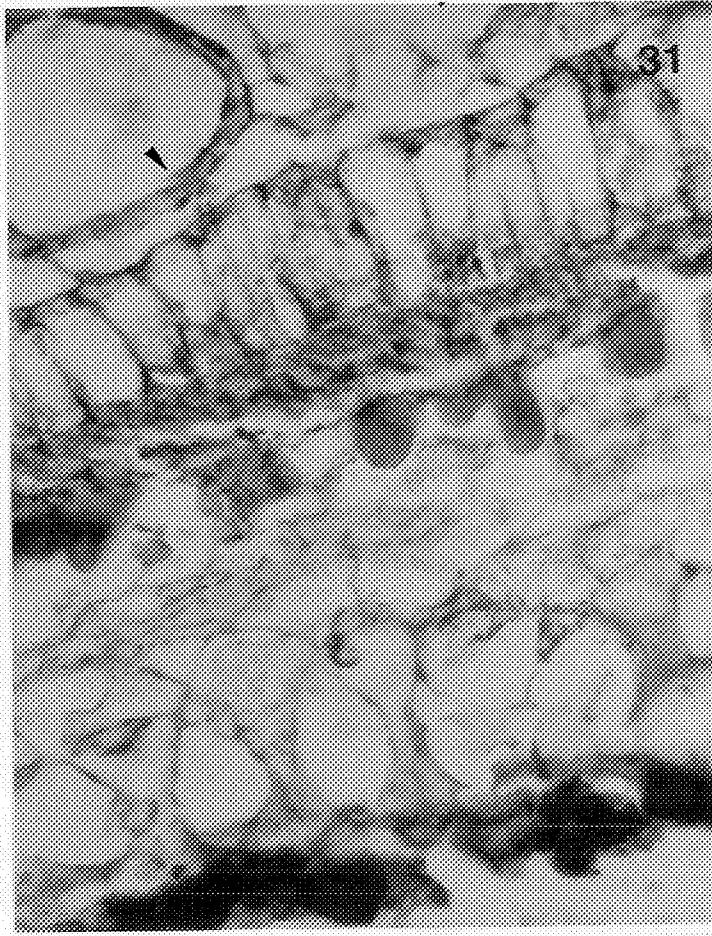


FIGURA 29-30: Cortes transversais da testa de sementes de B. orellana coradas com reativo de Schiff. Aumento: 460X. Fig.29: E2. A camada paliçádica apresenta-se pouco corada com o reativo de Schiff. Fig. 30: E5. Notam-se espessamentos na camada paliçádica na região mais basal, que corou mais do que a porção superior.

FIGURA 31-33: Cortes transversais da testa de sementes de D. orellana corados com ferricianeto férrico. Aumento 460X. Fig.31: E1. As paredes das células da palicádica apresentam-se pouco coradas. Nota-se a presença de material corado em castanho e as células produtoras de corante (A). Fig.32: E5. As células palicádicas apresentam-se coradas em azul na porção mais basal, em contraste com a sua região superior, menos corada. Fig.33: E7. Nota-se um aumento das características observadas em E5, com as porções basais mais coradas (B) e a ausência de reação nas regiões superiores da palicada.



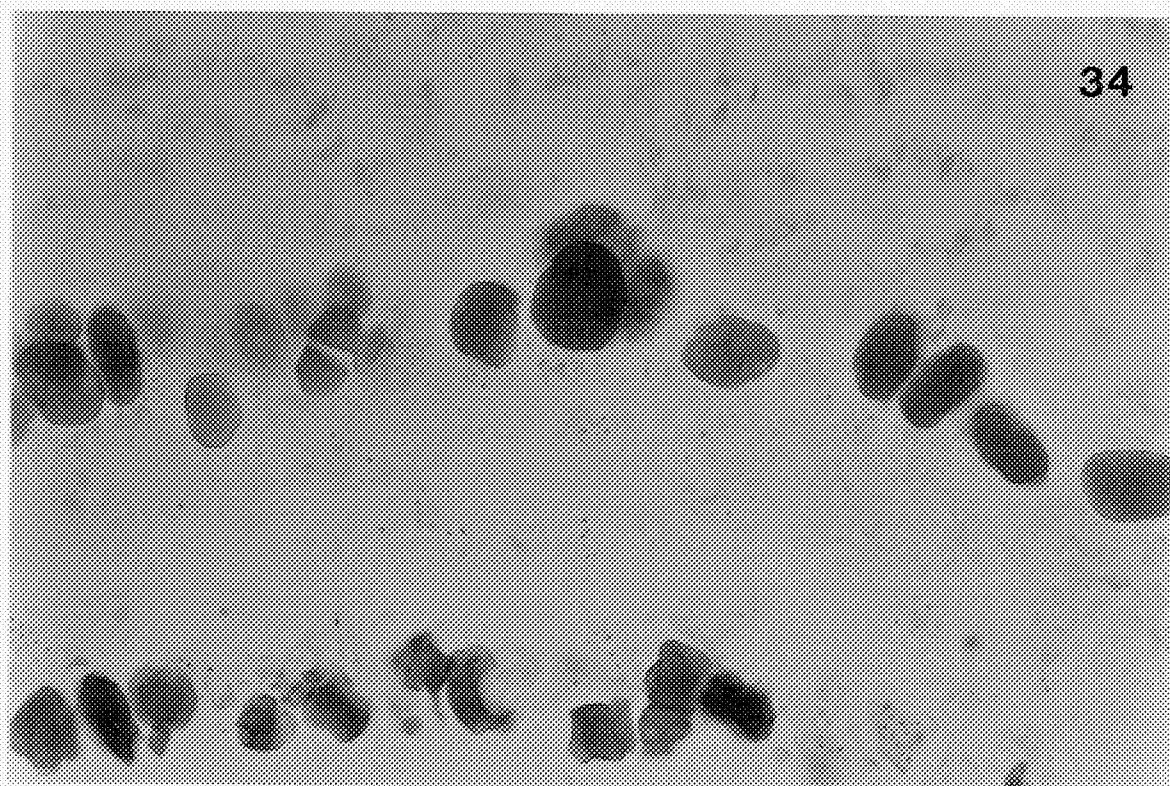


FIGURA 34: Corte transversal da testa de sementes de B. orellana no estágio E1. Podem ser visualizados os taninos corados em castanho. Aumento: 460X.

8.9 - Sudan IV: Não foi detectada a presença de substâncias graxas (cutícula, cutina e suberina) nas paredes das células palicádicas, nem nas sementes imaturas e nem nas maduras, através do uso da técnica do Sudan IV (não ilustrado).

8.10 - Lugol e H_2SO_4 : Verificou-se o aparecimento da cor azul indicadora da presença de hidrocélulose, após a adição de H_2SO_4 aos materiais corados com lugol, indicando que houve a hidrólise da celulose (figura 35).

8.11 - Fluorescência natural: No estágio E1, os contornos das células da palicada apresentaram-se mal delineados. Pode ainda ser observada uma grande fluorescência ao nível das paredes das células produtoras de corantes e o início da formação de material fluorescente nas células do endosperma. Os taninos apresentaram fluorescência amarelo-esverdeada (figura 36). No E2 verificou-se um aumento de fluorescência em verde nas células palicádicas que já estavam bem definidas e nas paredes das células em ampulheta (figura 37) que não estavam visíveis no estágio anterior (E1). As células produtoras de corante apresentaram paredes aparentemente rompidas (figura 37). No E5 (figura 38) e E7 (figura 39) ainda havia material fluorescente amarelo-esverdeado, como nos estádios anteriores, mas a fluorescência em verde aparentemente não aumentou. Ocorreu um ligeiro aumento de fluorescência na porção basal das células palicádicas tanto no E5 como no E7. Foi notada uma região de menor fluorescência na porção mediana das células da

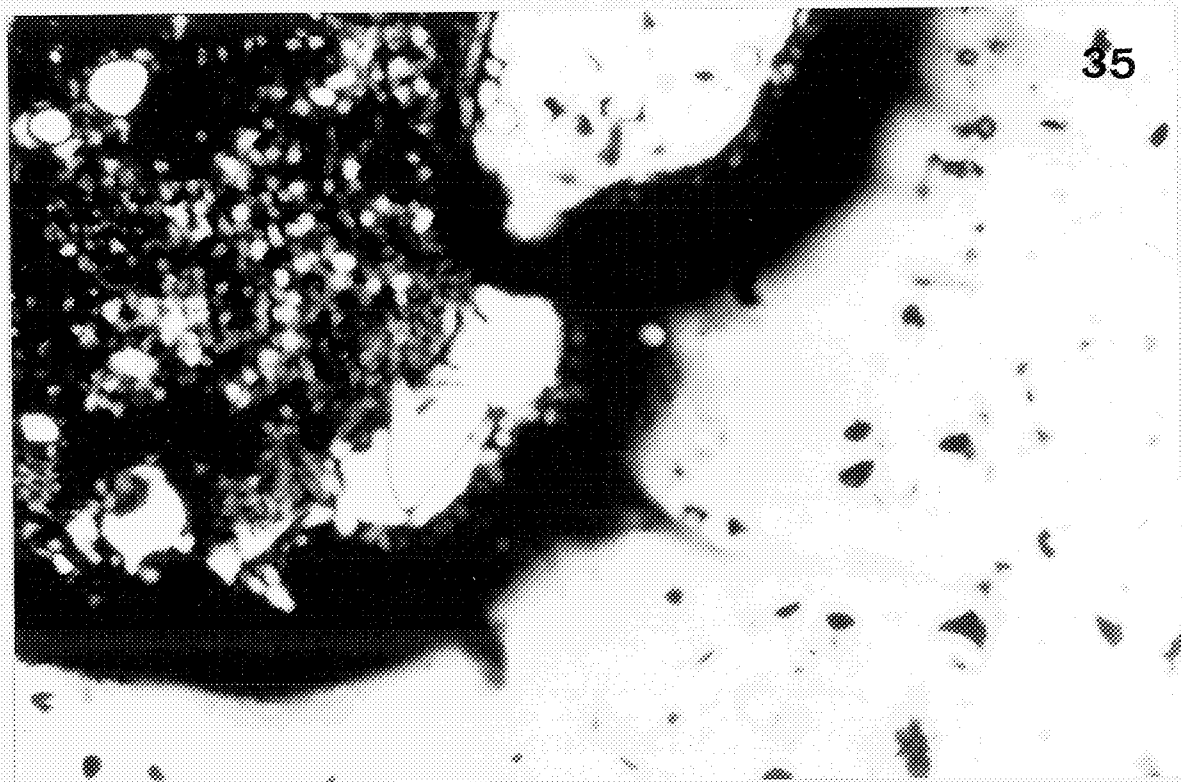
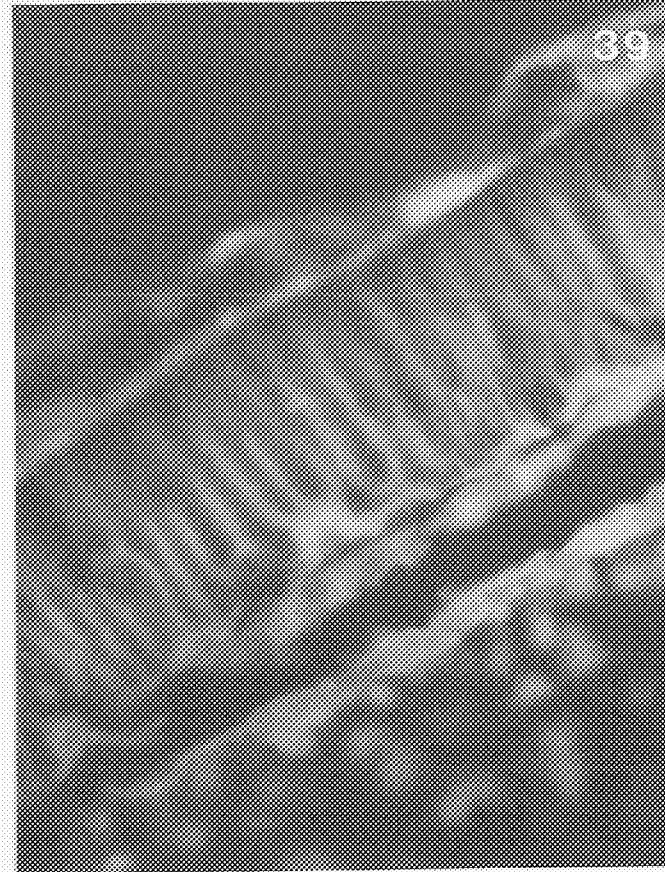
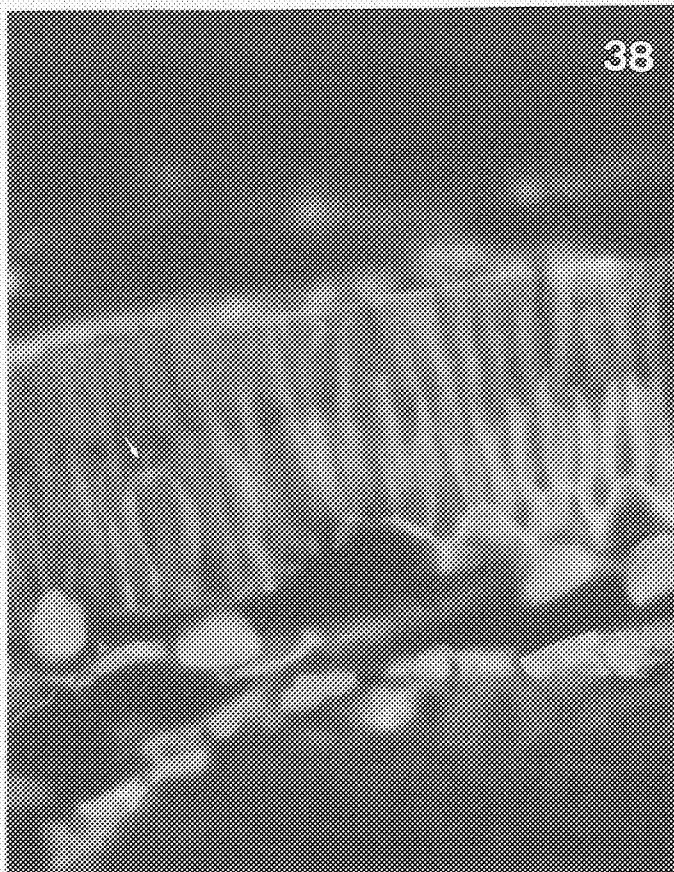
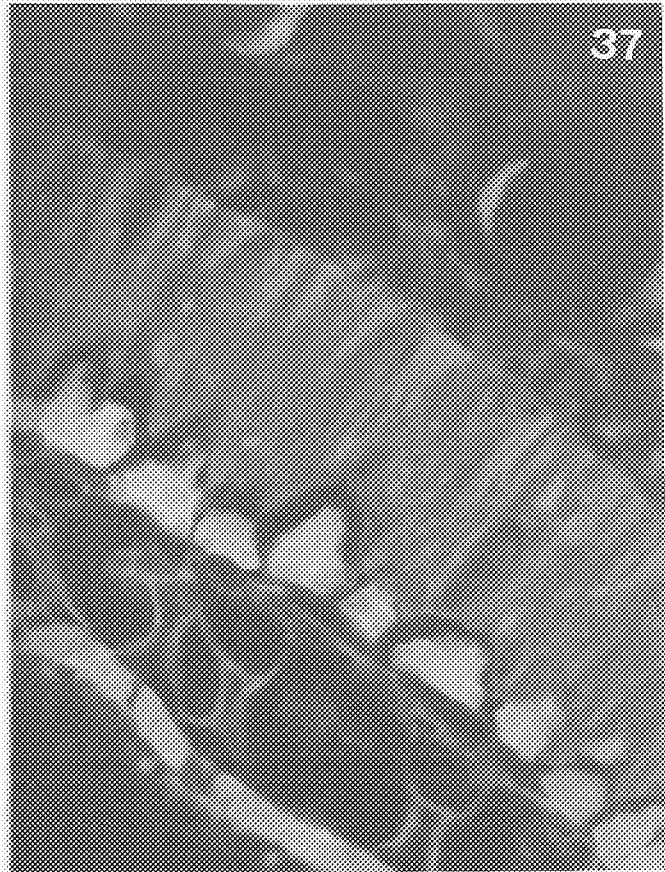
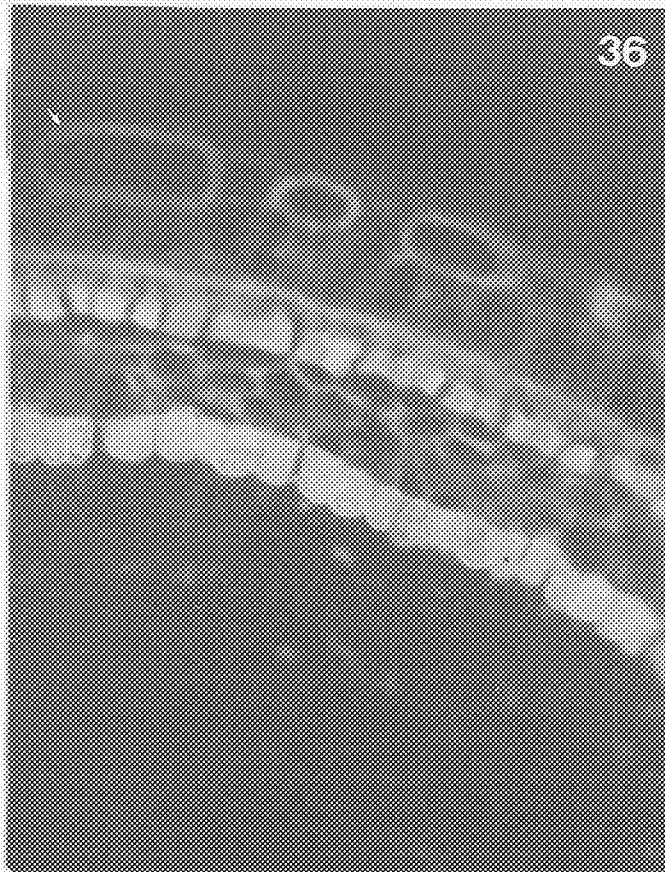


