

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**REGULADORES VEGETAIS NA SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA,
BALANÇO HORMONAL E DEGRADAÇÃO DE RESERVAS EM
SEMENTES DE *Annona diversifolia* SAFF. E *A. purpurea* MOC. &
SESSÉ EX DUNAL (ANNONACEAE)**

GISELA FERREIRA

Tese de Livre-Docência apresentada ao Instituto de Biociências da UNESP - *Campus* de Botucatu, Departamento de Botânica, disciplina de Fisiologia da Germinação e Dormência de Sementes, para obtenção do título de Livre-Docente em Fisiologia Vegetal.

BOTUCATU – SP
- 2011 -

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**REGULADORES VEGETAIS NA SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA,
BALANÇO HORMONAL E DEGRADAÇÃO DE RESERVAS EM
SEMENTES DE *Annona diversifolia* SAFF. E *A. purpurea* MOC. &
SESSÉ EX DUNAL (ANNONACEAE)**

GISELA FERREIRA

Tese de Livre-Docência apresentada ao Instituto de Biociências da UNESP - *Campus* de Botucatu, Departamento de Botânica, disciplina de Fisiologia da Germinação e Dormência de Sementes, para obtenção do título de Livre-Docente em Fisiologia Vegetal.

BOTUCATU – SP
- 2011 -

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Rosemeire Aparecida Vicente*

Ferreira, Gisela.

Reguladores vegetais na superação da dormência, balanço hormonal e degradação de reservas em sementes de *Annona diversifolia* SAFF. e *A. purpurea* Moc. & Sessé Ex Dunal (Annonaceae) / Gisela Ferreira. – Botucatu : [s.n.], 2011

Tese (livre docência) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu
Capes: 20303009

1. Anonácea - Semente. 2. Ácido abscísico. 3. Matéria médica vegetal.

Palavras-chave: Ácido abscísico; Anonáceas; Giberelinas; Mobilização de reservas; Propagação de anonáceas; Sementes.

À minha mãe Maria Aparecida,
Ao meu pai Israel,
Ao Gustavo, esposo e parceiro de jornada,
Aos sobrinhos, Pedro, Maria Luíza, Ana, Gabriel, Julia, Mel,
Aos meus irmãos Alexandre e Juliano,,
Às minhas cunhadas Luciana e Fernanda,,
À avó Sebastiana,
Ao Paulo,
À Vera,

A ausência é um vazio que milhões de anos serão incapazes de preencher,
mas também pode ser uma vaga lembrança quando a compreensão e o amor
gritam no silêncio...

À todos vocês ...

Ofereço

" Os sonhos trazem saúde para a emoção, equipam o frágil para ser autor de sua história, renovam as forças do ansioso, animam os deprimidos, transformam os inseguros em seres humanos de raro valor."

"Os sonhos fazem os tímidos terem golpe de ousadia e os derrotados serem construtores de oportunidades."

"Nem sempre os sonhos são definidos e bem organizados no teatro da mente. Às vezes nascem como pequenos traçados, simples esboços, idéias vagas que vão se desenhando e tomando forma ao longo do tempo. Todas as grandes mudanças da humanidade no campo social, político, emocional, científico, tecnológico e espiritual surgiram por causa dos grandes sonhos."

(Augusto Cury)

Àqueles que duvidam da impossibilidade de seus sonhos.....

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus que habita nas Leis que mantém cada coisa em seu lugar, ou fora dele e permite que, independente disso, o sol continue brilhando e a semana tenha mais que sete dias.

Às pessoas que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho e em especial:

À Prof^a Dr^a Alma Rosa González Esquinca por me receber em seu laboratório, viabilizar o necessário para o desenvolvimento dos experimentos desta tese e ainda, por me adotar, em sua família científica e pessoal de maneira tão afetiva e verdadeira, em tão pouco tempo. A mais esta amiga e parceira científica meu muito obrigada.

À Prof^a Dr^a Lorena pelo convívio, amizade e por todas as 'platicas' matinais.

Ao Engenheiro Bioquímico Dr. Ivan de la Cruz Chacón pelo constante apoio, parceria, auxílio nas adaptações de métodos, na execução das análises laboratoriais dos experimentos e incondicional amizade.

À Luz Maria Dominguez Gutú, Walter Acuña Castro e Dolores López Hernández, meu eterno agradecimento por terem me auxiliado em

muitas das tarefas que resultaram nesta tese e por serem meus amigos, apesar de tanta 'chamba'!

A José Agustin Orozco Castillo; Christian Anabi Riley Saldaña; Marisol Castro Moreno; Leamsi Paola Fajardo; Madai, Rocio Ortega, Sonia Santiago, Verónica Zavaleta, Anselmo, Martha Morales, Belen Lopez Morales, Daniela Somoza, Denisse e Alfredo Cisneros, que não mediram esforços para que minha permanência em Tuxtla fosse perfeita. Vocês são parte muito importante de minha história, todos, cada um à sua maneira, mas todos, indistintamente.

À Prof^a Dr^a Marta Maria Mischan e à Prof^a Dr^a Sheila Zambelo de Pinho pelo companheirismo, amizade, apoio e orientações estatísticas.

Ao Daniel Baron, pelo carinho e paciência com os quais me ajudou na realização das análises estatísticas e me manteve tranquila nos momentos de maior sufoco.

Aos meus pais, ao Gustavo meu esposo, meus irmãos, cunhadas, sobrinhos, avó Sebastiana, que além de compreenderem, foram obrigados a adaptarem-se à minha ausência. Obrigada por trilharem comigo grande parte da jornada.

À Carmen S. F. Boaro pelo constante incentivo, apoio incondicional e amizade, que me fazem forte nos momentos nos quais muitos fraquejariam.

Aos amigos da disciplina Fisiologia Vegetal (Carmen S. F. Boaro, Elizabeth Orika Ono, João Domingos Rodrigues, Luís Fernando Rolim de Almeida) por colaborarem ministrando minhas aulas e realizando as tantas outras tarefas que ficaram pendentes na minha ausência. Agradeço o apoio, compreensão e amizade.

Aos meus orientados (Daniel Baron, Jaqueline M. Corsato e Juliana I. Gimenez) que entenderam a necessidade de minha ausência e se esforçaram para dar continuidade às tarefas sem prejuízo à sua formação.

Aos Conselhos do Departamento de Botânica e do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do IB, Unesp, por permitirem minha ausência e apoiarem a iniciativa do estágio de pós-doutorado.

À UNESP – pelas autorizações de afastamento e suporte técnico e administrativo durante o período no qual estive ausente.

À UNICACH – Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, pela acolhida.

À CAPES – Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de pós-doutorado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XIII
1 RESUMO.....	01
2 SUMMARY.....	03
3 INTRODUÇÃO.....	05
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	07
4.1 A Família Annonaceae.....	07
4.2 A espécie <i>Annona diversifolia</i> Saff.....	10
4.3 A espécie <i>Annona purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal.....	11
4.4 Germinação: as fases do processo.....	12
4.5 Dormência de sementes e reguladores vegetais.....	17
4.5.1 ABA e indução à dormência.....	20
4.5.2 Superação da dormência primária.....	22
4.6 Germinação e reguladores vegetais.....	23
4.6.1 Uso de reguladores vegetais em sementes de Annonaceae...	26
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5.1 Experimento 1: Curva de aquisição de água de sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. e <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal.....	32
5.2 Experimento 2: Germinação de sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. e <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA ₃ e GA ₄₊₇ + Benziladenina.....	33
5.3 Experimento 3: Balanço hormonal e degradação de reservas em sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. e <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal submetidas a tratamentos para superação da dormência.	34
5.3.1 Determinação de hormônios.....	36
5.3.2 Determinação de Açúcares Solúveis Totais.....	37
5.3.3 Determinação de proteínas.....	37
5.3.4 Determinação de lipídeos.....	38
5.3.5 Análise estatística.....	38

	Página
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6.1 Experimento 1: Curva de aquisição de água de sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. e <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal.....	39
6.2 Experimento 2: Germinação de sementes de <i>A. diversifolia</i> e <i>A. purpurea</i> submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA ₃ e GA ₄₊₇ + BA.....	45
6.3 Experimento 3: Balanço hormonal e degradação de reservas em sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. e <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal submetidas a tratamentos para superação da dormência.	64
7 CONCLUSÕES.....	87
8 REFERÊNCIAS.....	88

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Frutos e sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. ('papausa'). (Foto: FERREIRA, G., 2010).....	31
2. Frutos e sementes de <i>Annona purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal ('chincuya'). (Foto: FERREIRA, G., 2010).....	31
3. Curva de aquisição de água de sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff.....	40
4. Curva de aquisição de água de sementes de <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal.....	41
5. Germinação (%) de sementes de <i>A. diversifolia</i> e <i>A. purpurea</i> submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA ₃ e GA ₄₊₇ + BA.....	46
6. Porcentagem de sementes dormentes de <i>A. diversifolia</i> e <i>A. purpurea</i> submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA ₃ e GA ₄₊₇ + BA.....	49
7. Porcentagem de sementes mortas de <i>A. diversifolia</i> e <i>A. purpurea</i> submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA ₃ e GA ₄₊₇ + BA.....	51
8. Índice de Velocidade de Germinação de sementes de <i>A. diversifolia</i> e <i>A. purpurea</i> submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA ₃ e GA ₄₊₇ + BA.....	53
9. Tempo médio de germinação de sementes de <i>A. diversifolia</i> e <i>A. purpurea</i> submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA ₃ e GA ₄₊₇ + BA.....	55
10. Frequência relativa (%) da germinação de sementes de <i>A. diversifolia</i> submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA ₃ e GA ₄₊₇ + BA (DAIE = dias após o início da embebição).....	57
11. Frequência relativa (%) da germinação de sementes de <i>A. purpurea</i> submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA ₃ e GA ₄₊₇ + BA (DAIE = dias após o início da embebição).....	58

	Página
12. Porcentagem de plântulas normais de <i>A. diversifolia</i> e <i>A. purpurea</i> submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA ₃ e GA ₄₊₇ + BA.....	59
13. Concentrações de ácido abscísico (ABA) em sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. e <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA ₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.....	64
14. Concentrações de giberelinas (GA) em sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. e <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA ₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.....	65
15. Variações no conteúdo de albumina em sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. e <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA ₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.....	71
16. Variações no conteúdo de globulinas em sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. e <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA ₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.....	73
17. Variações no conteúdo de prolaminas em sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. e <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA ₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.....	75

	Página
18. Variações no conteúdo de glutelina em sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. e <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA ₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.....	77
19. Variações no conteúdo de Açúcares Solúveis Totais em sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. e <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA ₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.....	79
20. Variações no conteúdo de Lipídeos em sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. e <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA ₄₊₇ + BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.....	83

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Germinação (%) de sementes de <i>A. diversifolia</i> e <i>A. purpurea</i> submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA ₃ e GA ₄₊₇ + BA.....	45
2. Porcentagem de sementes dormentes de <i>A. diversifolia</i> e <i>A. purpurea</i> submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA ₃ e GA ₄₊₇ + BA.....	50
3. Porcentagem de sementes mortas de <i>A. diversifolia</i> e <i>A. purpurea</i> submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA ₃ e GA ₄₊₇ + BA.....	52
4. Índice de Velocidade de Germinação de sementes de <i>A. diversifolia</i> e <i>A. purpurea</i> submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA ₃ e GA ₄₊₇ + BA.....	54
5. Tempo médio de germinação de <i>A. diversifolia</i> e <i>A. purpurea</i> submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA ₃ e GA ₄₊₇ + BA.....	56
6. Porcentagem de plântulas normais de <i>A. diversifolia</i> e <i>A. purpurea</i> submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA ₃ e GA ₄₊₇ + BA.....	60
7. Variações no conteúdo de albumina em sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. e <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA ₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.....	72
8. Variações no conteúdo de albumina em sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. e <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA ₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.....	74
9. Variações no conteúdo de prolamina em sementes de <i>Annona diversifolia</i> Saff. e <i>A. purpurea</i> Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA ₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.....	76

10. Variações no conteúdo de glutelina em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias..... 78
11. Variações no conteúdo de Açúcares Solúveis Totais em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias..... 80
12. Variações no conteúdo de Lipídeos em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias..... 84

1 RESUMO

As sementes de anonáceas são conhecidas por apresentarem mecanismos de dormência, o que dificulta a perpetuação das espécies e a formação de áreas produtivas para a exploração comercial. Deste modo, os objetivos deste trabalho foram estudar curva de aquisição de água; a germinação de sementes tratadas com GA₃ e GA₄₊₇ + Benziladenina; o balanço hormonal e a degradação de reservas em sementes de *Annona diversifolia* Saff e *Annona purpurea* Moc & Sessé ex Dunal tratadas com reguladores vegetais para a superação da dormência. Para tanto foram realizados três experimentos. Para a construção da curva de aquisição de água foram utilizadas 4 repetições de 25 sementes que foram mantidas em embebição e pesadas durante 480 horas. O segundo experimento foi constituído pela germinação das sementes tratadas com os reguladores vegetais; o delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições de 25 sementes por parcela em esquema fatorial 2 x 7 (reguladores x concentrações). Os tratamentos foram constituídos pelas combinações entre concentrações de GA₃ e de GA₄₊₇ + Benziladenina (GA₄₊₇ + BA) x 0, 200, 400, 500, 600, 800 e 1000 mg L⁻¹ i.a.. No terceiro experimento foram quantificados ABA (Ácido abscísico) e GA (Giberelinas), proteínas, açúcares

solúveis totais e lipídeos em sementes embebidas em água, sem embebição e embebidas em GA_{4+7} + BA, durante 15 dias (0, 2, 5, 10 e 15 dias). A partir dos resultados pode-se relatar que sementes de ambas as espécies atingem Fase I e II da aquisição de água, demonstrando não serem duras; no entanto, a germinação (Fase III) não é alcançada. Na avaliação dos reguladores na germinação, a mistura GA_{4+7} + BA promoveu respostas mais significativas no incremento da germinação que GA_3 , embora os dois reguladores tenham superado a dormência das espécies. Com a aplicação de GA_{4+7} + BA foi possível verificar redução no conteúdo de ABA e aumento de GA, o que resultou em superação da dormência. E ainda, verificou-se efeito de GA_{4+7} + BA na degradação de reservas desde o início da embebição, principalmente de proteínas e açúcares solúveis totais, seguidos por lipídeos, nas sementes germinadas.

Palavras-chave: Anonáceas, propagação de anonáceas, mobilização de reservas, giberelinas, ácido abscísico.

PLANT GROWTH REGULATORS IN THE DORMANCY BREAK, HORMONAL BALANCE AND RESERVE DEGRADATION IN *ANNONA DIVERSIFOLIA* SAFF AND *ANNONA PURPUREA* MOC & SESSÉ EX DUNAL SEEDS (ANNONACEAE). Botucatu, 2011. 101p. Tese de Livre Docência (Livre Docência em Fisiologia Vegetal) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Author: GISELA FERREIRA

2 SUMMARY

Annonaceae seeds have been known by presenting dormancy mechanisms, which makes difficult the perpetuation of species and the formation of productive areas for commercial exploration. Thus, the present work aimed to evaluate water uptake curve; germination of seeds treated with GA₃ and GA₄₊₇ + Benzyl adenine; hormone balance and reserve degradation in *Annona diversifolia* Saff and *Annona purpurea* Moc & Sessé ex Dunal seeds subjected to plant growth regulators for dormancy break. Three experiments were carried out. To obtain the water uptake curve, four replicates of 25 seeds were kept in imbibition and weighed for 480h. The second experiment evaluated the germination of seeds treated with plant growth regulators; experimental design was completely randomized, with four replicates of 25 seeds per plot in the 2x7 (plant growth regulators x concentrations) factorial arrangement. Treatments consisted of combinations between concentrations of GA₃ and GA₄₊₇ + Benzyl adenine (GA₄₊₇ + BA) with 0, 200, 400, 500, 600, 800 and 1000 mg L⁻¹ a.i.. In the third experiment, ABA (abscisic acid), GA (gibberellins), proteins, total soluble sugars and lipids were quantified in seeds soaked in water, without imbibition and soaked in GA₄₊₇ + BA for 15 days (on the 0th, 2nd, 5th, 10th and 15th days). Based on the results, seeds

from both species reached the phases I and II of water uptake, which indicates they are not hard; however, germination (phase III) was not reached. The evaluation of plant growth regulators on germination revealed that the combination between GA₄₊₇ and BA led to more significant responses as to germination increase than those of GA₃, although both plant growth regulators have broken the dormancy of species. The application of GA₄₊₇ + BA resulted in decreased ABA content and increased GA one, which led to dormancy break. In addition, the effect of GA₄₊₇ + BA on reserve degradation was detected since the beginning of imbibition, mainly proteins and total soluble sugars, followed by lipids, in the germinated seeds.

Keywords: Annonaceae, Annonaceae propagation, reserve mobilization, gibberellins, abscisic acid.

3 INTRODUÇÃO

A expansão do cultivo de anonáceas tem por objetivo suprir a demanda de mercado por frutas frescas e também para a indústria de processamento de polpa, sucos, geléias, entre outros (KAVATI, 2004). Além disso, há um aumento das pesquisas com moléculas oriundas das anonas com as mais diversas funções na medicina, o que tem atraído cada vez mais pesquisadores para esta área. Desta forma, há necessidade crescente de conhecer a fisiologia da Família Annonaceae para dar suporte ao desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva (VIDAL et al., 2000; CAZÁREZ et al., 2006).

Considerando-se, portanto que a base da perpetuação das espécies é o conhecimento de seus mecanismos reprodutivos e de dispersão, torna-se de suma importância o estudo da fisiologia da germinação das sementes de anonáceas. Assim, das sementes dependem o estabelecimento de novas plantas, sejam estas para a formação de porta-enxertos, para a produção de mudas para reflorestamento, para recuperação de áreas degradadas, para manutenção de bancos de germoplasma, para extração de princípio ativo, ou

simplesmente para a perpetuação da espécie (BASKIN; BASKIN, 1998; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; VIDAL et al., 2000).

Devido à importância da Família Annonaceae, estudos que envolvem a compreensão dos mecanismos de dormência das sementes e seu controle são de relevância. Além disso, observando-se de maneira mais direta a propagação, principalmente a enxertia, há constante busca por espécies alternativas para uso como porta-enxerto (TOKUNAGA, 2000; STENZEL, 1997), e desta forma as espécies *Annona diversifolia* Saff e *Annona purpurea* Moc & Sessé ex Dunal podem ser consideradas possíveis alternativas. Neste caso, não só como alternativa para a formação de porta-enxertos, mas para o fornecimento de frutos para o mercado 'in natura', devido a elevada qualidade de seus frutos (PARADA; FIDEL, 2010).

Justifica-se, portanto a realização deste trabalho, pois além da tentativa de elucidar questões a respeito da fisiologia da germinação e dos mecanismos de dormência das anonáceas, há também o objetivo de encontrar e divulgar alternativas para a expansão do número de espécies da Família Annonaceae atualmente cultivadas no Brasil. Deste modo os objetivos deste trabalho foram:

- Estudar a curva de aquisição de água das sementes *Annona diversifolia* e *A. purpurea* a fim de detectar a existência de dormência física pelo impedimento à entrada de água;
- Avaliar a germinação de sementes de *Annona diversifolia* e *A. purpurea* quanto à aplicação dos GA₃ e GA₄₊₇ + Benziladenina;
- Estudar o balanço hormonal e a degradação de reservas em sementes de *Annona diversifolia* e *A. purpurea* tratadas com reguladores vegetais para a superação da dormência.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 A Família Annonaceae

Em alguns sistemas de classificação tradicionais, a família Annonaceae é considerada como angiosperma basal por apresentar atributos considerados primitivos, como hábito lenhoso; perianto bem desenvolvido, muitas vezes sem diferenciação em cálice e corola (tépalas); polinização por coleópteros; numerosos estames, gineceu apocárpico, pólen monossulcados (CRONQUIST, 1981; APG II, 2003).

A classificação segundo Cronquist (1981) é a seguinte:

Reino – Plantae

Divisão – Magnoliophyta

Classe – Magnoliopsida

Subclasse – Magnoliidae

Ordem – Magnoliales

Família – Annonaceae Juss.

No entanto, de acordo com a classificação filogenética das Angiospermas, baseada no grupo das Angiospermas II (APG II, 2003), a família

Annonaceae pertence ao grupo das Eudicotiledôneas, no clado das Magnoliídeas (arbóreas), esse clado é constituído de quatro ordens (Canallales, Laurales, Magneliales e Piperales). A ordem Magnoliales é constituída por três famílias: Magnoliaceae, Myristicaceae e Annonaceae (SOUZA; LORENZI, 2005).

Dentre as características botânicas consideradas relevantes para a identificação de Annonaceae relata-se o odor forte quando realizado corte de troncos ou ramos, presença de fibras longas e resistentes na casca do caule, conhecida popularmente como envira e pela aparência de marcas de chamas no corte transversal do tronco. As folhas são dísticas (exceto em Tetrameranthus, com folhas espiraladas), alternas, simples sem estípulas e margem interna. As flores são isoladas ou reunidas em inflorescências, hemicíclicas, hermafroditas, diclamídeas, com perianto diferenciado no cálice e corola, em geral são trímeras e carnosas; estames numerosos, dispostos de forma espiralada; ovário súpero com numerosos carpelos apocárpicos com um a muitos óvulos. Os frutos podem ser apocárpicos ou sincárpicos, carnosos e indeiscentes ou deiscentes (JOLY, 2002).

A literatura não é unânime em relação ao número de gêneros e espécies em Annonaceae. De acordo com relatos de Bailey (1949), a família possui 46 gêneros e entre 500 e 600 espécies, enquanto Fries (1959), ambos autores citados por Geurts (1981), afirma que esta contém 119 gêneros e mais de 2000 espécies. Popenoe (1974) descreve como tendo de 40 a 50 gêneros e mais de 500 espécies, na sua maioria arbustos e pequenas árvores. Em citação mais recente, Pinto et al. (2005) se refere a cerca de 2.500 espécies em 140 gêneros, distribuídas entre as áreas tropicais da América, África e Ásia.

No Brasil, a família Annonaceae está representada por 26 gêneros e aproximadamente 260 espécies, desempenhando um importante papel na composição da vegetação (MAAS et al., 2001).

Dentre as espécies encontradas no Brasil, existem várias cultivadas em larga escala, que são a graviola (*Annona muricata* L.), a fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.) e a atemóia (*A. cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.), seguida pela cherimóia (*Annona cherimola* Mill.). Cabe salientar que cultivo de anonáceas vem expandindo mundialmente assim como o consumo, principalmente devido a qualidade de seus frutos (KAVATI, 2004).

As anonáceas são consideradas de interesse em diversos outros países, dentre os quais se relata o México. Neste país são reportadas a cherimóia (*A. cherimola* Mill), o saramuyo (*A. squamosa* L.), a graviola (*A. muricata* L.), a anona colorada (*A. reticulata* L.), a atemóia (*A. cherimola* x *A. squamosa*), a 'papausa' (*A. diversifolia* Saff.), 'chincuya' (*A. purpurea* Moc & Sesse) e a *Rollinia mucosa* Baill (MORTON, 1987). A cherimóia e a graviola são as mais comercializadas nos comércios locais, regionais e a nível nacional (VIDAL et al., 2000).

Para atender à demanda de mercado é necessário que a cadeia produtiva esteja bem estabelecida, o que se inicia com área de produção de elevada produtividade. Assim, para a implantação de pomares produtivos o primeiro aspecto a ser observado é a utilização de mudas de boa qualidade, formada a partir de métodos vegetativos como a estaquia e a enxertia a fim de garantir a fidelidade genética e, portanto a uniformidade de produção. O método de propagação mais utilizado é a enxertia, e a muda que será usada como porta-enxerto é formada a partir de sementes (GAMA; MANICA, 1994; KAVATI, 2004).

Em relação a produção de mudas enxertadas de anonas existem basicamente dois problemas. O primeiro se refere a constante busca por porta-enxertos compatíveis com as variedades copa e que sejam tolerantes a condições adversas e a patógenos. Por exemplo, para a produção de mudas de atemóia, a própria espécie é utilizada como porta-enxerto, devido a dificuldade em encontrar uma espécie porta-enxerto compatível e que atenda as necessidades fitossanitárias para a cultura (STENZEL, 1997). O outro é a dificuldade na germinação das sementes dos porta-enxertos, pois as citações de dormência são comuns (KAVATI, 2004; TOKUNAGA, 2000).

Neste contexto, é constante a busca de espécies que possam ser avaliadas como alternativas para porta-enxerto, assim como é primordial o conhecimento dos processos fisiológicos que envolvem mecanismos de germinação e dormência das sementes. Além do que, outras espécies devem ser exploradas tanto para o consumo 'in natura' como para a industrialização, em função de aptidões específicas. Deste modo, *A. diversifolia* e *A. purpurea* surgem como alternativas para suprir as diferentes possibilidades de utilização e de mercado.

4.2 A espécie *Annona diversifolia* Saff.

A *Annona diversifolia* Saff. é considerada como a “cherimóia das terras baixas” e foi descrita por W. E. Safford em 1911 (POPENOE, 1974). O nome com o qual se conhece a fruta é “papausa”, que tem origem náhuatl: de “Pauatl”= fruta macia, e “Tza”= partícula intensiva; significando “muito suave ou muito macia” (MARTÍNEZ, 1990 citado por GUTU, 2010).

A espécie é nativa de América central, das terras baixas e quentes do oeste e sudeste do México (OCHSE et al., 1986; MARTÍNEZ, 1990; ZAVALA; BALLESTEROS, 2000; CRUZ, 2002, 2003; CORTÉS et al., 2009 citados por GUTU, 2010).

A *Annona diversifolia* é uma árvore pequena, que cresce até 7,5 metros de altura; desenvolve caule principal de aproximadamente 25 centímetros de diâmetro, com córtex de cor parda ou escuro (MORTON, 1987). As folhas são oblongo-ovaladas, com 5, 8-14 cm de comprimento e 2-6 cm de largura, (STEVENS et al., 2001). As flores são solitárias, carnosas, com três pétalas externas de 2 a 5 cm de comprimento e três internas diminutas, a cor das flores é uma característica varietal que varia de rosa a púrpura (MORTON, 1987).

O fruto é um agregado de bagas, ovóide, com 13-15 cm de comprimento e 12-15 cm de diâmetro, de epiderme verde claro ou escura, coberto de protuberâncias arredondadas ou lisos; com polpa branca, rosa ou rosada com aroma e sabor doce ou subácido, sucosa e suave (MORTON, 1987). As sementes são abundantes, lisas, medem aproximadamente 2 cm de comprimento e 1cm de largura; apresentam coloração cobre, forma oblonga-ovoide, testa dura, coberta por uma membrana e endosperma massivo parenquimatoso do tipo ruminado. O embrião é pequeno, reto, linear, localizado próximo do hilo, contém dois cotilédones (PERIASAMY, 1962 e NIEMBRO, 1989 citados por GUTU, 2010).

A *Annona diversifolia* é uma espécie pouco conhecida no âmbito internacional e existem poucas referências a seu respeito, no entanto, sua aceitação nos mercados locais e regionais colocam esta espécie como uma das anonáceas mais promissoras para o sudeste mexicano (ZAVALA; BALLESTEROS, 2000 citados por GUTU, 2010).

Pouco se conhece a respeito de seu cultivo, que é rústico, suporta condições adversas, próprias de solos argilosos e pedregosos, tolera solos pobres em nitrogênio e fósforo, embora se desenvolvam melhor em solos de boa aeração e drenagem, com reação ácida, neutra ou ligeiramente alcalina. No entanto, o fato das sementes apresentarem dormência desestimula a formação de mudas para a formação de pomares (MARTÍNEZ, 1990; ZAVALA; BALLESTEROS, 2000; CRUZ, 2002 citados por GUTU, 2010).

Devido a ausência de estudos de pós-colheita e a rápida maturação, se consome os frutos unicamente como fruta fresca, sendo que a colheita ocorre de julho a outubro. Como não existem plantações comerciais, geralmente os frutos são colhidos de árvores silvestres, de pomares mistos e de quintais (MARTÍNEZ, 1990; CHÁVEZ-PRIMITIVO et al., 1999; ZAVALA; BALLESTEROS, 2000 citados por GUTU, 2010).

4.3 A espécie *Annona purpurea* Moc & Sessé ex Dunal

A 'chincuya' (*Annona purpurea* Moc & Sessé ex Dunal) é uma espécie que se encontra nos Estados de Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Veracruz e Campeche, onde faz parte da diversidade fitogenética regional existente.

O nome com o qual se conhece a espécie é originário de um povoado Jutiapa, Guatemala, chamado 'cincuya' (STANDLEY; STEYERMARK, 1946 citados por VIDAL et al., 2000). Em inglês é 'soncoya', em português é 'cabeça de negro', em espanhol se conhece por 'guanabana torete' e no México se conhece por chincuya (VIDAL, 1993).

Esta espécie apresenta frutos com características agradáveis para o consumo 'in natura', as folhas são utilizadas como remédio para febre, o córtex para tratar disenteria e a madeira como combustível. Além disso, sementes e folhas são usadas como inseticida e ainda existem estudos a respeito de sua ação anticancerígena (VIDAL et al., 2000).

Com o objetivo de sistematizar informações a respeito da espécie Cazáres et al. (2006) complementam as informações de Vidal et al.

(2000) reportando que dentre os compostos isolados da espécie se encontraram 35 alcalóides, 16 acetogeninas, 20 óleos essenciais, assim como uma purina, uma lactama amida e dois esteroides. Dentre as atividades biológicas reportam-se atividades antitumorais, antifúngicas, antitripanossômica, antibacteriana, e cardiotônica, entre outras.

