

INSTITUTO DE BIOLÓGICA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
- 0750 -

ANA MARIA VIANA

ORIENTADOR: DR. G. M. FELIPPE

CRESCIMENTO E REPRODUÇÃO DE  
DIOSCOREA COMPOSITA

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE  
BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL  
DE CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO TÍ-  
TULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

CAMPINAS

- 1985 -

Empréstimo Proibido

a Lu, com esperança

aos meus pais, com gratidão

## AGRADECIMENTOS

Ao orientador Dr. G. M. Felipe, com quem compartilhei, com emoção, esta etapa do meu amadurecimento profissional, pela objetividade, estímulo e atenção.

Ao Dr. I. F. M. Válio e as Dras. M. F. Aleixo e R. Sharif, pelas valiosas sugestões e discussões.

Aos pesquisadores da Seção de Raízes e Tubérculos e da Fazenda Experimental de Ubatuba, do Instituto Agronômico de Campinas, pela amizade e apoio técnico para a obtenção de material.

A Dra. Eva Magalhães pelo auxílio na parte de separação e identificação de diosgenina.

Ao Prof. A. C. Gabrielli e a Maria Odete pelo auxílio na parte de anatomia.

A Dulce, Sebastiana, João, Dulcinéia, Sebastião, Pedro e Aribes pela amizade e apoio técnico.

A Universidade Federal de Santa Catarina e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que me auxiliaram na realização deste trabalho.

## ÍNDICE

I	-	INTRODUÇÃO .....	1
		Objetivos .....	9
II	-	MATERIAL E MÉTODOS .....	10
		MATERIAL .....	10
		MÉTODOS .....	12
		Crescimento foliar .....	12
		Condições de germinação e cultivo .....	12
		Crescimento .....	12
		Germinação .....	13
		Viabilidade das sementes .....	13
		Armazenamento das sementes .....	14
		Embebição das sementes .....	15
		Condições de germinação .....	15
		Reguladores de crescimento e CEPA .....	16
		Nitrato de Prata .....	17
		Aminoetoxivinilglicina .....	17
		Enraizamento .....	18
		Condições de enraizamento .....	18
		Métodos gerais .....	18
		Reguladores de crescimento .....	18
		Translocação de IBA e IAA .....	19
		1. Preparação e usos de blocos de agar .....	19
		2. Extração dos reguladores .....	20
		3. Cromatografia sobre camada delgada .....	21
		4. Bioteste de indução de raiz em <u>Phaseolus</u> <u>aureus</u> .....	21

Análise anatômica .....	22
Diosgenina em folhas .....	23
Extração de sapogeninas .....	23
Cromatografia sobre camada delgada .....	23
1. Preparação das cromatoplasmas .....	23
2. Aplicação das amostras .....	24
3. Desenvolvimento e revelação das cromatoplasmas .....	24
4. Separação e identificação da diosgenina ...	25
Dosagem de diosgenina .....	25
Análise estatística .....	26
Crescimento foliar .....	26
Germinação .....	27
Enraizamento .....	27
Dosagem de diosgenina .....	28
III - RESULTADOS .....	29
Crescimento foliar .....	29
Crescimento inicial da plântula .....	29
Crescimento foliar: plantas mantidas em casa de vegetação.....	33
Análise do crescimento foliar .....	35
1. Número e velocidade de aparecimento de folhas .....	41
2. Velocidade de crescimento das folhas..	45
3. Tamanhos máximos atingidos pelas folhas	54
4. Aumento em área e peso seco .....	56

Crescimento foliar: plantas cultivadas em canteiro	58
Análise de crescimento .....	61
1. Número e velocidade de aparecimento das folhas .....	63
2. Velocidade de crescimento das folhas ...	63
3. Comprimentos máximos atingidos pelas fo- lhas .....	66
Germinação .....	66
Determinação da viabilidade das sementes pelo tes- te do tetrazólio .....	66
1. Teste do tetrazólio .....	66
2. Padrões de coloração em embriões isolados ...	69
Embebição de sementes .....	69
Efeito de alas na germinação .....	72
Efeito de temperaturas constantes na germinação .	72
1. Sementes armazenadas por 4 anos .....	72
2. Sementes armazenadas por 5 anos .....	75
3. Sementes recém-coletadas .....	78
Efeito de temperaturas alternadas na germinação .	80
1. Sementes armazenadas por 4 anos .....	82
2. Sementes armazenadas por 5 anos .....	86
Períodos curtos de temperaturas baixa e alta ....	88
Efeito do armazenamento .....	91
1. Temperaturas constantes .....	91
2. Temperaturas alternadas .....	96
3. Períodos curtos de armazenamento .....	98
4. Tipo de armazenamento .....	104
Efeito de reguladores de crescimento, CEPA, AgNO <sub>3</sub> e AVG .....	106

Enraizamento .....	119
Efeito da aplicação de IBA .....	119
Efeito da aplicação de IBA com 6-BA .....	126
Fatores endógenos .....	140
1. Efeito do pulvino e caule .....	140
2. Efeito da redução da área foliar .....	140
3. Efeito da localização da folha no caule ...	143
4. Efeito da presença de gemas florais .....	147
5. Efeito do diâmetro do caule .....	151
Translocação de IAA e IBA .....	154
1. Cromatografia sobre camada delgada .....	157
2. Enraizamento de <u>Phaseolus aureus</u> .....	158
Análise anatômica .....	161
Efeito de 6-BA, GA <sub>3</sub> , IAA e CCC no desenvolvimento de gemas e tubérculos de estacas enraizadas .....	165
/ Diosgenina em folhas .....	165
Separação e dosagem de diosgenina .....	165
Nível de diosgenina .....	171
IV - DISCUSSÃO .....	176
V - RESUMO .....	200
VI - LITERATURA CITADA .....	202

## I - INTRODUÇÃO

As plantas da família Dioscoreaceae distribuem-se pelas regiões tropicais e subtropicais do Velho e do Novo Mundo. O gênero Dioscorea, em particular, apresenta importância especial por abrigar espécies de interesse econômico, comestíveis, ou de valor para a indústria farmacêutica (PAL e SHARMA, 1980). Estudos citogenéticos de várias espécies têm mostrado que a África foi o centro de origem das espécies deste gênero. A presença de diferentes complementos cromossômicos em plantas de áreas geograficamente distantes, sugere que as espécies migraram para oeste e leste com as modificações climáticas ambientais (PAL e SHARMA, 1980).

No Velho Mundo, especialmente na África Ocidental e Ásia, as espécies cultivadas (conhecidas como inhame) em larga escala e amplamente consumidas pela população são Dioscorea alata, D. rotundata, D. cayenensis e D. bulbifera (AYENSU, 1972). Nestes locais, os inhames constituem o elemento alimentar básico e são utilizados também nas principais cerimônias religiosas (SCHUBERT, 1972; ANÔNIMO, 1981).

As principais espécies de interesse farmacêutico são Dioscorea composita, D. floribunda e D. mexicana no México, D. elephantites e D. sylvatica no sul da África, D. deltoidea e D. prazierii, encontradas em grandes altitudes na Índia, sendo todas selvagens (PAL e SHARMA, 1980; AMMIRATO, 1984).

As espécies do gênero Dioscorea, são trepadeiras pe-



renes, que são capazes de regeneração rápida quando podadas, crescendo rapidamente na estação chuvosa. Apresentam tubérculos resistentes ou bulbilhos nas axilas das folhas e o caule com folhas alternas. As inflorescências nascem nas axilas das folhas e as sementes são aladas. A maioria das espécies é dióica. D. composita, em particular, é uma espécie dióica que apresenta tubérculo e caule trepador semi-lenhoso e folhas com lâmina coriácea oval, cortada na base e aguda no ápice (MATUDA, 1954; SCHUBERT, 1972).

Os tubérculos das plantas deste gênero, armazenam nutrientes para garantir a reprodução sexuada e a produção de novas folhas, já que a parte aérea não apresenta porte adequado para isto. Produzem vários caules que se alongam rapidamente, característica importante para vencer a competição em seu habitat natural (JANZEN, 1980). As partes inferiores dos caules, apresentam espinhos que auxiliam na defesa contra ataques de animais. Os tubérculos, além de permanecerem enterrados, acumulam, em muitas espécies, compostos secundários em quantidades variáveis, que fazem sua defesa química (COURSEY, 1967; JANZEN, 1980). Estes compostos secundários, têm aplicações em indústrias farmacêuticas e podem ser alcalóides, taninos e saponinas. Os taninos ocorrem em poucas espécies e até 1977 algumas delas eram cultivadas na Tailândia para utilização no curtume de couro ou de redes de pesca. Os alcalóides, também são de distribuição restrita e altamente venenosos, provocando paralisia do sistema nervoso central. As saponinas são os compostos secundários de maior ocorrência e mais importantes do ponto de vista econômico (COURSEY, 1967).

A saponina é um glicosídeo que consiste de um resi-

duo de açúcar (uma ou mais unidades de glicose, galactose e etc...) ligadas a um complexo de anéis com 27 a 31 átomos de carbono através de uma molécula de oxigênio. A hidrólise deste composto libera o açúcar e um álcool policíclico que é a sapogenina. As sapogeninas podem ser agrupadas em agliconas triterpenóides, com estruturas com 30 e 31 átomos de C e em agliconas esteroidais com estrutura com 27 átomos de carbono. Todas as sapogeninas importantes dos inhames são de natureza esteroidal, por apresentarem o mesmo tipo de estrutura que o composto ciclopentanoperidofenantreno. A estrutura molecular das sapogeninas, facilita a formação de isômeros como a verificada entre iamogenina e diosgenina (COURSEY, 1967).

O interesse pelo estudo das sapogeninas esteroidais, iniciou-se na década de 40, quando se descobriu a interrelação estrutural entre estas substâncias e as secretadas pelas glândulas sexuais e suprarenais, ou seja os hormônios sexuais e/corticóides (COURSEY, 1967). Os hormônios corticóides são utilizados no tratamento de processos inflamatórios, e os sexuais modificados formam a base para a síntese de anti-concepcionais.