FIGURA 35: Corte transversal da testa de sementes de B. orellana no estágio E7 após o tratamento "in situ" com lugol e ácido sulfúrico. Nota-se o aparecimento da cor azulada decorrente da degradação da celulose. Aumento: 460 X.

FIGURA 36-39: Cortes transversais de testa de sementes em desenvolvimento de B. orellana observados em microscópio de fluorescência. Aumento: 460X. Fig.36: E1. Pode ser visualizado o início da formação da camada palicádica. Nota-se o contorno fortemente fluorescente das células produtoras de corante (▲) e os taninos, que apresentam fluorescência amarelo-esverdeada. Fig.37: E2. A palicada apresenta-se fluorescente em verde e os taninos estão presentes. Fig.38: E5. A fluorescência em verde da palicádica não aumentou, mas ainda está presente o material fluorescente amarelo-esverdeado (taninos). Nota-se uma região de menor fluorescência na porção mediana da palicada (▲) e um ligeiro aumento de material fluorescente na região basal. Fig.38: E7. Aspecto da testa semelhante ao estágio anterior.



palicada mais visíveis até o estágio E5 (figura 38), mas também detectável em E7 (figura 39), sugerindo uma deposição diferenciada de material nas duas porções desta camada.

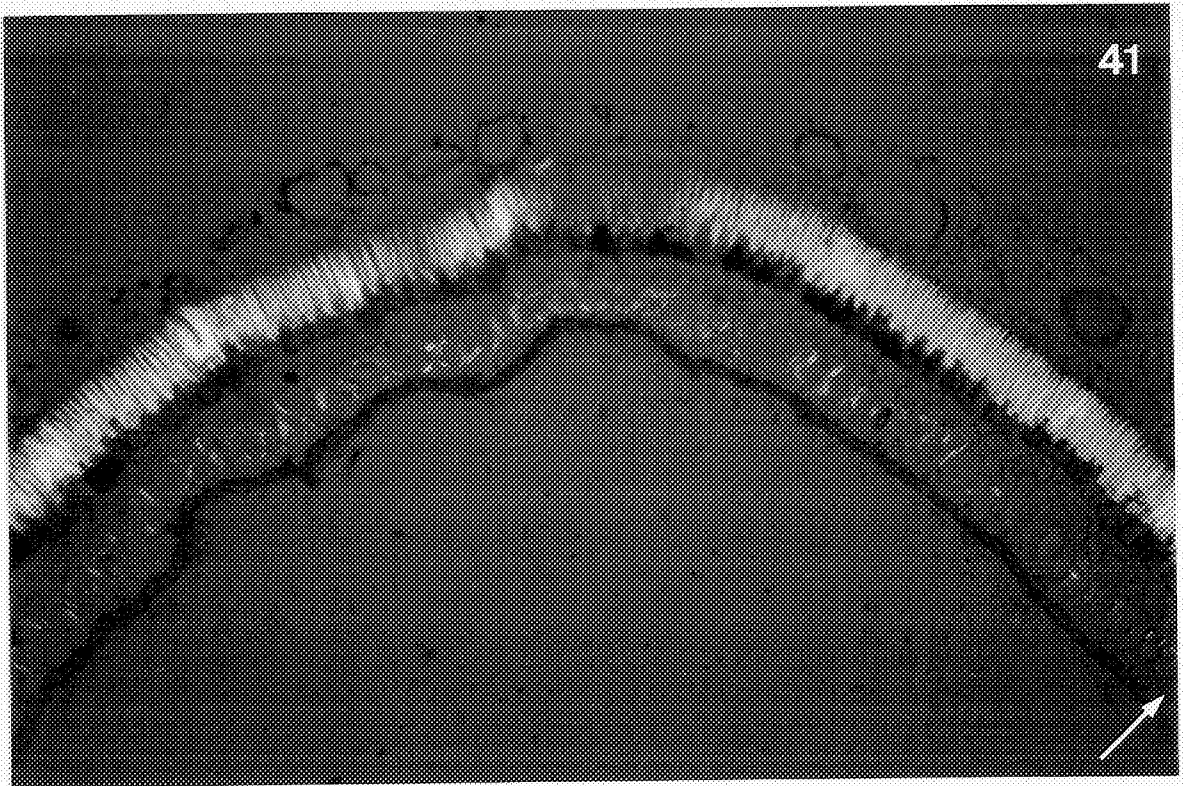
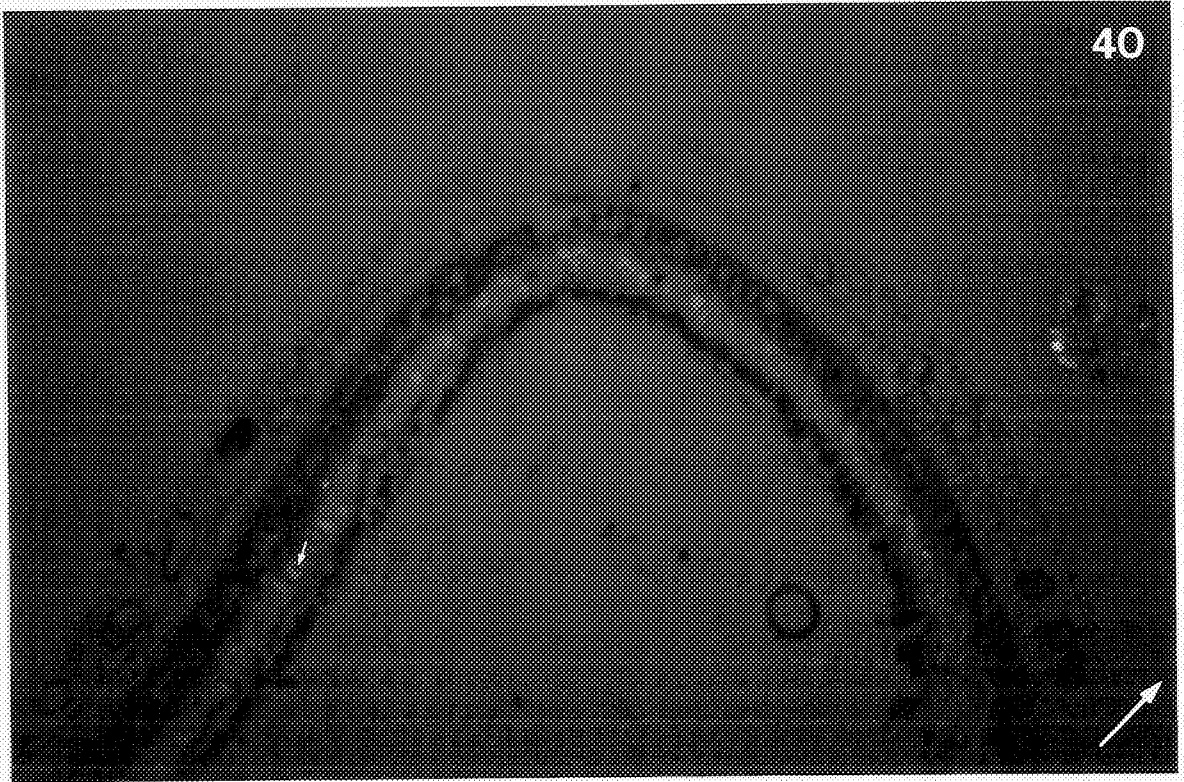
8.12 - Azul de anilina: Os dois testes específicos para calose foram negativos, pois não ocorreu o aparecimento da cor azul escuro e nem se obteve fluorescência amarela deste material (não ilustrado).

8.13 - Microscopia de polarização: No estágio mais imaturo (E1) não foi observada birrefringência nas células da palicada em formação. A partir do E2 esta camada tornou-se birrefringente e pode ainda ser notada a birrefringência dos grãos PAS positivos, em forma de cruz de malta (não ilustrado).

O uso do compensador vermelho de 1ª ordem confirmou a pequena birrefringência exibida pelo material no estágio E1, que mostrou apenas algumas regiões com cor azul ou amarela na região dos osteosclereídeos, situada entre as células contendo tanino (figura 40).

No estágio E2, pode ser notada a ordenação do material birrefringente no sentido do maior eixo das células em palicada, que exibiram a cor azul de 2ª ordem, quando a direção de propagação γ das substâncias formadoras destas células esteve paralela à direção do compensador. Exibiram a cor amarela de 1ª ordem quando sua direção de propagação esteve perpendicular a do compensador

FIGURA 40-41: Cortes transversais de testa de sementes nos estádios E1 e E2 de B. orellana observados em microscópio de polarização e compensador vermelho de 1ª ordem. Aumento: 100 X. Setas: direção ζ de propagação do compensador. Fig.40: E1. Nota-se a ausência de material birrefringente na paliçada e a sua presença nas paredes celulares dos osteosclereídeos (\perp). Fig.41: E2. A birrefringência dos osteosclereídeos se torna mais evidente e na paliçada as células com material ordenado paralelamente à direção ζ do compensador aparecem em azul; as com material ordenado perpendicularmente a ζ , apresentam-se amarelas e os materiais paralelos ao analisador, em vermelho.



e finalmente vermelha quando paralela ao analisador. As células em ampulheta também apresentaram suas paredes birrefringentes (figura 41).

A partir do E4 foi observado o aparecimento da cor amarela de 2ª ordem na região mais externa das células em paliçada e azul na região mais interna, onde nos estádios anteriores só se observava a cor azul (figura 42). Da mesma forma, a região anteriormente amarela de 1ª ordem, passou a apresentar a sua região mais externa com a cor branca de 1ª ordem (não ilustrado).

Esse comportamento se acentuou, sendo que em E6 (figura 43) já ocupava grande parte da camada paliçada e no E7 (sementes maduras) atingiu o seu máximo (figura 44-45).

8.14 - Digestão com NaOH: Nos estádios E4 (não ilustrado), E5 (figura 46) e E7 (figura 47) houve uma redução da cor amarela em relação à cor azul apresentada pela camada em paliçada, indicando que ocorre uma deposição gradual de hemiceluloses sobre a camada superior da paliçada, durante os últimos estádios de desenvolvimento das sementes.

8.15 - Digestão com H_2SO_4 : Exposição de 15 segundos ao ácido sulfúrico foi suficiente para causar a hidrólise de praticamente toda a camada em paliçada da testa, pois as cores de birrefringência desapareceram após o tratamento (figura 48).

FIGURA 42-43: Cortes transversais de testa de sementes nos estádios E4 e E6 de B. prellana observados em microscópio de polarização e compensador vermelho de 1ª ordem. Aumento: 100 X. Seta: direção δ de propagação do compensador. Fig.42: E4. Nota-se o aparecimento de material com cor de birrefringência amarelo de 2ª ordem na porção apical das células da palicada quando o seu maior eixo se encontra paralelo à direção δ de propagação do compensador. Fig.43: E6. A região cujo aparecimento se deu em E4 torna-se mais espessa e pode ser notada a cor branca de 1ª ordem no células cujo maior eixo está direcionado perpendicularmente à direção δ do compensador (\perp).