De acordo com Parada e Fidel (2010) *A. purpurea* apresenta boa compatibilidade em viveiro quando usada como porta-enxerto para *A. diversifolia* e *A. muricata*.

Por apresentar propriedades tão úteis justifica sua preservação, no entanto Vidal et al. (2000) relatam que não existem estudos de propagação da espécie mas há relatos de dormência das sementes.

Para que as espécies possam ser perpetuadas, independentemente de seu potencial uso pelo homem, seja como porta-enxerto, para produção de princípios ativos, para extração de madeira, recuperação de áreas degradadas ou ainda para a manutenção de bancos de germoplasma, é necessário o conhecimento da germinação e seus mecanismos de controle.

4.4 Germinação: as fases do processo

A germinação é o reinício do crescimento do embrião, paralisado nas fases finais de maturação de sementes ortodoxas. O embrião inicia sua formação quando o óvulo é fecundado e se desenvolve até atingir sua maturação. Nesta fase os níveis de umidade são reduzidos e as sementes entram em quiescência, quando são reduzidas todas as atividades metabólicas, principalmente a respiração (POPINIGIS, 1985; KIGEL; GALILI, 1995; FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Em condições apropriadas, de água, temperatura e oxigênio o embrião dá prosseguimento ao seu desenvolvimento, que havia sido interrompido por ocasião da maturidade fisiológica (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Deste modo, quando sementes secas e viáveis absorvem água, uma série de eventos é iniciada, resultando na emergência da radícula, o que significa que a germinação foi completada com sucesso (BEWLEY; BLACK, 1994).

Do ponto de vista fisiológico a germinação ocorre em quatro fases: embebição (re-hidratação das sementes), alongamento de células, divisão celular e diferenciação das células em tecidos. Do ponto de vista físico-bioquímico a germinação poderia ser dividida em embebição, aumento da respiração, formação de enzimas, digestão enzimática das reservas, mobilização e transporte de reservas, assimilação metabólica, crescimento e diferenciação dos tecidos (MARCOS FILHO, 2005).

De acordo com o estabelecido por Bewley e Black (1994), a germinação ocorre em padrão trifásico, no entanto devem-se considerar tanto as variações físicas que envolvem o movimento de água durante o estabelecimento do padrão trifásico, como os distintos eventos metabólicos que são provocados pela hidratação.

A primeira Fase, também denominada de embebição, é caracterizada pela aquisição de água como consequência de um gradiente estabelecido pelo potencial hídrico da semente e o potencial hídrico do substrato com o qual a mesma permanece em contato. Nesta fase, o potencial matricial é o principal responsável pela variação do potencial hídrico da semente (BEWLEY; BLACK, 1994). Do ponto de vista do movimento de água, o processo de embebição é puramente físico e depende da ligação da água à matriz da semente, ocorrendo em qualquer material, morto ou vivo, que contém sítios de ligação ou afinidade pela água (CASTRO; HILHOST, 2004).

Cabe ressaltar que ao mesmo tempo em que a água é embebida em função de variações de potencial hídrico na Fase I, sementes vivas, apresentam aumento acentuado da atividade respiratória (principalmente a partir de 14-16% de teor de água), ativação das enzimas e início da degradação das substâncias de reserva (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; COPERLAND; McDONALD, 1999).

Durante a Fase I também tem início a reorganização das membranas fosfolipídicas, originalmente desorganizadas nas sementes secas e que, pouco a pouco recuperam sua configuração mais estável (BEWLEY, 1997).

Com o aumento da disponibilidade de água livre e do metabolismo na semente, o potencial matricial deixa de ser o responsável pela entrada de água na semente, o que indica entrada na Fase II da curva, fase *lag*

(KERBAUY, 2004). Na Fase II, portanto, é quando todas as matrizes atingem hidratação plena, o potencial matricial se torna zero (CASTRO; HILHOST, 2004) e o potencial osmótico passa a ser o responsável pelo movimento da água para dentro das sementes, até que seja balanceado pelo turgor ou potencial de pressão (BEWLEY; BLACK, 1994; CASTRO; HILHOST, 2004; KERBAUY, 2004).

Do ponto de vista metabólico, no início da Fase II é verificado o aumento do tamanho do retículo endoplasmático, ribossomos e RNA ribossômico preparando as células para a quebra, transporte e síntese de substâncias utilizadas ao longo do processo germinativo (BEWLEY, 1997).

As principais substâncias de reserva armazenadas nas sementes são carboidratos, proteínas e lipídeos. Essas substâncias não podem ser transportadas de uma célula a outra e transferidas até pontos de crescimento do embrião, nem utilizadas para a formação de novos protoplasmas e paredes celulares antes de serem simplificadas. O processo de hidrólise das reservas e sua transformação em substâncias solúveis e difusíveis, sob controle enzimático, caracteriza a digestão de reservas (MARCOS FILHO, 2005).

Com o processo de hidratação das células, durante as Fases I e II da aquisição de água, as enzimas são sintetizadas e ativadas, em resposta a atividade hormonal (BEWLEY; BLACK, 1994; ARTECA, 1995, GUBLER et al., 2005). As substâncias de reserva presentes no endosperma ou nos cotilédones são decompostas e os produtos solúveis desse processo são translocados para os pontos vegetativos do embrião. Dentre as principais enzimas hidrolíticas podem-se citar as amilases, maltases, fosforilase, lipases, proteases, ribonuclease, celulase, entre outras (BEWLEY, 1997, MARCOS FILHO, 2005).

Durante esta fase (Fase II) os principais eventos metabólicos relacionam-se ao preparo do desenvolvimento da radícula de sementes não dormentes. No entanto, sementes dormentes podem ser metabolicamente ativas nesta fase (BEWLEY; BLACK, 1994; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Segundo Kigel e Galili (1995), Bradford (1995) sementes com dormência fisiológica ou morfofisiológica podem sustentar um baixo nível de atividade metabólica e a Fase II pode ser consideravelmente prolongada.

De acordo com Nonogaky et al. (2010) é durante esta fase que os reguladores genéticos da germinação atuam, seja para promover ou inibir

a entrada na Fase III. Como essa transição é regulada ainda não está bem compreendida, embora esteja claro o papel chave das giberelinas, uma vez que sementes inábeis para produzir giberelinas não completam a germinação.

Embora sementes dormentes possam atingir a Fase II, somente sementes não dormentes e viáveis atingem a Fase III. Nesta Fase, as substâncias desdobradas são reorganizadas em substâncias mais complexas, dando origem a componentes celulares, o que permite o crescimento do eixo embrionário e a emissão da radícula (BEWLEY, 1997; COPERLAND; McDONALD, 1999). A aquisição de água nesta fase é influenciada pela redução do potencial osmótico, resultado da presença de moléculas osmoticamente ativas provenientes da hidrólise de reservas (BEWLEY; BLACK, 1994; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

A duração de cada fase da aquisição de água e/ou germinação, depende de propriedades inerentes à semente (permeabilidade do tegumento, tamanho da semente, natureza do material de reserva, teor de água inicial e qualidade fisiológica da semente) e ao meio (condições ambientais durante a embebição composição do substrato, disponibilidade de água, área de contato, temperatura, quantidade de solutos no meio, tempo de exposição ao ambiente úmido) e são variáveis com as espécies (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; MARCOS FILHO, 2005).

Em geral, a Fase I ocorre durante oito a dezesseis horas, atingindo teor de umidade superior a 45% em sementes cotiledonares e 30-35% em sementes endospermáticas (MARCOS FILHO, 2005). Segundo Carvalho e Nakagawa (2000) entre uma e duas horas a semente completa a Fase I, atingindo teor de água oscilando entre 35 e 40% para as sementes cotiledonares e 25 e 30% para as endospermáticas.

Deste modo, considerando-se o movimento de água, principalmente nas Fases I e II da curva, relata-se a importância do estudo da curva de aquisição de água, pois está relacionado tanto a características de impermeabilidade de tegumento, como à determinação da duração de tratamentos com reguladores vegetais, condicionamento osmótico e pré-hidratação (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Com o propósito de estudar a aquisição de água em sementes de anonas, Ferreira et al. (1997) observaram que sementes de fruta-do-conde (*A. squamosa* L.) imersas em água destilada, adquiriam água e estabilizavam o ganho de massa de água em aproximadamente cinco horas a partir do início do experimento, caracterizando o final da Fase I (embebição). No entanto, verificaram também que sementes de atemóia (*A. cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) ainda não haviam atingido a fase *lag* da curva de aquisição de água após 12 horas de imersão, demonstrando estarem ainda na Fase I.

Posteriormente, Ferreira et al. (2006) avaliaram três metodologias para o estabelecimento da curva de aquisição de água e verificaram que ocorre a transição da Fase I para a Fase II nas sementes de atemóia (*A. cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) aproximadamente entre 30 e 36 horas após o início da embebição; e da Fase II para Fase III aproximadamente entre 260 e 264 horas após o início de embebição, com as sementes mantidas entre papel em caixas de germinação e em rolos de papel, respectivamente.

Em estudo da aquisição de água em sementes de *Annona emarginata*, Costa et al. (2011) verificaram que para completar a Fase I (embebição) foram necessárias 60 horas de imersão em água à temperatura de 25°C ou 72 horas em temperatura alternada de 20/30 °C. Os autores observaram também que a entrada de água ocorre de maneira desuniforme ao longo do tempo.

Deste modo, para que uma semente complete satisfatoriamente as três Fases do processo germinativo são necessárias condições internas e externas. Dentre os fatores internos, relaciona-se a longevidade e a viabilidade e dentre os externos a água, a temperatura e o oxigênio (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; FERREIRA; BORGHETTI, 2004). No entanto, muitas vezes mesmo em condições consideradas favoráveis (luz, água, temperatura) as sementes não germinam o que caracteriza a presença de algum tipo de dormência (KIGEL; GALILI, 1995; BEWLEY, 1997; BASKIN; BASKIN, 1998; FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

4.5 Dormência de sementes e reguladores vegetais

Na literatura é comum encontrar relatos de que sementes viáveis e intactas não conseguem completar a germinação sob condições consideradas favoráveis e a estas se denominou “dormentes” (BEWLEY, 1997; NONOGAKI et al., 2010). No entanto, os processos que envolvem a dormência bem como sua classificação, ainda são alvos de constantes estudos e discussões. Cabe ressaltar que são variadas as classificações encontradas, mas, de modo geral se dividem em dormência relacionada ao embrião e ao tegumento, de origem primária ou secundária (BEWLEY; BLACK, 1994; CARDOSO, 2004; BORGHETTI, 2004; MARCOS FILHO, 2005, NONOGAKI et al., 2010).

Desta forma, quanto a origem a dormência pode ser classificada em primária e secundária. Denomina-se primária quando é induzida ainda durante a fase de desenvolvimento e/ou maturação, antes da dispersão e a secundária instala-se em uma semente quiescente após a dispersão, devido a ambiente desfavorável (CARDOSO, 2004).

Quanto aos mecanismos, Bewley e Black (1994) classificam a dormência embrionária (quando o embrião não retoma seu desenvolvimento mesmo ao ser isolado do restante a semente) e a imposta pelos envoltórios (o bloqueio à germinação se origina dos tecidos que envolvem o embrião). Por outro lado Baskin e Baskin (1998) classificaram a dormência em endógena, subdividida em fisiológica, morfológica e morfofisiológica e exógena, classificada em física, química e mecânica.

Em ambas as classificações verifica-se a divisão entre dois grandes grupos, exógena e endógena. No entanto, é importante ressaltar que a dormência é uma estratégia de adaptação que visa garantir a sobrevivência das plantas em condições ambientais hostis. Neste caso, a dormência garante que a germinação e o estabelecimento das plântulas ocorram em condições mais favoráveis (BASKIN; BASKIN, 1998).

Considerando-se a classificação de Baskin e Baskin (1998), a dormência endógena, também classificada como embrionária, é causada por algum bloqueio à germinação relacionada ao embrião, mas que pode envolver

tecidos extra embrionários, quando estes impedem o desenvolvimento do embrião.

A dormência endógena do tipo fisiológica é causada por mecanismos inibitórios que envolvem processos metabólicos e o controle do desenvolvimento do embrião. Neste tipo de dormência a inibição envolve uma interação entre o embrião e os tecidos adjacentes, mas controlada pelo embrião (CARDOSO, 2004).

Grande parte das espécies produz embriões maduros cujas estruturas básicas, como cotilédones, eixo embrionário, plúmula, entre outras, se encontram diferenciadas mas não germinam. Neste caso, a dormência pode resultar de um impedimento metabólico localizado tanto no eixo embrionário como nos cotilédones e endosperma (BORGHETTI, 2004), pois o embrião pode até apresentar metabolismo ativo durante a embebição, mas não apresenta diferenciação nem crescimento (BEWLEY, 1997).

Quando a dispersão de sementes ocorre com o embrião não diferenciado (estádio de pré-embrião) ou não completamente desenvolvido (estádio de torpedo ou linear), ao que também se denomina embrião imaturo, a dormência é denominada endógena do tipo morfológica. Para este tipo de dormência é necessário um período chamado de pós-maturação, com as sementes separadas da planta-mãe, para o completo desenvolvimento do embrião (BASKIN; BASKIN, 1998; CARDOSO, 2004; BORGHETTI, 2004).

No entanto, a imaturidade do embrião pode não ser apenas morfológica, mas também estar relacionada a barreiras fisiológicas ou requerimentos metabólicos que necessitam ser supridos para que o embrião se torne apto a germinar. Neste caso a dormência é denominada morfofisiológica (BASKIN; BASKIN, 1998). A dormência morfofisiológica foi relatada por Rizzini (1973) em sementes de *Annona crassiflora*. O autor reporta que há necessidade de meses de pós-maturação sob alta temperatura e umidade, para o completo desenvolvimento embrionário.

Em relação à dormência em sementes de anonáceas, Esquinca et al. (1997) relatam que o mecanismo encontrado na espécie *A. diversifolia* não é devido a natureza do tegumento ou a imaturidade, mas sim, ao mecanismo de dormência que os autores relacionaram como “sobrevivência

estacional". Os autores não verificaram diferenças na germinação de sementes escarificadas e não escarificadas.

No entanto, cabe ressaltar que Svoma (1998) e Smet et al. (1999) relatam que sementes de anonáceas possuem tegumento composto de uma capa lenhosa impermeável, indicando que a água pode penetrar nas sementes somente pelo hilo, através da micrópila. Além disso, Smet et al. (1999) se referindo as citações de Hayat (1963), Sanewsk (1991) e Gaswppd (1995), afirmam que uma das características das sementes de anonáceas é a presença de embrião rudimentar e de desenvolvimento lento, que na maioria dos casos não está totalmente diferenciado, mesmo quando os frutos se encontram maduros. Esse estado permanece mesmo depois de coletadas as sementes e a germinação não ocorre antes da completa diferenciação do embrião, o que caracteriza a dormência morfofisiológica.

Do mesmo ponto de vista corroboram Rizzini (1973) e Baskin e Baskin (1998), relatando dormência morfofisiológica para as anonas. No entanto, ao se considerar a possibilidade da dormência morfofisiológica, deve-se considerar tanto o aspecto morfológico como fisiológico do processo (FERREIRA; BORGHETTI, 2004; SILVA et al., 2007).

Em relação ao aspecto morfológico da dormência de *A. diversifolia*, Esquinca et al. (1997) em análise anatômica do embrião, verificaram que não existe imaturidade do embrião e que há diferenciação dos tecidos embrionários. Além disso, relatam que foi notória a presença de sistema vascular que recorre de maneira contínua tanto os cotilédones como o eixo embrionário e que não ocorreram modificações anatômicas durante sete meses de armazenamento das sementes.

Silva et al. (2007) em estudo com sementes de *A. crassiflora*, também verificaram que os embriões estavam diferenciados no momento da dispersão, diferente do encontrado nas sementes estudadas por Rizzini (1973) cujos embriões eram uma massa indiferenciada.

Posteriormente, ao avaliar sementes de *A. diversifolia*, Gutu (2010) verificou que os embriões possuíam cotilédones, eixo embrionário e radícula diferenciados no momento da dispersão, embora com tamanho reduzido (3,28 mm de comprimento por 1,13 mm de largura, em média). No entanto o autor

verificou a necessidade de 6 a 8 meses de armazenamento para a superação da dormência, da mesma forma que Esquinca et al. (1997).

Deste modo, Esquinca et al. (1997), Gutu (2010) além de relatarem que as sementes de *A. diversifolia* são dispersas com embriões completos, afirmam que a dispersão ocorre no início do inverno e portanto, momento desfavorável à germinação, o que sugere a necessidade de alterações fisiológicas para que a dormência seja superada.

O direcionamento do metabolismo para germinação ou para a dormência de sementes é regulado pelo balanço entre hormônios promotores e inibidores da germinação. Deste modo, a aquisição da dormência antes da dispersão, tem como seu principal responsável o ABA – Ácido Abscísico (KOORNNEEF et al., 2002; TAIZ; ZEIGER, 2009).

4.5.1 ABA e indução à dormência

O controle da dormência pode ser dividido em indução, manutenção, suspensão do bloqueio e germinação. A dormência é um fenômeno induzido, preestabelecido durante a maturação, em resposta a condições específicas do ambiente. A manutenção é caracterizada por atividade metabólica relativamente baixa, devido aos mecanismos de bloqueio. A superação do bloqueio vai ocorrer mediante a ação de fatores externos detectados pela semente. Superada a dormência, a semente está apta a retomar o metabolismo para a formação de nova plântula (MARCOS FILHO, 2005).

Quando se trata de sementes quiescentes, o conteúdo de ABA é extremamente baixo no início de desenvolvimento da semente, mas se eleva à medida que o desenvolvimento continua, para atingir o máximo em cerca de um terço ou até a metade do tempo do início da maturidade da semente, e, em seguida, é reduzido (BLACK, 1981; MARCOS FILHO, 2005).

A dormência primária é comumente iniciada durante a maturação das sementes e sua manutenção depende de fatores genéticos e ambientais. Nestas sementes, o ABA é o principal agente no estabelecimento do

processo, sendo acumulado durante a maturação da semente na planta-mãe, num processo ativo (BEWLEY; BLACK, 1994; GUBLER et al., 2005).

A análise de mutantes e de plantas transgênicas tem evidenciado que a biossíntese de ABA está relacionada com a indução e a manutenção da dormência. Em trabalhos de Karssen et al. (1983) e Frey et al. (2004) com mutantes e espécies selvagens, foi demonstrado que a dormência nas sementes em desenvolvimento é dependente do ABA que é sintetizado no embrião e não do ABA proveniente de fontes maternas.

O uso de inibidores da síntese de ABA, durante a embriogênese, resultou na formação de embriões não dormentes (HILHORST, 1995) assim como o uso de mutantes deficientes na síntese ou percepção de ABA, produziu sementes não dormentes (KARSSSEN, 1995).

A indução da dormência depende não somente da síntese de ABA, mas também parcialmente da sensibilidade da semente ao ABA. Por exemplo, a germinação de sementes de espécies que apresentam elevada dormência é inibida por concentrações que não afetam a germinação de sementes de baixa dormência (BEWLEY, 1994; KIGEL; GALILI, 1995).

Mudanças no conteúdo de ABA durante a embebição refletem um balanço entre a sua biossíntese e o catabolismo, com dominância de síntese em sementes dormentes e catabolismo em não dormentes. Estudos deixam claro que a síntese *de novo* de ABA é requerida para a manutenção da dormência em sementes em embebição (ALI-RACHED et al., 2004).

Há considerável interesse na função do ABA e das GAs (giberelinas) no controle da superação da dormência e subsequente germinação. Em vários estudos verificou-se que o acúmulo de GAs ativas em embriões somente ocorreu após a redução de ABA. Durante a embebição de embriões dormentes de cevada, por exemplo, o conteúdo de ABA permaneceu elevado e de GA ativa muito baixo. Em embriões de sorgo, ABA reprime a expressão do gen da GA 20-oxidase impedindo que se formem giberelinas ativas, e, portanto bloqueia a germinação e mantém a dormência (PEREZ-FLORES et al., 2003; GUBLER et al, 2005).

O ABA também atua impedindo a germinação, por atuar na inibição da expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na degradação

de reservas como amilases e proteases, que tem sua síntese estimulada pela ação de giberelinas. Desta maneira o ABA atua na manutenção da dormência, induzindo a síntese de proteínas que impedem a síntese de GA para a germinação, como também atua inibindo a síntese de enzimas responsáveis pela degradação de reservas (BARDUCHE et al., 1999).

4.5.2 Superação da dormência primária

A redução ou superação da dormência endógena de algumas espécies é promovida por diversos fatores, incluindo pós-maturação (exposição de sementes secas a temperaturas altas ou baixas) e estratificação (embebição em baixas temperaturas) (GUBLER et al., 2005). Nestes casos, a pós-maturação e a estratificação causam mudanças no catabolismo do ABA, resultando em redução do conteúdo de ABA no embrião e um aumento na quantidade de ABA em formas inativas, tais como ácido faseico (PA) e ácido dehidrofaseico (DPA) com a consequente alteração no balanço hormonal. Deste modo a conversão do ABA em PA é uma etapa crucial para a superação da dormência em várias espécies (KUSHIRO et al., 2004).

Dentre os mecanismos de superação da dormência em sementes armazenadas a seco uma outra possibilidade é que a composição ou estrutura da plasmalema seja alterada em pós-maturação, resultando em modificações das proteínas ligadas à membrana. Algumas dessas proteínas podem ser receptores de GA e que são ativados. Ao mesmo tempo, inibidores de GA podem ser degradados por oxidação (KIGEL; GALILI, 1995).

Na natureza, sinais ambientais (temperatura, luz) induzem a síntese de GAs que, por sua vez, bloqueiam a expressão de genes repressores da germinação (RGL2, SPY) e/ou promovem a degradação dos respectivos produtos (mRNAs e proteínas), aumentando assim o potencial de germinação do embrião (PENG; HARBERD, 2002). Deste modo, Koornneef et al. (2002) relatam que GAs também agem na superação da dormência, por atuar no silenciamento de genes envolvidos na manutenção da dormência.

Observa-se, portanto que há um mecanismo sincronizado e continuado entre a superação da dormência e a germinação. A partir do momento em que as sementes têm a dormência superada, seguem-se os processos metabólicos mediados pelos hormônios para que ocorra a degradação de substâncias presentes nos tecidos de reserva e o subsequente transporte dos produtos resultantes, para os pontos de crescimento do eixo embrionário e se complete a germinação.

4.6 Germinação e reguladores vegetais

Dentre os fatores que regulam o processo germinativo, o balanço entre hormônios, promotores (giberelinas, citocininas e etileno) e inibidores como o ácido absísico exerce papel fundamental tanto na dormência como na promoção da germinação (BEWLEY; BLACK, 1994; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Cabe observar que durante a germinação, as reservas armazenadas no endosperma (carboidratos, proteínas e lipídeos), são quebradas por enzimas hidrolíticas como alfa e beta amilase, proteinases, lipases, fosfatases e os açúcares, aminoácidos e outros produtos são transportados para o crescimento do embrião (LIMA et al., 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009). E ainda, que estas enzimas têm a síntese ou ativação regulada por hormônios vegetais (BEWLEY; BLACK, 1994; ARTECA, 1995; MARCOS FILHO, 2005).

Dentre os promotores da germinação, será abordado neste trabalho o grupo das giberelinas e das citocininas.

De maneira geral, as giberelinas (GAs) determinam nas plantas importantes alterações fisiológicas, como a indução da floração, expressão sexual, senescência, alongamento de ramos em plantas anãs, pegamento e crescimento de frutos (TAKAHASHI et al., 1991; TAIZ; ZEIGER, 2009). A síntese das GAs ocorre nas regiões de crescimento, sementes em germinação, endosperma, frutos imaturos, ápices de caules e raízes e são encontradas em menor concentração nas raízes (DAVIES, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Durante a germinação, duas funções principais para as giberelinas têm sido propostas. A primeira está relacionada ao fato de que giberelinas aumentam o crescimento potencial do embrião por atuarem na degradação de reservas, com o objetivo de fornecer energia para o embrião. A segunda refere-se a superação da restrição mecânica imposta pelos tecidos que envolvem a radícula (HILHORST, 1995; BEWLEY, 1997; KOORNNEEF et al., 2002).

GAs sintetizadas *de novo* iniciam sinais por meio de fatores de sinalização (GCR1, SLY, CTS) que, por sua vez, promovem a síntese de enzimas hidrolíticas que atuam na degradação de reservas e na modificação da parede celular, enfraquecem o tegumento e possibilitam a germinação (PENG; HARBERD, 2002).

Deste modo giberelinas promovem a síntese de enzimas envolvidas na hidrólise de reservas (amilases, lipases, entre outras), liberando energia e substrato para o desenvolvimento do embrião. E ainda, promovem a síntese e o aumento da atividade de enzimas de hidrólise de galactomananos (endo-beta-mananases, expansinas monohidrolases e alfa-galactosidase) e, portanto também atuam no enfraquecimento dos tegumentos. Ambos os eventos estão relacionados à protrusão de radícula e portanto à germinação (BEWLEY; BLACK, 1994; KIGEL; GALILI, 1995; BEWLEY, 1997; SILVA et al., 2007; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Trabalhos pioneiros com sementes de cevada demonstraram que antes da embebição a maior concentração de giberelinas se encontra no embrião. À medida que o tempo de embebição aumenta, maiores quantidades são encontradas no endosperma. Embora a sede da síntese de giberelinas seja o embrião, estas aí não se acumulam, se mobilizando para o endosperma e atuam sobre as células da camada de aleurona, nas quais induzem a síntese de enzimas hidrolíticas (POPINIGIS, 1985; HILHORST, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Deste modo, as alfa amilases, por exemplo, que em geral não estão presentes em sementes dormentes e quiescentes de cereais, devem ser sintetizadas *de novo* durante a germinação. Para a indução da síntese, há necessidade de giberelinas disponíveis. Em cereais, portanto, as GAs produzidas

no eixo embrionário e difundidas para a camada de aleurona atuarão como ativador primário na cascata de sinais que culminará com a indução de um fator de transcrição (o GAMyb) e a expressão gênica de enzimas amilolíticas (JACOBSEN; BEACH, 1985; UEGUCHI-TANAKA et al, 2000; TAIZ ;ZEIGER, 2009) .

Segundo Kigel e Galili (1995) a mobilização de reservas é um evento pós-germinativo. Compostos resultantes da degradação de reservas são transportados do endosperma, perisperma ou cotilédones para o crescimento das plântulas. Contudo, em algumas espécies, parte deste processo ocorre antes da protrusão da radícula. Isto é mais evidente em espécies onde sementes maduras contêm um embrião pouco desenvolvido. Em sementes de aipo, por exemplo, o endosperma se degrada simultaneamente ao crescimento do embrião, inclusive com hidrólise de galactomananos da parede celular e divisão celular.

Em sementes de espécies selvagens o enfraquecimento do endosperma ocorre em água antes da protrusão da radícula e, em sementes mutantes, deficientes em GA (gib1) foi absolutamente dependente da aplicação de GA₄₊₇ (PENG; HARBERD, 2002). Da mesma forma, Silva et al. (2007) verificaram que a aplicação de GA₄₊₇ induziu a atividade da endo-beta-mananase e ao mesmo tempo o crescimento do embrião em sementes de *A. crassiflora*.

Além das giberelinas, citocininas também tem ação na germinação e nos eventos pós-germinativos das sementes de várias espécies (TAIZ; ZEIGER, 2009), pois as citocininas endógenas atuam no crescimento da radícula, pela habilidade em induzir a divisão celular (HORCAT; LETHAM, 1990, CROZIER et al., 2001).

Nas plantas, de modo geral, apresentam também outros efeitos como indução de brotação de gemas laterais, alterações na dominância apical, promoção da expansão foliar e atraso na senescência foliar, levando ao acúmulo de clorofila e aumento da conversão de etioplastos para cloroplastos (DAVIES, 1995). Na germinação as citocininas participam no controle de genes, da regulação das funções protéicas, da regulação da permeabilidade de membranas e da regulação dos níveis de giberelina (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Além de GA antagonizar o efeito do ABA, na promoção de genes específicos da dormência em *Bromus secalinus*, por exemplo, de modo

similar, citocininas aumentam RNA e a síntese proteica principalmente para superar o efeito do ABA (BEWLEY; BLACK, 1994). Walker et al. (1989) mencionam que as citocininas regulam o nível de inibidores ativos presentes nas sementes, permitindo que se tornem mais sensíveis à ação da giberelina.

As citocininas também controlam a mobilização de reservas. Em alguns casos a aplicação de citocininas induz a degradação de reservas e/ou aumenta a atividade de enzimas relacionadas com a mobilização (BEWLEY; BLACK, 1994). Os autores afirmam que citocininas causam, por exemplo, aumento na atividade amilolítica e proteolítica de cotilédones isolados de grão de bico, bem como mobilização de carboidratos e proteínas.

Para Marcos Filho (2005) além de estimular a divisão e alongamento celular, as citocininas apresentam efeito sinérgico com a luz e atenuam efeitos de substâncias inibidoras da germinação, como ABA e cumarina.

4.6.1 Uso de reguladores vegetais em sementes de Annonaceae

Com o intuito de avaliar o efeito de reguladores vegetais na germinação de sementes de anonáceas, diversas pesquisas têm sido realizadas. Em trabalho desenvolvido com sementes de *A. cherimola* e *A. diversifolia*, Campbell e Popenoe (1968) obtiveram 80% de germinação com o uso de 350 a 500 mg L⁻¹ de GA₃. Jubes et al. (1975) utilizaram 500 mg L⁻¹ de GA₃ em sementes de *A. cherimola* e verificaram germinação de 77,32%.