Em 1904, foi isolada no Japão a dioscina ( $C_{45}H_{70}O_{16}$ ), que por hidrólise produz uma molécula de glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) e duas moléculas de ranhose ( $C_6H_{12}O_5$ ) e a sapogenina  $C_{12}H_{42}O_3$  (diosgenina), mas apenas em 1936-37, os japoneses obtiveram a aglicona e caracterizaram-na como um esteróide. Coube a Marker a elucidação completa de sua estrutura (MORS e SHARAPIN, 1973). Marker e col. observaram que a diosgenina continha uma dupla ligação em seu núcleo, o que a tornava o composto ideal para aplicação das mesmas reações aplicadas a outras sa-

pogeninas esteroidais para remoção de sua cadeia lateral, levando aos derivados da série pregnano e androstano através de processo simples (MARKER et al., 1940 a, b). Até então, MARKER e colaboradores haviam feito as primeiras transformações, com sapogenina extraída de liliáceas do gênero Smilax, mas esta apresentava o inconveniente de não se encontrar disponível em grande quantidade e por sua molécula ser altamente saturada, dificultando a síntese (MORS e SHARAPIN, 1973).

Após a elucidação da estrutura das sapogeninas esteroidais e da demonstração da transformação destas em hormônios sexuais, começou a procura de sapogeninas oxigenadas na posição 11 para a síntese de hormônios corticóides (MARKER et al., 1947). A diosgenina não apresenta esta característica, mas em 1951-52 foi descoberto que certos microrganismos como Rhizopus arrhizus, R. nigricans, Aspergillus niger e espécies de Streptomyces eram capazes de introduzir o grupo hidroxí na posição 11, tornando a diosgenina um material altamente adequado para a síntese de drogas do tipo dos corticosteróides (COURSEY, 1967).

A procura por fontes naturais de sapogeninas esteroidais, especialmente diosgenina, levou à descoberta de muitas espécies interessantes e de muitos tipos de sapogeninas. Estas foram detectadas em numerosas espécies dos gêneros Agave, Yucca, Smilax. A diosgenina contudo, foi a sapogenina esteroidal mais comum presente em 43 espécies analisadas predominantemente entre as Dioscorea (MARKER et al., 1943 a, b). Os pesquisadores americanos concluíram que todas as Dioscorea do México analisadas (24 espécies) continham diosgenina em quantidade variando de 1,5 a 5% do peso seco do tubércu

lo (MARKER et al. 1943a).

Devido à abundância, Dioscorea mexicana, D. floribunda e D. composita foram as mais exploradas. Em D. composita, a quantidade de diosgenina detectada por MARKER et al. (1943a) foi de 3% do peso seco do tubérculo. Em 1965, Cruzado et al. detectaram 13% do peso seco (MARTIN , 1969). Segundo COURSEY (1967) essa diferença no nível de diosgenina, poderia ser devida a diferentes métodos de quantificação, mas PAL e SHARMA (1980) mostraram que D. composita é uma espécie poliploide, havendo populações com  $2n = 30, 36$  ou  $54$  cromossomos o que explicaria níveis tão diferentes desta substância.

Na década de 1960 o México tornou-se o primeiro país exportador de hormônios esteroidais e até dez anos atrás, era o maior produtor de diosgenina. Outros produtores eram a Guatemala, Porto Rico, Índia e República Popular da China. Até 1976, dois terços dos hormônios esteroidais eram feitos a partir de diosgenina, mas a intensa exploração das matas já indicava uma escassez desta matéria prima, devido à ausência do cultivo em larga escala (RIZZINI e MORS, 1976). Atualmente as populações naturais de Dioscorea produtoras de saponinas estão ameaçadas de extinção. Em vista disso, outras fontes alternativas de diosgenina e outras matérias primas menos apropriadas, mas mais abundantes como o estigmasterol, sitosterol e hecogenina são convertidas em esteróides (AMMIRATO, 1984). O estigmasterol e o sitosterol são menos interessantes do que a diosgenina, do ponto de vista químico (RIZZINI e MORS 1976). A hecogenina é obtida das fibras do sisal e é utilizada pelos laboratórios britânicos. Apesar de possuir todos os requisitos químicos para a síntese de hormônios corticóides sua

molécula, por ser muito saturada, exige etapas adicionais de pouco rendimento para a síntese de hormônios sexuais, o que faz com que prevaleça a preferência por diosgenina. Segundo MORS e SHARAPIN (1973) o uso desta substância pelos fabricantes, certamente está relacionado com a manutenção da tecnologia alternativa, caso falhe a diosgenina.

No Brasil, as espécies de Dioscorea analisadas não apresentam níveis elevados de diosgenina e o país, em 1980, importou 8 milhões de dólares em hormônios esteroidais segundo dados da Cacex (VARANDA, 1984), apesar de demonstrada a viabilidade ou obtenção de hecogenina a partir do sisal (RIZZINI e MORS, 1976). Outras espécies apresentam potencial para fornecimento de sapogeninas esteroidais como a Yucca gloriosa, mas a quantidade máxima obtida é de 0,9% do peso seco foliar (VARANDA, 1984). Estudos sobre Dioscorea composita, mostraram a viabilidade de seu cultivo em Porto Rico (MARTIN et al., 1966) e no litoral norte do Estado de São Paulo (DOMINGOS MONTEIRO, comunicação pessoal), o que indica que esta espécie apresenta potencial de cultivo.

O cultivo em larga escala das espécies de Dioscorea tanto comestíveis como medicinais, possuidoras de tubérculos têm apresentado problemas comuns. Por serem plantas trepadeiras a maior produtividade ocorre quando estas são tutoradas, já que esta característica assegura melhor competição com ervas daninhas (Cruzado et al., 1964a; Janzen, 1980). As plantas são perenes e no caso de D. composita devem ser mantidas no campo por períodos de três anos acumulando grande quantidade de material na parte aérea, o que indica que o tutoramento deve ser feito com material resistente (CRUZADO et al., 1964a; MARTIN e GASKINS, 1968). Outros suportes de durabilidade inter-

mediária como bambu poderiam ser usados, mas teriam que ser substituídos regularmente. Os tubérculos atingem tamanho razoável o que dificulta a colheita. Os maiores custos verificados durante o cultivo relacionam-se com o tutoramento da parte aérea e o principal problema agrônomico a ser resolvido é a coleta dos tubérculos. Com relação ao ataque por pestes, as Dioscorea que produzem sapogeninas não são tão atacadas (MARTIN et al.; 1966, MARTIN e GASKINS, 1968).

A variação do conteúdo de sapogeninas entre os clones exige métodos rápidos de propagação vegetativa para o desenvolvimento de indivíduos que produzam alta quantidade de diosgenina (PRESTON e HAUN, 1962). Os métodos de propagação disponíveis para as Dioscorea que produzem tubérculos também surgem como um fator limitante para o cultivo em larga escala (ANÔNIMO, 1981). Nestes casos são necessárias quantidades imensas de pedaços de tubérculos para se obter um número relativamente pequeno de plantas, pois estes apresentam gemas pré formadas apenas na parte superior, que origina os ramos aéreos. A região do tubérculo imediatamente inferior à região das gemas, apresenta restos de tecido merismático com potencial de formação de gemas, mas o processo é mais lento. A região inferior do tubérculo não apresenta potencial de regeneração e é desprezada (COURSEY, 1967; MARTIN, 1972). Desta forma, o brotamento não é sincronizado, o que implica no surgimento de plantas não uniformes (MARTIN e GASKINS, 1968) e o ataque por fungos ou insetos contribui para diminuir o número de tubérculos viáveis (MARTIN, 1972).

Os poucos trabalhos sobre a propagação vegetativa por estacas, indicam que para algumas espécies como Dioscorea flo

ribunda, D. alata, D. rotundata, D. dumentorum, D. spiculiflora e D. belizensis o enraizamento pode ocorrer na ausência de reguladores de crescimento (PRESTON e HAUN, 1962; BLUNDEN et al., 1966; COURSEY, 1967). Para outras espécies como D. esculenta, D. trifida, D. deltoidea, D. sylvatica, o enraizamento é problemático e às vezes impossível (BLUNDEN et al., 1966; CABANILLAS e MARTIN, 1978; ZAAG e FOX, 1981). No caso de Dioscorea composita, a máxima porcentagem de enraizamento obtida com o auxílio de Rootone F é de 43% e a taxa de obtenção de plantas completas é ainda menor (MARTIN e DELPIN, 1969).

São poucos os estudos sobre a propagação por sementes de espécies de Dioscorea produtoras de sapogeninas. No caso de D. composita as informações existentes são de que a germinação ocorre de duas a três semanas após a semeadura, sendo a luz a melhor condição. A germinação de sementes velhas é mais rápida e estas podem ser armazenadas por três anos ou mais em refrigerador (CRUZADO et al., 1964b ; MARTIN e GASKINS, 1968).

PAL e SHARMA (1980) sugerem que certos problemas relacionados com o cultivo, poderiam ser resolvidos através de um programa de melhoramento genético. Assim, a hibridização, entre espécies comestíveis, que se reproduzem por bulbilhos, e espécies produtoras de sapogeninas, poderia assegurar o fornecimento de híbridos que produziriam alta quantidade de diosgenina e se propagariam por bulbilhos ao invés de grandes tubérculos.

## OBJETIVOS

A opção pelo estudo de Dioscorea composita foi devida à importância e à viabilidade do cultivo desta espécie no Brasil, além do fato de ser uma espécie ameaçada de extinção.

Esse trabalho teve como objetivos, a investigação sobre o crescimento inicial, germinação, enraizamento de estacas e sobre o nível de diosgenina na parte aérea, no sentido de se obter informações úteis para o cultivo e ampliar o conhecimento sobre os vários aspectos da fisiologia de uma espécie produtora de sapogeninas.

Pretendeu-se desenvolver metodologia para determinação da viabilidade e das condições ótimas de armazenamento e germinação das sementes. O estudo sobre a propagação vegetativa por estacas foi realizado com o objetivo de se determinar as condições ótimas que assegurem alta taxa de enraizamento e de produção de novas plantas. A determinação da quantidade de diosgenina na parte aérea foi realizada visando verificar o potencial de aproveitamento anual da parte aérea da planta, o que minimizaria os custos com o tutoramento.



## II - MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAL

Sementes de Dioscorea composita Hemsl. foram obtidas através da Seção de Raízes e Tubérculos do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), da Fazenda Experimental de Ubatuba e também da Universidade Federal da Paraíba. As plântulas obtidas após a germinação eram mantidas em casa de vegetação e a seguir transplantadas para canteiros, no Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas. Estas plantas foram utilizadas nos experimentos de crescimento foliar, enraizamento, dosagem de diosgenina, além de fornecerem sementes para os experimentos de germinação. Foram utilizadas plântulas de Phaseolus aureus em biotestes.