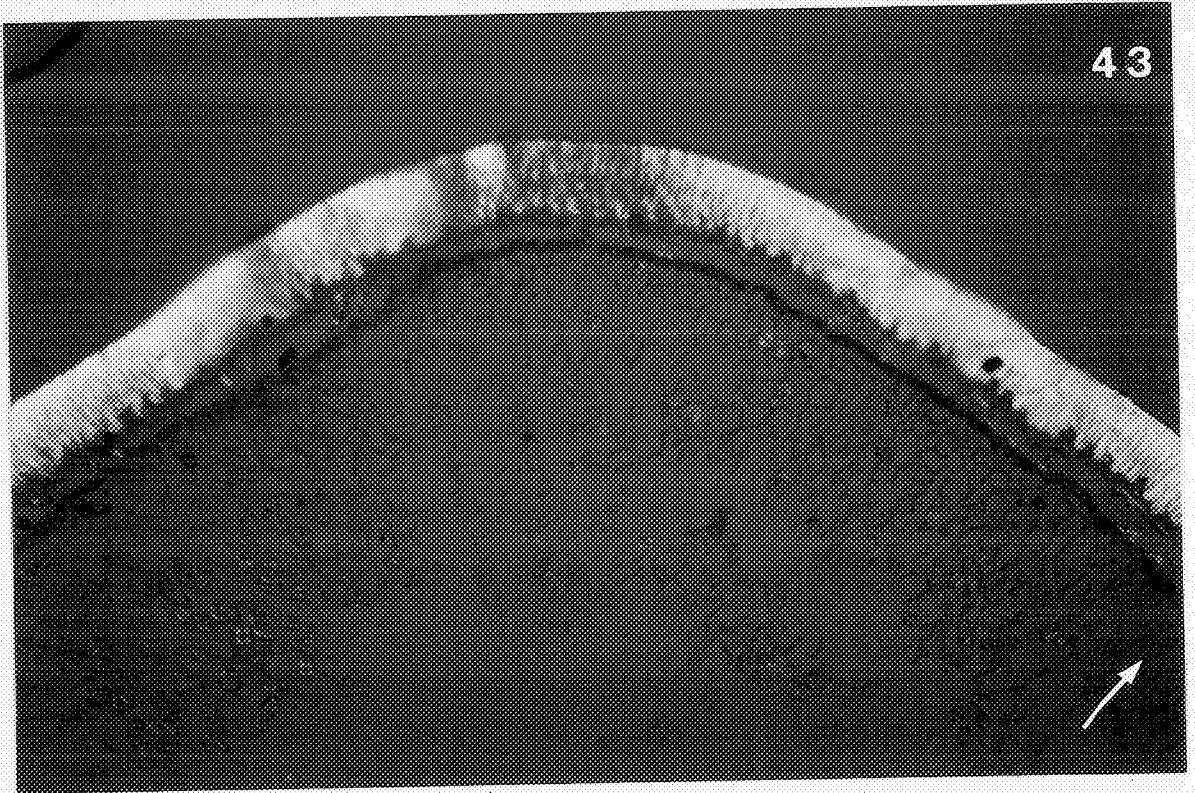
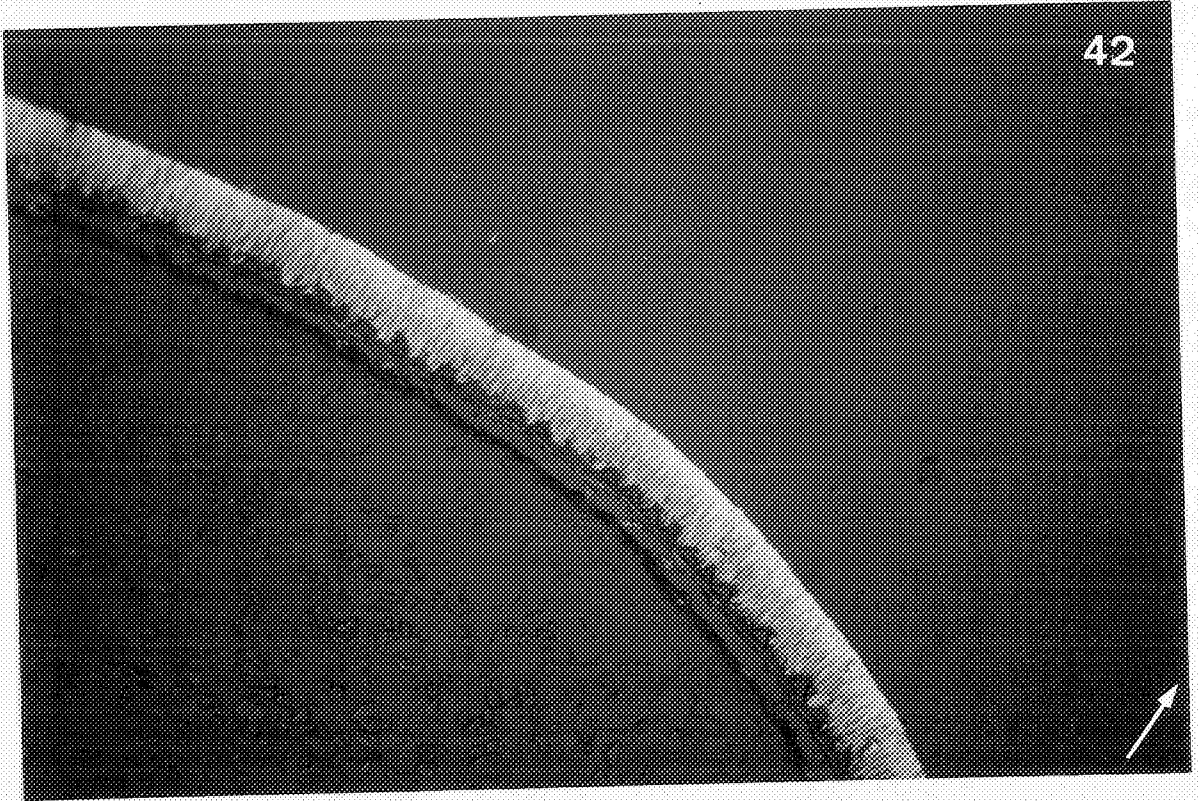


FIGURA 44-45: Corte transversal de testa de semente no estádio E7 de B. orellana observado em microscópio de polarização e compensador vermelho de 1ª ordem. Aumento: 400 X. Seta: direção \uparrow de propagação do compensador. Nota-se que a porção apical das células da paliçada se apresentam na cor amarela de 2ª ordem quando as células estão com seu maior eixo paralelas à direção \uparrow do compensador (Fig.44) e se apresentam na cor branca de 1ª ordem quando esse eixo se encontra perpendicular ao \uparrow do compensador (Fig.45).

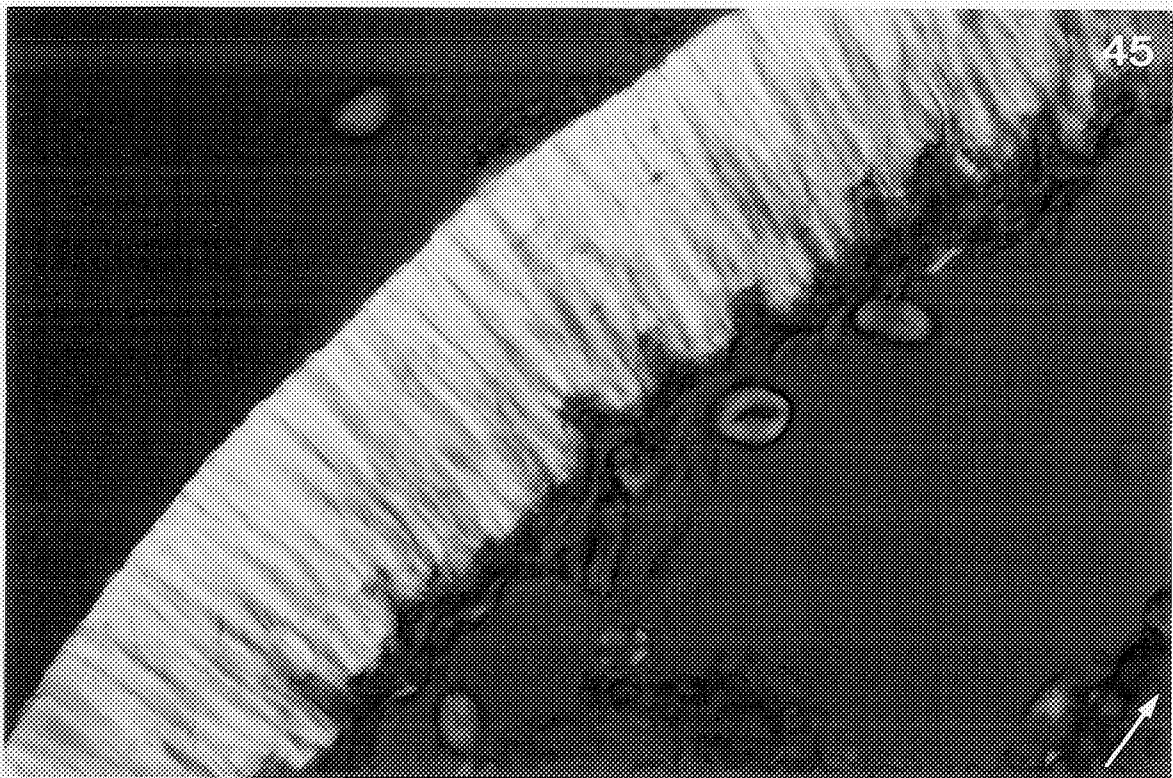
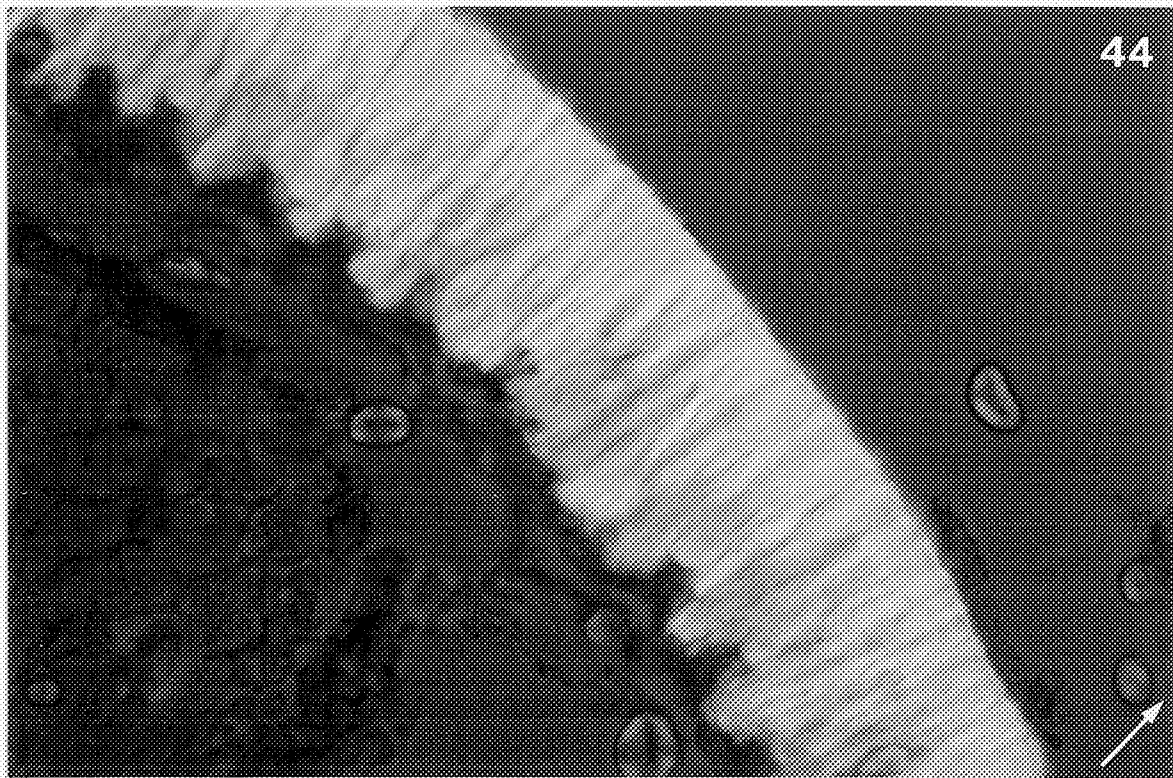
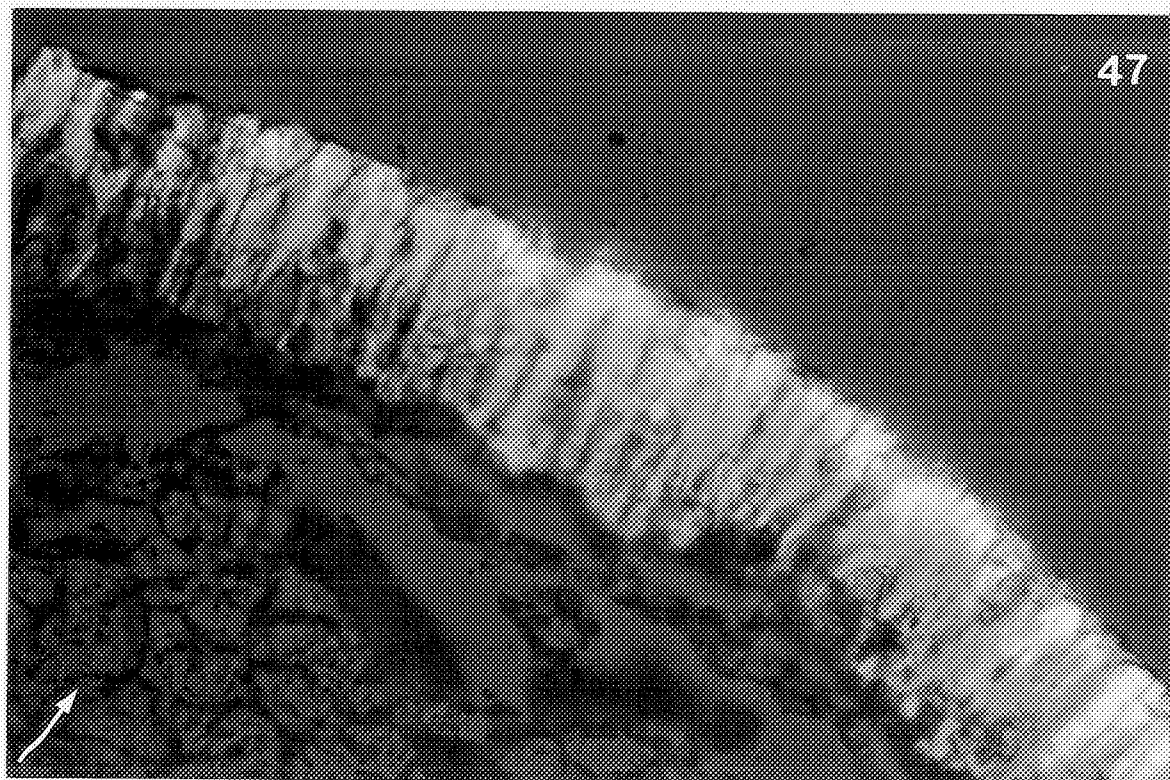
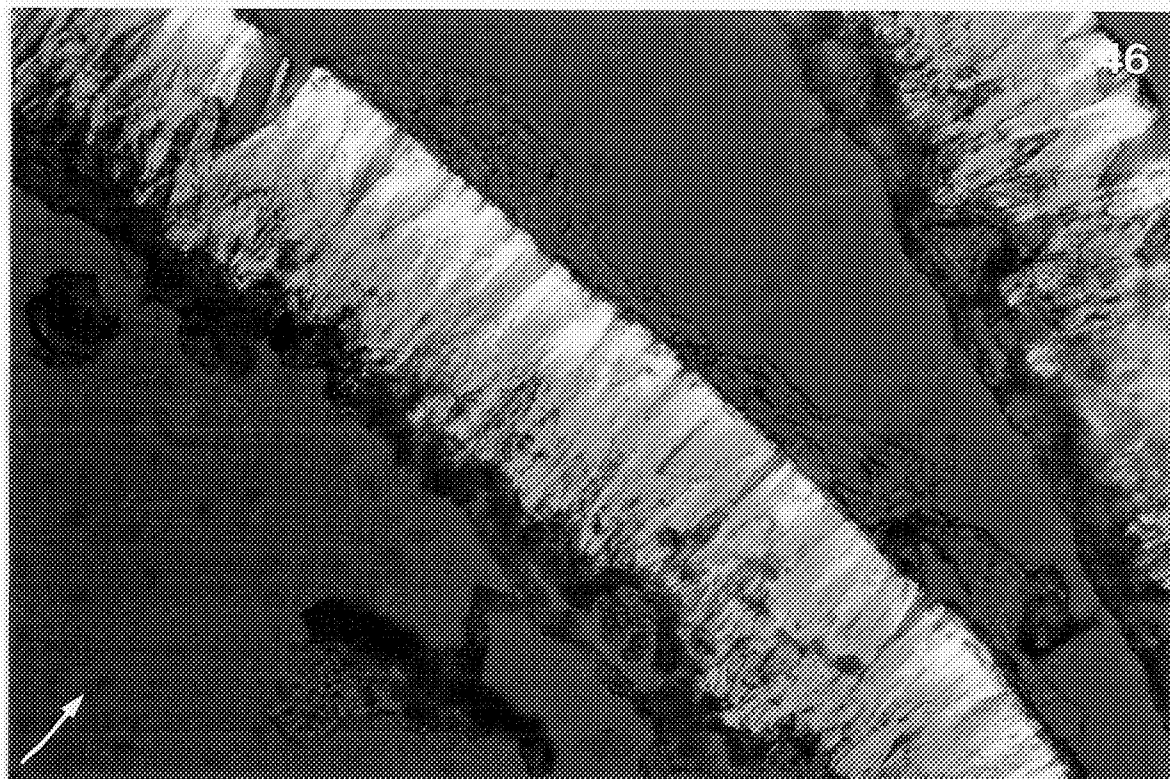