Pinto (1976) utilizou 200, 300, e 400 mg L⁻¹ de ácido giberélico em sementes de graviola (*A. muricata* L.) e observou que embora as diferenças na porcentagem de germinação não tenham sido significativas, a aplicação de 300 mg L⁻¹ proporcionou 82,1% de germinação, enquanto a testemunha apresentou 75,1% de germinação.

Hernández (1993) relata que Duarte et al. (1975) ao estudar sementes de *Annona cherimola* Mill. verificaram significativo aumento na porcentagem de germinação (70%), em relação à testemunha (57,25%), somente quando tratadas com 10000 mg L⁻¹ de GA₃.

A partir de outro trabalho com sementes de *A. cherimola* Agustín e Altivier (1996) sugerem que para reduzir o tempo de germinação das sementes é necessário tratamento em soluções de 150 a 200 mg L⁻¹ de GA₃ por 12 horas de embebição.

Smet et al. (1999) também trabalharam com sementes de *A. cherimola* e após avaliarem tratamentos com embebição das sementes por diferentes períodos (24 h, 48 h, 72 h) em soluções contendo água destilada, 500, 1000 e 10000 mg L⁻¹ de GA₃, obtiveram as porcentagens de germinação de 47,5% (48 h e 500 mg L⁻¹); 58,5% (24 h e 500 mg L⁻¹); 65,5% (24h e 1000 mg L⁻¹); 69,5% (24 h e 5000 mg L⁻¹) e 74,5% (24 h e 10000 mg L⁻¹), enquanto as sementes sem tratamento apresentaram 10% de germinação.

Diversos trabalhos foram desenvolvidos com sementes de *A. squamosa* Ferreira et al. (1999) que avaliaram tempos de embebição (4, 8, 12, 16, 20, 24 e 48 horas) e concentrações de GA₃ (0, 50, 100, 250, 500 mg L⁻¹). Os autores verificaram que o índice de velocidade de germinação foi significativamente maior com o uso de 500 mg L⁻¹ e com esta concentração, os tempos de 16, 20 e 24 horas promoveram as maiores médias.

Em outro trabalho com *A. squamosa* L., Ferreira et al. (2000a) estudaram a interação entre períodos de armazenamento de sementes (0, 30, 60, 120 e 150 dias) e tratamentos com GA₃ (sementes sem embebição; 0, 50, 100, 250, 500 e 1000 mg L⁻¹ de GA₃ com quatro horas de embebição). Os autores não observaram diferenças na porcentagem de germinação das sementes tratadas com GA₃. No entanto, 30 dias de armazenamento foi favorável a germinação que alcançou 75% de germinação.

Ferreira et al. (2000b) estudaram a germinação de sementes de *A. squamosa* L. de diferentes localidades (área de preservação ecológica do município de Santa Helena-PR e comércio local) e concentrações de GA₃ (0, 50, 100, 250, 500 e 1000 mg L⁻¹ de GA₃ por 5 horas de embebição). Não foram observadas diferenças na interação entre origem e concentrações de GA₃. No entanto, sementes tratadas com 250 mg L⁻¹ de GA₃ (67% de sementes germinadas) diferiram significativamente da testemunha (53% de sementes germinadas).

Ao avaliar o efeito do GA₃ (0; 50; 100; 250; 500; 750 e 1000 mg L⁻¹) na germinação de sementes de fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.) mantidas em câmaras de germinação e na emergência de plântulas em casa de vegetação, Ferreira et al. (2002a) verificaram que as concentrações de GA₃ promoveram diferenças na porcentagem de germinação em relação à testemunha, sob condições de câmara de germinação. No entanto, não observaram diferenças na porcentagem de emergência de plântulas mantidas em viveiro.

O efeito dos reguladores vegetais também tem sido estudado em outras anonas. Ferreira et al. (2002b) avaliaram o efeito de GA₃ e temperaturas na germinação de sementes de atemóia (*A. cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.), cultivares 'Gefner' e Ferreira et al. (2002c) em 'Tompson' e obtiveram diferenças significativas em relação à testemunha nas concentrações de 500, 750 e 1000 mg L⁻¹ para cultivar 'Tompson' e 1000 mg L⁻¹ para cultivar 'Gefner'. Observaram ainda que a temperatura alternada (20 °C por oito horas e 30 °C por 16 horas) foi, adequada para germinação de sementes de ambas cultivares.

Ao estudar sementes de fruta-do-conde (*A. squamosa* L.) e de três cultivares de atemóia ('Gefner', 'PR-1' e 'PR-3') tratadas com GA₃ (50 mg L⁻¹, e 100 mg L⁻¹) e água à 5 °C e 30 °C, Stenzel et al. (2003) verificaram efeito satisfatório com o uso de GA₃ nas sementes de atemóia, porém sem diferenças entre as concentrações. Para a fruta-do-conde o tratamento com 50 mg L⁻¹ de GA₃ proporcionou a maior porcentagem de germinação (75%).

Lima-Brito et al. (2006), obtiveram aumento na porcentagem de germinação de sementes de *A. crassiflora*, *A. squamosa* e *A. muricata* alcançando 56%, 94% e 84% de germinação com o uso de 750 mg L⁻¹ de GA₃.

Em trabalho com objetivo de estudar a relação do efeito de giberelina e etileno, Oliveira et al. (2010) verificaram aumento na porcentagem de germinação de sementes de atemóia (*A. cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.), cultivar Gefner, (85,5%) com a concentração calculada de 778 mg L⁻¹ de GA₃. Os autores observaram ainda, que a interação entre os GA₃ e etileno foi positiva, promovendo incremento na obtenção de plântulas normais e no índice de velocidade de germinação.

Poucos trabalhos foram encontrados utilizando misturas de reguladores. Neste exemplo, além do aumento da porcentagem de germinação de sementes de *A. crassiflora* Mart. com a aplicação de 2000 mg L⁻¹ GA₃, Silva et al. (2007) obtiveram superação da dormência de sementes da mesma espécie, alcançando germinação de 43%, com o emprego de 143 mg L⁻¹ de GA₄₊₇, demonstrando o efeito sinérgico da associação de giberelinas utilizadas em bioestimulantes.

De acordo com Braga et al. (2010) o uso de bioestimulante (GA₄₊₇ + N-(fenilmetil)-aminopurina) também foi favorável à germinação de sementes de atemóia, cultivar Gefner, que alcançou 95,45% com a concentração estimada de 329,14 mg L⁻¹, enquanto a testemunha apresentou 52% de germinação.

Costa et al. (2011) também obteve respostas satisfatórias com o uso de bioestimulante composto por GA₄₊₇ + N-(fenilmetil)-aminopurina na superação da dormência de sementes de *A. emarginata* com as maiores porcentagens de germinação verificadas com o emprego de 600 mg L⁻¹, temperatura alternada de 20/30 °C, sob condições de luz (37%) e escuro (32%). As sementes embebidas em água apresentaram germinação de 27% e 23%, sob condições de luz e escuro respectivamente.

Diante dos trabalhos relatados fica evidente que o emprego de reguladores vegetais auxilia na superação da dormência e na germinação de sementes de anonáceas. No entanto, conhecer as variações no balanço hormonal e os efeitos deste na mobilização de reservas em sementes que receberam reguladores vegetais para a superação da dormência ainda é tema que requer muitos estudos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Para a condução dos três experimentos, os frutos da espécie *Annona diversifolia* Saff. ('papausa') (Figura 1) foram obtidos nos mercados locais do município de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México e eram provenientes de pomares caseiros do município de San Lucas. Os frutos de *Annona purpurea* Moc & Sessé ex Dunal ('chincuya') (Figura 2) foram obtidos diretamente com camponeses e demais moradores dos arredores do mesmo município de origem.

As sementes foram extraídas manualmente sob água corrente e para minimizar contaminações, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 10% (i.a.) durante 5 minutos e, em seguida, lavadas com água destilada, mantidas sobre papel filtro em bancada de laboratório, à temperatura de aproximadamente 25 °C, durante sete dias para secagem superficial.

O teor de água inicial das sementes foi determinado empregando-se quatro repetições de 25 sementes, pelo método de secagem em estufa a 105 °C por 24 h (BRASIL, 2009). O teste de tetrazólio para avaliar a viabilidade das sementes foi realizado em quatro repetições de 25 sementes de acordo com Gutu (2010). Em seguida foi realizado o primeiro experimento.



Figura 1. Frutos e sementes de *Annona diversifolia* Saff. ('papausa'). (Foto: FERREIRA, G., 2010).



Figura. 2. Frutos e sementes de *Annona purpurea* Moc & Sessé ex Dunal ('chincuya'). (Foto: FERREIRA, G., 2010).

5.1. Experimento 1: Curva de aquisição de água de sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal

Neste experimento os tratamentos foram constituídos pelos tempos nos quais as sementes permaneceram imersas em água destilada, a fim de determinar as três fases da curva de aquisição de água.

Após a determinação do grau de umidade inicial do lote de sementes, quatro repetições de 25 sementes foram acondicionadas em “Becker” contendo água destilada com aeração e mantidas em germinador da marca Biotronette^(R) a 30 °C (± 2 °C), umidade relativa de 50 a 60%, na ausência de luz.

As pesagens foram realizadas a cada hora, durante oito horas, e após 8 h foram realizadas com 24 h e 32 h do início da colocação das sementes em contato com a água. As pesagens continuaram a cada 8 h até alcançar 120 h de imersão e depois em intervalos de 24 h até 480 h de imersão. Em cada um dos tempos as sementes eram retiradas dos recipientes (Becker), pesadas e retornavam. A água era substituída em cada avaliação e mantida a oxigenação com bombas de aquário.

Para a realização da curva com a aquisição de água durante as fases da germinação, foi considerado o grau de umidade obtido antes da imersão das sementes nos tratamentos (Tempo = 0), após quatro horas de imersão e assim sucessivamente, até atingir 480 h de imersão. Os resultados estão apresentados em porcentagem de água presente nas sementes (grau de umidade ou teor de água) em relação à massa da matéria seca inicial.

Para o estudo das variações no teor de água foi ajustado o modelo de equação logística $y = a / [1 + \exp(b-c*x)]$, com y = teor de água (%), x = tempo (em horas). Para o cálculo da mudança da Fase I para a Fase II da aquisição de água foi utilizado o cálculo do ponto de desaceleração assintótico (PDA), conforme proposto por Mischan et al. (2011).

5.2 Experimento 2: Germinação de sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA₃ e GA₄₊₇ + Benziladenina

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições de 25 sementes em esquema fatorial 2 x 7 (reguladores x concentrações). Os tratamentos foram constituídos pelas combinações entre concentrações de GA₃ e de GA₄₊₇ + Benziladenina (GA₄₊₇ + BA) x 0, 200, 400, 500, 600, 800 e 1000 mg L⁻¹ i.a.. Além do tratamento com sementes embebidas somente em água para cada um dos reguladores (0 mg L⁻¹), foi acrescentada uma testemunha na qual as sementes não foram previamente embebidas.

Como fonte dos reguladores vegetais foi utilizado o GA₃ e uma mistura de reguladores vegetais (bioestimulante) contendo em sua composição química uma citocinina e duas giberelinas (GA₄ e GA₇) nas seguintes proporções: GA₄+GA₇: 1,8% e benziladenina 1,8%.

As sementes foram tratadas com os reguladores vegetais por período 4 dias, que foi estabelecido a partir da curva de aquisição de água do experimento anterior. As soluções nas quais as sementes permaneceram foram mantidas sob aeração constante.

Após os tratamentos, a semeadura foi realizada em rolo de papel umedecido com água destilada (2,5 vezes o seu peso). Após o acondicionamento, as sementes foram mantidas em germinador da marca Biotronette^(R) a 30 °C (±2 °C), umidade relativa de 50 a 60%, na ausência de luz.

As observações foram realizadas a cada dois dias desde o início da implantação do experimento, quando se realizava a contagem do número de sementes germinadas. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentavam raiz primária com aproximadamente 2 mm de comprimento (HADAS, 1976).

Foram calculadas as seguintes variáveis: porcentagem de germinação (%G), de sementes dormentes (%SD) e mortas (%SM) e de plântulas normais (%PN), frequência relativa (f) segundo Labouriau (1983), índice de velocidade de germinação (IVG) calculado segundo Maguire (1962) e tempo médio

de germinação, segundo Edmond e Drapala (1958), sendo os dois últimos autores citados por Silva e Nakagawa (1995). As equações utilizadas para VG e TM:

$$IVG = \sum G_i / T_i$$

Onde: IVG = germinação média diária

G_i = porcentagens diárias de germinação

T_i = tempo (dias)

$$TM = \sum G_i * T_i / \sum G_i$$

Onde: TM = tempo médio necessário para atingir a germinação máxima

G_i = porcentagens diárias de germinação

T_i = tempo (dias)

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre reguladores e regressão para verificar a tendência dos dados em relação às concentrações (PIMENTEL-GOMES, 2000).

Para realização das análises, foi utilizado o programa SAS (SAS institution, Cary, NC).

5.3 Experimento 3: Balanço hormonal e degradação de reservas em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal submetidas a tratamentos para superação da dormência

Para a implantação deste experimento, foi escolhida a concentração de 400 mg L⁻¹ de GA₄₊₇ + BA a partir dos resultados obtidos no experimento anterior.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três repetições por parcela, em esquema fatorial 3 x 4 (tratamentos x tempos de avaliação). Os tratamentos foram constituídos por sementes que foram colocadas para germinar sem embebição prévia (denominadas de “Seca”); sementes mantidas 4 dias imersas em água destilada e posteriormente

transferidas para o germinador (“Água”) e sementes mantidas 4 dias em solução contendo 400 mg L^{-1} de $\text{GA}_{4+7} + \text{BA}$ (“ $\text{GA}_{4+7} + \text{BA}$ ”). As soluções de embebição foram mantidas em aeração constante, empregando-se bombas de aquário.

As sementes dos tratamentos com embebição foram colocadas em imersão e posteriormente acondicionadas em rolos de papel para germinar. As sementes do tratamento sem embebição prévia foram colocadas diretamente nos rolos de papel. Ao papel de germinação foi adicionada água na proporção de 2,5 vezes seu peso seco. As sementes foram mantidas em germinador da marca Biotronette^(R) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), umidade relativa de 50 a 60%, na ausência de luz.

As avaliações foram realizadas nos tempos zero, 2, 5, 10 e 15 dias, sendo que o tempo zero foi comum a todos os tratamentos (Seca, Água, $\text{GA}_{4+7} + \text{BA}$) indicando o estágio metabólico inicial do lote de sementes.

Nos tempos 2 dias e 5 dias foram coletadas sementes de todos os tratamentos e que ainda não apresentavam germinação visível.

Para as coletas dos tempos 10 dias e 15 dias foram consideradas as sementes com 1 mm de radícula e 1 cm de raiz primária (respectivamente). Neste caso, foram coletadas sementes que haviam sido tratadas com os reguladores e que, portanto, apresentaram germinação. Ao mesmo tempo (10 e 15 dias) foram coletadas as sementes dormentes dos outros tratamentos (Seca e Água), sem nenhum sinal de desenvolvimento do embrião. Para tanto, o tegumento era retirado e o embrião avaliado quanto ao estágio de desenvolvimento proposto.

As quantificações dos teores de açúcares solúveis totais, proteínas e lipídeos, foram realizadas em três repetições de amostras de endosperma de cada tratamento em cada data de avaliação e para as quantificações de hormônios (GA e ABA) foram utilizados endospermas com os embriões.

5.3.1 Determinação de hormônios

O método para a extração e quantificação dos hormônios foi adaptado de Kelen et al. (2004). Para o preparo das amostras para a quantificação de GA e ABA foram utilizadas três repetições de cinco sementes, o que equivale a aproximadamente 5,341 g por repetição para cada tratamento.

As amostras foram maceradas em metanol a 70% e mantidas 12 h a 4 °C (geladeira). O material foi filtrado a vácuo e rotaevaporado a 45 °C para eliminar o metanol. A fase aquosa foi ajustada a pH 8,5 com Buffer Fosfato 0,1 M e particionada três vezes com acetato de etilo (ACoEt). A fase acetato foi removida e o pH da fase aquosa foi ajustado a 2,5 com HCl 1 N. O material foi particionado novamente com acetato de etilo (ACoEt), a parte orgânica filtrada sobre sulfato de sódio anidro e o acetato evaporado. O material foi guardado em frascos pesados e etiquetados em geladeira.

A análise de GA e ABA foi realizada conforme Kelen et al. (2004), Chacón e Gonzalez-Esquinca (2011) por cromatografia líquida utilizando-se o HPLC modelo Perkin Elmer Series NCI 900 (Norwalk, CT, USA) em fase reversa (Spheri-5 RP-18, 100 mm x 4.6 mm; 5 μ m de diâmetro de partícula). A fase móvel foi constituída de acetonitrile:água (26:74%). O fluxo foi de 1 ml min⁻¹, a temperatura da coluna foi mantida em 30 °C. A detecção do UV foi realizada a 210 nm.

A curva padrão de calibração de cada regulador (GA e ABA) foi realizada a partir de soluções estoque contendo 378; 350; 330; 250; 225; 150; 100; 59,36; 50; 25; 14,84; 7,42; 3,71; 1,85 μ M de ABA e 288; 250; 200; 150; 100; 50; 25 μ M de GA₃. A curva para as concentrações de GA apresentou regressão linear, sendo $Y = 6402,9x - 182769$, com R^2 de 0,98; e para ABA $y = 20742x + 287104$, com R^2 de 0,99. Para copilação, análise dos dados e integralização das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas, foi utilizado o software "Perkin Elmer Turbochrom", acoplado ao HPLC.

As amostras foram dissolvidas em metanol para obtenção de concentração de 2 mg L⁻¹ e 20 μ L destas soluções foram injetadas para análise no HPLC. Os picos de amostras foram coletados, e as suas características foram comparadas com as bandas de absorção. Assim, a confirmação da identificação

dos hormônios foi feita pelas comparações entre os picos obtidos em HPLC e espectro de UV, utilizando como referência padrões puros. A curva de absorção do espectro foi obtida empregando-se o espectrofotômetro modelo “Thermo Electron Corporation Genesys” 10 UV (WI, USA). A confirmação das giberelinas obtidas será realizada posteriormente, e, portanto neste trabalho foi utilizado o termo giberelina, referindo-se ao grupo hormonal.

5.3.2 Determinação de Açúcares Solúveis Totais

A extração dos açúcares foi realizada de acordo com Garcia et al. (2006) e a para a quantificação empregou-se a análise calorimétrica utilizando-se o método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

Para a extração dos açúcares solúveis totais, foram utilizadas três repetições de uma semente, o que equivale a 1,200 g por repetição de cada tratamento. As amostras foram moídas em 10 ml de etanol a 80% e a extração foi feita por fervura em banho-maria a 90 °C por cinco minutos para inativar as enzimas. Em seguida foram centrifugadas a 1000 g, a 4 °C por cinco minutos e o resíduo extraído mais duas vezes com etanol 80% por cinco minutos a 80 °C e uma vez com água por cinco minutos a 60 °C. Da combinação dos extratos, resultou a fração de açúcares solúveis totais. Os extratos foram concentrados a 35 °C para redução do volume.

5.3.3 Determinação de proteínas

Para a extração das proteínas foram utilizadas três repetições de uma semente, o que equivale a 1,200 g em média, por repetição de cada tratamento. A extração foi realizada conforme Suda e Giorgini (2000).

As proteínas foram extraídas conforme sua solubilidade. Dos endospermas foi extraído consecutivamente, albuminas (com água destilada),

globulinas (com 5% de cloreto de sódio), prolaminas (com 60% de etanol) e glutelinas (com 0,4% de hidróxido de sódio), a cada 24 horas.

Os extratos eram centrifugados a 15000 g por 30 minutos e os sobrenadantes quantificados de acordo com Bradford (1976). A cada 24 h era extraída uma proteína, de acordo com o solvente.

5.3.4 Determinação de lipídeos

A extração de lipídeos foi realizada conforme Manirakiza et al. (2001), Ambalkar et al. (2011). Para a extração dos lipídeos foram utilizadas três repetições de três sementes, o que equivale a aproximadamente 3,987 g por repetição de cada tratamento.

Os endospermas foram moídos em almofariz, colocados em matraz com hexano e mantidos em Soxhlet para extração por três períodos de 8 h. A cada período de extração o sobrenadante era filtrado e levado para ser concentrado e armazenado em frascos devidamente etiquetados e pesados.

5.3.5 Análise estatística

Os dados das concentrações hormonais, açúcares solúveis totais, proteínas e lipídeos foram submetidos à análise de variância, teste de homogeneidade de Levene a 0,01% e regressão polinomial para verificar a tendência dos dados em relação ao período compreendido entre o início da embebição das sementes à germinação visível (15 dias) (PIMENTEL-GOMES, 2000).

Para realização das análises, foi utilizado o programa SAS (SAS institution, Cary, NC).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Experimento 1: Curva de aquisição de água de sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal

Durante a aquisição de água pelas sementes são ativados processos metabólicos, com o objetivo de fornecer energia para a retomada do desenvolvimento do embrião e estabelecimento do indivíduo para perpetuação da espécie (BEWLEY, 1997; COPERLAND; McDONALD, 1999). Deste modo, a partir da entrada de água em sementes quiescentes ocorre a síntese *de novo* de hormônios como as giberelinas e enzimas como a alfa amilase, que irão atuar na degradação de reservas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Neste contexto se evidencia a importância da compreensão das Fases de aquisição de água pelas sementes propostas por Bewley e Black (1994). O conhecimento das Fases auxiliará, portanto na detecção de mecanismos de controle de entrada de água nas sementes, e também auxiliará na determinação de tempos para tratamentos pré-germinativos em soluções, com reguladores vegetais ou condicionamento osmótico, por exemplo.

Os gráfico contendo a curva de aquisição de água das sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal estão apresentados nas Figuras 3 e 4 respectivamente. A partir de cálculos propostos por Mischán et al. (2011), foi possível estabelecer o término da Fase I de aquisição de água, a partir da determinação do ponto de desaceleração assintótico. Este ponto indica um valor aproximado, quando há a redução da velocidade de aquisição de água pela semente, indicando que o potencial matricial tende a zero, o que resulta na estabilidade da aquisição de água.

A aquisição de água pelas sementes ocorre em função da diferença entre o potencial hídrico destas e do meio. Neste caso, a primeira fase da aquisição de água (Fase I) tem a tendência de ser rápida, devendo durar de 1 a 2 horas (BEWLEY; BLACK, 1994).

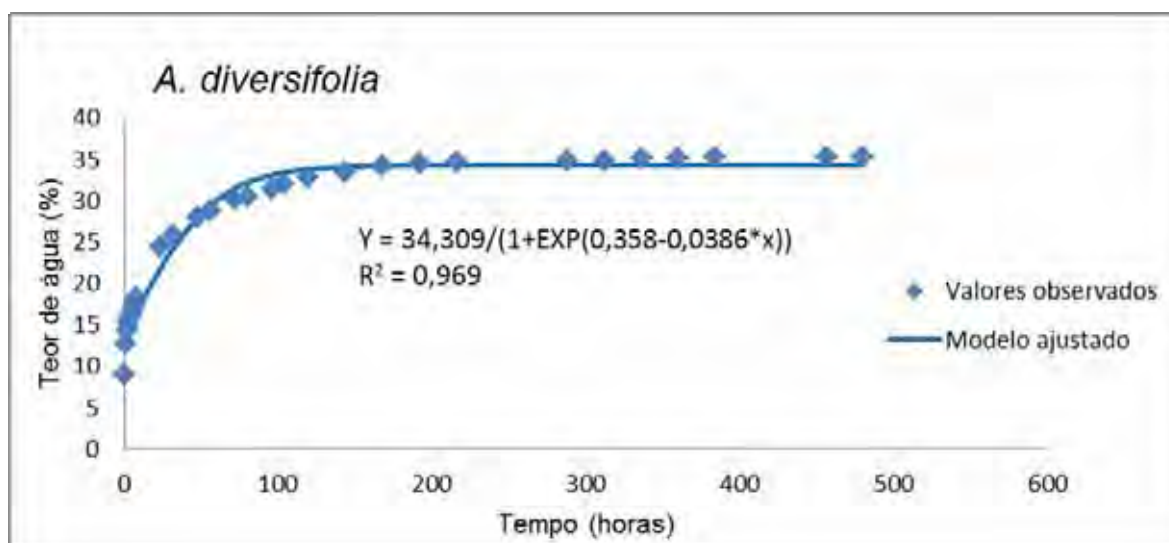


Figura 3. Curva de aquisição de água de sementes de *Annona diversifolia* Saff.

Deste modo, o principal responsável pela variação do potencial hídrico nesta fase é o potencial matricial e o processo é considerado físico, por depender da adsorção da água a uma matriz, ocorrendo em material vivo ou morto, que contenha sítios de ligação ou afinidade pela água (CASTRO; HILHORST, 2004).

No entanto, a duração das fases e a quantidade de água embebida dependem de uma série de fatores tais como a resistência conferida pelo tegumento à entrada de água, a composição das reservas e as condições ambientais no momento da embebição (BEWLEY; BLACK, 1994; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

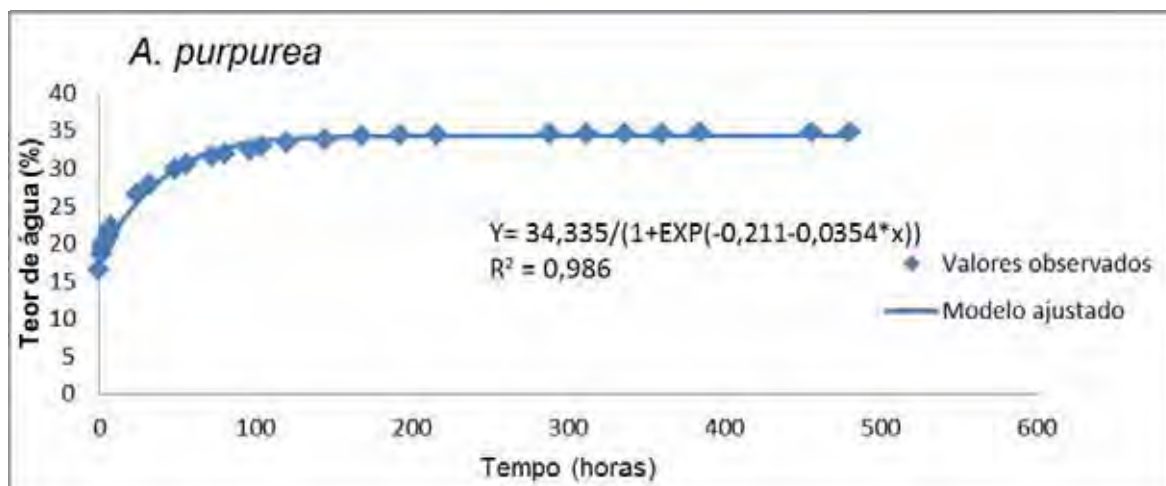


Figura 4. Curva de aquisição de água de sementes de *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal.

Neste experimento e de acordo com cálculos propostos por Mischan et al. (2011) a Fase I da aquisição de água ou embebição, teve duração de aproximadamente 50 horas em sementes de *A. diversifolia*, quando houve tendência a estabilidade na aquisição de água. Estas sementes apresentavam teor de água inicial de 9,04%, antes do início da embebição e, após aproximadamente 50 horas de imersão em água sob condições de 30°C e aeração constante, atingiram 31,16% de teor de água.

O mesmo padrão de resposta foi observado em sementes de *A. purpurea*, sendo que estas possuíam teor de água inicial de 16,54% e alcançaram a estabilidade da curva ao redor das 70 horas, com teor de água de 31,18%.

As espécies em estudo apresentaram aquisição de água de maneira lenta, no entanto, foi estabelecida a Fases I do padrão trifásico proposto por Bewley e Black (1994), embora não possa ser considerado um processo

rápido, conforme sugerido pelos autores. No entanto, está de acordo com as variações observadas com sementes de outras anonas.

Nota-se que, enquanto sementes de *A. diversifolia* e de *A. purpurea* apresentam duração da Fase I em torno de 50 e 70 horas respectivamente, Ferreira et al. (1997) observaram que sementes de *A. squamosa* L. estabilizavam a entrada de água com aproximadamente 5 horas de imersão em água, caracterizando a mudança entre as fases I e II, enquanto, com 12 horas, as sementes de atemóia (*Annona cherimola* x *A. squamosa*) continuavam na Fase I.

Posteriormente, Ferreira et al. (2006) determinaram a Fase I em sementes de atemóia (*Annona cherimola* x *A. squamosa*) com duração de 30 a 36 horas. E em estudo com sementes de *Annona emarginata*, Costa (2009) verificou que para completar a Fase I foram necessárias de 60 à 72 h de embebição.

Cabe observar ainda, que independente do teor de água inicial das sementes, a Fase I se completou em ambas as espécies quando foi atingido teor de água de aproximadamente 31%, não importando o tempo gasto para atingir tal conteúdo de água.

Assim, fica evidente que a mudança da Fase I para a Fase II é caracterizada pelo teor de água atingido e não em função do tempo gasto para atingi-lo. Da mesma forma Costa (2009) também obteve 27,85% e 28,35% de teor de água em sementes de *A. emarginata* quando completaram a Fase I da curva de aquisição de água. Tais observações estão de acordo com o proposto por Carvalho e Nakagawa (2000), uma vez que os autores relatam que a estabilização da curva se dá quando é atingido teor de água de aproximadamente 25 a 30% em sementes endospermáticas.