Para todos os experimentos de enraizamento, exceto quando especificado, foram utilizadas estacas vegetativas do terço médio dos caules com 0,1-0,2 cm de diâmetro, obtidas de plantas de D. composita com aproximadamente 1 ano, crescidas em condições naturais no canteiro do Depto. de Fisiologia Vegetal da UNICAMP. Os caules eram seccionados na base e separados em três partes. A parte superior, contendo folhas não completamente expandidas, em geral menores que 6 cm de comprimento, era desprezada, assim como a parte basal do caule próxima ao 10º nó. Este critério foi adotado com base nos resultados da análise de crescimento (ver resultados).

As estacas constavam de meia lâmina foliar, pecíolo, pulvino e 1 cm de caule de cada lado do pecíolo. No caso dos

experimentos realizados com o objetivo de verificar o efeito da redução da área foliar, metade da lâmina foliar foi removida, (corte transversal). Estacas com pulvino mas sem caule ou sem pulvino, foram também utilizadas em alguns experimentos. Para os experimentos cujo objetivo era verificar o efeito da localização da folha no caule, foram utilizadas estacas das porções basal (folhas em geral maiores que 10 cm, completamente expandidas), média (folhas em geral com 8-9 cm, completamente expandidas), e superior (folhas menores que 6 cm não expandidas completamente), com lâminas foliares intactas.

Estacas com gemas florais desenvolvidas foram também utilizadas. Neste caso, as estacas foram divididas em dois grupos: um com gemas florais menores que 1,5 cm e outro com gemas florais maiores que 1,5 cm. Em alguns tratamentos as gemas florais foram removidas.

Os experimentos para verificar o efeito do diâmetro do caule foram realizados com estacas de caules de mesma idade fisiológica, obtidos a partir de tubérculos com aproximadamente 1 e 2 anos de idade, e com 0,2 e 0,5 cm de diâmetro, respectivamente.

Para os experimentos de dosagem de diosgenina as folhas completamente expandidas do terço médio dos caules, foram coletadas em dois períodos: outono-inverno, época em que o crescimento é lento (MARTIN e GASKINS, 1968) e as plantas estão em estágio reprodutivo, e primavera-verão, época em que o crescimento é acentuado.

## MÉTODOS

### Crescimento foliar

#### Condições de germinação e cultivo

Sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri em câmara com temperatura constante de 25°C. As plântulas obtidas foram plantadas em vasos contendo solo e mantidas em casa de vegetação por três meses. Após este período foram replantadas em canteiros em condições naturais. Os experimentos foram conduzidos durante o período outubro-fevereiro.

#### Crescimento

Os comprimentos da nervura principal do limbo foram medidos diariamente, na primeira fase do crescimento (21 plantas), ou semanalmente quando as plantas estavam em canteiros (11 plantas). As medidas das folhas foram iniciadas dez dias após a germinação, devendo-se levar em conta este fato na avaliação da idade real das plantas analisadas.

Para determinação do peso seco procedeu-se à dissecação das plantas, sendo que as várias partes das mesmas foram mantidas a 85°C por 48 horas, após o que efetuaram-se as pesagens. Neste caso, as épocas de coleta correspondem à idade da planta.

A área foliar, para cada período analisado, foi de-

terminada através do desenho do contorno das folhas em papel, recorte, pesagem e leitura em gráfico obtido a partir de pesagens de pedaços de papel de áreas conhecidas.

Os desenhos dos vários estádios de desenvolvimento das plântulas, foram realizados com o auxílio de microscópio estereoscópico Wild M3 e câmara clara PZ0 MWR2.

### Germinação

#### Viabilidade das sementes

A viabilidade foi verificada através do teste do cloreto de 2, 3, 5-trifeniltetrazólio (DELOUCHE et al., 1962). Em todos os experimentos foram utilizados 5 lotes de 25 sementes. A remoção das lâminas de endosperma foi realizada com sementes não embebidas ou embebidas em água destilada por um período de 24 horas, em placa de Petri. Assim, a facilidade da remoção das lâminas foi verificada após a embebição das sementes ou não. O teste de tetrazólio foi realizado com sementes intactas, seccionadas transversalmente pelo meio e com embriões isolados. As sementes intactas foram colocadas em soluções de tetrazólio a 0,1, 0,5 e 1% e mantidas por 24 e 48 horas, em estufa a 37°C sob escuro. No segundo caso, as sementes intactas permaneceram embebendo por 24 horas sob luz a 25°C antes de serem seccionadas transversalmente. Em seguida, as metades contendo o embrião foram colocadas em solução de tetrazólio 0,1 e 1% e mantidas por 12 e 24 horas a 37°C sob escuro. Em ambos os casos os embriões foram removidos das sementes e examinados sob microscópio estereoscópico. Para os

experimentos com embriões isolados as sementes foram embebidas em água destilada, por períodos de 24 horas a 8 dias, sob luz, a 25°C. Após os diferentes períodos, as sementes foram seccionadas e os embriões retirados; estes foram colocados em tubos de ensaio contendo 2 ml de solução de tetrazólio a 0,1%. Os tubos de ensaio foram fechados com papel "Magipack", envoltos em papel alumínio e mantidos em estufa a 37°C por 24 horas. Após este período os embriões foram lavados e observados sob microscópio estereoscópico. De acordo com critérios utilizados por DELOUCHE *et al.* (1962), foram considerados não germináveis embriões com radícula não corada, com mais da metade do tecido cotiledonar não corada ou com cotilédone completamente incolor. Com o auxílio de uma câmara clara PZO MWR2 foram feitos esquemas dos embriões e seus respectivos padrões de coloração observados.

#### Armazenamento das sementes

As sementes foram armazenadas em saco de papel, em temperatura ao redor de 25°C, por diferentes períodos (até 4 anos) ou em frasco de vidro fechado a 4°C. As sementes utilizadas nos experimentos foram:

1. recém-coletadas, mantidas em saco de papel, a 25°C.
2. armazenadas até 4 anos em sacos de papel a 25°C.
3. armazenadas por 4 anos em saco de papel a 25°C e um ano a 4°C em vidro fechado.
4. armazenadas por 9 meses a 4°C em frasco de vidro.

### Embebição das sementes

Lotes de 30 sementes foram pesados e a seguir colocados em placas de Petri sobre papel de filtro umedecido com água destilada. As placas foram mantidas a 25°C, sob luz branca ou escuro. A condição de escuro foi conseguida colocando-se as placas em sacos de plástico preto. As sementes permaneceram embebendo por períodos de 1 hora até 12 dias. A cada período, as sementes de cada lote eram secas em papel de filtro e pesadas. Foram utilizadas 5 repetições por período de embebição analisado. A porcentagem de embebição das sementes foi calculada através da fórmula:

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

Os lotes mantidos em luz foram, após a determinação do peso final, colocados em estufa a 85°C por 24 horas para determinação do peso seco.

Para a determinação do teor de umidade, lotes de 20 sementes (4 repetições) foram pesados e em seguida colocados em estufa a 85°C por 24 horas, após o que eram novamente pesados. O cálculo do teor de umidade foi feito através da fórmula:

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

### Condições de germinação

As sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri de 9 cm de diâmetro sobre papel de filtro umedecido, com 5 ml de solução aquosa de Nystatin  $0,02 \text{ mg.ml}^{-1}$ . As placas foram mantidas em câmara de germinação "Forma Scientific" modelo 24, sob luz fluorescente branca de  $320 \mu\text{W cm}^{-2}$  de irradiação (MARCONDES-FERREIRA e FELIPPE, 1984) ou escuro constantes. A temperatura utilizada foi a de  $25^{\circ}\text{C}$ , a não ser nos experimentos em que o efeito de temperatura foi estudado. As temperaturas constantes testadas foram de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e  $45^{\circ}\text{C}$  e as alternadas, 5-25, 10-25, 15-25, 30-25, 35-25, 40-25 e  $45-25^{\circ}\text{C}$ , em ciclos de 12 horas de acordo com a metodologia de FELIPPE (1978). Os experimentos eram sempre iniciados com a temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ . A duração dos experimentos variou de acordo com o lote de sementes utilizado. As contagens do número de sementes germinadas foram feitas em dias alternados.

Em alguns experimentos, sementes recém coletadas e armazenadas em temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  por 5 e 10 meses foram embebidas em água destilada a  $25^{\circ}\text{C}$  sob luz e escuro por 24 horas. A seguir as placas (previamente em luz ou escuro) foram colocadas em sacos plásticos pretos a  $4^{\circ}\text{C}$  (choque de temperatura baixa) ou a  $35^{\circ}\text{C}$  (choque de temperatura alta) por períodos de 5 e 10 dias. Após estes períodos as placas foram transferidas para câmara de germinação a  $25^{\circ}\text{C}$  em luz ou escuro, para se observar a germinação.

Reguladores de crescimento e CEPA

Nos experimentos com reguladores de crescimento e â

cido 2-cloroetilfosfônico (CEPA) que libera etileno (ABELES, 1973) as sementes foram embebidas em água destilada por 24 horas a 25°C em luz e escuro. Após este período, foram transferidas para placas de Petri contendo soluções aquosas de 6-benziladenina (6BA) nas concentrações de 25 e 50 mg.l<sup>-1</sup>, de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) a 180 e 360 mg.l<sup>-1</sup> e de ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA) a 0,75, 1,5, 3, 6, 12 e 24 µl.l<sup>-1</sup>.

#### Nitrato de prata

Em alguns experimentos foi utilizada solução aquosa de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), que inibe a ação do etileno endógeno (BEYER Jr. 1976, 1979). Neste caso as sementes eram mantidas em escuro, por 24 horas, a 25°C em placas de Petri, sobre papel de filtro umedecido com soluções de AgNO<sub>3</sub> nas concentrações de 62,5, 125, 250 e 500 mg.l<sup>-1</sup>. Em seguida eram transferidas para placas de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada e mantidas a 25°C sob luz ou escuro.

#### Aminoetoxivinilglicina

Foi também utilizada solução aquosa de aminoetoxivinilglicina (AVG) que inibe a síntese de etileno (YANG, 1985). Neste caso as sementes eram mantidas a 25°C por 24 horas, em luz branca e escuro, em solução aquosa de AVG nas concentrações de 10 mM e somente em luz branca na concentração de 20 mM. Em seguida eram lavadas, colocadas em placas de Petri, sobre papel de filtro umedecido com água destilada e mantidas a 25°C em luz.