FIGURA 46-47: Cortes transversais de testa de sementes de B. orellana tratados com NaOH a 4% e observados em microscópio de polarização e compensador vermelho de 1ª ordem, posicionados com o maior eixo das células da palicada, paralelo com a direção χ de propagação do compensador. Nota-se que a maior parte da porção apical das células que anteriormente apresentavam-se amarelas, voltaram a exibir a cor azul de 2ª ordem. Aumento: 400 X. Seta: direção χ de propagação do compensador. Fig. 46: E5. Fig. 47: E7.



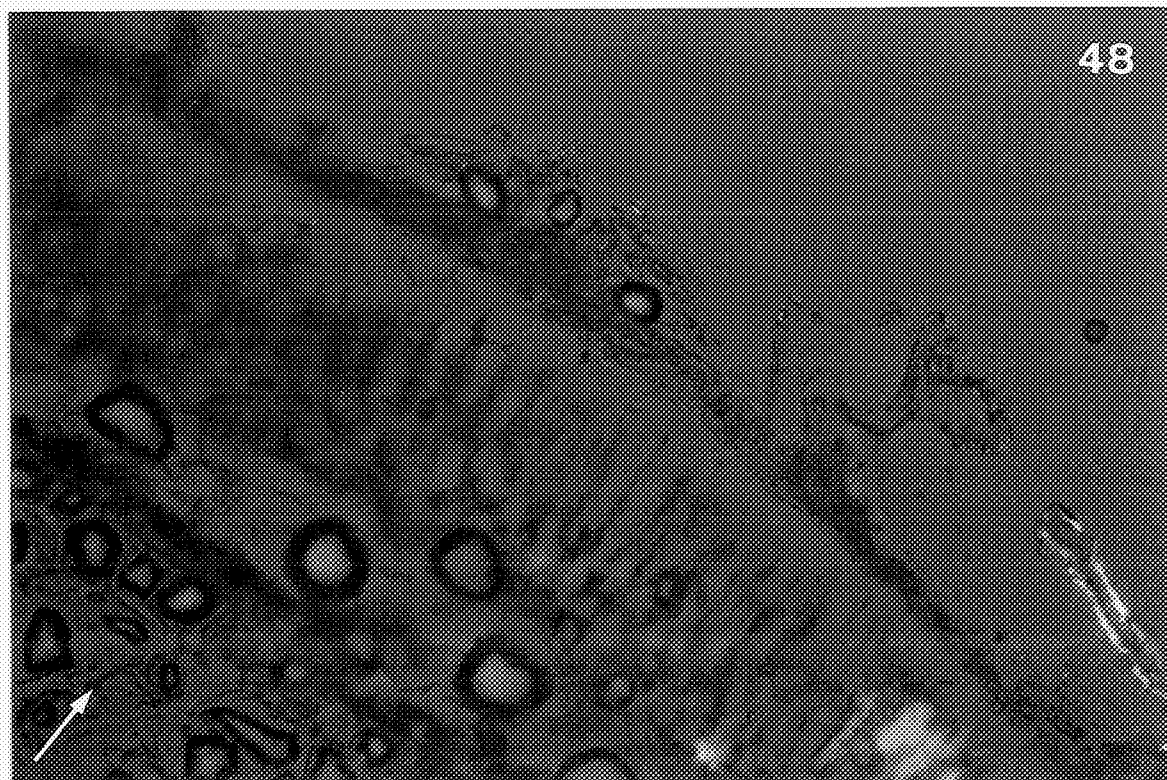


FIGURA 48: Corte transversal de testa de semente no estágio E7 de *B. prellana* tratado com H_2SO_4 a 72% e observado em microscópio de polarização e compensador vermelho de 1ª ordem. Nota-se a digestão praticamente total do material birrefringente presente na camada palicádica. Aumento: 400 X. Seta: direção de propagação do compensador.

DISCUSSÃO

A idade fisiológica das sementes pode ser caracterizada adequadamente através de alterações que ocorrem durante seu desenvolvimento. Estas alterações podem caracterizar índices de idade fisiológica, que são extremamente úteis, principalmente em condições naturais, onde a idade cronológica assume um significado menor, devido a alterações ambientais.

Índices de idade fisiológica baseados na morfologia e/ou comprimento de frutos e sementes, foram utilizados para caracterizar estádios de desenvolvimento de sementes (Walbot et al. 1972, Adams & Rinne 1981, Figueiredo & Pereira 1985). Índices de idade fisiológica baseados no peso fresco e teor de umidade foram usados em Acacia auriculiformis (Pukittayacamee & Hellum 1988).

Em Bixa orellana, os estádios de desenvolvimento foram caracterizados com base no comprimento e coloração dos frutos e morfologia, peso fresco e seco associados com o teor de umidade das sementes. Entre estes parâmetros, o peso fresco e seco associados ao teor de umidade foram os mais adequados para separar todos os estádios de desenvolvimento. Entretanto, o aspecto dos frutos e sementes foram convenientes para uma separação preliminar dos estádios. Talvez os primeiros parâmetros sejam mais convenientes, pois esta espécie possui segregação ao acaso, e há uma variação muito grande entre os indivíduos. Além disso, em um

mesmo indivíduo ocorrem algumas alterações fenotípicas entre uma colheita e outra no ano seguinte, devido talvez a flutuações ambientais.

A absorção de água pelas sementes imaturas de Bixa orellana apresenta algumas peculiaridades. Sementes imaturas nos primeiros estádios não embebem, pois já estão hidratadas, havendo portanto uma grande resistência à entrada de água, devido ao seu alto potencial hídrico. Além disso, as sementes possuem poucas matrizes (amido, corpos protéicos e paredes celulares) que poderiam ter papel na alteração de seu potencial mátrico. À medida que a semente se desenvolve, há uma tendência a maior embebição, devido a uma redução do potencial hídrico. A baixa embebição verificada no último estágio de desenvolvimento (E7) deve-se à impermeabilização da testa, processo que será discutido com detalhes mais adiante.

Nos estádios E4 e E5 há uma maior entrada de água em relação aos estádios anteriores, provavelmente devido à presença de uma maior quantidade de matrizes hidrofílicas, como amido, corpos protéicos e paredes celulares, embora estas ainda se encontrem parcialmente hidratadas. Esta hidratação explica porque há uma embebição tão baixa em relação às sementes completamente maduras escarificadas, que será discutida mais à frente.

As sementes no estágio E6 apresentam um teor de umidade muito baixo, mas também um adiantado processo de impermeabilização, o que explica a sua pouca embebição.

O potencial mátrico é um dos componentes do potencial hídrico e assume importância no processo de embebição das sementes (Labouriau, 1983). Como já foi dito, amido, proteínas e paredes celulares são os compostos e estruturas celulares envolvidas neste componente. Os outros componentes do potencial hídrico são o potencial osmótico e o potencial de pressão. O potencial osmótico está correlacionado com a concentração de substâncias dissolvidas na célula e influencia a entrada de água: quanto maior a sua concentração mais baixo é o potencial hídrico. O potencial de pressão se estabelece quando a água entra na célula, e exerce uma força contra a parede celular. Este componente, ao contrário dos anteriores, causa um aumento no potencial hídrico da semente e portanto leva a uma redução na taxa de entrada de água (Bewley & Black, 1986).

Entre todos os tecidos da semente, a testa é a parte que opõe maior resistência ao fluxo de água, como já foi demonstrado em sementes de Brassica napus (Shaykewich & Williams, 1971). Em sementes completamente maduras e impermeáveis de Bixa orellana esta resistência é total.

Em sementes escarificadas de urucum, a embebição ocorre normalmente seguindo o modelo da cinética da embebição (Bewley & Black, 1986). Na fase inicial ocorre uma rápida absorção, dependente de processos físicos, fatores ambientais, como temperatura e por forças mátricas inerentes à semente (Labouriau, 1983). A segunda fase é caracterizada por um período em que não há aumento em peso fresco, já que a absorção física da água pela semente

atingiu um equilíbrio osmótico. Sementes dormentes ou mortas mantêm este nível de hidratação. Sementes viáveis, quando em condições favoráveis, entram na terceira fase de embebição, que é caracterizada por uma absorção metabólica de água, a qual é associada com a germinação visível da semente. Há ainda sementes que apresentam impermeabilidade do tegumento à absorção de água, não mostrando assim, nenhum aumento de peso fresco quando colocadas em contato com a mesma. A absorção ocorrerá após a quebra de sua dormência e se dará apresentando as três fases de embebição descritas (Mayer & Poljakoff-Mayber 1975, Labouriau 1983). A duração de cada uma destas fases depende de certas propriedades inerentes à semente, como níveis de substratos hidratáveis, permeabilidade do tegumento, tamanho, entrada de O₂ e também das condições que prevalecem durante a hidratação, como temperatura, teor de umidade e composição do substrato (Bewley & Black, 1986).

Sementes maduras recém-colhidas de Bixa orellana praticamente não embebem, mas o fazem quando escarificadas. Pode-se afirmar assim que estas sementes apresentam dormência imposta pela testa.

Em outras espécies como Halimium hamilifolium (Peña et al. 1988), Ricinus communis cv Guarani (Lagôa e Pereira, 1990), Rhus javanica (Washitani, 1988), Tetrapleura tetraptera (Odoemena., 1988), Sesbania punicea e S. bispinosa (Graaf e van Staden, 1983) o tegumento também funciona como barreira ao fluxo de água e tratamentos de escarificação eliminam este impedimento.

Sementes imaturas de urucum não germinaram durante os três primeiros estádios de desenvolvimento. A capacidade germinativa foi atingida quando as sementes alcançaram o ponto de máximo acúmulo de matéria seca. Este estágio foi alcançado quando as sementes ainda possuíam altos teores de umidade, confirmando o que foi encontrado para outras espécies como por exemplo Ricinus communis (Kermode & Bewley, 1989), Glycine max (Obendorf *et al.*, 1980, Rosenberg & Rinne, 1986, Miles *et al.* 1988) e várias cultivares de feijão (Adams & Rinne, 1981). Entretanto, para Phaseolus vulgaris cv Goiano Precoce, Figueiredo (1984) não encontrou esta relação, pois sementes com o máximo conteúdo de matéria seca ainda assim não atingiam sua germinação máxima. Este autor concluiu que o fator limitante nesta variedade era o teor de umidade.

O teor de umidade nas sementes de urucum declina durante o período sobre o qual a germinabilidade se desenvolve. A principal mudança no conteúdo de água coincide com o acúmulo de matéria seca. É possível que esta perda de água tenha algum papel no desenvolvimento da capacidade germinativa, ou no gradiente de potencial hídrico entre a semente e o fruto (Welbaum & Bradford, 1988).

Além disso, os períodos de intensa desidratação que, aparentemente, são importantes para o desenvolvimento de sementes de leguminosas, ocorrem após o acúmulo de matéria seca, como verificado em ervilha (Le Deunff & Rachidian, 1988) e soja (Rosenberg & Rinne, 1986). Em melão a taxa de declínio em conteúdo de água é mais lenta após a fase final de acúmulo de matéria seca (Welbaum

& Bradford, 1989). Entretanto em B. orellana, ocorre inicialmente uma perda muito lenta de água (E1-E3). Esta perda de água ainda é lenta quando a semente atinge o seu máximo de matéria seca (E4-E5) e a partir deste ponto cai bruscamente.