Com o término da Fase I com duração de 50 h para sementes de *A. diversifolia* e 70 h para sementes de *A. purpurea*, teve início a Fase II, que foi observada até 480 h do início da imersão, quando as sementes ainda não haviam atingido a Fase III da germinação. No entanto, o experimento foi encerrado devido ao elevado nível de danos observado aos tegumentos pelo manuseio.

Observa-se que na Fase II a aquisição de água se torna lenta, pois as reduções no potencial hídrico da semente são dependentes principalmente de reduções no seu potencial osmótico, que por sua vez, depende da atividade metabólica iniciada na Fase I (BEWLEY; BLACK, 1994). Assim, nesta fase é comum observar pequenas variações na aquisição de água, o que não foi detectado neste trabalho.

Além disso, quando as sementes apresentam dormência fisiológica ou morfofisiológica, a duração da fase II pode ser consideravelmente prolongada, podendo sustentar um baixo nível de atividade metabólica e permanecer na fase II por meses ou anos, até a atingir a germinação visível (BRADFORD, 1995; KIGEL; GALILI, 1995).

Desta forma, eventos metabólicos que ocorrem durante a embebição de sementes dormentes também podem ocorrer em sementes germinantes. Assim, taxas respiratórias, perfis de síntese de proteínas, consumo de ATP e atividade de diversas enzimas do metabolismo são bastante similares em embriões dormentes e não dormentes, o que sugere que a passagem da condição de dormente para germinante envolve alterações “discretas” no metabolismo embrionário durante a embebição (BEWLEY; BLACK, 1994).

No entanto, somente sementes viáveis não dormentes atingem a Fase III, quando é observada a protrusão da radícula, o que significa que todo o processo germinativo ocorreu de modo satisfatório. Deste modo, o fato de sementes de *A. diversifolia* e *A. purpurea* não alcançarem a Fase III, indica a existência de algum outro mecanismo de dormência, que não esteja relacionado a aquisição de água pelas sementes.

Observa-se, portanto, que embora ocorram relatos de dormência em sementes de anonáceas devido a dureza do tegumento (Pawshe et al., 1997; Smet et al., 1999), neste experimento pode-se verificar que as sementes de *A. diversifolia* e *A. purpurea* apresentaram aquisição de água e que portanto, não é o tegumento o responsável pela dormência das sementes.

Da mesma forma, Esquinca et al. (1997) observaram que sementes de *A. diversifolia* escarificadas com lixa e não escarificadas, não apresentaram diferenças na porcentagem de germinação, o que confirma que não são as características do tegumento as responsáveis por regular a germinação.

Outros autores, tais como Ferreira et al. (1997) com sementes de *A. squamosa*, Ferreira et al. (2006) com sementes de atemóia, Silva et al. (2007) com sementes de *A. crassiflora*, Costa (2009) com *A. emarginata* e Lobo et al. (2010) com sementes de *A. muricata* e *A. cherimola*, também verificaram que as sementes de anonáceas absorvem água e portanto, devem haver outros mecanismos de dormência envolvidos com a sementes da Família Annonaceae que devem ser avaliados.

6.2 Experimento 2: Germinação de sementes de *A. diversifolia* e *A. purpurea* submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA₃ e GA₄₊₇ + BA

Quanto aos resultados obtidos para porcentagem de germinação, verificou-se que as sementes de *A. diversifolia* e *A. purpurea* que foram colocadas para germinar sem embebição prévia, mantiveram-se dormentes durante os 30 dias de avaliação. Como não ocorreu germinação estes resultados não estão apresentados nas tabelas, pois não fizeram parte da análise estatística.

Na Tabela 1 observa-se que as sementes de *A. diversifolia* que embeberam em água durante os 4 dias não germinaram, enquanto sementes de *A. purpurea* apresentaram de 1% a 4% de germinação quando embebidas em água.

Tabela 1. Germinação (%) de sementes de *A. diversifolia* e *A. purpurea* submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA₃ e GA₄₊₇ + BA

mg L ⁻¹	GERMINAÇÃO (%)			
	<i>A. diversifolia</i>		<i>A. purpurea</i>	
	GA ₃	GA ₄₊₇ + BA	GA ₃	GA ₄₊₇ + BA
0	0 A* ¹	0 A	4,0 A	1,0 A
200	51 B	77 A	17,0 B	30,0 A
400	37 B	71 A	19,0 B	29,0 A
500	39 B	66 A	29,0 A	27,0 B
600	35 B	60 A	21,0 A	22,0 A
800	32 B	59 A	20,0 A	18,0 A
1000	19 B	50 A	20,0 B	25,0 A
Média	30,5 B	54,7 A	18,6 B	21,7 A
F	881,01		77,52	
Pr > F	<0,0001		<0,0001	
C.V.	3,84		9,75	

*1. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade e comparam reguladores em cada espécie.

Quando as sementes de *A. diversifolia* e *A. purpurea* receberam GA₃ ou GA₄₊₇ + BA ocorreu germinação, com tendência de aumento da porcentagem de germinação com o uso dos reguladores nas menores concentrações (Figura 5).

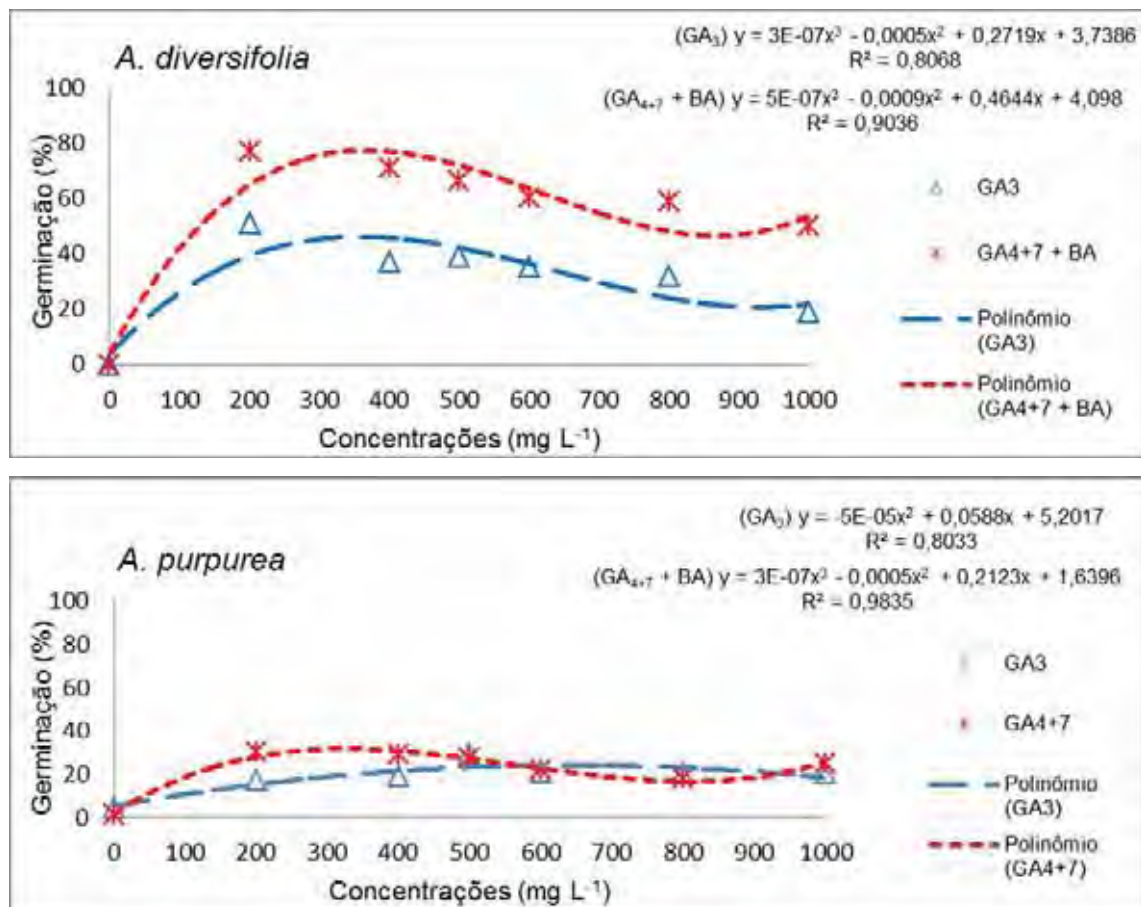


Figura 5. Germinação (%) de sementes de *A. diversifolia* e *A. purpurea* submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA_3 e $GA_{4+7} + BA$.

No entanto, ao se comparar os efeitos de GA_3 com os de $GA_{4+7} + BA$ (Tabela 1), obteve-se que sementes de *A. diversifolia* e *A. purpurea* tratadas com $GA_{4+7} + BA$ apresentaram maiores porcentagens de germinação do que as que receberam somente GA_3 , em todas as concentrações, exceto quando se empregou 500 mg L^{-1} em sementes de *A. purpurea* em que a porcentagem com $GA_{4+7} + BA$ foi menor e, quando se usou 600 mg L^{-1} e 800 mg L^{-1} e não se observou diferenças entre os reguladores.

Em relação aos efeitos da aplicação do GA_3 , verifica-se que sementes tratadas com GA_3 apresentaram porcentagens de germinação que variaram de 19% a 51% (*A. diversifolia*) e de 17% a 29% (*A. purpurea*). Tais porcentagens, embora baixas por serem menores que 50% (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; BRASIL, 2009), representam as alterações provocadas pelo

GA₃ no metabolismo que resultou na germinação, uma vez que sem o GA₃ as sementes mantiveram-se dormentes.

Quanto às sementes de *A. purpurea* as porcentagens de germinação obtidas com GA₃ (17% a 29%) são próximas à encontrada por Albornoz et al. (2006) após 9,5 meses de armazenamento das sementes em temperatura ambiente (17,5%). Os resultados observados com *A. diversifolia* diferem dos relatados por Campbel e Popenoe (1968) e Jubes et al. (1975), pois os autores sugerem que 350 a 500 mg L⁻¹ de GA₃ promoveriam aumento na porcentagem de germinação das sementes de 30 a 80%.

Em contrapartida, Esquinca et al. (1997) não obtiveram diferenças entre a testemunha e uso de GA₃ em sementes de *A. diversifolia* e embora tenham observado 42% de germinação com 10⁻³ M de GA₃ em sementes armazenadas por 18 dias, não consideraram o efeito satisfatório. Observaram ainda que, mesmo com o período de armazenamento de seis meses, a dormência não foi totalmente superada. Os autores obtiveram 64% de germinação com armazenamento de 51 dias.

Cabe salientar que os valores observados com o uso de GA₃ neste trabalho (19 - 51%) são menores que os 64% de germinação obtidos por Esquinca et al. (1997) após armazenamento das sementes, porém próximos aos 42% com o uso de GA₃. Gutu (2010), também estudando períodos de armazenamento de semente de *A. diversifolia*, verificou que sementes sem armazenamento não germinavam e necessitavam de um período de repouso de aproximadamente sete meses para obter entre 53,3 a 58,8% de germinação.

Além das condições ambientais dos locais de desenvolvimento da planta de origem, que poderiam provocar variações tanto no acúmulo do ABA na semente, como alterar a sensibilidade ao ABA e às giberelinas (KIGEL; GALILI, 1995), parece haver algum outro fator que não permite a superação total da dormência, mesmo quando é empregado um promotor como o GA₃ ou, quando as sementes permanecem em período de pós-maturação considerado adequado a germinação, conforme observado por Esquinca et al. (1997) e Gutu (2010), o que pode indicar baixo vigor das sementes da espécie (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

No entanto, o efeito de GA₃ para estimular a germinação é relatado em várias anonáceas. Com sementes de *A. cherimola* pode-se citar desde os trabalhos de Campbell e Popenoe (1968) aos de Valenzuela e Osório (1998) e Smet et al. (1999). Pinto (1976) em trabalho pioneiro com *Annona muricata* obteve aumento na porcentagem de germinação de 75,1% (testemunha) para 82,0% de germinação com 300 mg L⁻¹ de GA₃. Há diversos outros trabalhos, com sementes de *A. squamosa* (FERREIRA et al., 1999; FERREIRA et al., 2000a; FERREIRA, et al., 2000b.), de atemóia (FERREIRA et al., 2003; BRAGA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010) e *Annona purpurea* (VIDAL-LEZAMA, 2008), nos quais o GA₃ promoveu efeito satisfatório.

Ao se avaliar o efeito de GA₄₊₇ + BA em sementes de *A. diversifolia* verifica-se que as porcentagens de germinação variaram de 50% a 77% com o emprego de concentrações de 1000 mg L⁻¹ a 200 mg L⁻¹ (respectivamente) (Tabela 1 e Figura 5), enquanto em sementes de *A. purpurea* as porcentagens foram de 18% a 30% (800 mg L⁻¹ a 200 mg L⁻¹). As maiores porcentagens foram obtidas com o emprego de concentrações menores conforme verificado na curva de tendência (Figura 5) de ambas as espécies.

Silva et al. (2007), Braga et al. (2010) e Costa et al. (2011) também obtiveram efeito significativo do uso de misturas de reguladores na promoção da germinação de sementes de anonáceas. Braga et al. (2010) obtiveram incremento na porcentagem de germinação de sementes de atemóia, enquanto Costa et al. (2011), observaram o mesmo efeito em sementes de *A. emarginata*. Silva et al. (2007) verificaram efeito de GA₄₊₇ na superação da dormência de sementes de *A. crassiflora* e na germinação, uma vez que GA₄₊₇ induziu a síntese de endo-beta-mananase e o crescimento do embrião.

Ao mesmo tempo em que se avalia a porcentagem de germinação, deve-se observar outras duas variáveis que são a porcentagem de sementes dormentes (Figura 6 e Tabela 2) e de sementes mortas (Figura 7 e Tabela 3), pois sementes não germinadas poderiam estar mortas e, portanto não dormentes, o que resultaria em interpretação equivocada da porcentagem de dormência.

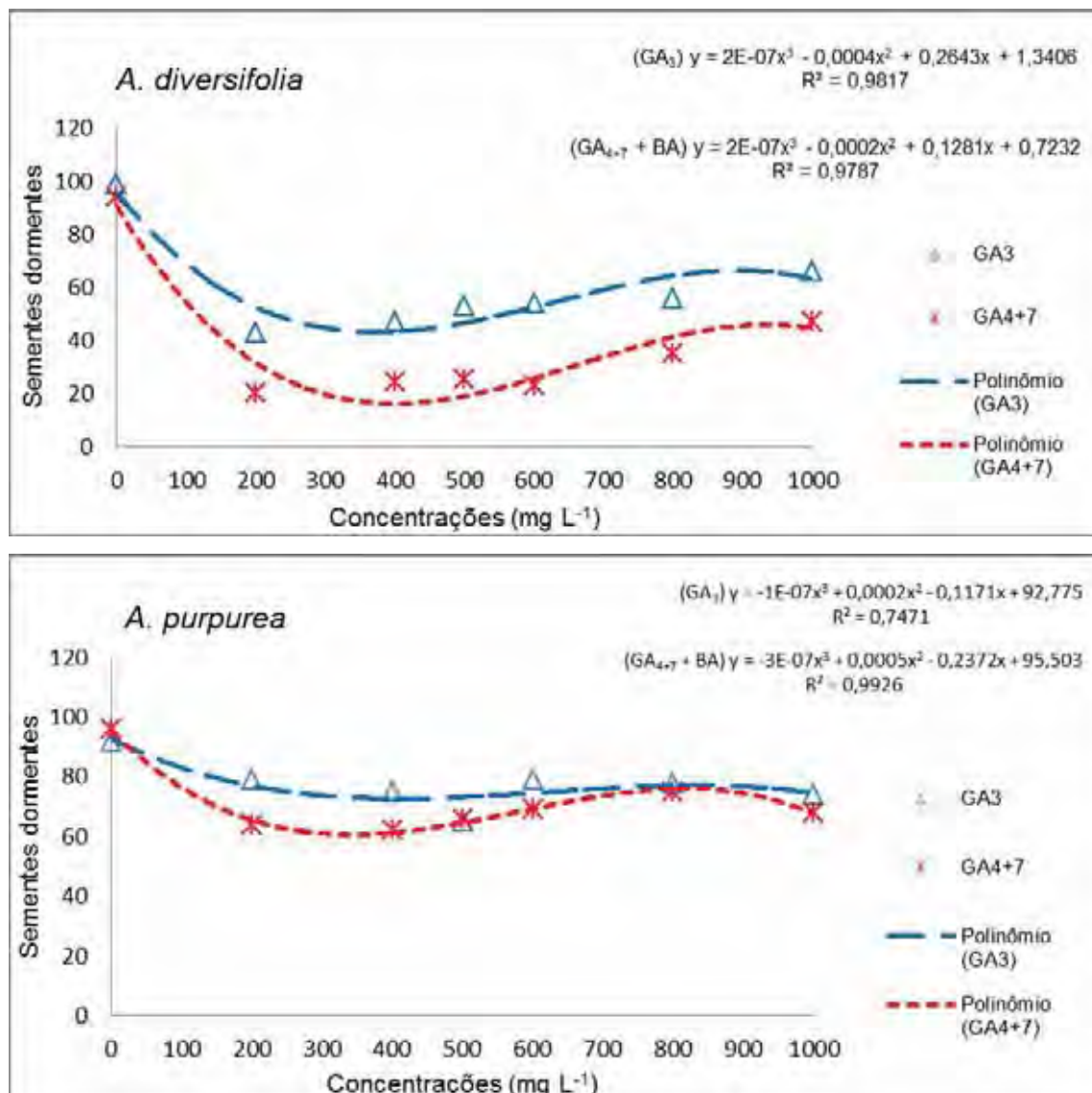


Figura 6. Porcentagem de sementes dormentes de *A. diversifolia* e *A. purpurea* submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA_3 e $GA_{4+7} + BA$.

Observa-se na Figura 6 que há tendência de redução da porcentagem de sementes dormentes de *A. diversifolia*, tratadas tanto com GA_3 , como com $GA_{4+7} + BA$ em concentrações menores (entre 200 mg L⁻¹ e 600 mg L⁻¹) o que confirma os resultados obtidos com a porcentagem de germinação. Observa-se também que $GA_{4+7} + BA$ proporcionou as menores porcentagens de sementes dormentes em comparação com GA_3 , em cada uma das concentrações (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de sementes dormentes de *A. diversifolia* e *A. purpurea* submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA₃ e GA₄₊₇ + BA

mg L ⁻¹	SEMENTES DORMENTES (%)			
	<i>A. diversifolia</i>		<i>A. purpurea</i>	
	GA ₃	GA ₄₊₇ + BA	GA ₃	GA ₄₊₇ + BA
0	99 A* ¹	94 B	92,0 A	96,0 A
200	43 A	20 B	79,0 A	64,0 B
400	47 A	24 B	75,0 A	62,0 B
500	53 A	25 B	65,0 A	66,0 A
600	54 A	23 B	79,0 A	69,0 B
800	56 A	35 B	78,0 A	75,0 A
1000	66 A	47 B	74,0 A	68,0 A
Média	59,71 A	38,29 B	77,43 A	71,43 B
F		44,41		41,31
Pr > F		<0,0001		<0,0001
C.V.		15,06		4,22

*1. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade e comparam reguladores em cada espécie.

Ao se analisar as sementes mortas de *A. diversifolia* verifica-se que GA₄₊₇ + BA reduziu a porcentagem de sementes mortas em relação a GA₃ nas concentrações de 400 mg L⁻¹ e 1000 mg L⁻¹ (Figura 7 e Tabela 3). Observa-se ainda, que apesar de concentrações elevadas não terem sido efetivas para a superação da dormência (tanto com GA₃ como com GA₄₊₇ + BA), há tendência de redução da porcentagem de sementes mortas em concentrações elevadas de GA₄₊₇ + BA, porém aumento com o uso de GA₃ (Figura 7).

Deste modo, o emprego dos reguladores não afetou negativamente as sementes de *A. diversifolia* e, portanto o fato de não terem germinado relaciona-se a elevada dormência e não a taxas de mortalidade das sementes.

Em relação às sementes de *A. purpurea*, as menores porcentagens de sementes dormentes foram observadas em concentrações menores, conforme indica a curva de tendência (Figura 6), com ambos os reguladores. No entanto, as menores porcentagens de sementes dormentes foram obtidas com o uso de 200 mg L⁻¹, 400 mg L⁻¹ e 600 mg L⁻¹ de GA₄₊₇ + BA (Tabela 2). Dentre tais concentrações somente 200 mg L⁻¹ e 400 mg L⁻¹ de GA₄₊₇ + BA haviam diferido do uso de GA₃ no aumento da porcentagem de germinação

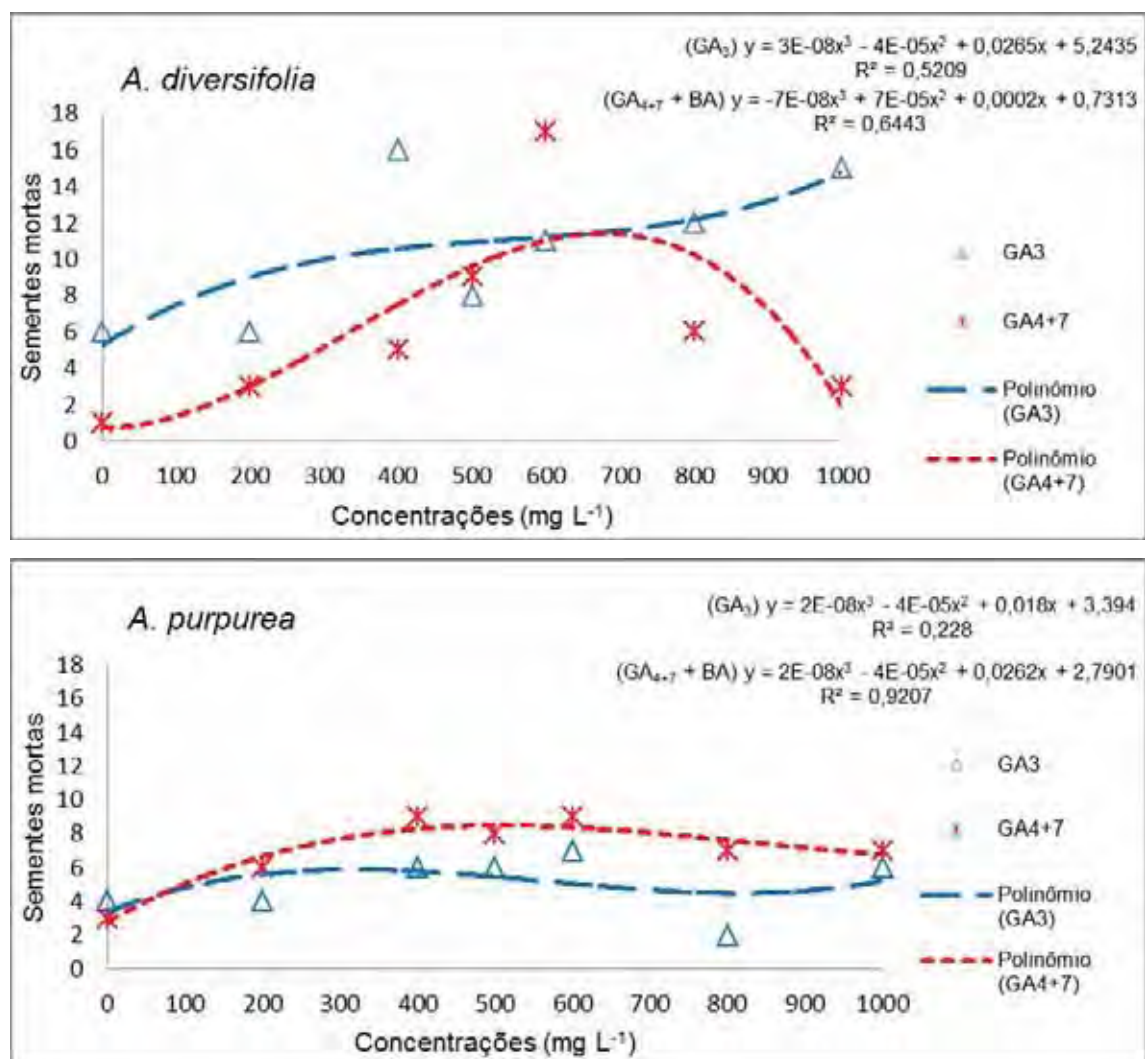


Figura 7. Porcentagem de sementes mortas de *A. diversifolia* e *A. purpurea* submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA_3 e $GA_{4+7} + BA$.

Quanto às sementes mortas de *A. purpurea* verifica-se tendência de maiores porcentagens em concentrações intermediárias, tanto com GA_3 como com $GA_{4+7} + BA$ (Figura 7). Além disso, não foram observadas diferenças entre as porcentagens de sementes mortas tratadas com os reguladores em nenhuma das concentrações, indicando que a porcentagem de mortalidade reflete características da espécie (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de sementes mortas de *A. diversifolia* e *A. purpurea* submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA₃ e GA₄₊₇ + BA

mg L ⁻¹	SEMENTES MORTAS			
	<i>A. diversifolia</i>		<i>A. purpurea</i>	
	GA ₃	GA ₄₊₇ + BA	GA ₃	GA ₄₊₇ + BA
0	6 A* ¹	1 B	4,0 A	3,0 A
200	6 A	3 A	4,0 A	6,0 A
400	16 A	5 B	6,0 A	9,0 A
500	8 A	9 A	6,0 A	8,0 A
600	11 A	17 A	7,0 A	9,0 A
800	12 A	6 A	2,0 A	7,0 A
1000	15 A	3 B	6,0 Aa	7a
Média	9,86 A	7,0 B	7,0 A	5,0 B
F	4,47		1,99	
Pr > F	0,0001		0,0460	
C.V.	57,19		49,87	

*1. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade e comparam reguladores em cada espécie.

Resultados satisfatórios na superação da dormência de sementes de anonas com o uso de misturas contendo giberelinas e citocinina também foram observados por Braga et al. (2010) e Costa et al. (2011). Os autores verificaram que além da superação da dormência, os reguladores não alteraram a porcentagem de mortalidade das sementes, que também foi reduzida, conforme se observa neste experimento.

No entanto, Costa et al. (2011) necessitaram de concentrações mais elevadas para superar a dormência de sementes de *A. emarginata*, sendo necessárias concentrações entre 600 mg L⁻¹ e 800 mg L⁻¹ de GA₄₊₇ + fenilmetilaminopurina, e no entanto as maiores porcentagens de germinação não ultrapassaram 37%.

Além dos reguladores atuarem no processo germinativo alterando as porcentagens de germinação, também afetaram a velocidade (Figura 8 e Tabela 4) na qual o processo ocorreu, assim como o tempo médio (Figura 9 e Tabela 5) e a frequência (Figuras 10 e 11).

A velocidade de germinação das sementes de *A. diversifolia* segue o mesmo modelo estatístico da porcentagem de germinação sendo as maiores velocidades observadas com as menores concentrações. Da mesma

forma, GA₄₊₇ + BA proporcionou as maiores velocidades, em todas as concentrações, em relação ao uso de GA₃ (Tabela 4).

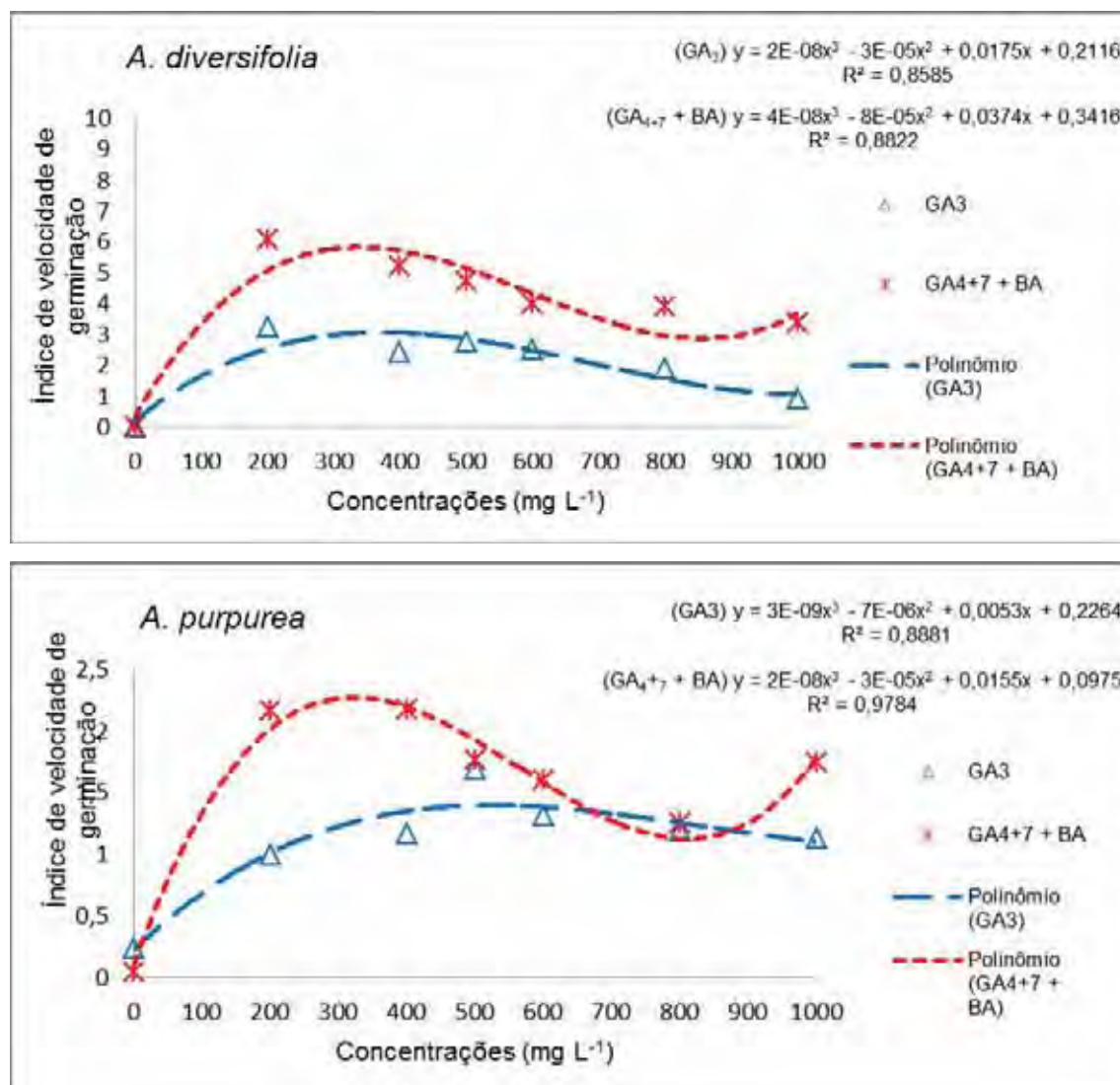


Figura 8. Índice de Velocidade de Germinação de sementes de *A. diversifolia* e *A. purpurea* submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA₃ e GA₄₊₇ + BA.