## Enraizamento

### Condições de enraizamento

### Métodos Gerais

Os caules eram coletados momentos antes do início dos experimentos e colocados em bandeja com água onde eram seccionados. As estacas obtidas, após o tratamento com ácido indolil-3-butírico (IBA) eram colocadas em bandejas de plástico contendo vermiculita lavada e umedecida. Estacas não tratadas com IBA foram utilizadas como controle. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, permanecendo sob sistema de nebulização que assegurava umidade relativa do ar de 50%.

A avaliação dos experimentos foi feita através da contagem, em períodos de 10 dias, do número de estacas vivas no momento de contagem, número de estacas que formaram calos, número de estacas sem calos e número de estacas enraizadas. Foram utilizadas no mínimo 10 estacas por tratamento.

As estacas enraizadas eram plantadas em vasos contendo solo e mantidas sob sistema de nebulização. Após uma semana eram submetidas aos vários tratamentos com reguladores de crescimento para indução do brotamento da gema e desenvolvimento do tubérculo, eventos necessários para o estabelecimento da nova planta.

### Reguladores de crescimento

O IBA foi misturado com talco, de modo a prover con

centrações de 2,5 a 20  $\text{mg.g}^{-1}$ . Em todos os experimentos, exceto os realizados para testar as concentrações efetivas, foi utilizado IBA na concentração de 10  $\text{mg.g}^{-1}$ . As superfícies dos caules, pulvinos e pecíolos (no caso dos experimentos em que o caule ou caule e pulvino eram removidos) eram umedecidas e a seguir colocadas em contato com a mistura contendo o regulador.

No caso dos experimentos, para verificar o efeito do 6-BA na senescência, esta foi aplicada em forma de solução aquosa na concentração de 22,5  $\text{mg.l}^{-1}$  através de pulverizações foliares. Dependendo do experimento, as aplicações de 6-BA eram feitas em dias alternados, sendo iniciadas no dia da montagem do mesmo. No caso dos experimentos em que se pretendia verificar o efeito da aplicação tardia de 6-BA, as aplicações iniciaram-se uma, duas ou três semanas após o início dos experimentos e também eram feitas em dias alternados.

Nos experimentos para indução do desenvolvimento de gema e/ou tubérculo em estacas já enraizadas foram realizadas duas pulverizações semanais, num período de 60 dias, de ácido indolil-3-acético (IAA) na concentração de 50  $\text{mg.l}^{-1}$ , de  $\text{GA}_3$  na concentração de 200  $\text{mg.l}^{-1}$ , de cloreto de 2-cloroetiltrimetilamônio (CCC), na concentração de 1000  $\text{mg.l}^{-1}$  e 6-BA 50  $\text{mg.l}^{-1}$  conforme metodologia de MCDAVID e ALAMU (1980).

Foram utilizadas, em todos os casos, soluções aquosas dos respectivos reguladores e Extravon 50 (0,1  $\text{ml.l}^{-1}$ ) como agente espalhante.

#### Translocação de IBA e de IAA

##### 1. Preparação e uso de blocos de agar

A metodologia adotada para estes experimentos foi baseada na descrita por MITCHELL e LIVINGSTON (1968). Blocos de agar a 1% com 2 mm de espessura e contendo AIA e IBA na concentração de 0,1%, foram cortados com o auxílio de furadores de rolhas de 0,2 e 0,5 cm de diâmetro e colocados sobre lâminas de vidro de microscópio, ou placas de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada.

As faces basais dos segmentos de caules recém coletados, com 0,3 mm de comprimento e com 0,2 ou 0,5 cm de diâmetro, eram colocadas em contato com os blocos doadores, enquanto que as faces apicais eram colocadas em contato com blocos de agar que não continham reguladores. O controle foi montado utilizando-se blocos doadores e receptores que não continham reguladores de crescimento em contato com os segmentos de caule. Lotes de 20 blocos com IBA e IAA foram separados e guardados em vidro no congelador. Foram montados 20 segmentos por placa. As placas de Petri eram fechadas com papel "Magi-pack" para evitar evaporação e eram mantidas em câmaras com luz contínua a 25°C, por 24 horas. As placas com tratamentos com o IAA eram envolvidas em papel alumínio. Após este período os blocos receptores e doadores eram coletados, colocados em vidros e mantidos em congelador para posterior extração.

## 2. Extração dos reguladores

Lotes de 20 blocos eram macerados em 3 ml de etanol em almofariz e a mistura centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante coletado era colocado em frasco de vidro e seu volume reduzido para aproximadamente 0,5 ml com auxílio

de ventilador, sendo utilizado para cromatografia e bioteste de indução de raiz em hipocótilo de Phaseolus aureus.

### 3. Cromatografia sobre camada delgada

Sobre placas de vidro de dimensões de 20 x 20 cm es-  
palhou-se uma camada de 0,5 mm de suspensão de silicagel G  
(Typ 60, Merk) na proporção de 1:2 (g de sílica:ml de água des-  
tilada). A seguir as placas foram expostas ao ar para seca-  
gem e ativadas por 30 minutos em estufa a 100°C.

Aliquotas de 50 µl do sobrenadante contendo IAA e  
IBA de soluções padrão dos respectivos reguladores, foram a-  
plicadas sobre as cromatoplasas com o auxílio de capilares de  
vidro. As aplicações foram feitas 2,5 cm acima do bordo infe-  
rior da placa.

Após a aplicação, as cromatoplasas foram colocadas  
em cubas de vidro fechadas e contendo os sistemas de solventes  
butanol : metanol : água (8:4:1) v/v (RANDI, 1980) ou clorofór-  
mio : acetato de etila : ácido acético (60:40:45) v/v (ZEEVART,  
1966). O desenvolvimento foi ascendente por percurso de 16 cm  
a partir do ponto de aplicação e realizou-se em temperatura am-  
biente de 25°C.

Após o desenvolvimento, as placas foram expostas ao  
ar, para secagem, pulverizadas com reagente de Salkowsky (EHMANN,  
1977) e aquecidas por 5 minutos a 100°C.

### 4. Bioteste de indução de raiz em Phaseolus aureus

O bioteste utilizado foi baseado no descrito por

MITCHELL e LIVINGSTON (1968) como método para cofator de enraizamento com duas modificações: ao invés de IAA foi testado IBA e o controle foi realizado com água.

Nos frascos contendo aproximadamente 0,5 ml de sobrenadante foram adicionados 5 ml de água destilada. A seguir, os cotilédones e o sistema radicular de plantas de Phaseolus aureus com 10 dias de idade eram removidos e as estacas contendo as folhas colocadas em contato com as soluções. Foram também usadas soluções de IBA de  $20 \text{ mg.l}^{-1}$  para testar a sensibilidade do material a este regulador de crescimento. Os vidros eram fechados com papel "Magipack" e mantidos em câmara com luz contínua a  $25^{\circ}\text{C}$  por 6 dias. Após este período foi contado o número de raízes em cada estaca. Foram utilizadas 10 estacas por tratamento.

#### Análise anatômica.

Segmento de estacas do controle ou tratadas com IBA, contendo púlvino e caule, com calo ou com raízes, foram fixadas em FAA 50 (50 ml de etanol 95%, 5 ml de ácido acético glacial, 10 ml de formol e 35 ml de água destilada) e a seguir desidratados e submetidos à infiltração de parafina seguindo procedimento descrito por JOHANSEN (1940). Os segmentos foram seccionados com  $12 \mu\text{m}$  de espessura nos sentidos transversal ou longitudinal. A coloração foi feita com safranina por 5 minutos e com "alcian blue" por 3 minutos (ANTONIO CARLOS GABRIELLI, comunicação pessoal) com safranina e "fast green" (JOHANSEN, 1940). As fotomicrografias foram tiradas em fotomicroscópio marca Zeiss 2.

## Diosgenina em folhas

### Extração de sapogeninas

As folhas foram secas por 16 horas em estufa a 65°C com circulação forçada de ar (BLUNDEN et al., 1968). Após este período, foram moídas em moinho de bola por aproximadamente dois minutos. O pó das folhas (8 g ) foi envolto em papel de filtro e colocado em Soxhlet para extração com clorofórmio até remoção completa dos pigmentos (BLUNDEN et al., 1981) (aproximadamente 36 horas). O resíduo foi colocado em 100 ml de água destilada e mantido sob agitação em temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida adicionou-se ácido clorídrico (HCl) concentrado a esta suspensão, de modo a se obter uma solução aquosa 2N. A suspensão em solução aquosa ácida foi deixada por 2 horas sob refluxo, para a hidrólise das saponinas. O material insolúvel na solução aquosa ácida, foi separado por filtração e lavado alternadamente com água e solução de hidróxido de amônio até pH neutro. Em seguida, o resíduo foi colocado em estufa a 65°C para secagem e depois novamente extraído com clorofórmio em Soxhlet por 6 horas para remoção das sapogeninas livres. Após evaporação do clorofórmio em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obteve-se o extrato clorofórmico contendo as sapogeninas livres.

### Cromatografia sobre camada delgada

#### 1. Preparação das cromatoplasacas

Sobre placas de vidro de dimensões de 20 x 20 cm ou

10 x 20 cm foram espalhadas camadas de silicagel G (Typ 60, Merck) de espessuras de 250  $\mu$ , 500  $\mu$  e 1000  $\mu$ , na proporção de 1:2 (g. de silicagel : ml de água destilada). As placas foram expostas ao ar para secagem e a seguir eram desenvolvidas em diclorometano : metanol 98 : 2 (v/v) para remoção de impurezas da sílica.

## 2. Aplicação das amostras.

Alíquotas de solução de diosgenina padrão em clorofórmio (10 mg.ml<sup>-1</sup>) variando de 10-60  $\mu$ l foram aplicadas sobre as cromatoplasas 2,5 cm acima dos bordos inferiores das mesmas, com o auxílio de microseringas.

O extrato contendo as sapogeninas foi ressuspenso em 3 ml de clorofórmio e alíquotas de 25  $\mu$ l foram aplicadas sobre as cromatoplasas do mesmo tempo que uma alíquota do padrão. As manchas das aplicações não ultrapassaram 0,5 cm de diâmetro.

No caso da cromatografia sobre camada delgada preparativa, a aplicação foi realizada com o auxílio de uma pipeta Pasteur com um filete de algodão na extremidade.

## 3. Desenvolvimento e revelação das cromatoplasas

Após a aplicação as cromatoplasas foram colocadas em cubas de vidro fechadas, saturadas e contendo diclorometano : metanol 98 : 2 (v/v) (EVA MAGALHÃES, comunicação pessoal) para o desenvolvimento ascendente por 16 cm em temperatura ambiente. Após o desenvolvimento as placas foram expostas ao ar para secagem e reveladas com vapor d'água, baseado no método

BLUNDEN et al. (1981), por período suficiente para o aparecimento das manchas hidrófobas, ou foram pulverizadas com ácido clorosulfônico : ácido acético 1 : 3 (v/v), seguido de aquecimento a 100°C por 2 minutos e observação sob luz ultravioleta de onda curta (ELMUNAJJED et al., 1965).