A velocidade de germinação que as sementes de urucum no E4 apresentam é menor quando comparada com os estádios mais avançados, sendo que nestes últimos (E5 a E7) a velocidade de germinação praticamente não se altera. Em sementes de feijão foi verificado que existem três faixas de velocidade de germinação das sementes, durante o desenvolvimento, sendo maior no último estágio (Walbot et al., 1972, Figueiredo & Pereira 1990). Estes autores demonstraram que a desidratação artificial conduz à promoção da capacidade e velocidade de germinação.

A proposição de que a desidratação impõe o processo de maturação nas sementes (Adams e Rinne, 1981, Rosenberg e Rinne, 1986) poderia explicar este atraso na germinação das sementes de urucum no E4. Entre o E4 e o E5 poderiam ocorrer mudanças sutis resultantes de pequenas flutuações no conteúdo de água, que por sua vez afetariam a velocidade de germinação. Estas flutuações de conteúdo de água à medida que ocorre a desidratação, causam alterações no metabolismo em sementes de soja (Rosenberg e Rinne, 1986), bem como alterações quantitativas e qualitativas de mRNA em sementes de Ricinus communis (Kermode et al., 1989a). Também foram verificadas alterações no balanço hormonal (níveis de ABA), inibindo ou permitindo o desenvolvimento até a germinação em sementes de Phaseolus vulgaris e Ricinus communis (Kermode et al.,

1986), embora tenha sido demonstrado, na cultivar Goiano Precoce desta espécie, que o nível endógeno de ABA não está relacionado com a capacidade germinativa das sementes em desenvolvimento (Figueiredo & Pereira, 1990).

As sementes nos primeiros estádios não germinam devido, provavelmente à insuficiência de materiais de reserva com foi demonstrado pela análise histoquímica.

A análise "in situ" do material de reserva das sementes de urucum revelou que ocorrem principalmente proteínas e amido nas células do endosperma.

Um método eficiente para detectar polissacarídeos neutros é a reação do PAS. O ácido periódico oxida hidroxilas de carbonos vicinais, rompendo a ligação entre os mesmos e produzindo dois radicais carbonila, que se ligarão com o reativo de Schiff através de ligações covalentes (Mello e Vidal, 1978). Assim a reação PAS detecta polissacarídeos neutros como por exemplo a celulose e o amido.

Durante os estádios iniciais o formato dos grãos de amido se mostrou elíptico devido provavelmente a uma menor quantidade de amilose. Com o desenvolvimento estes grãos tornam-se mais esféricos, devido a um aumento de amilose em relação à amilopectina (Bewley & Black, 1986).

A partir do E4 não foram notadas alterações no tamanho e quantidade dos grãos de amido que se mantiveram aparentemente constantes até E7. Isso demonstra que a partir destes estádios as células do endosperma já se apresentavam totalmente formadas com

relação a esta reserva.

Outra forma de evidenciar o amido foi o uso da microscopia de polarização. Sob luz polarizada os grãos de amido apareceram sob a forma de cruz de malta. Este aspecto característico deve-se ao fato de que diversas moléculas de amilose e amilopectina se dispõem circularmente a partir de um centro de nucleação (Vidal, 1987).

Para a visualização do material protéico utilizou-se Xylidine Ponceau a pH 2,5. Este corante possui dois radicais sulfato ionizados neste pH que se ligam aos radicais catiônicos (NH_3^+) disponíveis nas proteínas.

O uso do Xylidine Ponceau possibilitou a verificação de diferença no conteúdo protéico de células no endosperma das sementes durante o seu desenvolvimento. Houve acúmulo de material XP positivo disperso pelo citoplasma destas células, à medida que a semente de B. orellana se desenvolveu.

O aspecto do material protéico entre o E5 e o E7, indicam diferenças no grau de hidratação destas moléculas. No E5 elas ainda estão bastante hidratadas e mais dispersas pelo citoplasma. No E7 as proteínas já se encontram no seu grau máximo de desidratação, o que confirma os resultados obtidos para o teor de umidade e a classificação dos diversos estádios.

Segundo Mayer & Poljakoff-Mayber (1975) as proteínas são as componentes celulares que mais embebem nas sementes. Assim a diferença no grau de hidratação das proteínas pode explicar em parte porque as sementes do E4 e E5, com acúmulo protéico máximo,

embebem a taxas muito inferiores se comparadas com as sementes maduras escarificadas.

A detecção da fluorescência natural revelou a presença de aminoácidos aromáticos no conteúdo protéico, principalmente triptofano e tirosina, pois a fenilalanina possui excitação máxima a 260 nm (Udenfriend, 1962) e o filtro de excitação utilizado foi superior a este valor. O uso deste método revelou o mesmo padrão obtido pelo XP: há uma tendência de aumento no conteúdo protéico durante os estádios de desenvolvimento. No início há pouco material fluorescente, que vai aumentando até o estágio E4, que corresponde ao máximo acúmulo de matéria seca. A partir daí não é mais observado um aumento na fluorescência.

Os resultados obtidos para o material presente no endosperma, justificam o fato de que a partir do E4, as sementes já estão fisiologicamente maduras, pois todo o material de reserva já está formado, o que está de acordo com as análises de acúmulo de matéria seca, que atinge o máximo neste estágio.

A partir do momento em que a semente está fisiologicamente madura, ela torna-se capacitada a germinar se colocada em condições adequadas.

A germinação de muitas espécies é afetada pela presença de luz. Miconnia cinnamomifolia (Queiroz, 1983), Impatiens wallerana (Souza, 1990), Stevia rebaudiana (Randi & Felipe, 1981), Avena fatua (Hilton & Bitterli, 1983) e Vitis vinifera cv Patricia (Pereira & Maeda, 1986), são exemplos de sementes que só germinam em presença de luz. Existem outras sementes que só germinam em

ausência de luz, como Amaranthus retroflexus, Lamium amplexicaule, Nemophila menziesii (Bewley & Black, 1982), Cucumis anguria (Cardoso, 1985), Ricinus communis (Lagôa & Pereira, 1987). Além destas, existem espécies que são indiferentes à luz para germinar, como por exemplo, Anemona nemorosa, Brionia alba e Datura stramonium (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975).

As sementes de B. orellana são indiferentes à luz para germinar, pois a sua taxa de germinação é baixa tanto no escuro como na luz.

Existem espécies em que a germinação das sementes é promovida ou inibida pela lavagem. Quando ocorre promoção, o efeito da lavagem seria a remoção de substâncias inibidoras da germinação como verificado em Beta vulgaris cv. Kawemagamono (Santos & Pereira, 1989) e Vitis vinifera cv. Patricia (Maeda & Pereira, 1987). Por outro lado, a lavagem em água inibe a germinação de Ricinus communis cv. Guarani (Lagôa & Pereira, 1990) e Datura stramonium (Villar, 1982), por remover promotores de germinação.

Em sementes maduras intactas ou escarificadas de Bixa orellana a lavagem das sementes não tem nenhum efeito promotor ou inibidor. Portanto, se estas substâncias existem nas sementes, não ocorre a sua eliminação através da lavagem.

Sementes de diferentes espécies requerem faixas de temperatura diferentes para a sua germinação. Estas diferenças podem ser determinadas por fatores genéticos, pelos níveis de reguladores endógenos de crescimento, pela idade da semente e pelas suas condições de desenvolvimento (Probert et al., 1985). De maneira

geral temperaturas muito altas ou muito baixas inibem a germinação. Dentro da faixa de temperatura em que ocorre germinação há usualmente uma temperatura ótima, na qual um maior número de sementes germina, num período de tempo mínimo (Labouriau, 1983).

Sementes escarificadas de B. orellana germinam bem em temperaturas acima de 20°C. Embora em temperaturas de 25, 30 e 35°C as porcentagens finais de germinação não tenham diferido entre si, a velocidade de germinação foi menor para as sementes expostas a 35°C. Em temperaturas de 20°C a promoção e velocidade da germinação foram inferiores às desta faixa e a 15°C praticamente não ocorreu germinação. Portanto, a faixa ótima para esta espécie se situa entre 25-30°C.

Sementes intactas de B. orellana apresentam um comportamento ligeiramente diferente. A maior porcentagem de germinação foi obtida a 35°C, tendo sido encontrados valores intermediários a 30°C e porcentagens mais baixas a 25°C. No entanto quando se analisa a velocidade de germinação fica evidente que 25°C é a melhor condição, pois a germinação ocorre mais rapidamente, sendo seguida por 30°C. A velocidade mais baixa ocorreu a 35°C.

O atraso na germinação de sementes de urucum em temperatura de 35°C pode ser explicado por uma alteração no seu sistema enzimático. Segundo Koller (1972) com o aumento da temperatura, há uma tendência progressiva de alterações enzimáticas, tanto em atividade como em configuração, até a sua desnaturação. A ausência completa de germinação em algodão (Abdelmagid & Osman 1977) a temperatura de 40°C é atribuída a desnaturação de proteínas.

Entretanto McGinnies (1960) mostrou que temperaturas mais altas causam uma aceleração da iniciação da germinação das sementes de várias gramíneas, mas causam uma redução na sua porcentagem total.

A inibição da germinação de sementes de urucum a 15°C, pode ser explicada por uma redução drástica no seu metabolismo. Segundo Mayer & Poljakoff-Mayber (1975) esta inibição não significa que jamais ocorra germinação, uma vez que em temperaturas baixas o metabolismo torna-se muito baixo, mas não inativo, podendo a semente vir a germinar num período mais longo do que aquele utilizado para temperaturas mais altas. Uma outra possibilidade a ser considerada é a inativação de enzimas envolvidas neste processo, como foi sugerido para sementes de algodão (Abeldmagid & Osman, 1977).

Existem sementes de várias espécies que germinam melhor em regimes de temperaturas alternadas do que em temperaturas constantes como em Poa pratense (Toole, 1973). Mas há casos extremos onde não ocorre germinação em temperatura constante, como em Vitis vinifera (Pereira e Maeda, 1986).

A maioria das espécies cultivadas, como por exemplo, algodão, soja, milho e feijão (Harrington, 1953) germinam tanto em temperaturas constantes como em alternadas.

Sementes de B. orellana germinaram tanto em temperaturas constantes como nas temperaturas alternadas testadas.

A escarificação mecânica tem sido efetiva para quebrar a dormência de muitas sementes impermeáveis. Existem várias

maneiras de escarificar mecanicamente as sementes, como abrasão com lixa, danificação do tegumento com agulha, remoção de partes da sementes, seccionamento da testa. Em Sesbania punicea e S. bispinosa (Graaff & Van Staden, 1983), Tetrapleura tetraptera (Odoemena, 1988), Paspalum notatum (West & Marouski, 1989), Avena fatua (Raju et al. 1988), por exemplo, ocorre uma promoção da germinação após este tratamento. Em todos os casos este aumento está relacionado com a entrada de água na semente.

Em B. orellana a escarificação mecânica foi efetiva na quebra da dormência, levando a uma promoção da germinação.

A entrada de água foi positivamente associada com a germinação. Assim nestas sementes a testa constitui-se numa barreira física ao fluxo de água.

Vários tratamentos térmicos são utilizados com sucesso para promover a germinação de muitas sementes. Em B. orellana foram testados vários tratamentos de escarificação térmica, mas nenhum foi efetivo na promoção da germinação nesta espécie. Entretanto, estes tratamentos tiveram efeito na viabilidade e permeabilidade das sementes de urucum. Há uma tendência à perda de viabilidade e aumento de permeabilidade associados com a exposição ao calor, pois mesmo períodos de tempos curtos causaram alterações na permeabilidade e viabilidade das sementes.

Exposições mais prolongadas causaram perda de viabilidade de sementes. Este fato deve estar associado com inativação térmica ou danos ao embrião (Givelberg et al. 1984).

Em outras espécies a escarificação térmica é efetiva na promoção de germinação e aumento da permeabilidade como por exemplo em espécies de Canna (Grootjen & Bouman, 1988), Rhus javanica (Washitani, 1988) e Sesbania punicea (Graaf & Van Staden, 1983). Porém em outras os tratamentos térmicos são deletérios como por exemplo em sementes de S. bispinosa. Nesta espécie há uma grande sensibilidade ao calor, pois praticamente todas as sementes perdem a viabilidade e não germinam quando expostas ao calor (Graaff & Van Staden, 1983).

A escarificação química foi efetiva na promoção da germinação em urucum. Os tempos de imersão em ácido sulfúrico de 15 e 20 minutos foram os mais efetivos. A porcentagem de sementes permeáveis foi aumentada nos dois tempos de imersão, embora não tenha atingido o máximo. Quanto à viabilidade, não houve diferença estatística nos diversos tempos de imersão em relação ao controle, embora tenha havido uma tendência à redução a partir de 20 minutos. Assim o ácido sulfúrico não atingiu as regiões abaixo da testa e por isso não causou danos ao embrião.

Em Sesbania punicea e S. bispinosa houve um aumento de permeabilidade com o aumento do tempo de exposição ao ácido sulfúrico e a viabilidade também não foi alterada (Graaff & Van Staden, 1983). Nestas duas espécies o tratamento com ácido sulfúrico causa rupturas na região da paliçada e na camada de osteosclereídeos. A escarificação só é efetiva se atingir a camada de osteosclereídeos. Em outras leguminosas como a acácia meleira, Gymnocladus dioica e Cercis canadensis, o ácido sulfúrico

penetra através do topo das células da paliçada e expõe o lúmen destas células permitindo a embebição sem alterar a camada de osteosclereídeos (Liu et al. 1981).

Em B. orellana ocorrem rupturas na região da paliçada, desgastes na porção superior desta camada e rupturas em direção à região basal destas células, expondo o seu lúmen. Não foi possível verificar se a região dos osteosclereídeos é atingida, pois os cortes anatômicos invariavelmente causavam o rompimento desta camada tanto nas sementes escarificadas, como nas não tratadas.

A impermeabilidade do tegumento à água está correlacionada com várias características histológicas da testa da semente e com a presença de substâncias hidrofóbicas (Rolston, 1978). Assim foram executados testes histoquímicos para determinar quais as características da testa e quais as substâncias envolvidas no processo de dormência em B. orellana.

A coloração com safranina e azul astra mostrou-se eficiente para uma caracterização geral das células da testa das sementes.

O uso de safranina combinada com outro corante como o "fast green" e o azul astra é de aceitação geral entre os anatomistas para fornecer uma visão geral e uma indicação preliminar dos tipos de substâncias químicas encontradas nos tecidos vegetais. Em ápices vegetativos de Stevia rebaudiana (Monteiro & Gifford, 1988), ápices vegetativos e florais de Arachis hipogea cv Tatuí (Armando Jr. 1990) e em sementes de Prosopis tamarugo (Valentin et al., 1986) o uso de safranina e "fast green" mostraram ser adequados. Em Antonia ovata, (Venturelli & Bomtempo Jr., 1989)

foi utilizada a combinação de safranina e azul astra para observações do óvulo e desenvolvimento da testa das sementes.