Tabela 4. Índice de Velocidade de Germinação de sementes de *A. diversifolia* e *A. purpurea* submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA₃ e GA₄₊₇ + BA

ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO				
mg L ⁻¹	<i>A. diversifolia</i>		<i>A. purpurea</i>	
	GA ₃	GA ₄₊₇ + BA	GA ₃	GA ₄₊₇ + BA
0	0 A* ¹	0 A	0,24 A	0,05 A
200	3,25 B	6,09 A	1,00 B	2,16 A
400	2,42 B	5,21 A	1,17 B	2,17 A
500	2,76 B	4,71 A	1,69 A	1,76 A
600	2,52 B	3,99 A	1,31 B	1,60 A
800	1,91 B	3,89 A	1,19 B	1,25 A
1000	0,90 B	3,37 A	1,13 B	1,74 A
Média	1,96 A	3,90 B	1,10 B	1,53 A
F	848,04		220,43	
Pr > F	<0,0001		<0,0001	
C.V.	4,29		6,35	

*1. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade e comparam reguladores em cada espécie.

O tempo médio necessário para ocorrer a germinação foi reduzido com o uso de concentrações menores de ambos os reguladores (Figura 9) em sementes de *A. diversifolia*. Deste modo, quanto maior a velocidade de germinação, menor o tempo médio necessário para o processo.

No entanto as diferenças entre GA₄₊₇ + BA e GA₃ na redução do tempo médio necessário para a germinação, foram observadas somente com 200, 400 e 1000 mg L⁻¹ de GA₄₊₇ + BA diferindo de GA₃, enquanto a velocidade do processo foi maior em cada uma das concentrações de GA₄₊₇ + BA em relação a GA₃ .(Tabela 5).

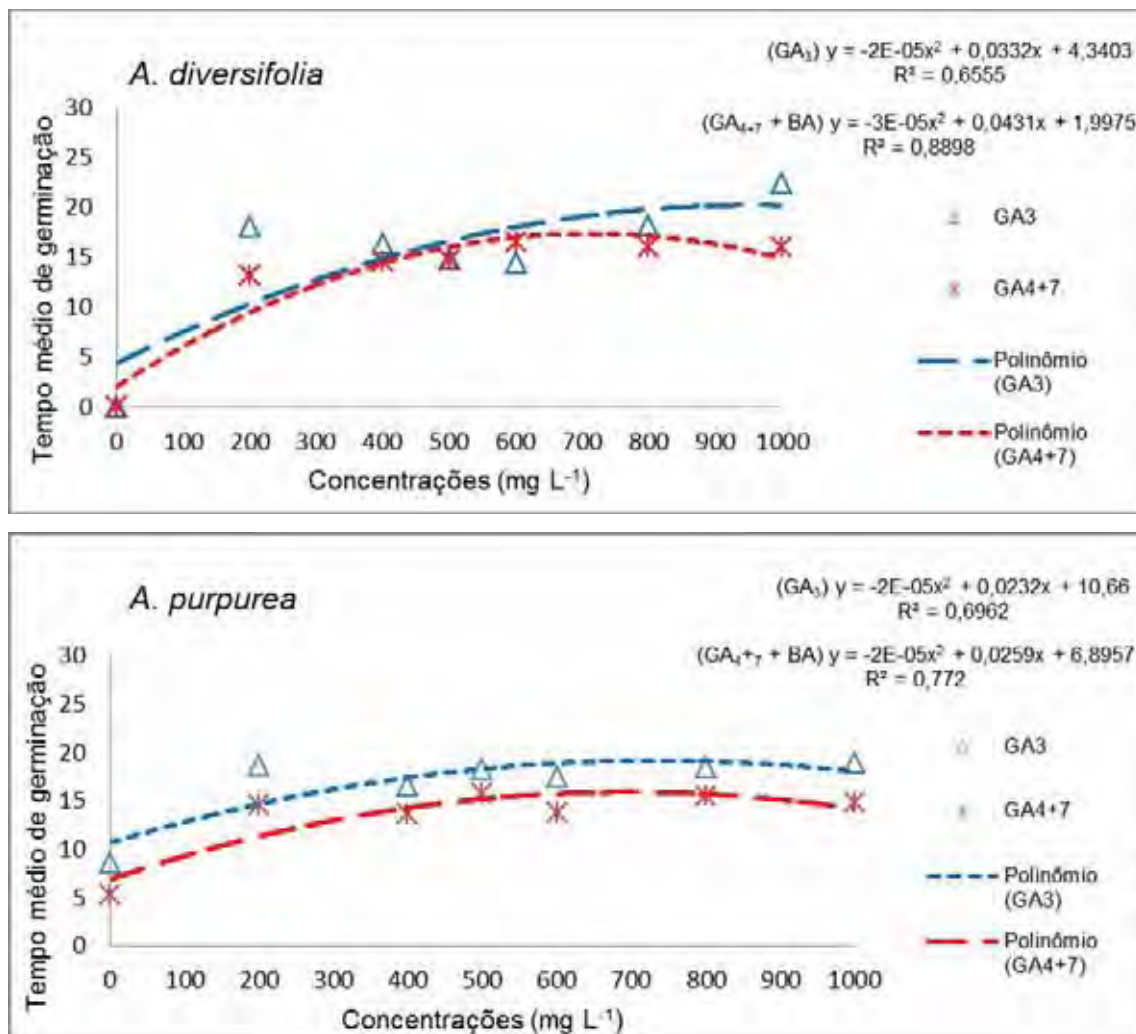


Figura 9. Tempo médio de germinação de sementes de *A. diversifolia* e *A. purpurea* submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA_3 e $GA_{4+7} + BA$.

Verifica-se ainda, no gráfico de frequência relativa da germinação de *A. diversifolia* (Figura 10) que com o uso de 200 mg L⁻¹ a 600 mg L⁻¹ de GA_3 a germinação foi antecipada em relação às concentrações maiores, ocorrendo de modo mais sincronizado.

Tabela 5. Tempo médio de germinação de *A. diversifolia* e *A. purpurea* submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA₃ e GA₄₊₇ + BA

mg L ⁻¹	TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO			
	<i>A. diversifolia</i>		<i>A. purpurea</i>	
	GA ₃	GA ₄₊₇ + BA	GA ₃	GA ₄₊₇ + BA
0	0 A* ¹	0 A	8,62 A	5,25 A
200	17,99 A	13,16 B	18,72 A	14,54 B
400	16,29 A	14,55 B	16,56 A	13,61 B
500	14,85 A	14,72 A	18,26 A	15,76 A
600	14,42 A	16,42 A	17,51 A	13,74 B
800	18,13 A	15,99 A	18,44 A	15,51 A
1000	22,45 Aa	15,94 B	18,94 Aa	14,82 B
Média	14,86 A	12,93 B	16,72 A	13,31 B
F	117,06		3,5	
Pr > F	<0,0001		0,001	
C.V.	8,38		28,01	

*1. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade e comparam reguladores em cada espécie.

Quando foi utilizado GA₄₊₇ + BA verifica-se que além do aumento da porcentagem de germinação, houve maior concentração de sementes germinadas no início do período, até a concentração de 500 mg L⁻¹. Concentrações maiores de GA₄₊₇ + BA além de reduzirem as porcentagens de germinação, fizeram com que as sementes germinassem de maneira dispersa ao longo do tempo.

As sementes de *A. purpurea* também germinaram mais rápido quando tratadas com de GA₄₊₇ + BA, diferindo daquelas que receberam as concentrações de GA₃. (Tabela 4). As maiores velocidades foram alcançadas com o emprego de concentrações menores de GA₄₊₇ + BA enquanto a tendência para respostas do uso de GA₃ foi a obtenção de maiores velocidades com concentrações intermediárias (Figura 8).

Enquanto o uso de GA₄₊₇ + BA promoveu as maiores velocidades de germinação, os menores tempos médios foram obtidos com as concentrações de 200, 400 e 600, quando comparados com as concentrações de GA₃. (Tabela 5). Verifica-se ainda tendência de que para esta variável, na medida

em que aumentou a concentração empregada, aumentou o tempo médio, com posterior redução nas concentrações maiores (Figura 9).

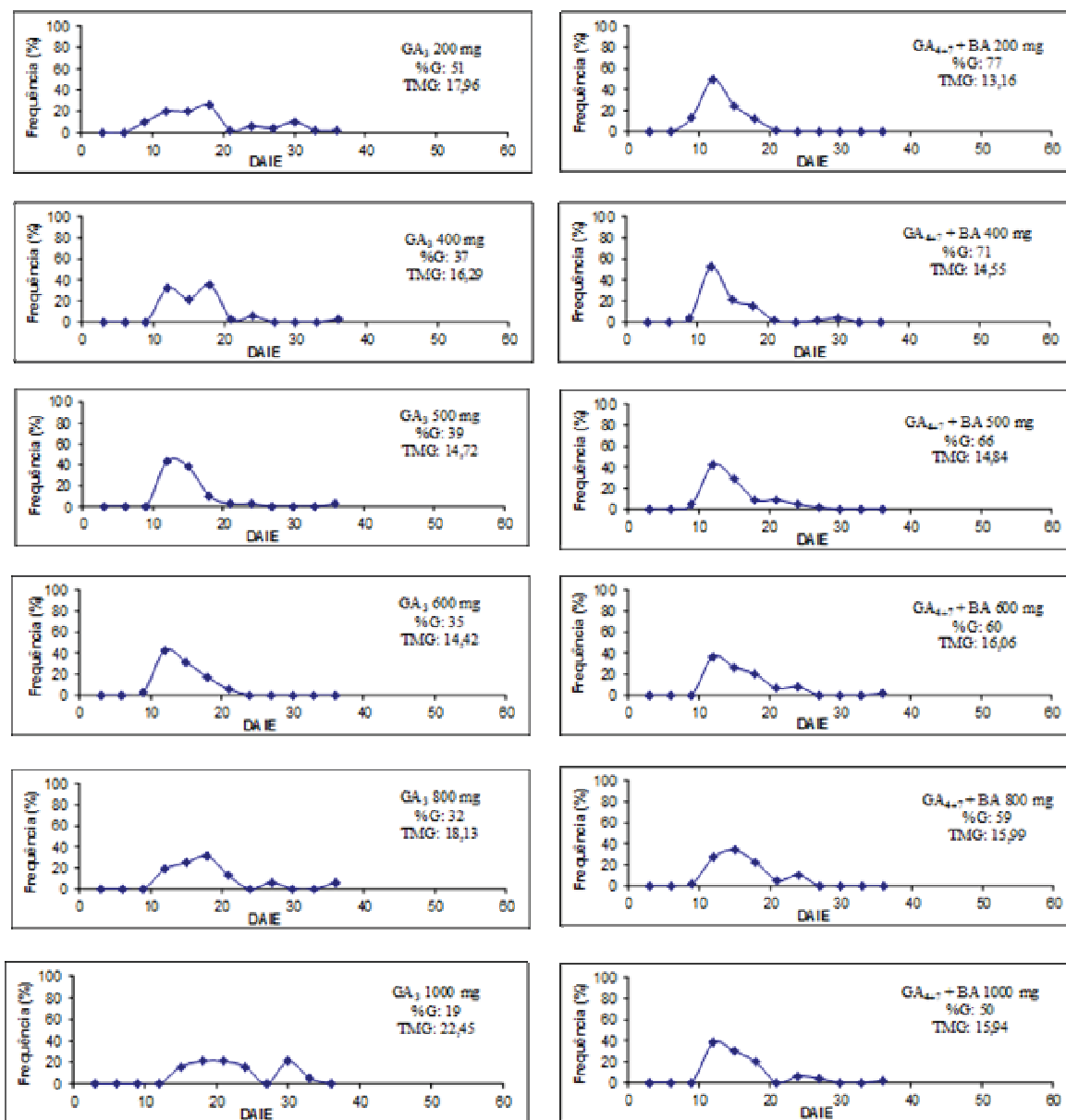


Figura 10. Frequência relativa (%) da germinação de sementes de *A. diversifolia* submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA₃ e GA₄₊₇ + BA (DAIE = dias após o início da embebição).

Em comparação com *A. diversifolia*, verifica-se nos gráficos de frequência que as sementes de *A. purpurea* (Figura 11) começaram a germinar mais tarde e de maneira desuniforme ao longo do tempo. Sementes tratadas com 200 mg L⁻¹ e 400 mg L⁻¹ GA₄₊₇ + BA foram as que apresentaram maiores porcentagens de germinação, porém foi com 400 mg L⁻¹ que houve maior

acúmulo de germinação no início do período e que inclusive reduziu o tempo médio de germinação.

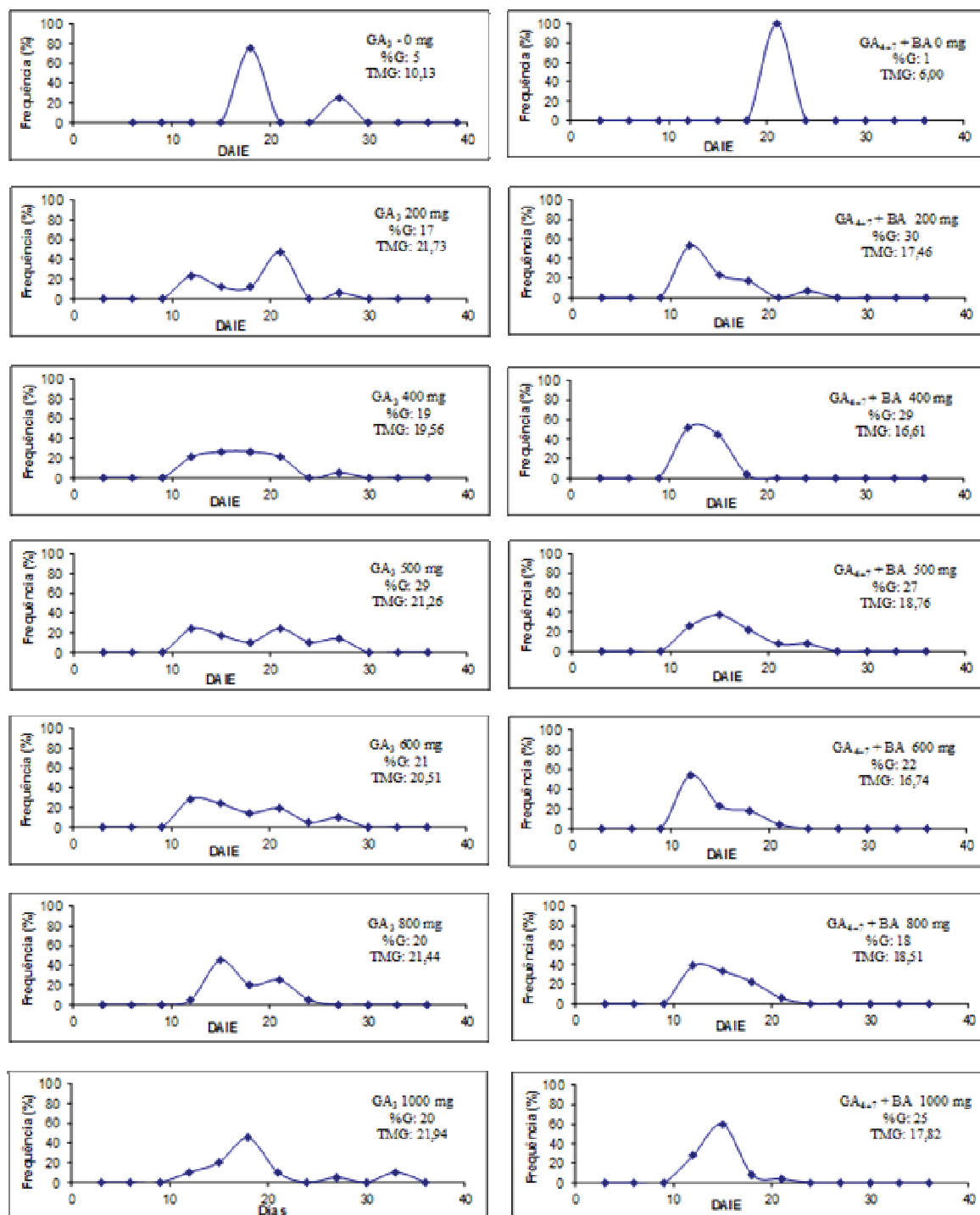


Figura 11. Frequência relativa (%) da germinação de sementes de *A. purpurea* submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA₃ e GA₄₊₇ + BA (DAIE = dias após o início da embebição).

Os reguladores utilizados não afetaram a porcentagem de plântulas normais de *A. purpurea*. No entanto, em *A. diversifolia* o estímulo dado à germinação refletiu na porcentagem de plântulas normais, observando-se maiores porcentagens com GA₄₊₇ + BA em comparação com GA₃. nas diferentes concentrações (Figura 12 e Tabela 6)

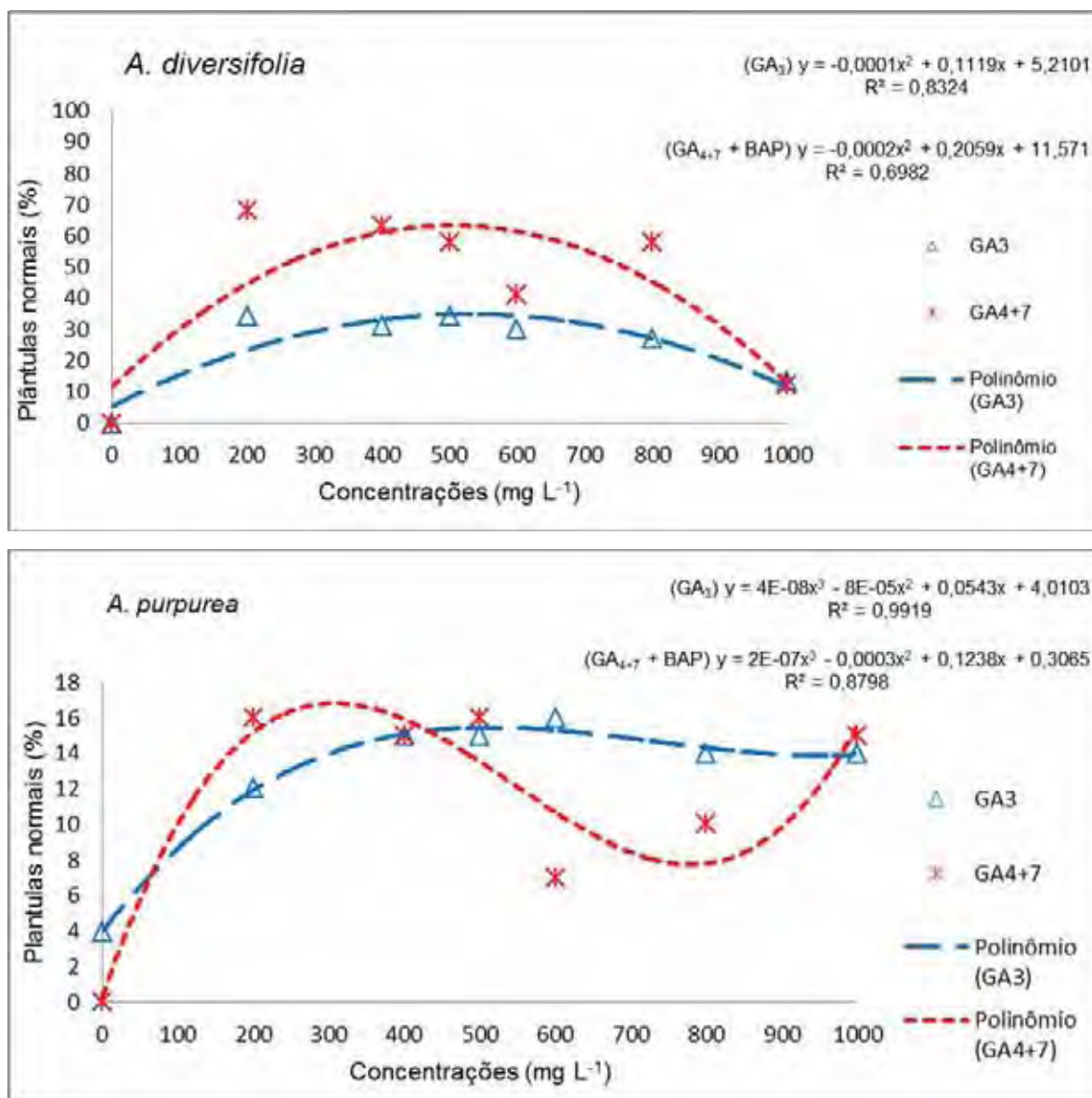


Figura 12. Porcentagem de plântulas normais de *A. diversifolia* e *A. purpurea* submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA₃ e GA₄₊₇ + BA.

Tabela 6. Porcentagem de plântulas normais de *A. diversifolia* e *A. purpurea* submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de GA₃ e GA₄₊₇ + BA

mg L ⁻¹	PLANTAS NORMAIS			
	<i>A. diversifolia</i>		<i>A. purpurea</i>	
	GA ₃	GA ₄₊₇ + BA	GA ₃	GA ₄₊₇ + BA
0	0 A* ¹	0 A	4,0 A	0,0 A
200	34,0 B	68,0 A	12,0 A	16,0 A
400	31,0 B	63,0 A	15,0 A	15,0 A
500	34,0 B	58,0 A	15,0 A	16,0 A
600	30,0 B	41,0 A	16,0 A	7,0 B
800	27,0 B	58,0 A	14,0 A	10,0 A
1000	13,0 A	12,0 A	14,0 A	15,0 A
Média	24,1 B	42,9 A	12,9 A	11,2 A
F	1236,34		2,54	
Pr > F	<0,0001		0,0114	
C.V.	3,79		52,33	

*1. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade e comparam reguladores em cada espécie.

Ao se analisar de maneira conjunta os resultados obtidos para as diferentes variáveis do processo germinativo, confirma-se a dormência das sementes de *A. diversifolia* e *A. purpurea*. No entanto, a dormência não está relacionada com a impermeabilidade de tegumento (exógena) conforme relatado por Pawshe et al. (1997) e Smet et al. (1999) e confirmado no primeiro experimento deste trabalho. Deste modo, sementes de *A. diversifolia* e de *A. purpurea* apresentam aquisição de água de maneira lenta, mas não é esta característica do tegumento que impede a germinação, o que também foi reportado por Perez (1992) e Esquinca et al. (1997) em relação as sementes de *A. diversifolia* e Albornoz et al. (2006) em relação a sementes de *A. purpurea*.

Desta forma, quando se refere a superação de dormência em Família Annonaceae, se trata de dormência endógena, no entanto o tipo de dormência endógena ainda é motivo de discussão.

Uma das hipóteses citadas na literatura é a de que a dormência a morfofisiológica, devido a presença de embrião rudimentar, não diferenciado e de desenvolvimento lento (SANEWSKI, 1991; SMET et al., 1999 referindo-se a citação de HAYAT, 1963). Rizzini (1973) e Baskin e Baskin (1998) confirmam que a dormência em anonas é morfofisiológica, assim como Lobo et al

(2007) no estudo de *A. cherimola* e *A. muricata*. Em contrapartida, Silva et al. (2007) se referem como dormência fisiológica, quando utilizaram como modelo a espécie *A. crassiflora*.

Deste modo, para que a dormência seja considerada morfofisiológica se deve ter a associação entre características morfológicas e fisiológicas (FERREIRA; BORGHETTI, 2004; SILVA et al, 2007). As características morfológicas estudadas por Esquinca et al. (1997) e Gutu (2010) com sementes de *A. diversifolia*, resultam nas informações de que não existe imaturidade do embrião no momento da dispersão e que há diferenciação dos tecidos embrionários.

Além disso, Esquinca et al. (1997) relatam que foi notória a presença de sistema vascular que recorre de maneira contínua tanto os cotilédones como o eixo embrionário e que não ocorreram modificações anatômicas durante sete meses de armazenamento das sementes. De maneira complementar Gutu (2010) verificou que os embriões possuíam cotilédones, eixo embrionário e radícula diferenciados no momento da dispersão, embora com tamanho reduzido (3,28 mm de comprimento por 1,13 mm de largura, em média). Estas informações diferem das observadas por Rizini (1973), no entanto com outra anonácea, a *A. crassiflora*, cujas sementes possuíam tecido indiferenciado e muito pequeno (2 mm) no momento da dispersão, o que denominou de embrião imaturo.

Cabe ainda observar que na natureza as sementes de *A. diversifolia* são dispersas no início do inverno, momento desfavorável à germinação. Ao longo dos meses de dormência e com a chegada à primavera, as sementes são submetidas a sinais ambientais que estimulam a síntese de giberelinas e redução de ABA (KUCERA et al., 2005), de modo a favorecer a germinação na época adequada à sobrevivência da plântula. Tais informações sugerem a presença de dormência fisiológica.

As sementes de *A. diversifolia* necessitam, portanto, de seis a oito meses de armazenamento para superar a dormência, mesmo considerando-se que no momento da dispersão os embriões encontram-se completos (ESQUINCA et al., 1997; GUTU, 2010). Deste modo, os embriões necessitam retomar o desenvolvimento que foi interrompido por ocasião da

dispersão (FERREIRA; BORGHETTI, 2004) e não de estímulo para que ocorra diferenciação de suas estruturas.

Além disso, após condições ambientais adequadas ou com estímulo dado por reguladores aplicados às sementes, os embriões retomam seu crescimento e as sementes germinam. Isto não seria possível em sementes sem armazenamento se os embriões estivessem imaturos.

Conforme observado neste experimento, com a aplicação de 200 mg L⁻¹ a 400 mg L⁻¹ de GA₄₊₇ + BA não há necessidade de esperar de 6 a 8 meses para que ocorra a superação da dormência, pois os reguladores promoveram incremento em todo o processo germinativo; desde o aumento na porcentagem e velocidade de germinação, até a maior sincronização da germinação, o que favorece o manejo das plantas em viveiros de produção de mudas.

Em relação a *A. purpurea* não foram encontrados relatos do estágio de desenvolvimento do embrião no momento da dispersão das sementes. No entanto, a literatura reporta elevada dormência na espécie, com germinação de 17,5% (ALBORNOZ et al., 2006) e mesmo com os reguladores observou-se neste trabalho que a maior porcentagem de germinação foi de 30% com GA₄₊₇ + BA. O incremento na germinação foi de 71,5%, no entanto, a porcentagem de germinação continua sendo baixa.

Desta forma, para *A. purpurea* são necessários estudos com o objetivo de compreender como as características genéticas e de adaptação ambiental afetam o mecanismo de dormência. Neste caso, devem-se avaliar tanto aspectos anatômicos do embrião antes e após a dispersão, além de balanço hormonal e padrões metabólicos durante a superação da dormência.

Em resumo, somente a embebição em água não foi suficiente para ativar a síntese de *novo* de GA e antagonizar os efeitos do ABA. Desta forma, aplicações exógenas dos reguladores foram necessárias para a superação da dormência e o estabelecimento do processo germinativo.

Neste contexto, as giberelinas podem ser consideradas responsáveis tanto pela superação da dormência como pela promoção da germinação. As giberelinas antagonizam o efeito do ABA durante a dormência, bem como estimulam a síntese de enzimas, como a alfa e beta-amilase, que irão

degradar reservas liberando energia para o desenvolvimento do embrião, além do que também atuam na síntese de mananases responsáveis pela degradação de paredes de células do endosperma que atuarão na redução da resistência dos tecidos para facilitar a protrusão da radícula (DAVIS, 1995; YAMAGUCHI et al., 2001; KUCERA et al., 2005; TAIZ; ZEIGER, 2009; NONOGAKY et al., 2010).