#### 4. Separação e identificação da diosgenina.

A faixa hidrófoba da placa preparativa em que foi aplicado extrato de folhas, de localização correspondente à da diosgenina padrão, foi eluída em clorofórmio por 2 horas. O eluato foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante evaporado completamente em evaporador rotatório. O material cristalizado foi dissolvido em clorofórmio e procedeu-se à identificação através do espectro de ressonância magnética nuclear protônica 100 MHz em aparelho Varian modelo XL-100.

Este mesmo material também foi recromatografado puro ou misturado com padrão através de cromatografia sobre camada delgada analítica, utilizando-se placas de silicagel de 250 µm de espessura e desenvolvimento ascendente em diclorometano : metanol 98:2 (v/v) e clorofórmio. Neste último caso, as placas foram desenvolvidas duas vezes na mesma direção ou em direções diferentes, mas sempre em hexano : acetato de etila 4:1 (v/v) na primeira vez e clorofórmio na segunda (BLUNDEN et al., 1968).

#### Dosagem de diosgenina

A dosagem da diosgenina foi realizada segundo o mé-



todo colorimétrico desenvolvido por NOWAK et al. (1980) que envolve a adição de 3 ml de mistura de ácido sulfúrico e etanol 1:1 (v/v) a 1 ml da solução em etanol contendo a diosgenina, seguida de aquecimento a 60°C em banho maria por 30 minutos, resfriamento por 5 minutos e leitura a 495 nm, em espectrofotômetro Micronal modelo B-280.

Para as curvas padrão de diosgenina não cromatografada e de diosgenina eluída, foram utilizadas concentrações variando de 100-600 µg/ml. No caso do padrão cromatografado foram utilizadas 2 repetições para cada concentração e no caso da diosgenina não cromatografada e dos extratos 3 repetições por tratamento.

#### Análise estatística

##### Crescimento foliar

As velocidades de crescimento e de aparecimento das folhas, foram calculadas através da análise de correlação e regressão linear ( $y = ax + b$ ) da fase exponencial de crescimento. A significância dos dados foi verificada através da análise da variância, (teste F a 5%) e as comparações das médias através do cálculo da  $DMS_{5\%}$ , pelo método de Tukey modificado por Snedecor (SNEDECOR e COCHRAN, 1967).

O tempo para a folha atingir o comprimento máximo foi calculado subtraindo-se o número de dias em que o crescimento havia estabilizado, do número de dias em que a folha tinha 0,5 cm.

A análise das velocidades e tamanhos máximos alcançados foi feita através da distribuição da frequência por clas

ses de tamanhos ou de velocidades. A frequência relativa foi calculada dividindo-se o número de indivíduos em cada classe pelo número total analisado. A frequência relativa acumulada foi calculada dividindo-se o total de indivíduos nas classes precedentes pelo número total analisado (SNEDECOR e COCHRAN, 1967).

#### Germinação

Os dados de porcentagem de germinação foram transformados em valor angular, que corresponde ao arco seno  $\sqrt{p}$  onde "p", representa a porcentagem de sementes germinadas. A significância dos dados foi verificada através do mesmo método utilizado para análise dos dados de crescimento.

No caso dos experimentos de determinação do aumento em peso fresco e da porcentagem de embebição foram calculados intervalos de confiança para  $p < 0,05$  (SNEDECOR e COCHRAN, 1967).

A velocidade de germinação (número de sementes.dia<sup>-1</sup>) foi calculada através da determinação do coeficiente de regressão (a), que representa a inclinação da reta da fase exponencial da curva de germinação (SNEDECOR e COCHRAN, 1967).

#### Enraizamento

A comparação entre os dados dos resultados dos biotes tes foi feita através do teste T para 5% de probabilidade (SNEDECOR e COCHRAN, 1967). Nos demais casos, foi aplicado o mesmo teste utilizado na análise dos dados de crescimento.

## Dosagem de diosgenina

As quantidades de diosgenina em plantas masculinas e femininas, foram comparadas pelo teste T para 1% de probabilidade (SNEDECOR e COCHRAN, 1967).

### III - RESULTADOS

#### Crescimento foliar

##### Crescimento inicial da plântula

Os estádios iniciais do desenvolvimento da plântula estão representados nas figuras 1-5. A figura 1 mostra o estágio em que há a protrusão da radícula após a germinação. Na figura 2 observa-se, após a remoção dos tegumentos, o cotilédone expandido e o embrião desenvolvido, com radícula e o primórdio da primeira folha. A figura 3 representa a plântula com oito dias de idade com a primeira folha já expandida. O processo de desenvolvimento prossegue e é mostrado na figura 4 (ainda sem tubérculo). Na figura 5 observa-se a plântula dois meses após a germinação, com o tubérculo formando-se abaixo do ponto de inserção do cotilédone (hipocótilo) e com a gemma perene, (SHARMA, 1974) que originará posteriormente os caules trepadores, que neste trabalho serão referidos como caules.

Foi analisado o peso seco da plântula nos estádios iniciais de desenvolvimento e os dados obtidos estão representados na tabela 1. Esta análise foi feita em um período de 80 dias. Observa-se que uma plântula com 20 dias de idade apresenta peso seco total de 4,0 mg; destes, 73% encontram-se na parte aérea e os restantes 27% estão nas raízes e cotilédone. Neste período o tubérculo ainda não está presente. Com o prosseguimento do desenvolvimento há expansão do cotilédone

FIGURA 1-5 - Desenhos esquemáticos de plântulas de D. com-  
posita em vários estádios de desenvolvimento.  
(r - radícula; c - cotilédone;  $f_1$  - folha 1;  
 $f_2$  - segunda folha; t - tubérculo; g - ge-  
ma perene ; R - raiz).

FIGURA 1-5

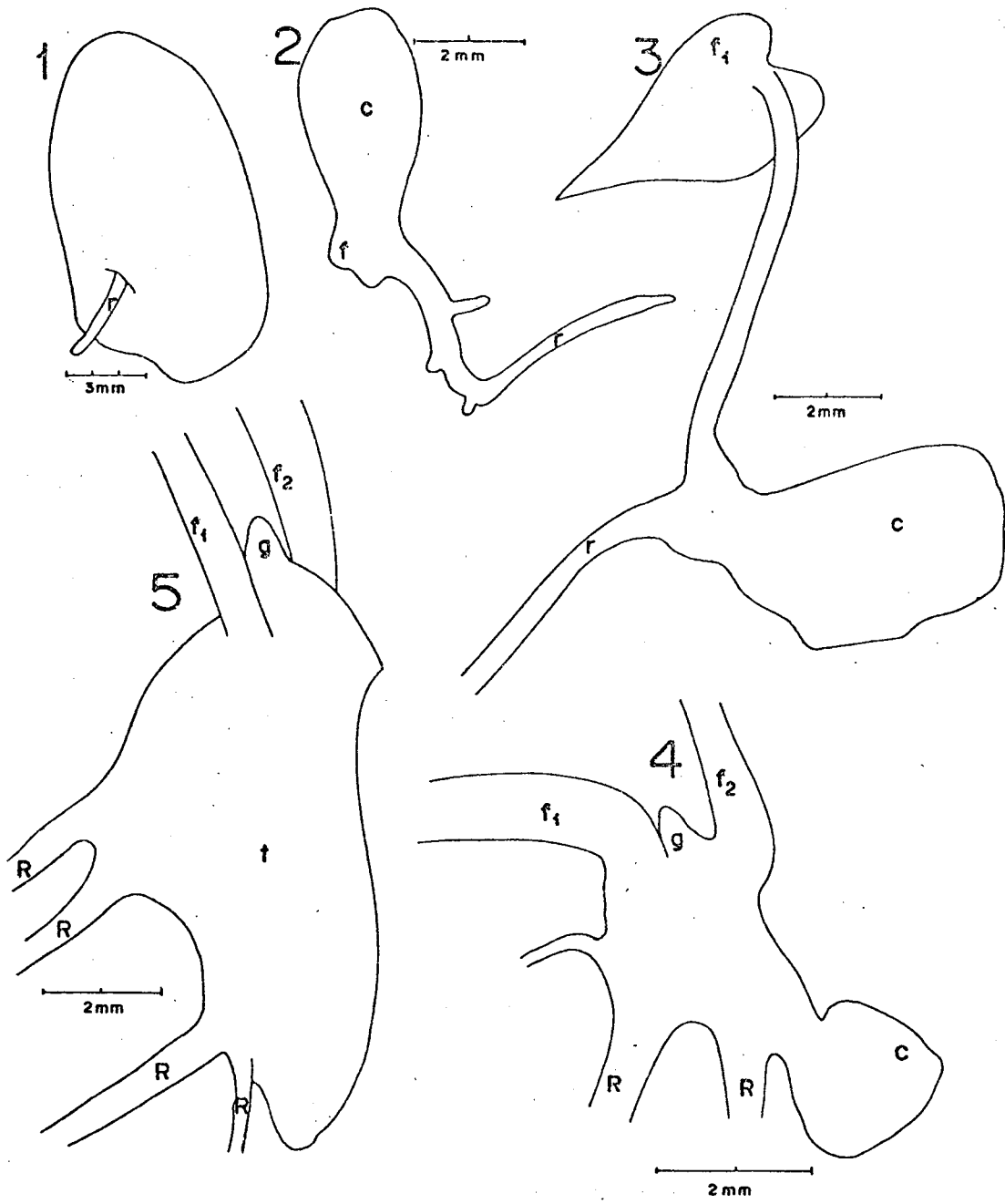


Tabela 1 - Distribuição de peso seco (mg) em plântulas de D. composita durante 80 dias.