A safranina possui afinidade por paredes celulares lignificadas, cutinizadas ou suberizadas e por substâncias fenólicas. O corante azul astra cora os outros componentes celulares não corados com a safranina, como paredes celulares celulósicas e pécticas (Johansen, 1940).

Comparando os materiais nos diversos estádios de desenvolvimento verifica-se que no início do desenvolvimento as paredes celulares são coradas somente em azul, indicando a presença de material péctico ou celulósico. Nos estádios finais do desenvolvimento há um aumento de material corado em vermelho entre as células paliçádicas, provavelmente devido à presença de lignina, suberina, cutina ou outras substâncias lipídicas.

Por esta coloração verifica-se que está ocorrendo um espessamento da camada paliçádica à medida que a semente se desenvolve.

Testes com azul de toluidina a pH 4.0 confirmaram os resultados obtidos pelo teste anterior. Através deste teste verificou-se que as células paliçádicas dos estádios iniciais são fortemente metacromáticas, indicando a presença de material péctico. Este material apresenta radicais aniônicos o que possibilita a interação com as moléculas planares do azul de toluidina, tornando as paredes coradas em azul arroxeado.

Com o avanço da idade verifica-se uma diminuição da metacromasia, ou seja, está havendo uma diminuição da disponibilidade de

radicais aniônicos do substrato corado, o que altera a cor obtida, que se torna azul e até azul-esverdeada. Segundo Vidal (1987), um aumento da disponibilidade de radicais aniônicos em diferentes estádios fisiológicos de um mesmo tecido ou de tecidos diferentes em função das interações com azul de toluidina, faz com que haja uma diminuição do pico de absorção da região corada devido a um empilhamento de moléculas deste corante.

O efeito visual da metacromasia é a mudança gradual da cor apresentada pelo material, que passa do verde para o azul, azul-arroxeadado e finalmente magenta. Na testa das sementes de B. orellana está ocorrendo o inverso, ou seja as paredes celulares passam do arroxeadado para o azul, devido a um menor empilhamento das moléculas planares de azul de toluidina, indicando que está ocorrendo uma diminuição das substâncias pécticas e/ou uma agregação das mesmas com outras substâncias que neutralizam parte de suas cargas negativas. Outra possibilidade seria um aumento de substâncias neutras e/ou básicas nestes locais, que poderiam impedir ou dificultar o acesso do corante até as regiões anteriormente evidenciadas.

O corante azul de toluidina para a detecção de metacromasia tem sido usado frequentemente para outras sementes como Prosopis tamarugo (Valentin *et al.*, 1986), Canavalia ensiformis e C. gladiata (Cortelazzo, 1989), Phaseolus vulagris (Lopes, 1990).

Para identificar a evolução e natureza das células da testa já detectados com os dois métodos anteriores, foram feitos testes específicos para cada uma das prováveis substâncias químicas

envolvidas no processo de impermeabilização da testa.

O uso de reações de óxido redução pode indicar a natureza oxidante ou redutora dos substratos a serem visualizados. No caso específico de ferricianeto férrico, sabe-se que ele pode oxidar mono e polifenóis, grupos pirrol e indol, ácido ascórbico e lipídios não saturados. A redução do ferricianeto férrico produz sucessivamente um pigmento verde (verde da Prússia), que é o ferrocianeto ferroso-férrico, um pigmento azul (azul da Prússia) que é o ferrocianeto férrico e um "corpo" incolor (precipitado branco) que é o ferrocianeto ferroso (Adams, 1956 in: Lison 1960).

O verde da Prússia se produz espontaneamente em soluções de ferricianeto férrico ou pela ação de redutores fracos e não tem grande valor na interpretação dos resultados. A reação do ferricianeto férrico é considerada positiva quando aparece o azul da Prússia, pela ação de redutores fortes. O precipitado branco só se produz se os redutores são muito fortes como tiosulfatos e outros, que não são facilmente encontrados em preparações histoquímicas (Lison, 1960).

No último estágio de desenvolvimento de sementes de urucum, ocorreu reação positiva para a camada paliçádica, cujas paredes se coraram em azul, exceto na sua região superior, que permaneceu incolor. Estes resultados indicam a ocorrência de redutores, tais como mono e polifenóis, nos locais corados e a ausência destas substâncias na região da camada paliçádica voltada para o exterior da semente.

Em Prosopis tamarugo a impermeabilização da testa é atribuída a uma camada hidrofóbica de natureza lipídica (Valenti et al., 1986). Para identificação do material lipídico das sementes vários autores utilizam o corante Sudan, como por exemplo em Sida spinosa (Egley et al., 1986), Cercidium floridum (Scott et al., 1962), e Sesbania punicea (Bevilacqua et al., 1987). Em B. orellana não foi detectado material de natureza lipídica, uma vez que não houve reação positiva ao Sudan IV. A ausência deste material entre as células da paliçada é bastante comum, pois geralmente a suberina ou cutina se depositam em contato com o ar (Priestley & Woffenden, 1922). No entanto, nas células paliçadas de Cercidium floridum que não estão em contato com o ar, verifica-se esta deposição. A explicação possível é a presença de O₂ entre os espaços intracelulares, em concentrações suficientes para permitir esta deposição (Scott et al., 1962).

A partir da constatação de que não há substâncias lipídicas na testa, procurou-se então verificar a existência de material lignificado.

O reativo de Schiff mostrou uma reação positiva, embora de pouca intensidade e que praticamente não se alterou a partir do E4. Mas os testes com floroglucinol foram negativos para lignina exceto nas células xilemáticas. A reação de floroglucinol baseia-se na sua ligação com um radical de um anel aromático específico da molécula de lignina (Rawlins & Takakashi, 1952). Uma possível explicação seria que a reação tenha sido negativa devido à presença de outros materiais que mascararam este local de ligação, e

também devido à baixa densidade deste material. Outra possibilidade é que realmente não haja material lignificado ao nível da testa, embora tenha ocorrido reação com o reativo de Schiff, pois este corante se liga covalentemente a quaisquer radicais carbonílicos (Mello e Vidal, 1978). Assim, este reagente não é específico para lignina e poderia estar se ligando a outros compostos que tivessem estes radicais livres.

A microscopia de fluorescência também fornece boas indicações do material encontrado nas células vegetais. A fluorescência natural apresentada por certas substâncias químicas são adequadas para identificação de materiais como a lignina (O'Brien & McCully, 1981).

Sob microscópio de fluorescência as paredes celulares da camada paliádica de B. orellana, nos estádios iniciais (E1) apresentaram-se pouco fluorescentes, indicando que ainda estavam em início de formação. No estádio seguinte houve um aumento de fluorescência nestas mesmas células e, nos estádios finais esta fluorescência não aumentou, reforçando a idéia de que não ocorre uma deposição de material lignificado ou de outros fenóis, pelo menos em quantidades apreciáveis.

Análise bioquímica das sementes de urucum apresentada por Kiok (1978) revelou que não existem, nesta espécie, flavonas, flavonóides, hidroxycumarina, ácido hidroxicinâmico ou seus derivados. Entretanto foi detectada a presença de ácido salicílico, uma substância fluorescente ao UV (Kiok, 1978). A autora não demonstrou em que região da semente este material é encontrado, se

na testa ou endosperma ou ainda na região produtora de corante.

Lenoir et al. (1986) mostraram que linhagens não dormentes de cevada são mais pobres em taninos do que fenóis simples. Cariopses dormentes mostraram uma relação inversa. Embora estes autores não tenham encontrado uma evidência direta para a relação entre dormência e oxidação de compostos fenólicos pela polifenoloxidase, tratamentos físicos ou químicos, que inviabilizam esta reação, facilitam a entrada de água na semente promovendo a sua germinação.

Marbach & Mayer (1974) sugerem que a impermeabilidade da testa das sementes esteja relacionada com a presença de compostos fenólicos na testa das mesmas e nível de oxidação destes compostos. Harris (1987) correlacionou a presença de compostos fenólicos em linhagens de testa enrigecida de soja com o estabelecimento da dormência.

É pouco provável que os taninos tenham papel na inibição da germinação, pois eles ocorrem desde os estádios mais imaturos até os mais avançados do desenvolvimento das sementes. Também é improvável que outros compostos fenólicos tenham esta função, pois a análise histoquímica mostrou, pelo teste do ferricnato férrico e por fluorescência que praticamente seus níveis não se alteram no último estágio de desenvolvimento (E7).

Outras substâncias podem ser importantes na impermeabilização da testa das sementes, como os polissacarídeos neutros.

As paredes das células da paliçada das sementes de urucum coraram intensamente após o método do PAS, indicando a presença

de celulosas nesta região. A análise em microscopia de polarização comprova um aumento de cristalinidade deste material, pois as paredes celulares nos últimos estádios apresentaram-se fortemente birrefringentes. Assim o material celulósico parece ser o mais abundante nesta camada. Porém não foram encontrados registros na literatura que mencionassem a associação de impermeabilidade das sementes com celulosas, pois as celulosas são substâncias hidrofílicas devido à sua estrutura.

Segundo Fahn (1969) a estrutura morfológica da celulose pode ser sumariada da seguinte forma: dentro da parede celular são reconhecidas lamelas diferencialmente arranjadas, cada uma das quais consistindo de microfibrilas, que podem estar agrupadas em feixes. Estes feixes, bem como as microfibrilas individuais anastomosam-se para formar uma rede tridimensional. Esta rede é interconectada com uma rede de espaços microcapilares ocupados por substâncias não celulósicas como lignina, cutina, suberina, hemicelulosas e outras substâncias orgânicas e até mesmo sais inorgânicos como carbonato de cálcio, oxalato de cálcio e sílica. Em paredes celulares muito enrijecidas, as microfibrilas são mais numerosas por unidade de área e estão muito mais compactadas do que em paredes mais delgadas, onde os espaços microcapilares são maiores.

O uso da microscopia de polarização para a análise dos materiais nos diversos estádios de desenvolvimento das sementes de B. orellana revelou não só o desenvolvimento dos grãos de amido mas, principalmente a formação da camada paliçádica. Esta camada

praticamente não apresentou nenhuma birrefringência no E1, mas mostrou um aumento desta anisotropia nos estádios seguintes.

Para verificar a deposição de material birrefringente ao longo do desenvolvimento da semente, foi utilizado o compensador vermelho de 1ª ordem. Esse compensador é um cristal de quartzo de espessura bem determinada e cuja direção δ de propagação (maior índice de refração) forma um ângulo de 45° com a direção de propagação da luz plano-polarizada, introduzindo um retardo óptico constante e igual a 551nm (Bennett, 1967), o que corresponde à cor vermelha de 1ª ordem e daí o seu nome (tabela 9). Com a introdução de um material birrefringente positivo (como é o caso da maioria dos compostos biológicos), com o seu maior eixo direcionado paralelamente à direção δ de propagação do compensador, haverá uma somatória de retardos, que passarão a apresentar valores superiores a 550nm e a cor da birrefringência será de 2ª ordem, o que em termos de cores da birrefringência nas espessuras normalmente utilizadas nos cortes (7-10 μm) corresponde ao azul de 2ª ordem ($\lambda=600-700\text{nm}$). Da mesma forma se posicionarmos o material analisado com sua direção de propagação (menor eixo neste caso) perpendicular àquela do compensador, teremos um efeito de subtração de retardos que passarão a valores inferiores a 551nm (Bennett, 1967; Vidal, 1987). Para os cortes em geral, é frequente a obtenção da cor amarela de 1ª ordem ($\lambda=300-450\text{nm}$).

No E2 essa descrição foi confirmada, com o material exibindo a cor azul de 2ª ordem ou amarela de 1ª ordem quando sua direção de propagação era respectivamente paralela ou perpendicular à di

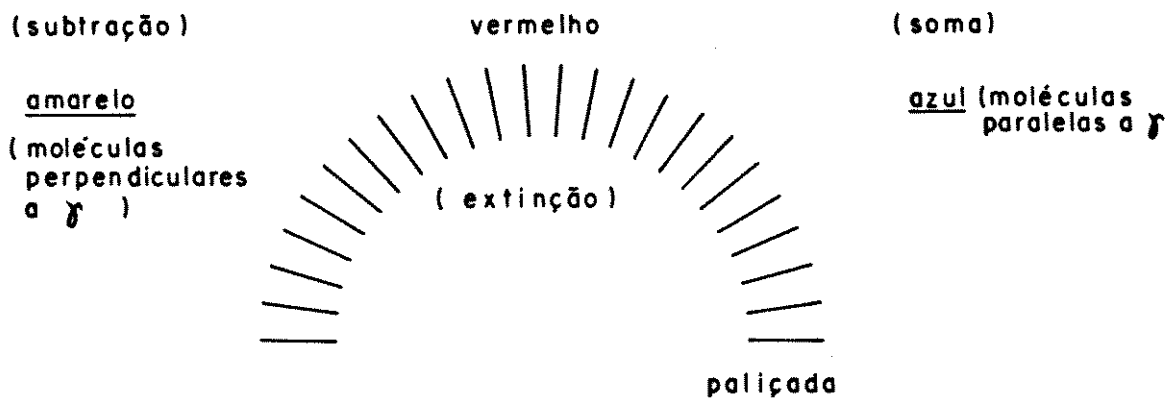
TABELA 9 - Correlação entre os retardos ópticos e as cores de interferência de birrefringência (VIDAL, 1987).

COR DE BIRREFRINGÊNCIA	RETARDO ÓPTICO
1ª Ordem	
Preto	
Cinza ferro	40
Cinza laranja	97
Cinza azulado	158
Branco acinzentado	234
Branco puro	259
Branco amarelado	267
Amarelo claro	275
Amarelo brilhante puro	332
Amarelo amarronzado	430
Vermelho alaranjado	505
Vermelho forte; profundo	551
2ª Ordem	
Púrpura	565
Violeta	575
índigo	589
Azul celeste	664
Azul esverdeado	728
Verde	747
Amarelo esverdeado	843
Amarelo (pouco lavado)	910
Laranja claro avermelhado	998-1000
Violeta escuro avermelhado	1101
3ª Ordem	
índigo claro	1151
Azul esverdeado	1258
Verde mar	1334
Amarelo esverdeado	1426
Carmim vermelho	1534
Violeta acinzentado	1652

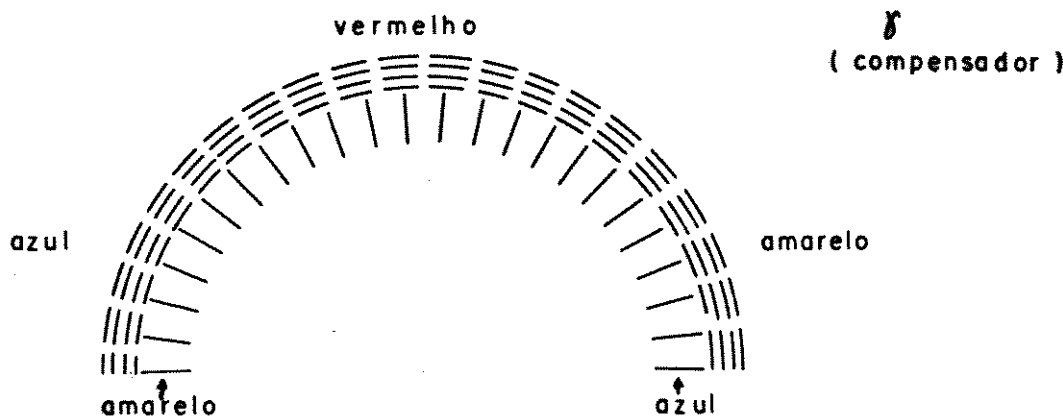
reção de propagação do compensador.