Dentre os reguladores, a mistura GA_{4+7} + BA foi mais adequada para a superação da dormência de *A. diversifolia* e *A. purpurea* do que a aplicação de a GA_3 . Ao utilizar o bioestimulante (GA_{4+7} + BA) há o efeito sinérgico das duas giberelinas e da citocinina empregadas, permitindo inclusive seu uso em menores concentrações. Assim, tanto GA_4 como GA_7 , que são ativas, atuaram na superação da dormência por antagonizar o ABA e na promoção da germinação (YAMAGUCHI et al., 2001; BENTSINK; KOORNNEEF, 2008).

Além disso, houve o efeito associado da citocinina, que também atua como antagonista ao ABA (WALKER et al, 1989; BEWLEY; BLACK, 1994) e na divisão celular, mesmo antes da protrusão da radícula, conforme observado por Silva et al. (2007) em sementes de *A. crassiflora*, indica que durante a protrusão não ocorre apenas alongamento celular. Efeitos de citocinina na germinação estão de acordo com Horcat e Letham (1990) e Crozier et al. (2001).

Cabe acrescentar, no entanto, que mesmo com o aumento da germinação promovido por GA_{4+7} + BA, concentrações elevadas reduziram a porcentagem de germinação, o que pode estar relacionado com o autocontrole da biossíntese da giberelinas (TAIZ; ZEIGER, 2009; NONOGAKI et al., 2010). Assim, com a adição de concentrações elevadas de giberelinas, ao contrário de inibir a ação do ABA na redução da dormência e estimular a síntese de enzimas hidrolíticas e/ou a síntese de *novo* de GA, pode ter atuado controlando a concentração endógena, o que resultou em redução do efeito.

Os resultados demonstram a importância dos reguladores na superação da dormência de sementes de *A. diversifolia* e *A. purpurea*. Neste contexto cabe avaliar como as aplicações exógenas dos promotores provocaram alterações no balanço hormonal e ainda atuaram na degradação de reservas para superar a dormência.

6.3 Experimento 3: Balanço hormonal e degradação de reservas em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal submetidas a tratamentos para superação da dormência

Nas sementes dormentes de *A. diversifolia* e *A. purpurea* sem embebição prévia (Seca) ou embebidas em água (Água), não foram verificadas alterações nas concentrações de ABA (Ácido abscísico) ao longo do tempo (Figura 13), mas tendência a pequenas alterações no conteúdo de GA (Giberelinas), conforme Figura 14.

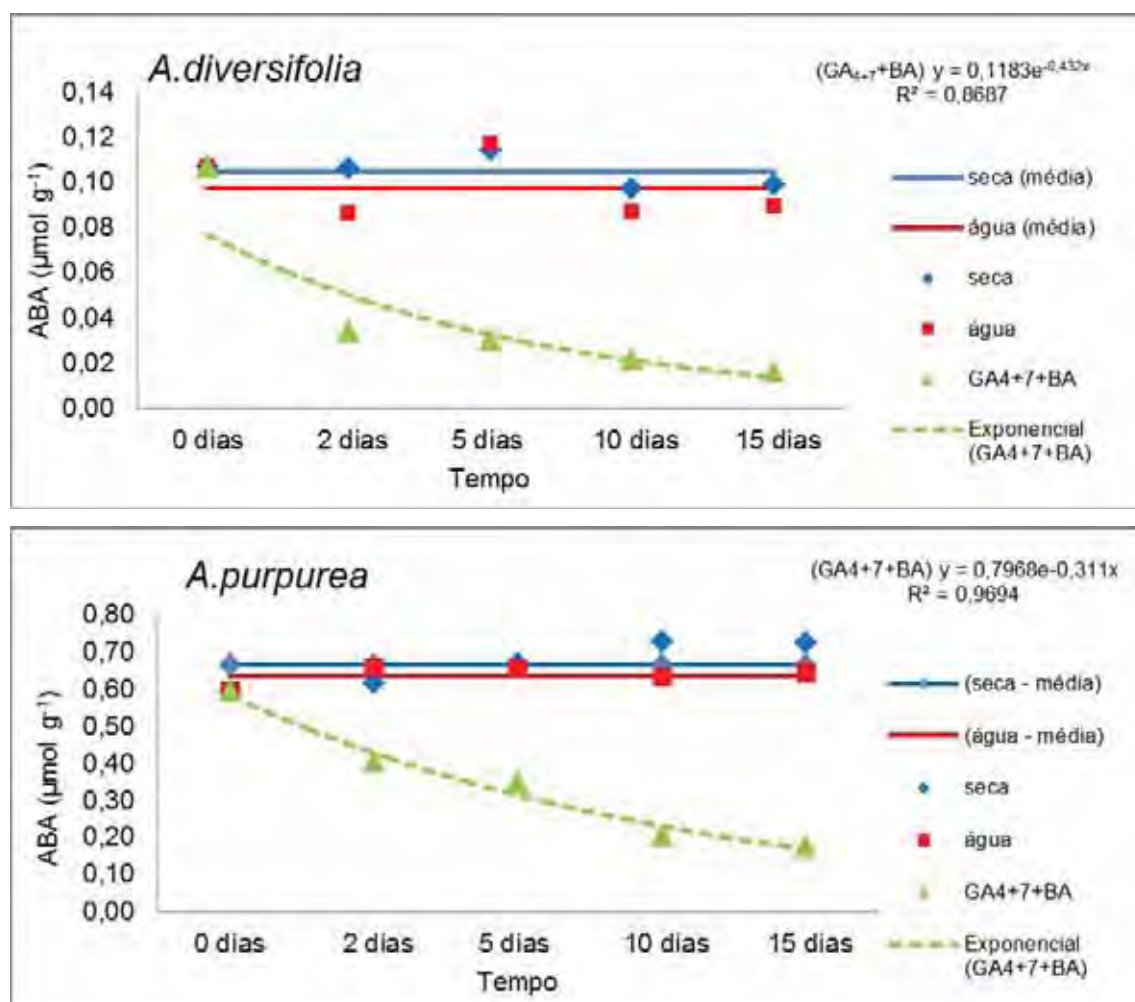


Figura 13. Concentrações de ácido abscísico (ABA) em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.

Em contrapartida sementes que receberam GA₄₊₇ + BA apresentaram grandes variações no conteúdo de ABA e GA durante o período de avaliação do processo (Figuras 13 e 14).

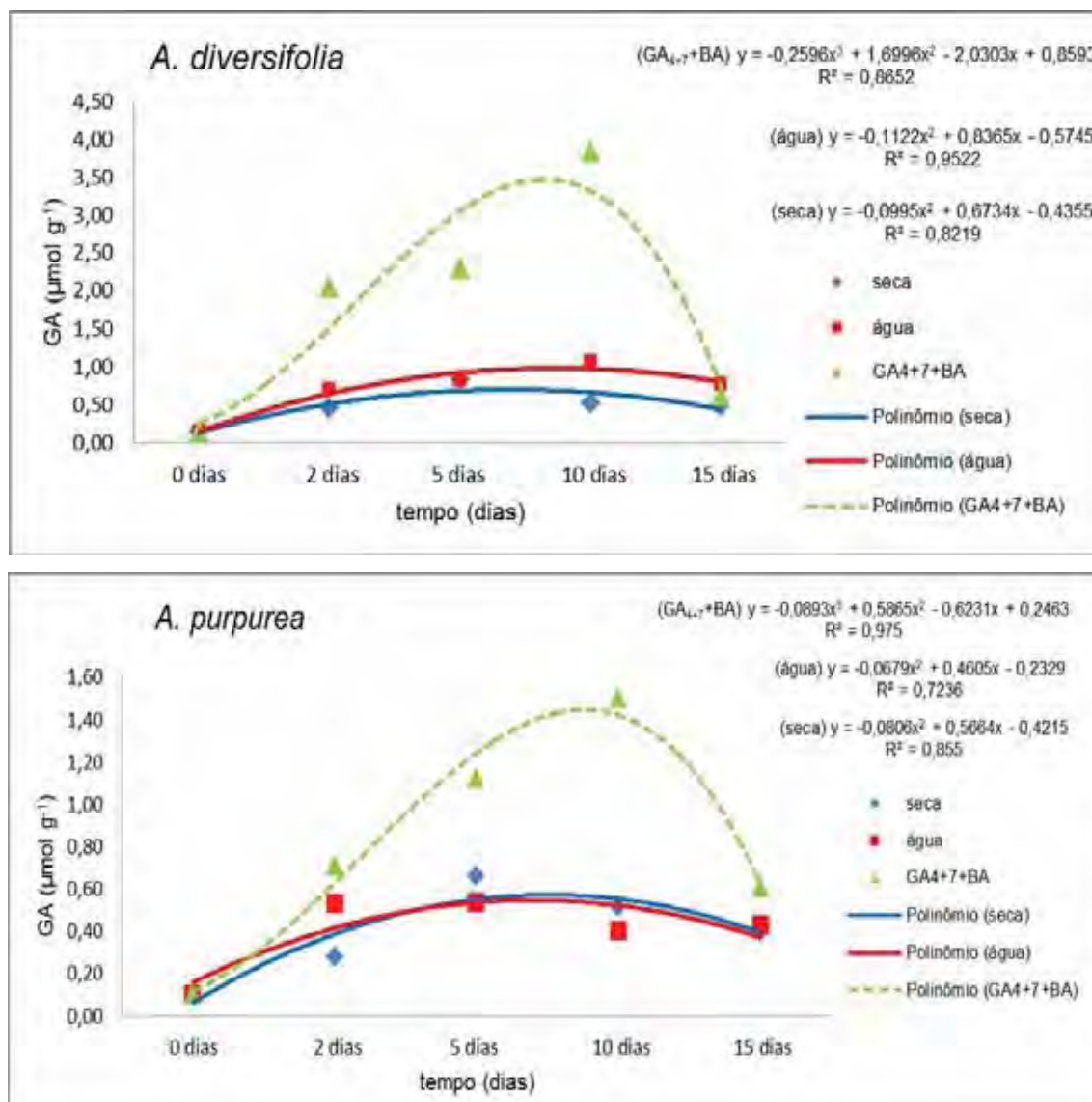


Figura 14. Concentrações de giberelinas (GA) em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.

Com a aplicação de GA₄₊₇ + BA obteve-se tendência de aumento da quantidade do GA endógeno nas sementes de ambas as espécies,

desde o início da embebição até 10 dias, o que coincidiu com o início da emissão de radícula (1 mm). A partir desta avaliação a quantidade foi diminuída. Cabe observar que as sementes de *A. diversifolia* possuíam maiores quantidades de GA, do que as de *A. purpurea*, principalmente após o tratamento com GA₄₊₇ + BA.

Ao contrário do observado com o conteúdo de GA, que aumentou ao longo do tempo com a aplicação de GA₄₊₇ + BA, a quantidade de ABA foi reduzida. A partir de 2 dias de embebição nos reguladores, houve tendência de redução constante na quantidade de ABA até o final das avaliações (15 dias após o início da embebição), tanto nas sementes de *A. diversifolia* como *A. purpurea*. As sementes de *A. purpurea* apresentaram maiores quantidades de ABA, ao longo do tempo, do que as de *A. diversifolia* mesmo após receberem os tratamentos com os reguladores.

A literatura descreve o ABA como responsável tanto pela indução como pela manutenção das sementes em dormência. Neste caso, é durante os estádios finais da maturação das sementes que o ABA se acumula estabelecendo a dormência primária (BEWLEY; BLACK, 1994; NAMBARA; MARION-POLL, 2003; GUBLER et al., 2005; BENTSIN; KOORNNEEF, 2008).

Estas observações levam ao entendimento de que a quantidade inicial de ABA encontrada nas sementes de *A. purpurea* e *A. diversifolia* foi, portanto acumulada nos estádios finais da maturação e é característica genética das espécies. Além disso, conforme citado por Kigel e Galili (1995), depende em parte do ambiente no qual as sementes foram desenvolvidas. Observa-se ainda, que tais quantidades foram suficientes tanto para o estabelecimento como a manutenção da dormência, uma vez que durante todo o período do estudo não se observou variações no conteúdo de ABA.

Ressalta-se também que não é só a redução do ABA que significaria a superação da dormência, mas mudanças na sensibilidade ao ABA e o aumento de promotores como giberelinas e citocininas uma vez que sementes sem habilidade em produzir GA não germinam (YAMAGUCHI, 2008; NONOGAKY et al., 2010). Deste modo, somente com a alteração do balanço hormonal provocada pela aplicação dos promotores é que a superação da dormência foi possível.

Outro aspecto a ser avaliado é que durante a embebição (Fase I da germinação) poderia ter havido aumento da síntese de ABA para a manutenção da dormência, conforme proposto por Garello et al. (2000), porém esse aumento não foi observado. Em contrapartida, Perez-Flores et al. (2003) relatam que sementes dormentes em embebição mantêm a elevada concentração de ABA, pois este reprime a expressão do gen da GA20-ox, impedindo a formação de GA.

Desta forma, a manutenção da dormência verificada nas sementes cuja concentração de ABA se manteve elevada, pode ser compreendida pela ação do ABA, que inibe a síntese de GA, conforme relatos de Finkelstein et al. (2002) e Perez-Flores et al. (2003). Além disso, o ABA atua na inibição da expressão de genes envolvidos na mobilização de reservas como amilases e proteinases, cuja síntese é promovida por giberelinas (BARDUCHE et al., 1999; PRITCHARD et al, 2002).

Ao se analisar o efeito dos reguladores, verifica-se que a aplicação do bioestimulante GA₄₊₇ + BA foi responsável pela alteração no balanço hormonal que resultou na superação da dormência e na ativação do metabolismo que levou a germinação de sementes de *A. diversifolia* e *A. purpurea*. Desde o início da embebição das sementes nos reguladores foi possível verificar o aumento de GA₃ e a redução do ABA.

Para a superação da dormência, GAs bloqueiam a expressão de genes repressores da germinação (RGL2, SPY) e/ou promovem a degradação dos respectivos produtos (mRNAs e proteínas), aumentando a possibilidade de germinação (PENG; HARBERD, 2002). Cabe acrescentar que tratamentos para superação da dormência provocam mudanças no catabolismo do ABA, resultando em redução do conteúdo de ABA no embrião e um aumento na quantidade de ABA em formas inativas, o que é crucial para superar a dormência (KUSHIRO et al, 2004; GUBLER et al., 2005).

Com a redução do conteúdo de ABA nas sementes, também diminui a sensibilidade a este inibidor e aumenta a sensibilidade às giberelinas, mediando uma alteração entre sementes dormentes e não dormentes (GUBLER et al. 2005). Além do que, com a redução do conteúdo de ABA os repressores da

síntese de GA desaparecem, bem como, os repressores da síntese de enzimas hidrolíticas (PEREZ-FLORES et al., 2003).

Ao mesmo tempo em que bloqueiam genes repressores da germinação, GAs sintetizadas *de novo* iniciam sinais por meio de fatores de sinalização (GCR1, SLY, CTS) que, por sua vez, promovem a síntese de enzimas hidrolíticas que atuam na modificação da parede celular, enfraquecem o tegumento e facilitam a protrusão da radícula (PENG; HARBERD, 2002) bem como, de enzimas relacionadas a degradação e mobilização de reservas, para o desenvolvimento do embrião (PRITCHARD et al, 2002).

Deste modo, com a aplicação de GAs exógenas, acredita-se que devem ter desaparecido diversos transcriptos inibidores, como o RGL2 e ao mesmo tempo aparecido genes ativados por GA, como CTS que atuam na repressão da dormência e promoção da germinação, conforme relatado por Peng e Harberd (2002).

Assim, na medida em que foram acrescentados GA₄₊₇ + BA às sementes, sugere-se que houve o silenciamento de genes relacionados à manutenção da dormência, em função da ação das giberelinas, conforme proposto por Barduche et al. (1999), Peng e Harberd (2002).

Cabe salientar que com o uso do bioestimulante deve-se considerar o efeito sinérgico dos reguladores. Assim, a citocinina age de modo similar às GAs para antagonizar o efeito do ABA na superação da dormência e, ao mesmo tempo, atua na germinação promovendo a divisão celular (BEWLEY; BLACK, 1994). As GAs atuam no alongamento celular e as citocininas na divisão celular, o que resulta no desenvolvimento do embrião e conseqüentemente na protrusão da radícula, completando-se a germinação (NONOGAKI et al., 2010).

O aumento gradativo da quantidade de GA até os 10 dias após o início da embebição sugere que GA₄₊₇ + BA tenha estimulado a síntese *de novo* de giberelinas. Como a redução ocorreu entre 10 e 15 dias, pode-se supor que tenha sido utilizado no alongamento celular, o que resultou no aumento do tamanho da radícula.

Dentre os efeitos das GAs na germinação já relatados por Bewley e Black (1994), Peng e Harberd (2002), cita-se seu papel para a produção de enzimas hidrolíticas, como a endo- B- mananase, que degrada mananos da

parede celular. Tonini et al. (2006) relatam que esta enzima é formada em resposta ao GA proveniente da radícula ou da aplicação exógena, conforme observado em estudos com mutantes deficientes em GA, com a função de degradar parede celular do endosperma que circunda a radícula e facilitar a protrusão da raiz.

Embora a mobilização de reservas seja considerada um evento pós-germinativo, no qual compostos mais simples são transportados do endosperma ou cotilédones para o crescimento das plântulas, em algumas espécies parte deste processo ocorre antes da protrusão da radícula. (NIELSEN; LIENER, 1984; KIGEL; GALILI, 1995). Neste experimento não foi estudado o papel dos reguladores na degradação de reservas de parede celular, no entanto, não se pode descartar a possibilidade de sua ocorrência, de modo aditivo aos efeitos hormonais, da mesma forma que relatado por Silva et al. (2007) em sementes de *A. crassiflora*.

Além de atuarem na degradação de parede celular do endosperma, giberelinas e outros promotores como citocininas estão envolvidos no controle da síntese ou ativação de enzimas como lipases, proteinases, fosfatases e hidrolases. Tais enzimas serão responsáveis pela degradação das reservas e manutenção do metabolismo do embrião até o estabelecimento da plântula (BEWLEY; BLACK, 1994; ARTECA, 1995; KAUR et al., 1998).

Deste modo, durante a germinação as reservas são hidrolisadas e mobilizadas para o crescimento do embrião (KUCERA et al., 2005). Lipídeos e carboidratos são usados como fonte de energia (PRITCHARD et al., 2002; SUBEDI; BHATTARAI, 2003) e proteínas para fornecer aminoácidos para formação de novos tecidos (RAMAKRISHNA, 2007).

Em relação às proteínas, verifica-se que embora a degradação seja considerada um evento pós-germinativo, relacionado ao crescimento e desenvolvimento da plântula (DAVIES; SLACK, 1981; RAMAKRISHNA; RAO, 2005), neste experimento a degradação foi observada desde os primeiros dias quando as sementes foram embebidas em GA₄₊₇ + BA, conforme pode ser observado nas Figuras 15, 16, 17, 18 e Tabelas 7, 8, 9, 10.

Durante a germinação, que é iniciada com a ativação do metabolismo na embebição das sementes, as reservas de proteínas começaram a ser degradadas por proteases com o objetivo de converter proteínas insolúveis

em peptídeos solúveis e aminoácidos livres, conforme proposto por Ramakrishna e Rao (2005). No entanto, cabe observar que esta degradação somente ocorreu quando as sementes foram tratadas com GA₄₊₇ + BA. Neste caso, ocorreu tendência a diminuições nas quantidades das diferentes proteínas (albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas) ao longo do tempo, em ambas as espécies.

Em sementes de *A. diversifolia* e de *A. purpurea* que receberam os reguladores, ocorreu constante degradação de albuminas (Figura 15 e Tabela 7), diferindo das sementes dormentes (secas e embebidas em água) a partir de 5 dias (120 h) até os 15 dias quando a radícula já apresentava 1 cm de comprimento. Suda e Giorgini (2000) observaram degradação de albuminas entre 60 e 84 horas, o que consideraram início da germinação e neste trabalho a degradação foi observada em todo o período, durante os 15 dias (360 horas).

Embora sejam observadas variações entre espécies conforme relatado por Al-Helal (1996), tanto Suda e Giorgini (2000) com sementes de *Euphorbia heterophylla* como neste trabalho, a degradação de proteínas teve início com a embebição. A diferença é que sementes de *A. diversifolia* e de *A. purpurea* necessitaram de aplicação exógena de reguladores vegetais para superar a dormência e dar início à degradação. Outros autores como Ramakrishna e Rao (2006) também observaram degradação de proteínas no início da embebição de sementes de *Dolichos lablab* L. vr. *Lignosus*.

Além de diferenças na degradação de albuminas entre as espécies, a quantidade observada em cada espécie também foi diferente, sendo que as sementes de *A. diversifolia* secas (tempo 0) apresentavam 9668,32 µg g⁻¹ e foram reduzidas a 2347,32 µg g⁻¹ de albuminas aos 15 dias após o início da embebição com os reguladores e nas de *A. purpurea* a quantidade inicial era de 19632,39 µg g⁻¹ e atingiu 6368,54 µg g⁻¹ no final do período, também com os reguladores.

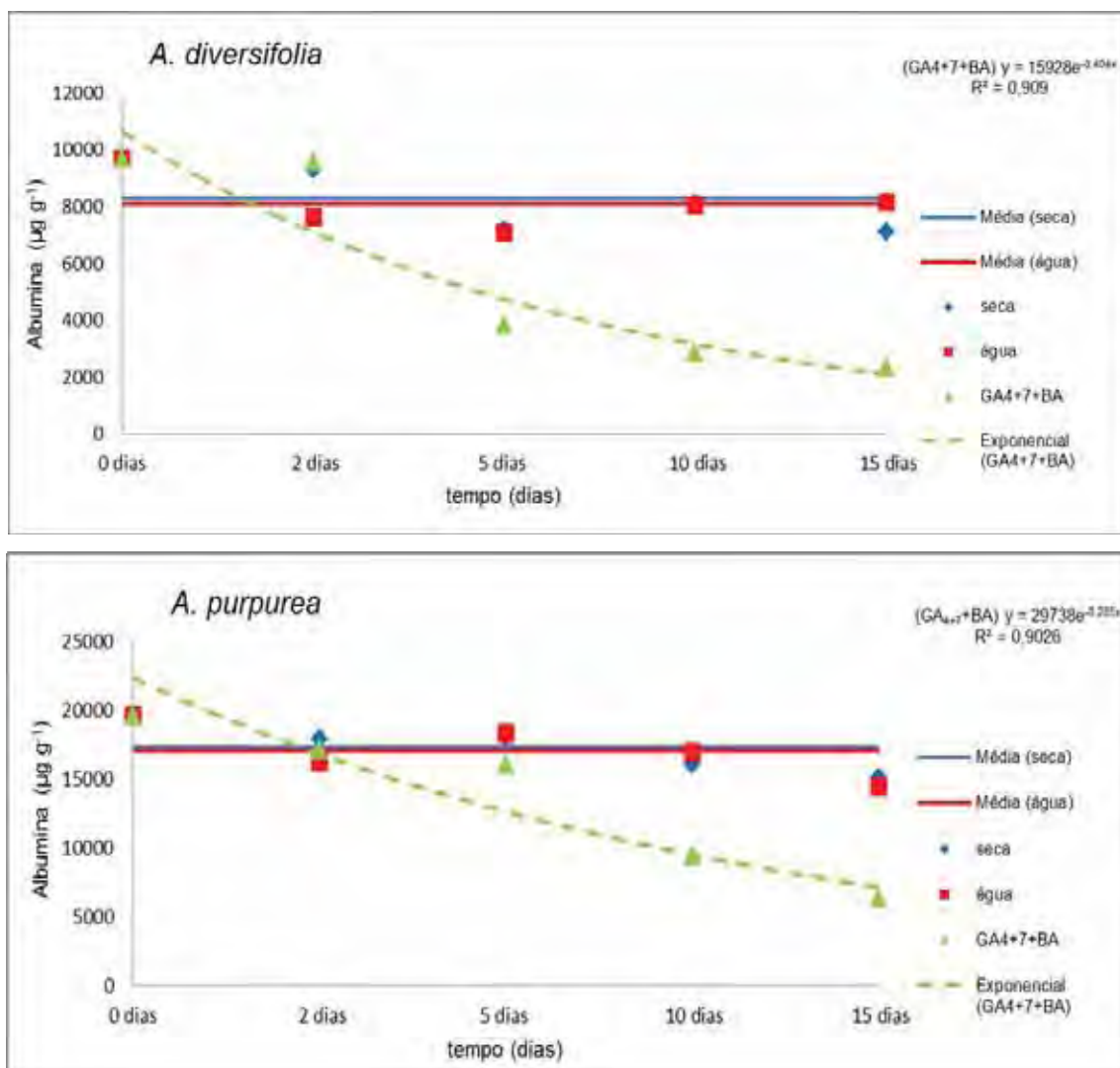


Figura 15. Variações no conteúdo de albumina em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.

Ao se observar conjuntamente a degradação de albumina com a de globulina nas sementes tratadas com os reguladores, verificam-se padrões distintos. Em *A. diversifolia*, a degradação de albumina foi menor no início das avaliações (entre 0 e 2 dias) e alcançou seu máximo em estádios mais tardios da germinação.

Tabela 7. Variações no conteúdo de albumina em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias

ALBUMINA ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
<i>A. diversifolia</i>			
Dias	Seca	Água	GA ₄₊₇ + BA
0	9668,32 * ¹	9668,32	9668,32
2	9296,91 A	7633,97 A	9580,88 A
5	7179,23 A	7077,72 A	3849,83 A
10	8130,63 A	8039,65 A	2862,95 B
15	7106,46 B	8162,07 A	2347,32 C
Média	7928,30 A	7728,40 A	4660,20 B
F		6,86	
Pr > F		<0,0001	
C.V.		23,59	
<i>A. purpurea</i>			
Dias	Seca	Água	GA ₄₊₇ + BA
0	19632,39	19632,39	19632,39
2	17937,53 A	16245,77 A	17125,66 A
5	18030,44 A	18324,79 A	16049,66 B
10	16086,55 A	16946,46 A	9410,38 A
15	15102,27 A	14420,38 A	6368,54 B
Média	16789,20 A	16484,40 A	12238,60 B
F		7,52	
Pr > F		<0,0001	
C.V.		15,21	

*1. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação às globulinas, a degradação ocorreu de maneira mais acentuada desde o início da embebição (Figura 16, Tabela 8). Nas sementes de *A. purpurea* albuminas e globulinas também iniciaram a degradação mais tarde sendo continuamente degradadas.

O mesmo foi observado por Ramakrishna (2007) durante a germinação de sementes de *Dolichos lablab* L. vr. *Lignosus* cujas frações de albuminas e globulinas também foram degradadas de maneiras distintas. Globulinas foram degradadas continuamente a partir do início da embebição, enquanto as albuminas foram menos degradadas nos estádios iniciais da germinação e atingiram seu máximo em estádios tardios.

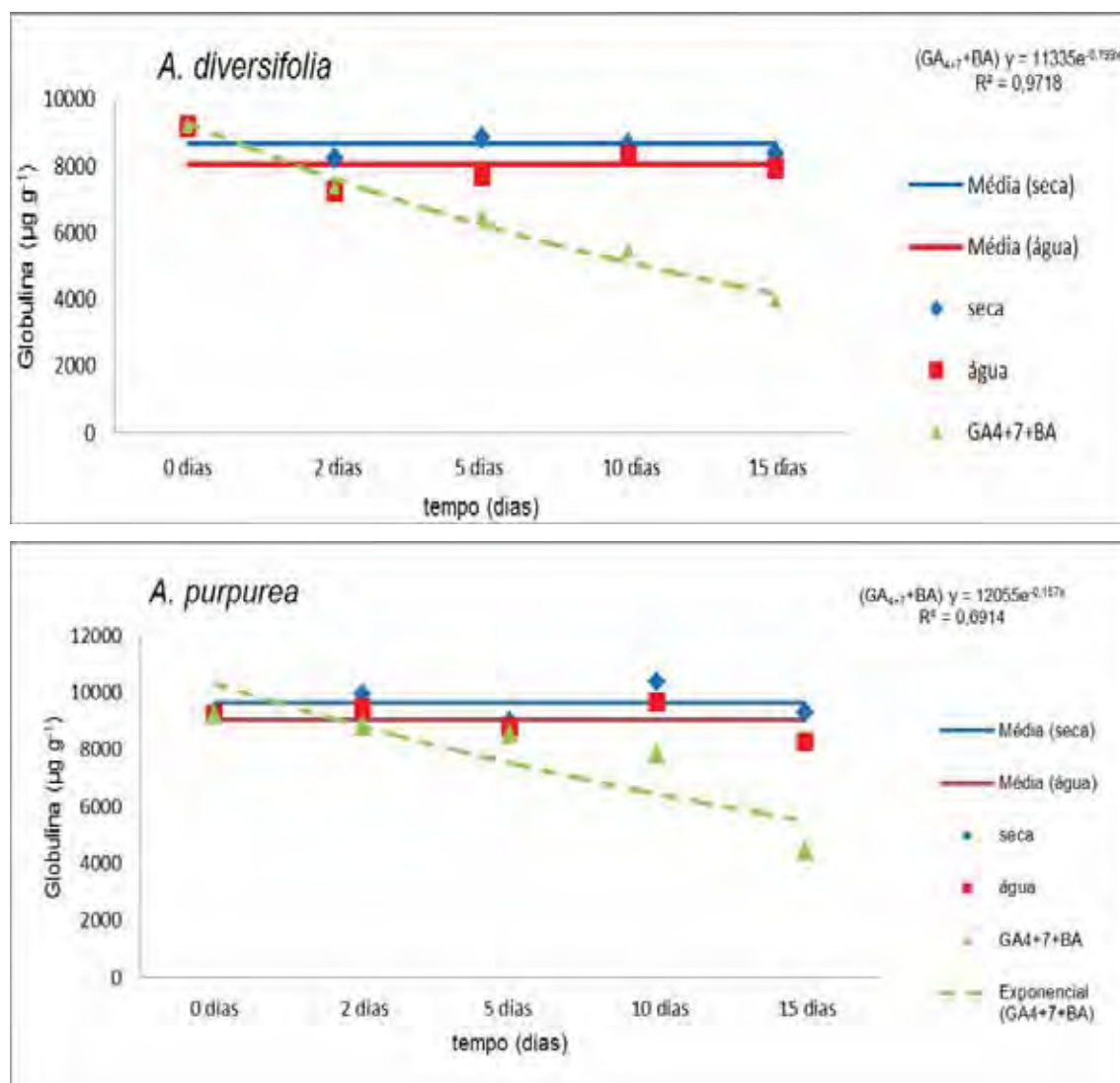


Figura 16. Variações no conteúdo de globulinas em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.