Cada valor representa média de 10 plantas.

dias	Peso seco (mg) ± intervalo de confiança				
	tubérculo	folhas	raízes	cotilédones	total
20	0	2,9 ± 0,5	0,7 ± 0,2	0,4 ± 0,1	4,0 ± 0,6
40	0,4 ± 0,2	3,8 ± 2,4	1,6 ± 0,8	2,8 ± 1,5	8,6 ± 2,3
60	2,9 ± 1,0	10,8 ± 1,9	4,1 ± 1,0	0	17,8 ± 2,7
80	16,2 ± 5,7	101,3 ± 24,6	22,6 ± 5,5	0	140,1 ± 33,5

absorvente (LAWTON e LAWTON, 1967), cujo peso seco, por ocasião do dia 40 perfaz 33% do peso seco total da planta (8,6 mg), crescendo 7 vezes em relação ao dia 20, enquanto que a parte aérea corresponde a 44% do peso seco total. As raízes contribuem com 18% do peso seco, valor semelhante ao obtido para o dia 20. Observa-se que o tubérculo em início de crescimento perfaz 4,6% do peso seco total da planta. Plantas com 60 dias apresentam peso seco total duas vezes maior que no dia 40. Do peso seco total, cerca de 60,7% correspondem à parte aérea; o tubérculo cresce 7,3 vezes em relação ao dia 40, enquanto que a parte aérea e as raízes crescem 2,8 vezes mais. No dia 60 o cotilédone absorvente já não está mais presente. O peso seco total das plantas com 80 dias é de 140,1 mg, ou seja, no pe<sup>ri</sup>odo 60-80 dias a planta cresce 7,9 vezes mais. Novamente aqui a parte aérea contribui com a maior parte da matéria seca, 72%, resultado de um crescimento 9,4 vezes maior que no dia 60. O tubérculo, crescendo 5,6 vezes mais que no período anterior, perfaz 11,6% do peso seco total da planta. As raízes crescem 5,5 vezes mais e contribuem com 16% do peso seco total da planta. Quando, com base na tabela 1, é analisada a velocidade de acúmulo de matéria seca, observa-se que o tubércu<sup>lo</sup> aumenta de  $0,002 \text{ mg dia}^{-1}$  no período 20-40 dias, ao passo que entre 60-80 dias o aumento é de  $0,670 \text{ mg.dia}^{-1}$ . Nas fo<sup>lhas</sup> o aumento é de  $0,045 \text{ mg.dia}^{-1}$  entre 20-40 dias, mas aumenta para  $4,5 \text{ mg.dia}^{-1}$  no período 60-80 dias. Em relação às raízes o valor é de  $0,045 \text{ mg.dia}^{-1}$  no período 20-40 dias, mas alcança  $0,910 \text{ mg.dia}^{-1}$  no período 60-80 dias. Há, portanto, um aumento rápido em termos de peso seco nessas três partes da plântula no período compreendido entre 60-80 dias.



Crescimento foliar: plantas mantidas em casa de vegetação

As plantas crescidas em casa de vegetação (período de cerca de 100 dias) apresentam, em relação ao aparecimento de folhas, dois padrões distintos de crescimento: o padrão 1 com aparecimento precoce de caules trepadores, (Figura 6A) e o padrão 2 com aparecimento târdio de caules trepadores (Figura 7A). De 21 plantas analisadas, 16 apresentaram caule a partir da 2ª ou 3ª folhas (padrão 1) e em apenas 5 isto ocorreu mais tardiamente (padrão 2).

As figuras 6B-F e 7B-F representam as curvas de crescimento de folhas de cinco plantas dos padrões 1 e 2, respectivamente. Pela figura 6B, pode ser visto que após o aparecimento da folha 1 e ao redor do 20º dia do experimento, surgiu a folha 2 e da axila desta apareceu um caule que produziu uma única folha, a 2ª, isto por volta do 25º dia. Após mais ou menos 30 dias surgiu a folha 3 de cuja axila emergiu um caule com folhas 3a-h, sendo que a 3h surgiu ao redor de 90 dias de pois do início do experimento. A folha 4 apareceu após 80 dias e de sua axila surgiu um novo caule com a folha 4a. Ainda, após 90 dias nasceu a folha 5. Desta forma, no período de 100 dias, esta planta apresentou os caules 2, 3 e 4, que se originaram das axilas 2, 3 e 4. Analisando-se os gráficos da figura 6, nota-se que no padrão 1 todas as folhas apareceram desde o início, com maior frequência, fazendo parte de um caule. Assim, nas figuras 6B e 6C o crescimento do caule ocorreu a partir da terceira folha e a maioria das folhas da planta surgiu neste mesmo eixo. Nas figuras 6D, 6E e 6F isto ocorreu a partir da segunda folha.

FIGURA 6 - Diagrama de uma planta e curvas de crescimento de  
folhas de D. composita do padrão 1.

A. Diagrama de uma planta do padrão 1.

B-F. Curvas de crescimento de folhas de padrão 1.

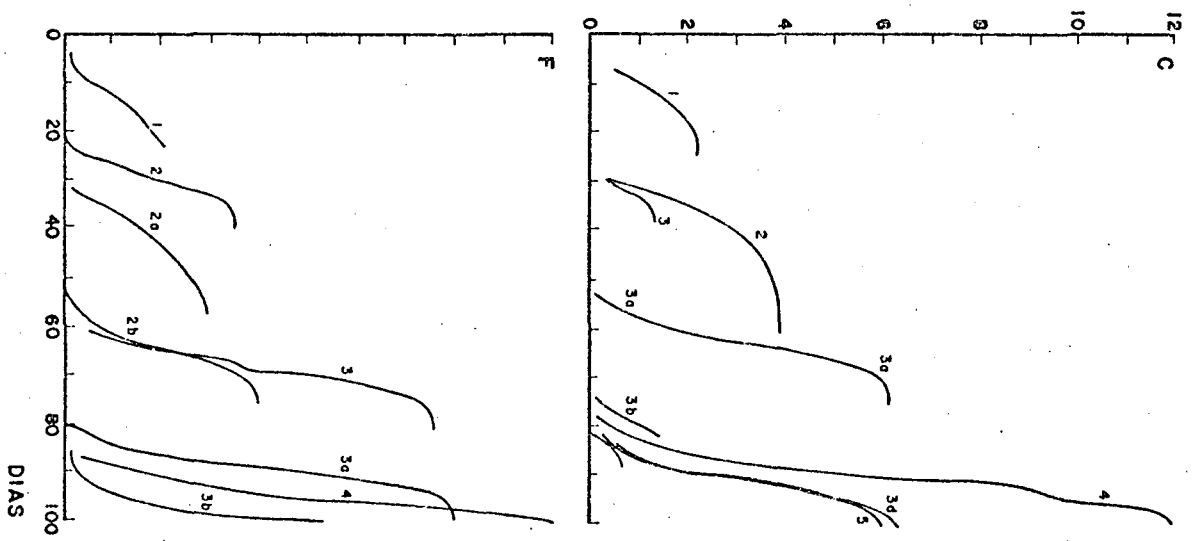
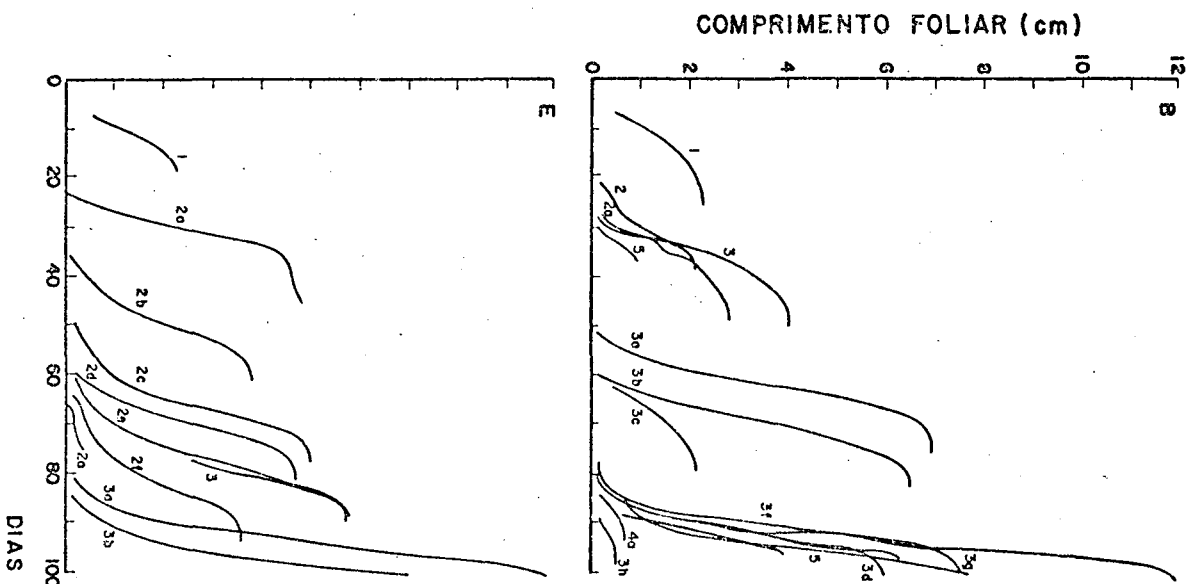
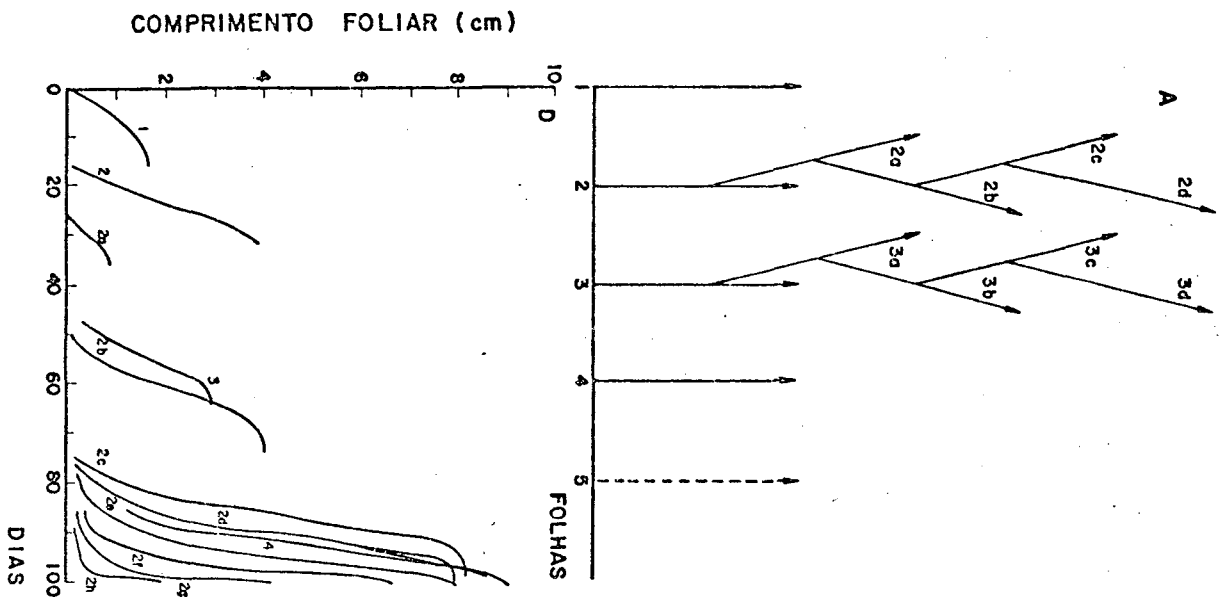


FIGURA 6

A figura 7B representa as curvas de crescimento de folhas de uma planta do padrão 2. Do mesmo modo, 20 dias após o início do experimento e portanto depois do aparecimento da folha 1, surgiu a folha 2 e da axila desta um caule que produziu as folhas 2a e 2b. A folha 3 morreu e 60 dias após o início do experimento apareceu a folha 4, da axila da qual surgiu um caule com as folhas 4a-g, sendo que a 4g surgiu por volta do 90º dia do experimento. A folha 5 apareceu por volta do dia 75 e de sua axila surgiu um caule com a folha 5a.