Assim a deposição do material birrefringente ao longo do maior eixo da camada paliçada neste estágio, poderia ser representado através do modelo apresentado no esquema 1.

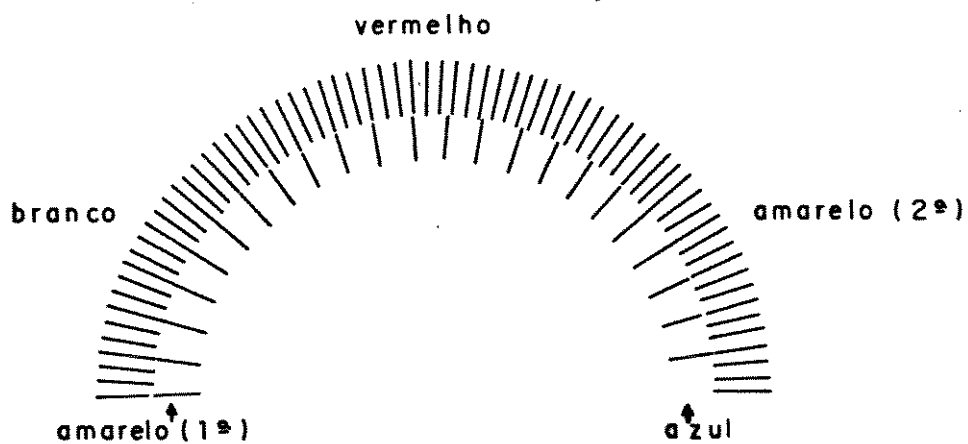
A partir do E4 começa a ser detectada a cor amarela nas porções apicais das células da paliçada juntamente com a cor azul das demais regiões desta camada. A princípio esse fato poderia indicar a deposição de moléculas perpendiculares àquelas existentes nos estádios anteriores (esquema 2). Entretanto essa hipótese foi descartada pois não apareceu a cor azul após um giro de 90° no material, mas sim a cor branca de 1ª ordem ($\lambda=250-260\text{nm}$). Assim, pode-se concluir que na posição de somatória dos retardos o amarelo apresentado tratava-se do amarelo de 2ª ordem ($\lambda=900-910\text{nm}$) indicando uma deposição de mais material birrefringente na mesma direção daquele pré-existente e apenas na porção apical da paliçada. Com um conseqüente aumento do retardo óptico nestes locais. Como a espessura dos cortes foi sempre a mesma ($8\mu\text{m}$), conclui-se que a cristalinidade desta região também aumentou, pois a birrefringência é a razão entre o retardo óptico obtido e a espessura do material (Bennett, 1967). Esse efeito é salientado ao máximo no E7, conforme mostrado no esquema 3, que sugere a deposição ordenada de moléculas e na mesma direção daquelas já existentes na paliçada, com um aumento do número de fibrilas por unidade de área e uma conseqüente diminuição dos espaços microcapilares nesta região, o que está de acordo com a estrutura organizacional sugerida por Fahn (1969) para este



ESQUEMA 2



ESQUEMA 3



homopolissacarídeo, em sementes de testa rígida.

O modelo proposto neste trabalho para a organização dos biopolímeros da camada paliçádica encontra suporte nos demais métodos utilizados. Pode ser notado que o ferricianeto férrico não foi reduzido na região apical da paliçada, indicando que nesse local não havia deposição de substâncias redutoras mais fortes como é o caso dos fenóis. Isso foi reforçado ainda com a coloração pelo reativo de Schiff que foi mais intensa nas regiões basais dessas células e pelo resultado negativo obtido pelo floroglucinol. A diminuição da metacromasia é um outro dado importante pois pode significar um acúmulo de material neutro na paliçada.

A extração realizada com o NaOH remove hemiceluloses (Fry, 1988). Os resultados obtidos indicam que há uma deposição dessas substâncias nos estádios finais de desenvolvimento da semente o que pode justificar a diminuição de permeabilidade à água a partir do E5. Estas hemiceluloses poderiam ser calose ou mananos entre outras, mas não foi encontrado calose em sementes de Bixa orellana. Em Sesbania punicea (Bevilacqua *et al.*, 1987) e em trevo (Bhalla & Slattery, 1984), houve reação fortemente positiva ao PAS nas células paliçádicas. Estes autores associaram este resultado com hemiceluloses, mais especificamente a calose, e concluíram que esta substância tem papel na impermeabilização das sementes.

A remoção do material das células paliçádicas pelo ácido sulfúrico também reforça a idéia da deposição de material cristalino nos estádios finais do desenvolvimento das sementes de B.

orellana. A formação de composto hidrossolúvel de cor azul quando o material é colocado em presença de lugol e ácido sulfúrico revela que esse material depositado na porção apical das células é celulósico.

Assim, podemos supor que inicialmente, a camada paliçada em formação apresenta grãos de amido, observado no E1 e que estariam presentes para suprir a demanda energética para as etapas subsequentes de espessamento das paredes celulares dessa camada. A partir desse estágio, passando pelo E2 e E3 há uma deposição na parede celular de substâncias pécticas, celulose, hemiceluloses e lignina o que possibilita uma coloração metacromática pelo AT, um resultado positivo com as colorações pelo reagente de Schiff e pelo ferricianeto férrico nas porções basais da paliçada e, principalmente, à observação das cores de interferência da birrefringência destas regiões. A partir de E4 começa a haver uma gradativa deposição de mais material celulósico na região apical da paliçada e essa deposição começa a tornar os espaços intercelulares menores e as paredes celulares muito mais compactadas. Com o aumento da compactação teríamos um maior retardo óptico. Concomitante, haveria uma deposição de hemiceluloses nos poucos espaços deixados após essa maior deposição celulósica, o que resultaria na impermeabilização das sementes.

Esse modo de desenvolvimento proposto, está de acordo com os resultados obtidos, o que possibilitou sugerir o modelo exposto no esquema 3 como o mais provável para explicar a dormência dessas sementes na maturidade. A impermeabilização da paliçada se

daria, desse modo, após a total formação das reservas no E4 e a forma gradual com que ela ocorre possibilitaria ainda a perda de água da semente a partir desse estágio, chegando a taxas de 10% na maturidade.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a aquisição da capacidade germinativa e o estabelecimento da dormência em sementes em desenvolvimento de Bixa orellana (urucum).

Sementes imaturas de B. orellana não germinam durante os estádios iniciais de seu desenvolvimento. As sementes adquirem a capacidade germinativa máxima quando apresentam teores de umidade entre 50-60%. Nesta fase as sementes atingem seu grau máximo de acúmulo de matéria seca.

A dormência se estabelece quando a semente apresenta um conteúdo de água em torno de 10%.

A faixa de temperatura ótima para a germinação destas sementes está entre 25 e 30°C. Regimes de temperaturas alternadas não promovem a sua germinação acima daquela apresentada pelas sementes em temperaturas constantes.

A luz não tem efeito na germinação das sementes de urucum, pois a porcentagem de germinação das sementes intactas expostas à luz e escuro contínuos foi baixa em ambos os tratamentos.

Entre os vários tratamentos de quebra da dormência testados, os mais efetivos foram a escarificação mecânica e a química. A escarificação térmica, além de ineficaz na promoção da germinação, causou a perda da viabilidade das sementes em alguns casos.

Sementes de urucum, quando escarificadas, apresentam uma taxa de embebição superior àquela apresentada por sementes intactas. Assim, esta espécie apresenta-se dormente devido à impermeabilidade da testa à água, ao nível do tegma.

Nesta espécie vai ocorrendo um espessamento gradual do tegma, especialmente na região da camada paliçádica, durante o desenvolvimento da semente. No estágio mais imaturo (E1) as paredes não se apresentam espessadas. Este espessamento começa a ser evidenciado a partir do E2 e se acentua com o avanço da idade até atingir a maturidade no E7. Neste estágio as sementes apresentam-se impermeáveis à água.

As principais substâncias químicas envolvidas neste processo são a celulose e as hemiceluloses. A lignina não tem papel na impermeabilização das sementes nesta espécie.

Através do estudo com microscopia de polarização e uso de compensador foi proposto um modelo de deposição diferenciada e gradual de celulose nas células paliçádicas. A região superior da camada paliçádica se espessa muito mais do que a região basal até atingir o seu máximo em E7.

A extração com NaOH mostrou que hemiceluloses estão presentes na região superior da camada paliçádica. Assim, a deposição intensa de celulose, principalmente na região apical, associada a uma deposição mais discreta de hemicelulose nos espaços microcapilares da estrutura da celulose, devem ser as responsáveis pela impermeabilização das sementes nesta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMAGID, A.S. & OSMAN, A.M., 1977. On the germination and changes in chemical composition during seedling emergence and development of cotton seeds. Ann. Bot., 41:697-705.
- ADAMS, C.A. & RINNE, R.W., 1981. Seed maturation in soybeans (Glycine max L.merr.) is dependent of seed mass and the parent plant, yet is necessary for production of viable seeds. J. Exp. Bot., 32:615-620.
- ARMANDO Jr., J., 1990. Floração em amendoim (Arachis hipogea L.). Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 83pp.
- ARTSCHWAGER, E., 1927 Development of flowers and seed in the sugar beet. J. Agric. Res., 34:1-25.
- ASPINALL, G.O., 1980. Chemistry of cell wall polyssacarides. In: STUMPF, P.R. & CONN, E.E. The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Vol.3. Academic Prees, New York. pp. 473-506.
- BANKS, W. & MUIR, D.D., 1980. Structure and chemistry of the starch granule. In: STUMPF, P.R. & CONN, E.E. The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Vol.3. Academic Prees, New York. pp. 321-369.
- BARROSO, G.M., 1978. Sistemática de angiospermas do Brasil. Vol.1. LTC/EDUSP, São Paulo. 315pp.

- BENNETT, H.S., 1967. The microscopical investigations of biological materials with polarized light. In: McGLUN'S JONES, R. (ed). Handbooks of microscopical technique. 3ed. Hafner Publishing Co., New York. pp. 591-677.
- BEVILACQUA, L.R.; FOSSATI, F. & DONDERO, G., 1987. "Callose" in the impermeable seed coat of Sesbania punicea. Ann. Bot., 59: 335-341.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M., 1982. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. 2. Viability, dormancy and environmental control. Springer-Verlag, Berlin. 375pp.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M., 1986. Seeds. physiology of development and germination. Plenum Press, New York. 367pp.
- BHALLA, P.L. & SLATTERY, H.D., 1984. Callose deposits make clover seeds impermeable to water. Ann. Bot., 53:125-128.
- CARDOSO, V.J.M., 1985. Germinação de sementes de Cucumis anguria. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 163pp.
- CHOPRA, R.N. & KAUR, H., 1965. Embryology of Bixa orellana Linn. Phytomorphology, 15:211-215.
- CLARK, G., 1981. Introduction. In: Staining procedures used by biological stain commission. CLARK, G. (ed). The Williams & Williams Wilkins Co., Baltimore. pp. 1-26.
- CORTELAZZO, A.L., 1989. Caracterização topoquímica e bioquímica em sementes de Canavalia ensiformis e Canavalia gladiata D.C. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 123pp.
- CUTTER, E.G., 1978. Plant anatomy: experiment and interpretation. Part 2. Edward Arnold, London. 343pp.

- DELOUCHE, J.C., STILL, T.W., RASPPERT, M. & LIENHARD, M., 1962. The tetrazolium test for seed viability. Miss. Agr. Sta. Tech. Bull., 51:1-63.
- DUKE, S.H. & KAKEFUDA, G., 1981. Role of the testa in preventing cellular rupture during imbibition of legume seeds. Plant Physiol., 67:449-456.
- DUKE, S.H., KAKEFUDA, G. HENSON, C.A., LOEFFLER, N.L. & van HULLE, N.M., 1986. Role of the testa epidermis in the leakage of intracellular substances from imbibing soybean seeds and implications for seedling survival. Physiol. Plant., 68:625-631.
- EGLEY, G.H., 1976. Germination of developing prickly sida seeds. Weed Sci., 24:239-243.
- EGLEY, G.H., PAUL Jr., R.N. & LAX, A.R., 1986. Seed coat imposed dormancy: histochemistry of the region controlling onset of water entry into Sida spinosa seeds. Physiol. Plant., 67:320-327.
- EGLI, D.B., 1990. Seed water relations and the regulation of the duration of seed growth in soybean. J Exp. Botany, 41:243-248.
- ESAU, K., 1977. Anatomy of seed plants. 2ed. John Wiley & Sons, New York. 550pp.
- FAHN, A., 1969. Plant anatomy. Pergamon Press, London. 534 pp.
- FIGUEIREDO, P.S., 1984. Germinação de sementes imaturas de Phaseolus vulgaris L. cv. Goiano Precoce. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 103pp.