Schlereth et al. (2000) verificaram que após 24 h de embebição de sementes de *Vicia sativa* L., quando ocorreu a emissão da radícula, a maior parte da globulina do eixo embrionário já havia sido degradada, enquanto a degradação dos cotilédones ainda não havia sido detectada. Neste caso, a degradação também ocorreu antes da emissão da radícula, no entanto, a reserva usada inicialmente foi do embrião. Em relação às anonas em estudo, se

observou degradação das proteínas do endosperma, desde o início da embebição, mas o embrião não foi avaliado.

Tabela 8. Variações no conteúdo de albumina em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias

GLOBULINA ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
<i>A. diversifolia</i>			
Dias	Seca	Água	GA ₄₊₇ + BA
0	9197,99 * ¹	9197,99	9197,99
2	8213,51 A	7233,78 A	7336,52 A
5	8818,30 A	7714,38 AB	6474,77 B
10	8647,81 A	8288,72 A	5471,11 B
15	8369,66 A	7914,11 A	3929,01 A
Média	8512,30 A	7787,70 A	5802,90 B
F		2,79	
Pr > F		0,0172	
C.V.		20,33	
<i>A. purpurea</i>			
Dias	Seca	Água	GA ₄₊₇ + BA
0	9204,31	9204,31	9204,31
2	9936,10 \pm 2253,56	9472,33 \pm 1746,15	8819,09 \pm 230,69
5	8976,96 \pm 132,32	8793,71 \pm 668,69	8543,65 \pm 72,52
10	10375,19 \pm 780,80	9666,23 \pm 346,57	7809,18 \pm 179,13
15	9282,93 \pm 888,97	8262,80 \pm 271,64	4461,52 \pm 232,94
Média	9936,09 \pm 364,43	9472,33 \pm 371,70	8819,09 \pm 1160,63
F		-	
Pr > F		-	
C.V.		-	

*1. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Prolaminas e glutelinas foram também degradadas ao longo do tempo em ambas as espécies, em função da aplicação de GA₄₊₇ + BA, no entanto, tais proteínas apresentaram concentrações bem menores (Figuras 17, 18 e Tabelas 9, 10, respectivamente). Suda e Giorgini (2000) observaram que glutelinas também foram degradadas desde o início da embebição de sementes de *Euphorbia heterophylla*, no entanto, os autores verificaram pequenas concentrações de prolaminas nas sementes e nestas, não detectaram variações na concentração.

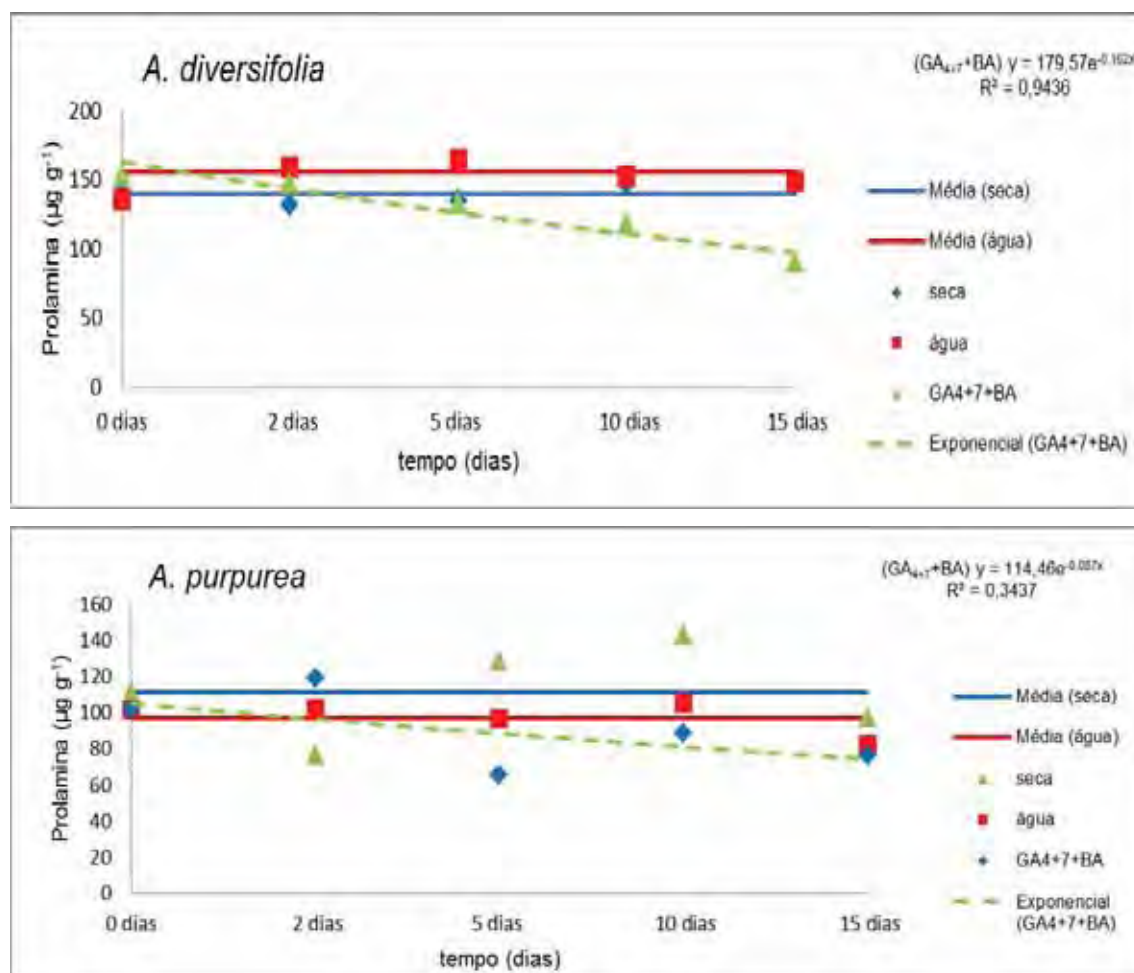


Figura 17. Variações no conteúdo de prolaminas em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.

Ao se analisar a degradação do conjunto de proteínas em função do tratamento com GA₄₊₇ + BA, se confirma a ação dos reguladores vegetais, no aumento da síntese de enzimas hidrolíticas, com conseqüente fornecimento de aminoácidos e energia para sustentar o desenvolvimento do embrião (BEWLEY; BLACK, 1994; NANDI et al., 1995; BEWLEY, 1997; BRADFORD et al., 2000; MUNTZ et al., 2001; RAMAKRISHNA; RAO, 2005a).

Tabela 9. Variações no conteúdo de prolamina em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias

PROLAMINA ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
<i>A. diversifolia</i>			
Dias	Seca	Água	GA ₄₊₇ + BA
0	167,50 * ¹	167,50	167,50
2	132,01 \pm 0,64	158,65 \pm 5,59	147,38 \pm 1,52
5	134,83 \pm 5,04	164,62 \pm 11,18	132,81 \pm 5,85
10	146,26 \pm 2,68	151,97 \pm 45,02	117,40 \pm 14,71
15	145,87 \pm 4,72	148,69 \pm 7,17	89,46 \pm 16,41
Média	139,74 \pm 3,70	155,98 \pm 3,55	121,76 \pm 12,38
F		-	
Pr > F		-	
C.V.		-	
<i>A. purpurea</i>			
Dias	Seca	Água	GA ₄₊₇ + BA
0	101,36	101,36	101,36
2	76,72 \pm 0,17	102,49 \pm 5,27	119,10 \pm 21,20
5	128,60 \pm 4,99	96,78 \pm 5,63	65,66 \pm 2,40
10	142,32 \pm 0,65	105,35 \pm 19,16	88,76 \pm 24,33
15	96,95 \pm 3,08	82,06 \pm 7,43	76,14 \pm 20,58
Média	111,15 \pm 17,20	96,67 \pm 2,45	87,41 \pm 13,36
F		-	
Pr > F		-	
C.V.		-	

*1. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Segundo Muntz et al. (2001), Ramakrishna e Rao (2005b) a mobilização de reservas de proteínas durante a germinação é iniciada por endoproteases que convertem proteínas insolúveis armazenadas em peptídeos solúveis que podem ser hidrolisados em aminoácidos por exopeptidases.

Deste modo, os reguladores aplicados além de atuarem na superação da dormência, ainda estimularam a degradação de proteínas, liberando aminoácidos para o desenvolvimento do embrião (PRITCHARD et al., 2002). Da mesma forma que verificado neste experimento, a redução do conteúdo de proteínas de reserva durante a germinação de sementes quiescentes foi também observada em sementes de *Macrotyloma uniflorum* (KARUNAGARAN; RAO, 1990) e *Lupinus albus* (NANDI et al, 1995).

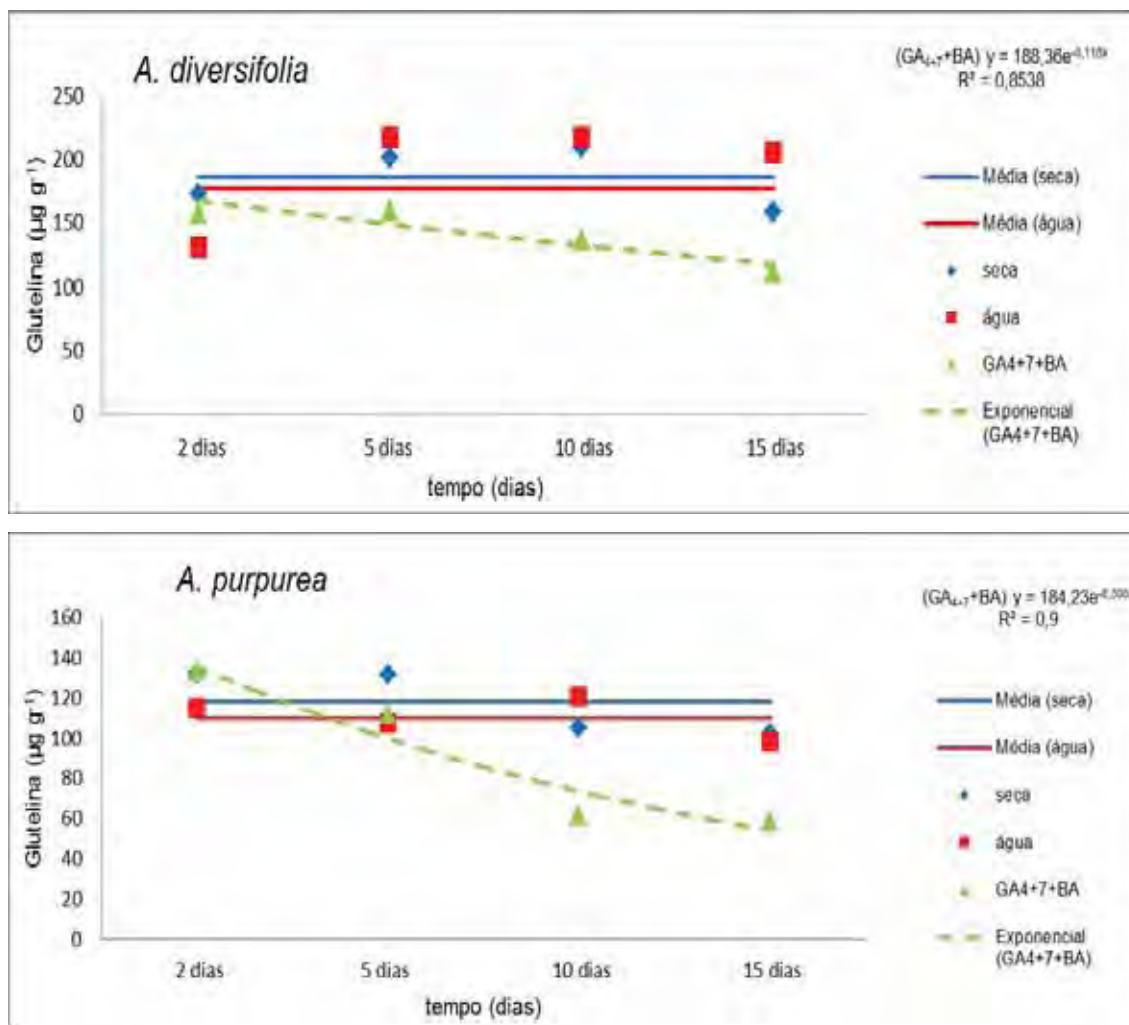


Figura 18. Variações no conteúdo de glutelina em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.

Em contrapartida as sementes dormentes, que foram previamente embebidas em água ou não, antes de serem colocadas para germinar, mantiveram o metabolismo reduzido, cujas variações não foram suficientes para sustentar o processo germinativo. Desta forma, confirma-se o fato de que sementes dormentes podem sustentar baixo nível de atividade metabólica durante a embebição e Fase II, no entanto, não atingem a Fase III da germinação (BEWLEY; BLACK, 1994; KIGEL; GALILI, 1995; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Tabela 10. Variações no conteúdo de glutelina em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias

GLUTELINA ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
<i>A. diversifolia</i>			
Dias	Seca	Água	GA ₄₊₇ + BA
0	216,15 * ¹	216,15	216,15
2	172,72 A	130,82 B	157,76 AB
5	201,19 A	156,91 A	159,94 A
10	209,65 A	216,87 A	136,56 A
15	158,43 AB	204,88 A	112,20 B
Média	185,00 A	177,37 AB	141,62 B
F		2,22	
Pr > F		0,0493	
C.V.		23,26	
<i>A. purpurea</i>			
Dias	Seca	Água	GA ₄₊₇ + BA
0	125,82	125,82	125,82
2	132,22 A	114,99 A	133,22 A
5	131,47 A	107,39 B	112,10 B
10	105,19 AB	120,41 A	61,45 B
15	102,24 A	97,98 A	58,61 A
Média	117,73 A	110,19 AB	91,34 B
F		4,41	
Pr > F		0,0012	
C.V.		19,14	

*1. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Cabe salientar que além de proteínas, a mobilização de outros componentes de reserva como açúcares e lipídeos também foram observados em função da aplicação de reguladores para superação da dormência.

Em relação à degradação de açúcares solúveis totais, observou-se que em sementes dormentes de *A. diversifolia* não ocorreram variações no conteúdo de açúcar, ao longo do tempo, que resultassem em liberação de energia necessária para a germinação. Este fato foi verificado independente das sementes terem permanecido embebidas previamente em água ou não (Figura 19 e Tabela 11).

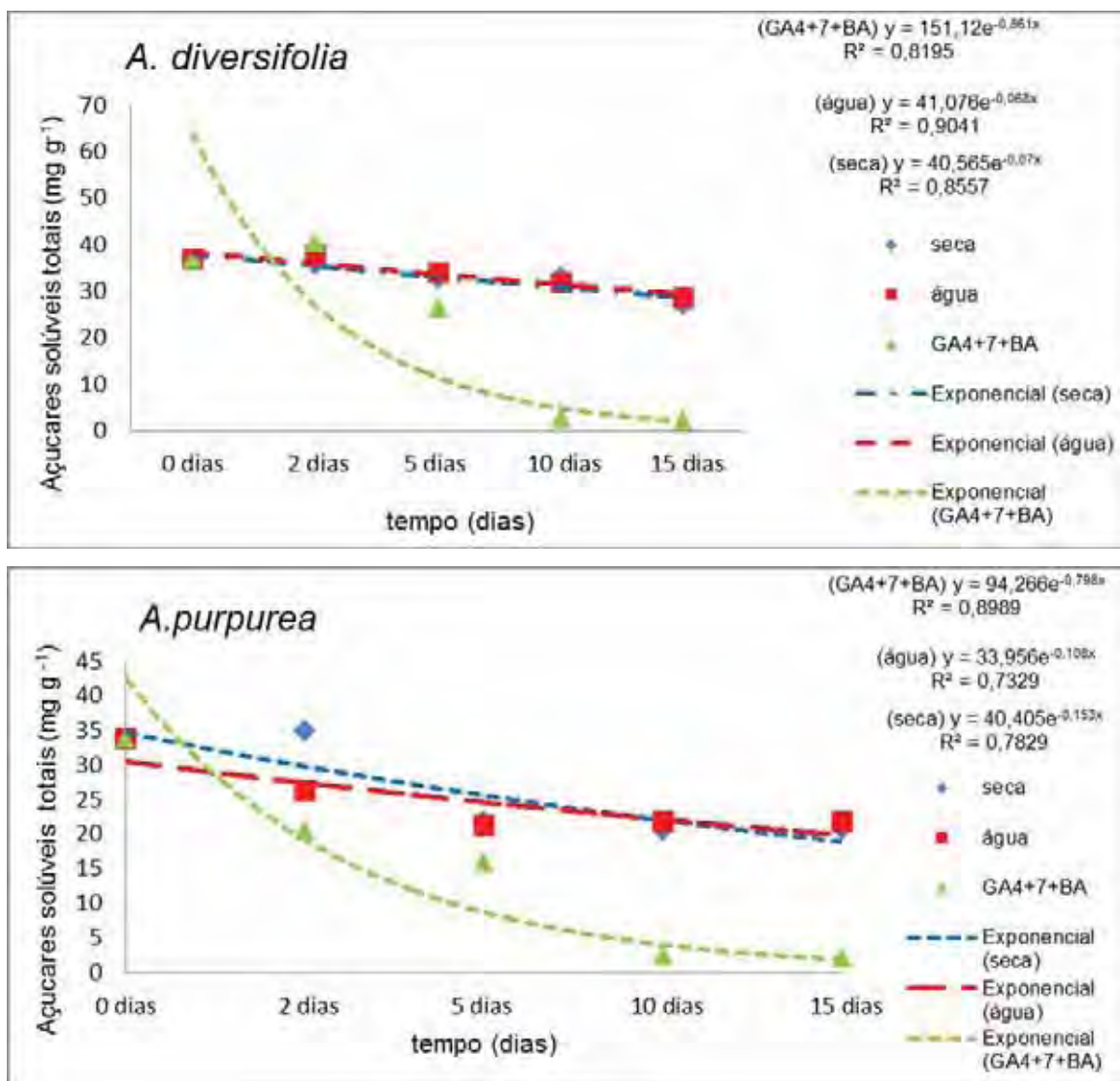


Figura 19. Variações no conteúdo de Açúcares Solúveis Totais em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇+BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.

Da mesma forma, sementes dormentes de *A. purpurea*, previamente embebidas em água ou não, também apresentaram pequena redução no conteúdo de açúcar, portanto, o metabolismo não é incrementado, havendo necessidade da aplicação exógena de reguladores para alterar o balanço hormonal e estimular a degradação.

Para que reservas de amido sejam degradadas, e possam ser utilizadas no metabolismo, há necessidade de serem desmembradas em

estruturas menores, e neste processo destacam-se as enzimas alfa-amilase, beta-amilase e amido fosforilase. Destas, a alfa-amilase é a única que ataca diretamente os grânulos de amido, o que a caracteriza como a primeira enzima do processo de degradação de amido (BUCKERIDGE et al., 2004). No entanto, os autores afirmam que as alfa-amilases não estão presentes em sementes dormentes e quiescentes de cereais, sendo necessário que sejam sintetizadas *de novo* durante a germinação.

Tabela. 11. Variações no conteúdo de Açúcares Solúveis Totais em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias

AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS (mg g⁻¹)			
<i>A. diversifolia</i>			
Dias	Seca	Água	GA ₄₊₇ + BA
0	36,80 * ¹	36,80	36,80
2	35,83 A	37,48 A	40,38 A
5	32,89 A	33,91 A	26,47 B
10	32,79 A	31,82 A	2,45 B
15	27,14 A	28,47 A	2,02 B
Média	32,16 A	32,92 A	17,83 B
F		21,47	
Pr > F		<0,0001	
C.V.		16,96	
<i>A. purpurea</i>			
Dias	Seca	Água	GA ₄₊₇ + BA
0	33,89	33,89	33,89
2	34,96 A	26,28 A	20,58 A
5	21,78 A	21,25 A	15,79 B
10	20,52 A	21,82 A	2,27 B
15	20,63 A	21,69 A	1,89 B
Média	24,47 A	22,76 A	10,13 B
F		10,95	
Pr > F		<0,0001	
C.V.		25,11	

*1. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a indução da síntese de alfa-amilase é necessária a presença de giberelinas, que em cereais são produzidas pelo eixo embrionário e se difundem até o escutelo e camada de aleurona onde atuam como ativador

primário numa cascata de sinais que resulta com um fator de transcrição (o GAMyb) e a expressão gênica de enzimas amilolíticas (JACOBSEN; BEACH, 1985; UEGUCHI-TANAKA et al., 2000; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Desta forma, sementes embebidas em água ou que foram colocadas para germinar sem embebição prévia, não ativaram a síntese de giberelinas, como ocorreria em sementes quiescentes em embebição e, conseqüentemente não houve estímulo para síntese de alfa-amilase.

Neste caso, o ABA apresenta importante papel, tanto para a manutenção da dormência por inibir a síntese de GA (FINKELSTEIN et al., 2002; PEREZ-FLORES et al., 2003) como inibindo a síntese *de novo* de alfa amilase a nível de transcrição gênica (BARDUCHE et al., 1999; PRITCHARD et al., 2002; KUCERA et al., 2005). Além do que, Zentella et al. (2002) a partir de estudos com cevada, relatam que o ABA pode afetar a estabilidade dos mRNA de alfa amilase, e conseqüentemente reduzir a produção da enzima. Assim, ABA bloqueia a cascata de sinais ativada por GA, antes da formação do fator de transcrição GAMyb, por meio de uma proteína quinase que é induzida por ABA a PKABA1.

Deste modo, os resultados sugerem que estes podem ter sido os mecanismos de controle provocados pelo ABA. No entanto, considerando que a alfa amilase tenha que ser produzida pela síntese *de novo* durante a germinação e que sua indução depende da disponibilidade de giberelinas (KUCERA et al., 2005; NONOGAKY et al., 2010), o efeito somente foi observado com a aplicação exógena destas.

Quando GA₄₊₇ + BA foi aplicado às sementes de *A. diversifolia* e de *A. purpurea*, além dos efeitos provocados pelas giberelinas associadas a citocinina na superação da dormência (PENG; HARBERD, 2002; KUSHIRO, 2004; GUBLER et al., 2005) foi possível verificar a ação também na redução dos teores de açúcares totais desde o início da embebição, com diferenças significativas entre as sementes secas (sem embebição prévia) e as que foram embebidas em água (Água), Tabela 11, o que é resultado do aumento das atividades metabólicas. Subedi e Bhattarai (2003) relatam elevada síntese de alfa amilase e degradação de amido desde as primeiras horas de embebição de sementes de *Zea mays* L. var. Arun-2 em giberelina (GA₃).

Além das giberelinas estimulando a síntese de alfa amilase para a degradação de amido, deve-se relatar o efeito da citocinina, que além de estarem relacionadas com a atividade amilolítica e proteolítica (BEWLEY; BLACK, 1994; KUCERA et al., 2005), atuam na divisão celular (KUCERA et al., 2005; NONOGAKY et al., 2010).

Da mesma forma, observam-se na Figura 19 e Tabela 11 que sementes de *A. purpurea* tratadas com GA₄₊₇ + BA também apresentaram redução na quantidade de açúcares totais ao longo do tempo, assim como *A. diversifolia*, comprovando que os açúcares são os substratos iniciais para a respiração, a fim de garantir a continuidade do metabolismo que resultará na germinação.

Verifica-se, portanto, que a redução dos açúcares solúveis totais é cada vez maior na medida em que mais energia é necessária para sustentar o desenvolvimento do embrião, o que resulta em 1 cm de radícula após 15 dias do início da embebição e reduzidos teores de açúcares solúveis totais (Figura 19 e Tabela 11).

Comparando-se as espécies tratadas com os reguladores, os dados revelam que as sementes de *A. purpurea* além de terem menor quantidade inicial de açúcares, apresentam degradação mais rápida desde o início da embebição. No entanto, ambas as espécies apresentam teores muito próximos de açúcares no momento da emissão da radícula.

Cabe observar que as principais reservas encontradas no endosperma de sementes de anonáceas são predominantemente de proteínas e lipídeos, seguidas de amido. Galastri (2008) detectou a partir de testes histoquímicos maior presença de proteínas e lipídeos em sementes de *Duguetia furfuraceae* e *Xylopia emarginata* e além destas reservas, ainda amido em sementes de *A. dioica*. De maneira semelhante, Corsato (2010) observou que células do endosperma de *A. emarginata* apresentam maiores quantidades de lipídeos e proteínas que amido.

Deste modo, a rápida redução no conteúdo de açúcares solúveis totais pode estar relacionada com a pequena quantidade de amido relatada para as anonáceas e ao mesmo tempo, à necessidade de uso imediato deste tipo de reserva, pois os açúcares são as reservas mais prontamente

disponíveis para uso imediato pelo embrião em desenvolvimento (BUCKERIDGE et al., 2004; TAIZ; ZEIGER, 2009). Desta forma, tanto o amido foi degradado e prontamente utilizado, como outras possíveis reservas pré-existentes, como sacarose em função da aplicação dos reguladores.

Da mesma forma que observado com reservas de proteínas e açúcares, reservas lipídicas também foram degradadas em função da aplicação dos reguladores, conforme se verifica na Figura 20 e Tabela 12.

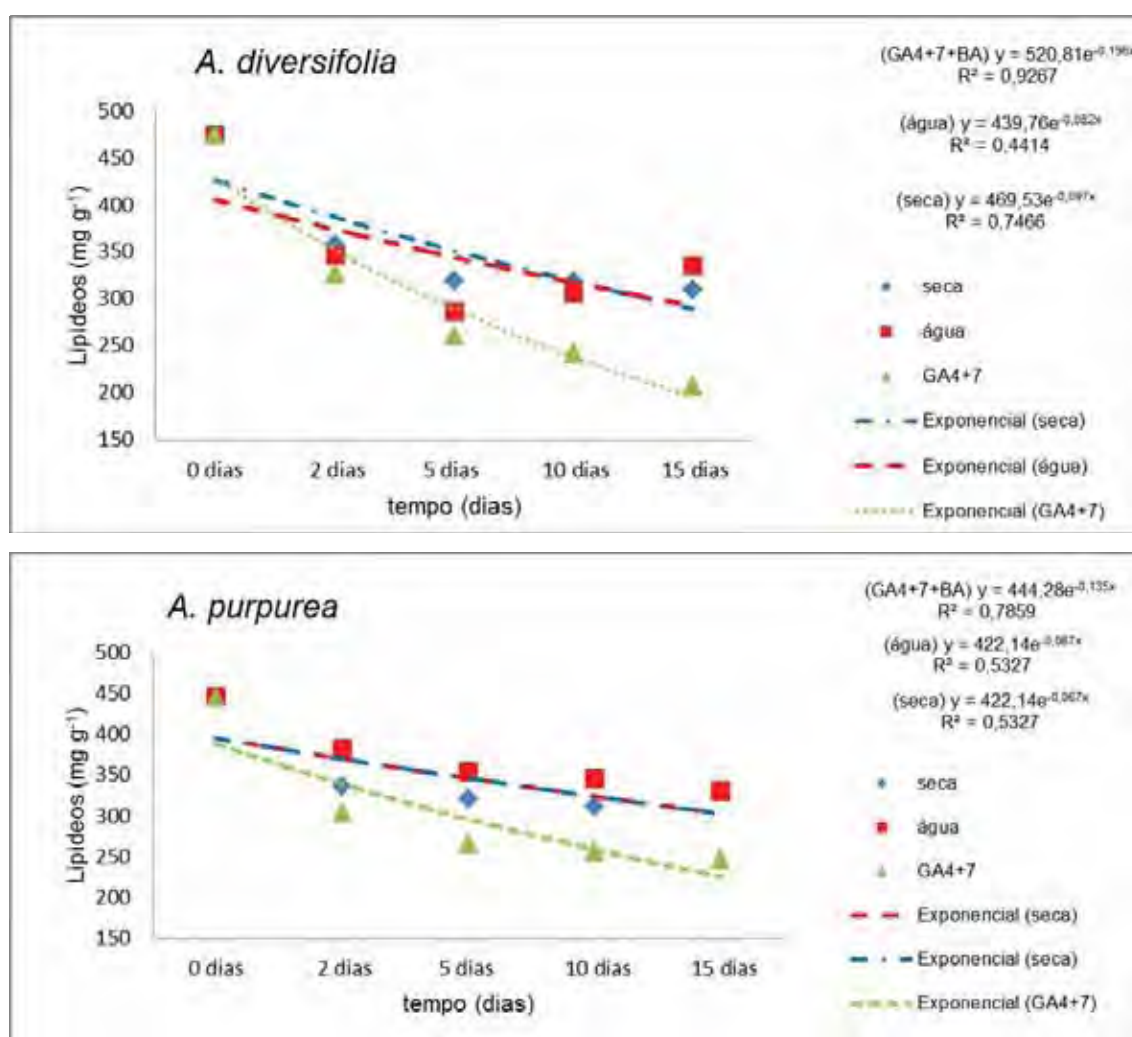


Figura 20. Variações no conteúdo de Lipídeos em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇ + BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias.