Os gráficos da figura 7 indicam que enquanto não ocorreu o desenvolvimento de um caule, as folhas apareceram a partir da gema perene ou da gema de folhas já existentes e somente mais tarde surgiram com maior frequência no caule. Assim, nas figuras 7B e 7D o caule se desenvolveu a partir da quarta folha e nas figuras 7C e 7F, a partir das folhas 3 e 5.

#### Análise do crescimento foliar

Na figura 8 as curvas de crescimento das folhas foram agrupadas conforme o local de aparecimento na planta. Assim, na figura 8A estão representadas todas as folhas 2a que surgiram nas axilas das folhas 2, na figura 8B, todas as que surgiram nas axilas das folhas 3 e na figura 8C, todas as folhas 4. Observa-se que, independente do local onde as folhas aparecem, há grupos que atingem comprimentos maiores a partir de determinado período de tempo.

O agrupamento das curvas de crescimento não mais levando em consideração o local, mas sim a ordem de aparecimento das folhas (cronologia), está representado na figura 9.

FUGURA 7 - Diagrama de uma planta e curvas de crescimento de folhas de D. composita do padrão 2.

A. Diagrama de uma planta do padrão 2.

B-F. Curvas de crescimento de folhas do padrão 2.

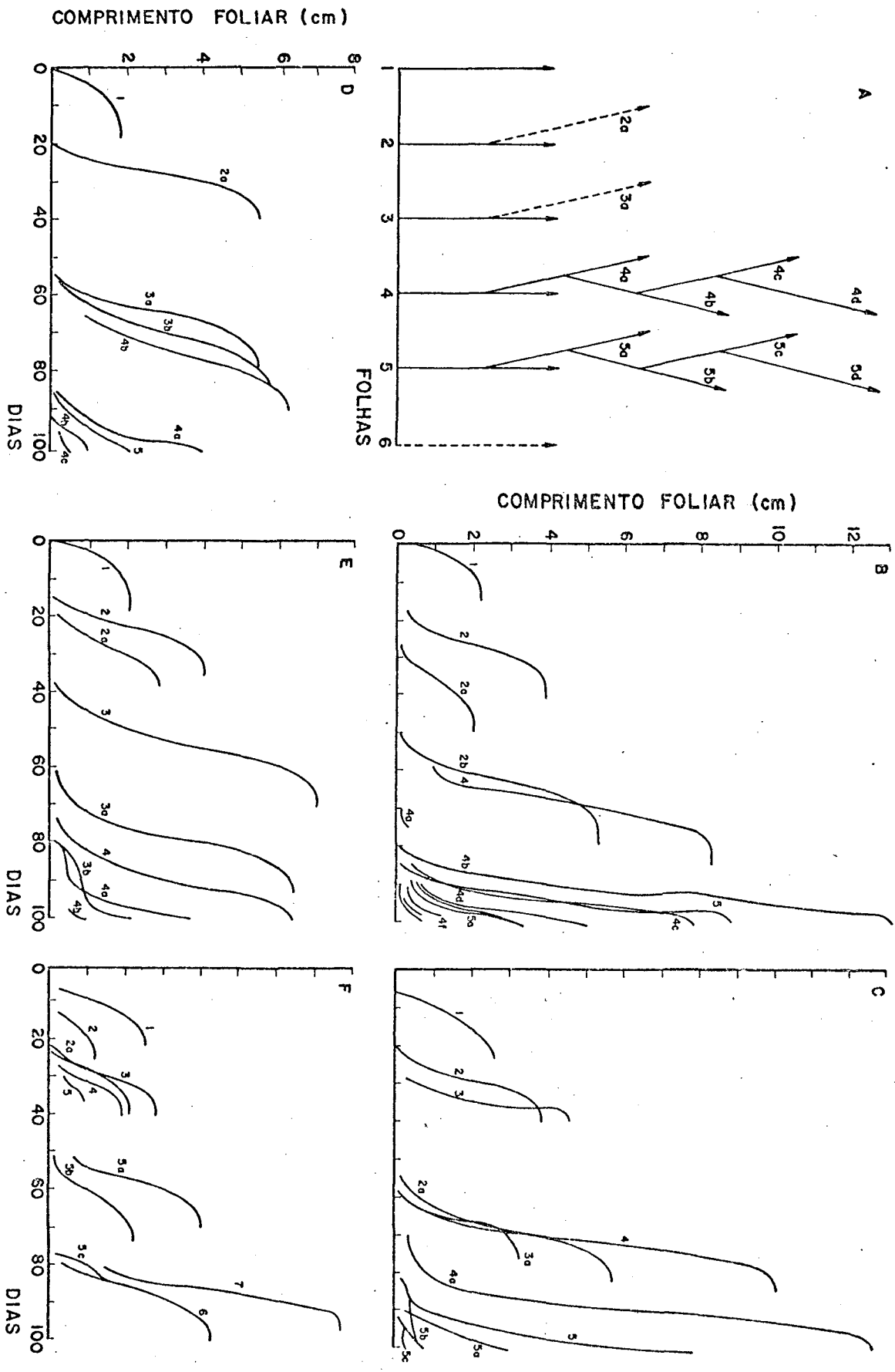


FIGURA 7

FIGURA 8 - Curvas de crescimento de folhas de D. Composita surgidas nas axilas das folhas 2 (A), nas axilas das folhas 3 (B), e das folhas 4 (C).

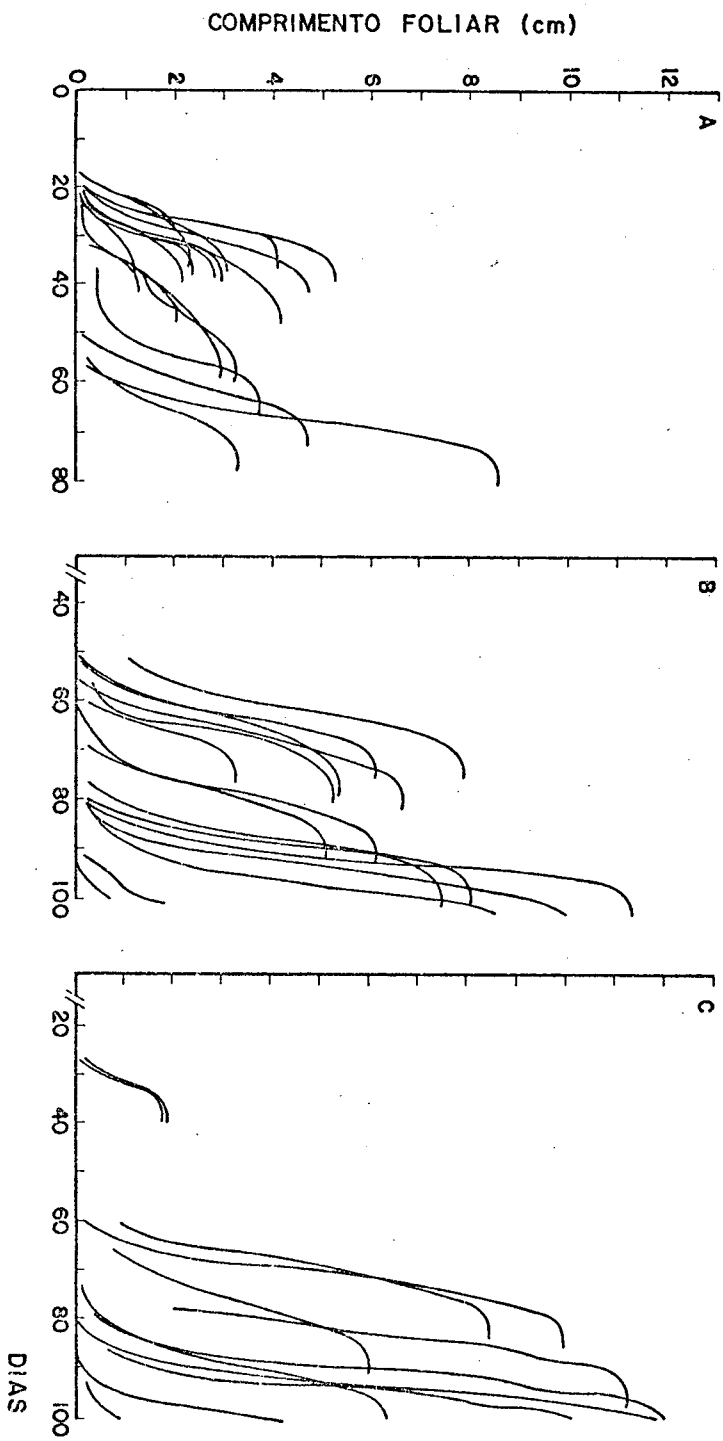


FIGURA 8



Assim, nas figuras 9A-H estão representadas todas as folhas que surgiram em cada planta, em primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto, sétimo e oitavo lugares, respectivamente, no decorrer do tempo. De modo geral, também aqui, há clara tendência das folhas que surgem da metade do experimento em diante atingirem comprimentos máximos maiores, não importando a sequência em que aparecem. Nota-se, novamente, a variedade de comportamentos fisiológicos das mesmas em termos dos comprimentos máximos atingidos. Assim, pela figura 9E observa-se que as quintas folhas que aparecem em todas as plantas, alcançam os mais variados comprimentos máximos e surgem nos mais diferentes pontos do período de 50 a 75 dias.