- FIGUEIREDO, P.S. & PEREIRA, M.F.A., 1985. Imature seeds of Phaseolus vulgaris L.: development, germination and reproductive capacity of the resulting plants. Revta. brasil. Bot., 8:169-175.
- FIGUEIREDO, P.S. & PEREIRA, M.F.A., 1990. Germinação de sementes imaturas de Phaseolus vulgaris: envolvimento do ácido abscísico. Revta. brasil. Bot. (no prelo).
- FRETT, J.L. & DIRR, M.A., 1979. Scarification and stratification requirements for seeds of Cercis canadensis L. (redbud), Cladrastis lutea (Michx.F.) Ckoch (yellowwood) and Gymnocladus dioicus L. Ckoch (Kentucky coffeetree). Plant Prop., 25:2-4.
- FRY, S.C., 1988. The growing plant cell wall, chemical and metabolic analysis. Langman Scientific & Technical, London. 333pp.
- FYFIELD, T.P. & GREGORY, P.J., 1989. Effects of temperature and water potential on germination, radicle elongation and emergence of mungbean. J. Exp. Bot., 40:667-674.
- GIVELBERG, A., HOROWITZ, M & POLJAKOFF-MAYBER, A., 1984. Germination behaviour of Solanum nigrum seeds. J. Exp. Bot., 35:588-598.
- GRAAFF, J.L. & van STADEN, J., 1983. The effect of different chemical and physical treatments on seed coat structure and seed germination of Sesbania species. Z. Pflanzenphysiol., 112:221-230.
- GRODTJEN, C.J. & BOUMAN, F., 1988. Seed structure in Cannaceae: taxonomic and ecological implications. Ann. Bot., 61:363-371.

- HAMLY, D.H., 1932. Softening of the seeds of Melilotus alba. Bot. Gaz., XCIII:345-375.
- HARRINGTON, G.T., 1953. The use of alternating temperatures in the germination of seeds. J. Agric. Res., 23:295-332.
- HARRIS, W.M., 1987. Comparative ultrastructure of developing seed coats of "hard-seeded" and "soft-seeded" varieties of soybean Glycine max (L.) Merr. Bot. Gaz., 148:324-331.
- HERNANDEZ, H.G., 1978. Aumento de la germinación em Atriplex repanda. I-Tratamiento con ácido sulfúrico. PHYTON, 36:117-121.
- HILTON, J.R. & BITTERLI, C.J., 1983. The influence of light on the germination of Avena fatua L. (wild oat) seed and its ecological significance. New Phytol., 95:325-333.
- JOHANSEN, D.A., 1940. Plant microtechnique. New York, McGraw. 523pp.
- JOLY, A.B., 1975. Botânica. Introdução à taxonomia vegetal. 2ed. Editora Nacional/EDUSP, São Paulo. 777pp.
- KERMODE, A.R. & BEWLEY, J.D., 1986. The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. IV. Protein synthesis and enzyme activity changes within the cotyledons of Ricinus communis L. seeds. J. Exp. Bot., 38:1887-1898.
- KERMODE, A.R. & BEWLEY, J.D., 1989. Development seeds of Ricinus communis L., when detached and maintained in an atmosphere of high relative humidity, switch to a germinative mode without the requirement for complete desiccation. Plant Physiol., 90:702-707.

- KERMODE, A.R., BEWLEY, J.D., DASGUPTA, J. & MISRA, S., 1986. The transition from seed development to germination: a key role for desiccation? Hortscience, 21:1113-1118.
- KERMODE, A.R., PRAMANIK, S.K. & BEWLEY, J.D., 1989a. The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. VI-Desiccation-induced changes in messenger RNA populations within the endosperm of Ricinus communis L. seeds. J. Exp. Bot., 40:33-41.
- KERMODE, A.R., DUMBROFF, E.B. & BEWLEY, J.D., 1989b. The role of maturation drying from seed development to germination. VII-Effects of partial and complete desiccation on abscisic acid levels and sensitivity in Ricinus communis L. seeds. J. Exp. Bot., 40:303-313.
- KIERNAN, J.A., 1981. Histological e histochemical methods: theory and pratice. Pergamon Press, London. 344pp.
- KIOK, B., 1978. Estudos de flavonas, flavonóides e ácido fenólico em uñucu (Bixa orellana). Acta Amaz., 8:109-110.
- KLEIN, E.S. & PEREIRA, M.F.A., 1986. O papel do pericarpo na germinação de sementes de Beta vulgaris cv. Britta. Anais III Congr. SBSP:51-58.
- KOLLER, D., 1972. Environmental control of seed germination. In: Seed Biology. KOZLOWSKI, T.T. (ed) Vol II. Academic Press, London. pp.2-97.
- KOZLOWSKI, T.T. & GUNN, C.R., 1972. Importance and characteristics of seeds. In: Seed Biology. KOZLOWSKI, T.T. (ed) Vol II. Academic Press, London. pp.2-97.

- LABOURIAU, L.G., 1983. A germinação das sementes. Organização dos Estados Americanos, Washington. 174pp.
- LAGÔA, A.M.M.A. & PEREIRA, M.F.A., 1987. Fotoblastismo em sementes de Ricinus communis. Revta. brasil. Bot., 10:155-158.
- LAGÔA, A.M.M.A. & PEREIRA, M.F.A., 1987. Envolvimento do tegumento no controle da germinação de sementes de Ricinus communis. Revta. Biol., 14: (no prelo).
- LE DEUNFF, Y. & RACHIDIAN, Z., 1988. Interruption of water delivery at physiological maturity is essential for seed development germination and seedling growth in pea (Pisum sativum L.) J. Exp. Bot., 39:1221-1230.
- LENOIR, C., CORBINEAU, F. & CÔME, D., 1986. Barley (Hordeum vulgare) seed dormancy as related to glumella characteristics. Physiol. Plant., 68:301-307.
- LEVITT, J., 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. II. Academic Press, New York. 607pp.
- LILLIE, R.D., 1954. Histopathological technic and practical histochemistry. Blakiston, New York.
- LISON, L., 1960 Histochemie et citochemie animales. Gauthier-Villars. Paris. 607pp.
- LIU, N.Y., KHATAMIAN, H. & FRETZ, T.A., 1981. Seed coat structure of three woody legume species after chemical and physical treatments to increase seed germination. J. Am. Soc. Hort. Sci., 106:691-694.
- LOPES, J.C., 1990. Germinação de sementes de Phaseolus vulgaris após diversos períodos e condições de armazenamento. Tese de

- Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 254pp.
- MAEDA, J.A. & PEREIRA, M.F.D.A., 1987. Germination of Vitis vinifera seeds: role of seed coat. Revta. bras. Bot., 10:1-5.
- MAIA, V., 1979. Técnica histológica. Atheneu, São Paulo. 2ed. 246pp.
- MARBACH, I. & MAYER, A.M., 1974. Permeability of seed coats to water as related to drying conditions and metabolism of phenolics. Plant Physiol., 54:817-820.
- MAUN, M.A., 1977. Response of seeds to dry heat. Can. J. Bot., 37:305-307.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A., 1975. The germination of seeds. 2ed. Pergamon Press, Oxford. 192pp.
- McDONALD, M.B. JR., VERTUCCI, C.W. & ROOS, E.E., 1988. Soybean seed imbibition: water absorption by seeds parts. Crop Sci., 28:993-337.
- McGINNIES, W.J., 1960. Effects of moisture stress and temperature on germination of six range grasses. Agron. J., 52:159-162.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C., 1978. A reação de Feulgen. Cienc. Cult., 30:665-676.
- MILES, D.F., TEKRONY, D.M. & EGLI, D.B., 1988. Changes in viability, germination and respiration of freshly harvested soybean seed during development. Crop Sci., 28:700-704.
- MONTEIRO, W.R. & GIFFORD Jr., E.M., 1988. Histochemical aspects of shoot apex of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertonii (Asteraceae) during transition to flowering. Revta. brasil. Bot., 11:11-21.

- NEILL, S. J., HORGAN, R. & REES, A. F., 1987. Seed development and vivipary in Zea mays L. Planta, 171:358-364.
- OBENDORF, R. L., ASWORTH, E. N. & RYTKO, G. T., 1980. Influence of seed maturation on germinability in soybean. Crop Sci., 20:483-486.
- O'BRIEN, T. P. & McCULLY, M. E., 1981. The study of plant structure. Principles and selected methods. Termarcaph PTY Ltda., Melbourne. 348pp.
- ODOEMENA, C. S., 1988. Breaking of seed coat dormancy in a medicinal plant Tetrapleura tetraptera (Schum & Thonn). J. Agric. Sci., 111:393-394.
- PEÑA, J., APARICIO-TEJO, P. & SANCHEZ-DIAZ, M., 1988. Dormancy mechanism and the effect of scarification in the germination of Halimium halimifolium seeds. J. Plant Physiol., 132:54-58
- PEREIRA, M. F. A. & MAEDA, J. A., 1986. Environmental and endogenous control of germination of Vitis vinifera seeds. Seed Sci. & Technol., 14:227-235.
- PERDOLLET, J. C. & MOSSÉ, J., 1983. Structure and location of legume and cereal seed storage proteins. In: DAUSSANT, J., MOSSÉ, J. & VAUGHAN, J. Seed proteins. Academic Press, London. pp.155-191.
- PIMENTEL GOMES, F., 1982. Curso de estatística experimental. Nobel, São Paulo. 430pp.
- PRIESTLEY, J. H. & WOFFENDEN, L. M., 1922. Causal factors in cork formation. New Phytol., 21:252-268.
- PROBERT, R. J.; SMITH, R. D. & BIRCH, P., 1985. Germination responses to light and alternating temperatures in european populations of Dactylis glomerata. I-Variability in relation to origin. New

- Phytol., 9:317-322.
- PUKITTAYACAMEE, P. & HELLMUM, A. K., 1988. Seed germination in Acacia auriculiformis: developmental aspects. Can. J. Bot., 66:388-393.
- QUEIROZ, M. H. 1983. Influência da luz na germinação de Miconia cinnamomifolia (DC) Naudin, Jacatirão-açu. Ínsula, 13:29-37.
- RAJU, M. V. S., HSIAO, A. J. & McINTYRE, G. I., 1988. Seed dormancy in Avena fatua. IV. Further observations on the effect of mechanical injury on water uptake and germination in different pure lines. Bot. Gaz., 149:419-426.
- RANDI, A. M. & FELIPPE, G. M. 1981. Efeito da temperatura, luz e reguladores de crescimento na germinação de Stevia rebaudiana Bert. Ciênc. Cult., 33(3):404-411.
- RALEIGH, G. J., 1930. Chemical conditions in maturation, dormancy and germination of seeds of Gymnocladus dioica. Bot. Gaz., 89:273-294.
- RAWLINS, T. E. & TAKAHASH, W. N., 1952. Technics plant histochemistry and virology. The National Press. Milbrew, California. 125pp.
- REEVES, R. G. & VALLE, C. C. Anatomy and microchemistry of the cotton seed. Bot. Gaz. 93:259-277.
- REITH, J. F., 1971. Properties of bixin and norbixin and the composition of annatto extracts. J. Food Sci. 36:861-864.
- RIVERA, D. I. & FLORES, E. M., 1983. Estructura y germinación de las semillas de Bixa orellana L. (achiote). Revta Biol. Trop., 31: 193-200.
- ROBERTS, E. H., 1973. Predicting the storage life of seeds. Seed Sci. Technol. 1:499-514.

- ROBERTS, E.H. & ELLIS, R.H. 1989. Water and seed survival. Ann. Bot., 63:39-52
- RODRÍGUEZ, R.G. & ENRÍQUEZ, G.A., 1983. In: CATIE, Aspectos del cultivo y desarrollo del achiote Bixa orellana. Costa Rica. 58-76.
- ROLSTON, M.P., 1978. Water impermeable seed dormancy. Bot. Rev., 44:365-396.
- ROSENBERG, L.A. & RINNE, R.W., 1986. Moisture loss as a prerequisite for seedling growth in soybean seeds (Glycine max L.merr.) J. Exp. Bot., 37:1663-1674.
- SANTOS, D.S.B. & PEREIRA, M.F.A. 1987. Germinação de sementes de dois cultivares de beterraba açucareira: Efeito de luz e temperatura. Revta bras. Bot., 10:15-20.
- SANTOS, D.S.B. & PEREIRA, M.F.A. 1989. Restrictions of the tegument to the germination of Beta vulgaris L. seeds. Seed Sci. & Technol., 17:601-611.
- SCOTT, F.M., BYSTROM, B.G. & BOWLER, E. 1962. Cercidium floridum seed coat, light and electron microscopic study. Am. J. Bot., 49:821-833.
- SHAYAKEWICH, C.F. & WILLIAMS, J., 1971. Resistance to water absorption in germinating rapessed (Brassica napus L.) J. Exp. Bot., 70:19-24.
- SIMON, E.W., 1974. Phospholipids and plant membrane permeability. New Phytol., 73:777.
- SIMON, E.W., MINCHIN, A., McMENEMIN, M.M. & SMITH, J.M., 1976. The low temperature limit for seed germination. New Phytol.

77:301-311.

- SOUZA, R.P., 1990. Fotocontrole da germinação de sementes de Impatiens wallerana HOOK. f. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 154pp.
- TOOLE, V.K., 1973. Effects of light, temperature and their interactions on germination of seed. Seed Sci. Technol. 1:389-396.
- TRIVEDI, B.S., BAGCHI, G.D. & BAJPAI, U. 1979. Scanning electron microscopic studies on spermoderm of some Mimosoideae (leguminosae). Phytomorphology 29: 211-218.
- UDENFRIEND, S., 1962. Fluorescence assay in Biology and medicine. Academic Press, New York. 505pp.
- VALENTI, G.S., MODENESI, P., ROTI-MICHELLOZZI, G. & BEVILACQUA, L. 1986. Structural and histochemical characters of the Prosopis tamarugo Phil. Seed coat in relation to its hardness. Acta Bot. Neerl. 35:475-487.
- VENTURELLI, M. & BOMTEMPI Jr., N. 1989. Ovule ontogeny and seed coat development in Antonia ovata Pohl (Logoniaceae). Revta bras. Bot., 12:11-16.
- VERTUCCI, C.W., 1989. The effects of low water contents on physiological activities of seeds. Physiol. Plant., 77:172-176.
- VIDAL, B.C., 1970. Dichroism in collagen bundles stained with xylydine Ponceau 2R. Ann. Histochem., 15:289-296.
- VIDAL, B.C., 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. Cell Mol. Biol. 22:45-64.

- VIDAL, B.C., 1987. Métodos em biologia celular. In: VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. (ed). Biologia Celular. Atheneu, Rio de Janeiro. pp.5-39.
- VILLAR, M.L.D., 1982. Germinação de Datura stramonium L. Tese de Mestrado. Universidade estadual de Campinas. 95pp.
- WALBOT, V., CLUTTER, M. & SUSSEX, M., 1972. Reproductive development and embryogeny in Phaseolus. Phytomorphology, 22:59-68.
- WASHITANI, I., 1988. Effects of high temperatures on the permeability and germinability of the hard seeds of Rhus javanica L. Ann. Bot., 62:13-16.
- WELBAUM, G.E. & BRADFORD, K.J., 1989. Water relations of seed development and germination in muskmelon (Cucumis melo L.). J. Exp. Bot., 40:1355-1362.
- WEST, S.H. & MAROUSKY, 1989. Mechanism of dormancy in Pensacola Bahiagrass. Crop Sci., 29:789-791.