Sementes de *A. diversifolia* e *A. purpurea* cuja dormência foi superada com GA₄₊₇ + BA apresentaram redução no conteúdo de lipídeos logo no início da embebição, que se seguiu de maneira constante, evidenciando-se a partir dos 10 dias, com diferenças entre os tratamentos para sementes de *A. purpurea* e aos 15 dias para sementes de *A. diversifolia*, quando foi observado o desenvolvimento da radícula (Tabela 12).

Tabela. 12. Variações no conteúdo de Lipídeos em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal, colocadas para germinar sem embebição prévia (Seca), embebidas em água (Água) e embebidas em GA₄₊₇ +BA, avaliadas aos 0, 2, 5, 10 e 15 dias

LIPÍDEOS (mg g⁻¹)			
<i>A. diversifolia</i>			
Dias	Seca	Água	GA ₄₊₇ + BA
0	474,66 * ¹	474,66	474,66
2	357,24 A	345,76 A	326,55 A
5	318,67 A	286,35 A	261,06 A
10	318,56 A	306,19 A	242,28 A
15	309,51 A	335,08 A	206,92 B
Média	326,00 A	318,34 A	259,20 B
F		1,61	
Pr > F		0,1588	
C.V.		20,18	
<i>A. purpurea</i>			
Dias	Seca	Água	GA ₄₊₇ + BA
0	445,01	445,01	445,01
2	335,77 A	380,80 A	304,38 A
5	320,62 A	354,37 A	265,58 A
10	311,29 A	345,36 A	255,59 B
15	331,40 A	330,50 A	246,66 B
Média	324,76 A	352,76 A	268,05 B
F		3,72	
Pr > F		0,0035	
C.V.		16,63	

*1. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No entanto, sementes dormentes apresentaram pequenas reduções no conteúdo de lipídeos, demonstrando atividade metabólica na Fase II da germinação, conforme relatos de Bewley e Black (1994), Carvalho e

Nakagawa (2000). Porém, devido a necessidade de superação da dormência para posterior germinação, as sementes mantiveram-se com atividade metabólica, mas sem completar a germinação, devido a elevadas concentrações de ABA impedindo o processo (PEREZ-FLORES et al., 2003; ALI-RACHED et al., 2004; GUBLER et al., 2005).

Desta maneira, Pritchard et al. (2002) relatam que o ABA relaciona-se a manutenção da dormência, conforme já citado, porém, o ABA não interfere diretamente na mobilização de lipídeos, que é considerado ABA-independente. Os autores observaram mobilização de lipídeos na presença de ABA, diferente do que ocorre com proteínas e açúcares, quando há completa inibição com a aplicação exógena de ABA.

Após a superação da dormência com a aplicação de GA_{4+7} + BA, portanto, houve incremento na degradação de lipídeos, no entanto, a redução na quantidade de lipídeos ocorreu de maneira mais lenta que as demais reservas estudadas (açúcares e proteínas). Este resultado pode ser explicado pelo fato de que deste tipo de reserva é comumente degradada com maior intensidade em pós-germinação, conforme relatos de Buckeridge et al. (2004), Penfield et al. (2005).

Desta forma, a degradação de lipídeos em períodos pós-germinativos é uma maneira de continuar o fornecimento de sacarose para o estabelecimento das plântulas e não mais para estimular o início da germinação. Assim, a partir da ativação da síntese de lipases os triglicerídeos foram hidrolisados e tanto glicerol como ácidos graxos livres foram utilizados para a síntese de sacarose (SUDA; GIORGINI, 2000). Desta forma, este processo ocorreu de maneira lenta, pois a sacarose seria empregada principalmente a partir dos 15 dias do início da embebição, quando as sementes apresentavam 1 cm de radícula e portanto, em pós-germinação.

Em contrapartida, em sementes de *A. purpurea* tratadas com os reguladores a redução dos níveis de lipídeos já era mais evidente a partir de 10 dias, demonstrando maior necessidade de energia para a manutenção do desenvolvimento do embrião do que em sementes de *A. diversifolia*.

A maior necessidade de açúcar em estádios pré-germinativos ou muito próximos da germinação visível pode estar relacionada

com a necessidade de energia nas sementes de *A. purpurea*, para garantir a emissão da radícula, uma vez que sementes desta espécie possuem menor quantidade inicial de açúcares em relação a *A. diversifolia*. Além do que, sementes de anonáceas tem maior reserva de lipídeos do que de açúcares (GALASTRI, 2008; CORSATO, 2010), dependendo destes para a síntese de sacarose (SUDA; GIORGINI, 2000).

Assim, para o fornecimento de sacarose e manutenção do desenvolvimento do embrião, teve início a degradação de reserva lipídica, com aumento da atividade enzimática num evento pré-germinativo, bem antes de terminada a germinação visível, conforme haviam proposto Penfield et al. (2005). Da mesma forma que neste experimento, Lima et al. (2008) observaram reduções no conteúdo de lipídeos desde antes da emissão da radícula de sementes de *Aniba roseodora*. Pontes et al. (2002) também verificaram redução no conteúdo de lipídeos de sementes de *Apuleia leiocarpa* desde o início da embebição.

Com a aplicação de GA₄₊₇ + BA, portanto, foi possível verificar uma rápida degradação das reservas, principalmente de proteínas e açúcares totais, seguida por lipídeos, o que confirma a ação dos reguladores na síntese ou ativação de enzimas relacionadas com a degradação de reservas.

7 CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados obtidos com *Annona diversifolia* Saff e *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal pode-se concluir:

- A dormência das sementes das espécies não está relacionada com a dificuldade de aquisição de água, mas a um balanço hormonal favorável a sua manutenção;

- A superação da dormência é possível com a aplicação de GA₃ e de GA₄₊₇ + Benziladenina, sendo que a mistura de reguladores promoveu respostas mais significativas para as duas espécies;

- GA₄₊₇ + Benziladenina aplicados às sementes induzem a superação da dormência pela diminuição do conteúdo de ABA e estimulam a degradação de reservas durante a germinação, principalmente proteínas e açúcares, seguidos pelos lipídeos, desde o início da embebição.

8 REFERÊNCIAS

AGUSTÍN, J. A.; ALVITER, A. E. **El cultivo de la cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) en el Estado de Michoacán**. Chapingo: Universidad Autónoma de Chapingo, 1996. 62 p.

ALBORNOZ, G. F. G. et al. Pruebas de envejecimiento acelerado en semillas de chincuya (*Annona purpurea* Moc & Sessé). I. Germinación. In: CONGRESO NACIONAL DE ANONÁCEAS, 3., Villahermosa, México. **Memoria...** Villahermosa: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 2006. p. 48.

AL-HELAL, A.A. Mobilization of starch and protein in germinating rice grains. **Science**, Saudi Arabia, v. 8, n. 2, p. 127-138, 1996.

ALI-RACHEDI, S. et al. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Berlin, n. 219, p. 479-488, 2004.

AMBALKAR, V. U. et al. A. Soxhlet extraction of Neem seed (*Azadirachta indica* A. Juss) using hexane as a solvent. **International Journal of Chemical and Analytical Science**, v. 2, n. 2, p. , 2011.

APG II - THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 141, p. 399-436, 2003.

ARTECA, R. N. **Plant growth substances**: principles and applications. New York: Chapman & Hall, 1995. 332 p.

BARDUICHE, D. et al. Effect of ABA and GA₃ on protein mobilization in embryos and cotyledons of angico (*Anadenanthera peregrina* L.) seeds during germination. Brazilian. **Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 42, p. 135-144, 1999.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds**: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. San Diego: Academic Press, 1998. 666 p.

BENTSINK, L.; KOORNNEEF, M. Seed dormancy and germination. **The Arabidopsis Book**, p. 1-18, 2008. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/suppl/10.1199/tab.0119?file=10.1199_tab.0050.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2011.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p.1055-1066, 1997.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BLACK, M. The role of endogenous hormones in germination and dormancy. **Israel Journal of Botany**, Israel, v. 29, n.1-4, p. 181-192, 1980/81.

BORGHETTI, F. Dormência embrionária. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artimed, 2004. p. 109-123.

BRADFORD, K. J. et al. Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. In: BLACK, M.; BRADFORD, K. J.; VAZQUEZ-RAMOS, J. **Seed biology**: advances and applications. Wallingford: CAB International, 2000. p. 231-251.

BRADFORD, K. J. Water relations in seed germination. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1995. p. 351-396.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, J. F. et al. Germination of atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) CV. Gefner seeds subjected to treatments with plant growth regulators. **International Journal of Science and Nature**, Ethiopia, v. 1, n. 2, p. 120-126, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regra de análise de sementes**. Brasília, DF: Departamento de Produção Vegetal, 2009. 398 p.

BUCKERIDGE M. S. et al. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artimed, 2004. p. 163-185.

CAMPBELL, C. W.; POPENOE, J. Effect of gibberellic acid on seed dormancy of *Annona diversifolia* saff. **Proceedings of the Tropical Region American Society for Horticultural Service**, Miami, v. 11, p. 31-36, 1968.

CARDOSO, V. J. M. Dormência: Estabelecimento do processo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artimed, 2004. p. 95-108.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal, SP: FUNEP, 2000. 588 p.

CASTRO, R. D.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Arned, 2004. p.158-162.

CAZÁRES, L. M. L.; CHACON, I. C.; ESQUINCA, A. R. G. Usos de *Annona purpurea* Mociño & Sessé ex Dunal. In: CONGRESO NACIONAL DE ANONÁCEAS, 3., 2006, Villahermosa, México. **Memoria...** Villahermosa: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 2006. p. 61.

CHACÓN, I. C.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. **Natural Product Research**, n. 1, p. 1-8, 2011.

COPERLAND, L. D.; McDONALD, M. B. **Principles of seed science and technology**. 4. ed. New York: Chapman and Hall, 1999. 409 p.

CORSATO, J. M. **Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER)**. 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

COSTA, P. N. **Reguladores vegetais, luz e temperatura na germinação de sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER)**. 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

COSTA, P. N.; BUENO, S. S. C.; FERREIRA, G. Fases da germinação de sementes de *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. Rainer em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 33, n. 1, p. 253-260, 2011.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. 18. ed. New York: Columbia University Press, 1981. 1962 p.

CROZIER, A. et al. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; RUSSEL, L. J. **Biochemistry and molecular biology of plants**. 3. ed. Rockville: Courier Companies, Inc., 2001. p. 850-929.

DAVIES, H. V.; SLACK, P. T. The control of food mobilization in the seeds of dicotyledonous plants. **New Phytologist**, Cambridge, n. 88, p. 41-51, 1981.

DAVIES, P. J. **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. 2. ed. London: Kluwer Academic Publishers, 1995. 833 p.

DUBOIS, N. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Manhattan, v. 28, p. 350-356, 1956.

ESQUINCA, A. R. G. et al. Estudios sobre el letargo de *Annona diversifolia* Saff (Annonaceae). In: CONGRESO INTERNACIONAL DE ANNONÁCEAS, 1., 1997, Chapingo, México. **Memorias...** Chapingo: Universidad de Chapingo, 1997. p. 229-239.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

FERREIRA, G. et al. Aplicação de ácido giberélico em sementes de fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.) submetidas a diferentes períodos de armazenamento. In: SEMINÁRIO PANAMERICANO DE SEMILLAS, 12., 2000, Montevideo, Uruguay. **Anais...** Montevideo: Sociedade Brasileira de Sementes, 2000a. p. 145.

FERREIRA, G. et al. Curva de absorção de água em sementes de atemóia (*Annona cherimola* MILL. x *Annona squamosa* L.) CV. 'Gefner'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 28, n. 1, p. 121-124, 2006.

FERREIRA, G. et al. Germinação de sementes de atemóia (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.) cultivar 'Gefner' sob tratamentos com ácido giberélico (GA₃). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 9., 2003, Atibaia. Campinas: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2003. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, SP, v. 15, p. 215, 2003.

FERREIRA, G. et al. Germinação de sementes de fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.) de origens diferentes submetidas a tratamentos com ácido giberélico. In: SEMINÁRIO PANAMERICANO DE SEMILLAS, 12., 2000, Montevideo, Uruguay. **Anais...** Montevideo: Sociedade Brasileira de Sementes, 2000b, p. 148.

FERREIRA, G. et al. Germinacion de semillas de atemoya (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.) cv. 'Gefner' bajo diferentes temperaturas y ácido giberélico. In: CONGRESO INTERNACIONAL DE ANONÁCEAS, 3., 2002, Quillota – LaSerena, Chile. **Memorias...** Quillota: Universidade Católica de Val Paraíso, 2002b. p. 16.

FERREIRA, G. et al. Imbibition studies of sugar apple (*Annona squamosa* L.) and atemoya (*A. squamosa* x *A. cherimola* Mill.) seeds. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ANONÁCEAS, 1., 1997, Chapingo, México. **Memorias...** Chapingo: Universidad de Chapingo, 1997. p. 210-224.

FERREIRA, G. et al. Semillas de atemoya (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.) cv. 'Thompson' sometidas a temperaturas y concentraciones de ácido giberélico. In: CONGRESO INTERNACIONAL DE ANONÁCEAS, 3., 2002, Quillota – LaSerena, Chile. **Memorias...** Quillota: Universidade Católica de Val Paraíso, 2002c. p. 16.

FERREIRA, G.; ERIG, P. R.; MORO, E. Uso de ácido giberelico em sementes de fruta-do-conde (*A. squamosa* L.) visando à produção de mudas em diferentes embalagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 24, n. 1, p. 178-182, 2002a.

FERREIRA, G. et al. Germinacion de semillas de *Annona squamosa* L. sometidas a diferentes tiempos y concentraciones de ácido giberélico. In: CONGRESO INTERNACIONAL DE ANONÁCEAS, 2., 1999, Tuxtía Gutiérrez-Chiapas, México. **Memórias...** Tuxtía Gutiérrez: Universidade de Ciencias y Artes Del Estado de Chiapas, 1999. p. 79.

FINKELSTEIN, R. R.; GAMPALA, S. S. L.; ROCK, C. D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. **The Plant Cell**, Rockville, v.14, suppl., p. 15-45, 2002.

FREY, A. et al. Maternal synthesis of abscisic acid control seed development and yeld in *Nicotiana plumbaginifolia*. **Planta**, Berlin, n. 218, p. 958-964, 2004.

GALASTRI, N. A. **Morfoanatomia e ontogênese de frutos e sementes de *Annona dióica* A. ST. -HIL., *Duguetia furfuracea* (A. ST. -HIL.) SAFF. e *Xylopiá emarginata* MART. (ANNONACEAE)**. 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

GAMA, F.; MANICA, I. Propagação. In: MANICA, I. **Cultivo das anonáceas: ata, cherimóia, graviola**. Porto Alegre: Evangraf, 1994. p. 30-37.

GARCIA, I. S. et al. Changes in soluble carbohydrates during storage of *Caesalpineá echinata* LAM. (Brazilwood) seeds, an endangered leguminous tree from the brazilian atlantic forest. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, SP, v. 66, n. 2b, p. 739-745, 2006.

GARELLO, G. et al. Abscisic acid-regulated responses of dormant and non-dormant embryos of *Helianthus annuus*: role of ABA-inducible proteins. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v. 38, p. 473-482, 2000.

GEURTS, F. **Annonaceous fruits**. Amsterdam: Royal Tropical Institute, 1981. 16 p.

GUBLER, F. et al. Dormancy reléase, ABA and pre-harvest sprouting. **Current Opinion in Plant Biology**, London, n. 8, p. 183-187, 2005.

GUTU, L. M. D. **Estudios de germinación de *Annona diversifolia* Safford (*Annonaceae*) variedad blanca (papausa)**. 2010. 94 f. Tese (Licenciado en Biología) – Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, 2010.

HADAS, A. Water uptake and germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solution. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 480-489, 1976.

HERNÁNDEZ, L. V. **La reproducción sexual y multiplicación vegetativa de las anonáceas**. Xalapa: Universidad Veracruzana, 1993. 35 p.

HILHORST, H. W. M. A critical update on seed dormancy. I Primary dormancy. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 5, p. 61-73, 1995.

HILHORST, H. W. M. Are dormant seeds lazy and germinating seeds not? **Seeds: Biology, Development and Ecology**, Lancs, p. 188-194, 2007.

HORCAT, C. H.; LETHAM, D. S. Biosynthesis of cytolinin in germination seeds of *Zea mays*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 233, p. 1525-1528, 1990.

JACOBSEN, J. V.; BEACH, L. R. Control of transcription of α -amilase and rRNA genes in barley aleurone protoplasts by gibberellin and abscisic acid. **Nature**, London, v. 316, p. 275-277, 1985.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo: Nacional, 2002. 286 p.

JUBES, J. T. et al. Efectos de escarificación, medio, posición de siembra y ácido gibberellico, sobre la germinación de semillas em cherimoyas (*Annona cherimola* Mill). **Revista Agronómica**, Argentina, v. 12, n. 1-2, p. 161-171, 1975.

- KARRSEN, C. M. Hormonal regulation of seed development, dormancy, and germination studied by genetic control. In: KIGEL, J; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 333-350.
- KARSSSEN, C. M. et al. Induction of seed dormancy during seed development by endogenous abscisic acid-deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. **Planta**, Berlin, v. 157, p. 158-165, 1983.
- KARUNAGARAN, D.; RAO, P. R. Axial control of protease development in the cotyledons of horse gram (*Macrotyloma uniflorum* Lam) seeds during germination. **Indian Journal of Plant Physiology**, New Delhi, v. 33, p. 232-238, 1990.
- KAUR, S.; GUPTA, A. K.; KAUR, N. Gibberellin A₃ reverses the effect of salt stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedling by enhancing amylase and mobilization of starch in cotyledons. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 26, p. 85-90, 1998.
- KAVATI, R. O. O Cultivo de anonáceas no Estado de São Paulo. In: ENCONTRO DE ANONÁCEAS: GERAÇÃO DE EMPREGO E RENDA, 2004, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP, 2004. p. 39-70.
- KELEN, M. et al. Separation of abscisic acid, indole-3-acetic acid, gibberellic acid in 99 R (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) and rose oil (*Rosa damascene* Mill.) by reversed phase liquid chromatography. **Turkish Journal Chemistry**, Ankara, v. 28, p. 603-610, 2004.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. 452 p.
- KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. 2. ed. New York: Plenum, 1995. 853 p.
- KOORNNEEF, M. et al. Seed dormancy and germination. **Current Opinion Plant Biology**, London, v. 5, p. 33-36, 2002.
- KUCERA, B.; COHN, M. A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research**, Wallingford, n. 15, p. 281-307, 2005.

KUSHIRO, T. et al. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. **EMBO Journal**, Oxford, v. 23, p. 1647-1656, 2004.

LABOURIAU, L. G. **A germinação de sementes**. Washington: Organização dos Estados Americanos, 1983. 174 p.

LIMA, R. B. S. et al. Primary metabolite mobilization during germination in Rosewood (*Aniba roseodora* Ducke) seeds. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 1, p. 19-25, 2008.

LIMA-BRITO, A. et al. Efeito do ácido giberélico (GA₃) na emergência de plântulas de *Annona crassiflora* Mart., *Annona squamosa* L. e *Annona muricata* L. **Magistra**, Cruz das Almas, BA, v. 18, n. 1, p. 27-33, 2006.

LOBO, M. et al. Categorización de la germinación y la latencia en semillas de chirimoya (*Annona cherimola* L.) y guanábana (*Annona muricata* L.), como apoyo a programas de conservación de germoplasma. **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v. 25, n. 2, p. 231-244, 2007.

MAAS, P. J. M. et al. Annonaceae from central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 80, p. 65-98, 2001.

MANIRAKIZA, P. A.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 1, p. 93-100, 2001.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MISCHAN, M. M.; PINHO, S. Z.; CARVALHO, L. R. Determination of a point sufficiently close to the asymptote in no linear growth functions. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 68, n. 1, p. 103-114, 2011.

MORTON, F. J. **Ilama in Fruits of Warm Climates**. Miami: Ed. Media Incorporated, 1987. 85 p.

MÜNTZ, K. et al. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 362, p. 1741-1752, 2001.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. ABA action and interactions in seeds. **Trends in Plant Science**, Oxford, n. 8, p. 213-217, 2003.

NANDI, S. K.; PALNI, L. M. S.; DEKLERK, J. M. The influence of the embryonic axis and cytokinins on reserve mobilization in germinating lupine seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, p. 329-226, 1995.

NIELSEN, S. S.; LIENER, I. E. Degradation of the master storage protein of *Phaseolus vulgaris* during germination. **Plant Physiology**, Washington, DC, v. 74, p. 494-498, 1984.

NONOGAKI, H. et al. Germination – still a mystery. **Plant Science**, Limerick, v. 179, p.574-581, 2010.

OLIVEIRA, M. C. et al. Germinação de sementes de atemóia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) CV. 'Gefner' submetidas a tratamentos com ácido giberélico (GA₃) e ethephon. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 32, n. 2, p. 544-554, 2010.

PARADA, B.; FIDEL, A. Evaluación de diferentes patrones anonáceas en la producción de plantas de anona (*A. diversifolia*) y guanabana (*A. muricata*). In: CONGRESO INTERNACIONAL DE ANONÁCEAS, 4., y CONGRESO NACIONAL DE ANONÁCEAS, 5., 2010, Tuxtla Gutiérrez, México. **Memorias de resúmenes...** Tuxtla Gutierrez: UNICACH, 2010. p. 51.

PAWSHE, Y. H.; PATIL, B. N.; PATIL, L. P. Effect of pregermination seed treatment on the germination and vigour of seedlings in custard apple (*Annona squamosa* L.). **Annals of Plant Physiology**, Ghaziabad, v. 11, n. 2, p. 150-154, 1997.

PENFIELD, S.; GRAHAM, S.; GRAHAM, I. A. Storage reserve mobilization in germinating oilseeds: *Arabidopsis* as a model system. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 33, p. 380-383, 2005.

PENG, J.; HARBERD, N. P. The role of GA –mediated signaling in the control of seed germination. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 376-381, 2002.

PÉREZ, G. M. P. **Estúdio preliminar sobre letargo y germinacion en *Annona diversifolia* SAFF. variedad blanca (papausa)**. 1992. 126 f. Tesis (Licenciado en Biología)-Facultad de Biología, Universidad de Ciências y Artes de Chiapas, UNICACH, Tuxtla Gutiérrez, 1992.

PEREZ-FLORES, L. et al. Expression analyses of GA20-oxidase in embryos from two sorghum lines with contrasting dormancy: possible participation of this gene in the hormonal control of germination. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, n. 129, p. 1912-1920, 2003.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: ESALQ, 2000. 468 p.

PINTO, A. C. Q. et al. ***Annona species***. Southampton: Universidade de Southampton, 2005. 284 p. Disponível em: <http://www.icuc-iwmi.org/files/R7187-Annona%20monograph%202005.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2008.

PINTO, A. C. Q. Influência de hormônios sobre o poder germinativo de sementes de graviola. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 3., 1975, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1976. p. 415-420.

PONTES, C. A. et al. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. (Garapa) durante a embebição. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 26, n. 5, p. 593-601, 2002.

POPENOE, W. The Annonaceous fruits, the cherimoya. In: _____. **Manual of tropical and subtropical fruits**. London: Collier-Macmillan Publishers, 1974. chapter 5, p. 161-189.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2. ed. Brasília: ABEAS, 1985. 289 p.

PRITCHARD, S. L. et al. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 639-647, 2002.

RAMAKRISHNA, V. Mobilization of albumins and globulins during germination of Indian bean (*Dolichos lablab* L. var. *lignosus*) seeds. **Acta Botanica Croatica**, Zagreb, v. 66, n. 2, p. 135-142, 2007.

RAMAKRISHNA, V.; RAO, P. R. Axial control of protein reserve mobilization during germination of Indian bean (*Dolichos lablab* L.) seeds. **Acta Biologica Szegediensis**, Szeged, v. 49, n. 3, p. 23-27, 2005a.

RAMAKRISHNA, V.; RAO, P. R. Purification of acidic protease from the cotyledons of germinating Indian bean (*Dolichos lablab* L. var. *lignosus*) seeds. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 4, n. 7, p. 703-707, 2005b.

RAMAKRISHNA, V.; RAO, P. R. Storage protein degradation in germinating Indian bean (*Dolichos lablab* L. var. *lignosus*) seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, n. 34, p. 161-168, 2006.

RIZZINI, C. T. Dormancy in seeds of *Annona crassiflora* Mart. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 24, n. 78, p. 117-123, 1973.

SANEWSKI, G. M. **Custard apples: cultivation and crop protection**. Brisbane: Queensland Department of Primary Industries, 1991. 103 p.

SCHLERETH, A. et al. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 349, p. 1423-1433, 2000.

SILVA, E. A. A. et al. Germination Ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. **Annals of Botany**, London, v. 99, p. 893-830, 2007.

SILVA, J. B. C.; NAKAGAWA, J. Estudo de fórmulas para cálculos da velocidade de germinação. **Informativo ABRATES**, Brasília, DF, v. 5, n. 1, p. 62-73, 1995.

SMET, S. D. E. et al. Seed structure and germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 497, p. 269-278, 1999.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640 p.

STENZEL, N. M. C. A Cultura da atemóia no Estado do Paraná In: SÃO JOSÉ, R.; SOUZA, I. V. B.; MORAIS, O. M.; REBOLÇAS, T. N. H. **Anonáceas**: produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimólia). Vitória da Conquista, BA: DFZ/UESB, 1997. p. 307-308.

STENZEL, N. M. C.; MURATA, I. M.; NEVES, C. S. V. J. Superação da dormência em sementes de atemóia e fruta-do-conde. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 25, n. 2, p. 305-308, 2003.

STEVENS, W. D. et al. **Flora de Nicaragua**: introducción a Gimnospermas y Angiospermas (*Acanthaceae-Euphorbiaceae*). Missouri: Botanical Garden Press, 2001. Tomo 1, v. 85, 294 p.

SUBEDI, C. K.; BHATTARAI, T. Effect of gibberellic acid on reserve food mobilization of maize (*Zea mays* L. var. Arun-2) endosperm during germination. **Himalayan Journal of Sciences**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 99-102, 2003.

SUDA, C. N. K.; GIORGINI, J. F. Seed composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, SP, v. 12, n. 3, p. 226-245, 2000.

SVOMA, E. Seed morphology and anatomy in some Annonaceae. **Plant Systematics and Evolution**, New York, n. 209, p. 177-204, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 820 p.

TAKAHASHI, N.; PHINNEY, B. O.; MACMILLAN, J. **Gibberellins**. New York: Springer-Verlag, 1991. 426 p.

TOKUNAGA, T. **A cultura da atemóia**. Campinas: CATI, 2000. 80 p. (Boletim Técnico, 233).

TONINI, P. P. et al. Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and endo- β -mannanase activity in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). **Trees**, Berlin, n. 20, p. 669-678, 2006.

UEGUCHI-TANAKA, M. et al. Rice dwarf mutant d1, which is defective in the alpha subunit of the heterotrimeric G protein, affects gibberellin signal transduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 11638-11643, 2000.

VALENZUELA, J. R. C.; OSORIO, J. D. B. Efecto del ácido giberélico y el método de siembra en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de anona colorada (*Annona reticulata* L.). **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín, v. 51, n. 2, p. 235 - 244, 1998.

VIDAL, H. L. **Reproducción sexual y multiplicación vegetativa de las Anonáceas**. Tuxpan, Veracruz: Universidad Veracruzana - Facultad de Ciencias Agrícolas en Fruticultura Tropical, 1993. 29 p. (Publicación Técnica, 3).

VIDAL, L. E. et al. Efecto del ácido giberélico, cloro, agua caliente, sustratos y edad de la semilla en la germinación de la chincuya (*Annona purpurea* Moc & Sessé Ex Dunal). In: CONGRESO NACIONAL DE ANONACEAS, 1., 2000, Chapingo, México. **Memorias...** Chapingo, México: Sociedad Mexicana de Anonáceas, 2000. p. 53-69.

VIDAL-LEZAMA, E. et al. Comportamiento germinativo de semillas de chincuya e ilama bajo condiciones diferentes de almacenamiento. In: CONGRESO NACIONAL DE ANONÁCEAS, 4., 2008, Cuernavaca, Morelos, México. **Memorias...** Cuernavaca: Sociedad Mexicana de Anonáceas, 2008. p. 153-155.

WALKER, M.A. et al. Relationship among cytokinin, ethylene and polyamines during the stratification-germination process in seeds of *Acer saccharum*. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 76, p. 326-332, 1989.

YAMAGUCHI, S. Gibberellin metabolism and its regulation. **Annual Review of Plant Biology**, New York, v. 59, p. 225-251, 2008.

YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y.; SUN, T. P. Distinct cell-specific expression patterns of early and late gibberellin biosynthetic genes during Arabidopsis seed germination. **Plant Journal**, Oxford, v. 28, p. 443-453. 2001.

ZENTELLA, R.; YAMAUCHI, D.; HO, T. H. D. Molecular dissection of the gibberellin/abscisic acid signaling pathways by transiently expressed RNA interference in Barley aleurone cells. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 2289-2301, 2002.