Devido a esta grande variação, procurou-se agrupar folhas da mesma idade fisiológica dividindo-se todo o tempo do experimento (100 dias) em períodos de tempo de vinte dias (Figura 10). Deste modo as curvas de crescimento de uma folha 2a (Figura 8A) e de uma folha 5 (Figura 9E) agora podem estar representadas no mesmo gráfico, pois podem ter a mesma idade fisiológica, independente do local ou da ordem cronológica em que aparecem.

A análise dos gráficos da figura 10 indica, com menor variação, que qualquer que seja o período em que as folhas aparecem, sempre atingem comprimentos muito variados. As análises do número e velocidade de aparecimento, dos comprimentos máximos atingidos e das velocidades de crescimento das folhas no decorrer do experimento serão feitas considerando-se então folhas da mesma idade fisiológica.

FIGURA 9 - Curvas de crescimento das primeiras 3 folhas sur-  
gidas em plantas de D. composita (A-H).

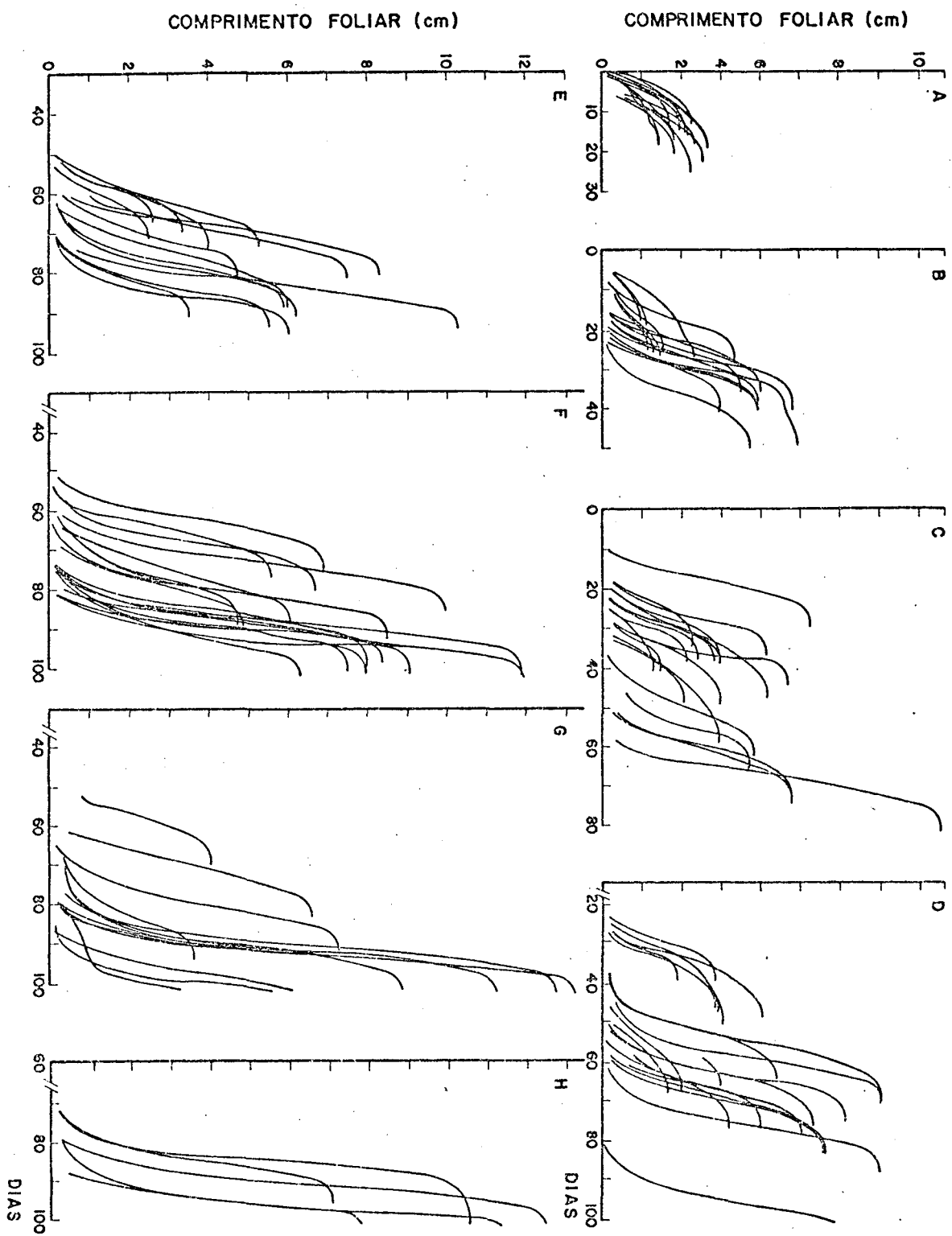


FIGURA 9

FIGURA 10 - Curvas de crescimento de folhas de D. Composita, surgidas em um mesmo período de 20 dias.

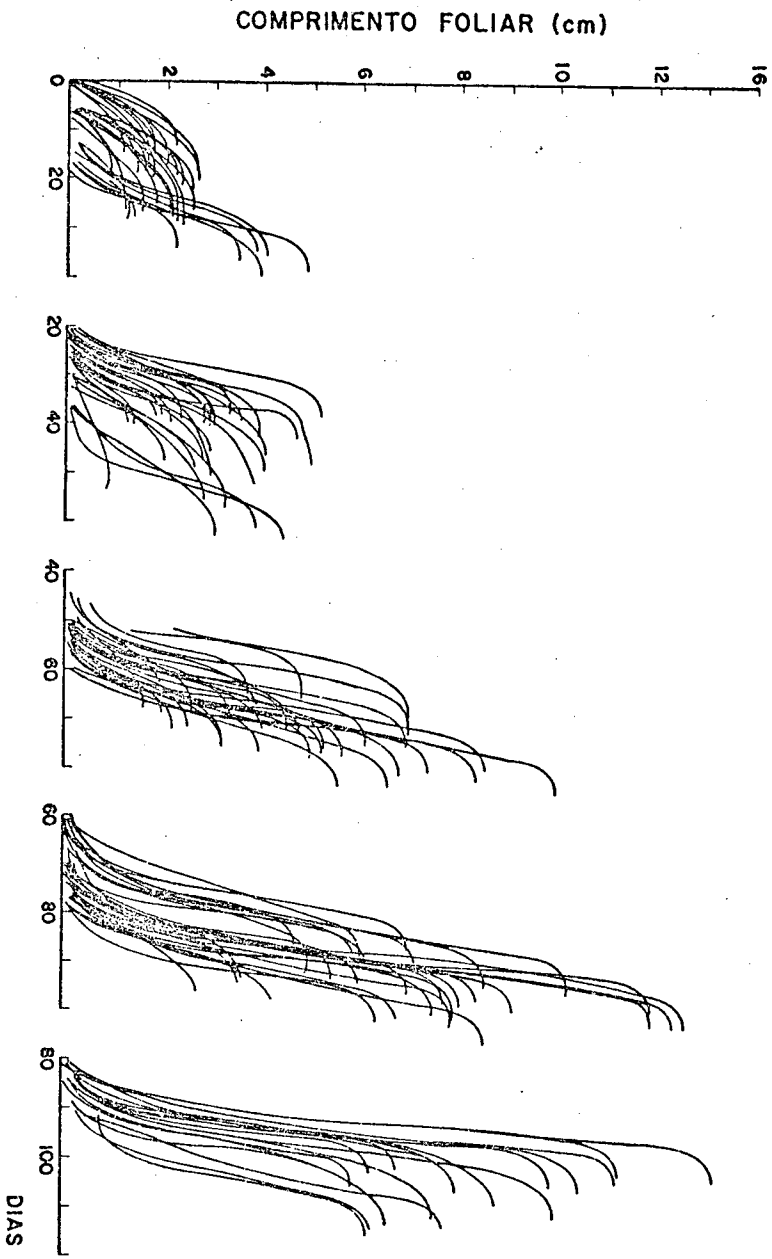


FIGURA 10

### 1. Número e velocidade de aparecimento das folhas

Nas tabelas 2 e 3 estão representados os números de folhas que aparecem nas plantas em intervalos de 19 dias. A tabela 2 apresenta os dados para as 15 plantas do padrão 1 e a tabela 3 para as 5 plantas do padrão 2. Nota-se que no período de 0-19 dias o número de folhas que surgiu nas plantas dos dois padrões é muito semelhante e entre 80-100 dias aparecem mais folhas novas nas plantas do padrão 2 (Tabela 3) do que no padrão 1 (Tabela 2). Observa-se ainda que tanto num caso como no outro o número de folhas que surgiu no período de 60-100 dias é aproximadamente igual (padrão 1) ou maior (padrão 2) ao número de folhas que surgiu nos dois primeiros meses do experimento, não havendo diferença entre os mesmos. Assim, no padrão 1 (Tabela 2), entre 60-100 dias, aparecem 4,69 novas folhas, o que representa, aproximadamente, a mesma quantidade surgida no período de 0-60 dias, o que leva a planta a dobrar o seu número de folhas em pouco mais de um mês. No padrão 2 (Tabela 3), entre 60-100 dias nascem 6 folhas em relação a 5,20 surgidas nos dois primeiros meses e novamente aqui o número de folhas na planta duplica em relação ao período anterior.

Pode ser visto também que o padrão 1 não difere do padrão 2 com relação ao número total final de folhas na planta e por esta razão pode-se analisar conjuntamente os dados que são apresentados na tabela 4. Verifica-se que ao redor de 100 dias uma planta de D. composita tem em média 9,63 folhas, sendo que 48% delas aparecem nos primeiros 60 dias e 52% nos últimos 40 dias do experimento.

Tabela 2 - Número de folhas em plantas de D. composita do padrão 1 nos vários períodos de tempo analisados.

	Períodos de tempo (dias)				
	0-19	20-39	40-59	60-79	80-100
nº total folhas	28	24	20	32	43
média do nº folhas novas/planta	1,75	1,50	1,25	2,00	2,69
média do nº total de folhas/planta	1,75	3,25	4,50	6,50	9,19

TABELA 3 - Número de folhas em plantas de D. composita do padrão 2 nos vários períodos de tempo analisados.

	Períodos de tempo (dias)				
	0-19	20-39	40-59	60-79	80-100
nº total de folhas	9	9	8	10	20
média do nº folhas novas/planta	1,80	1,80	1,60	2,00	4,00
média do nº total de folhas/planta	1,80	3,60	5,20	7,20	11,20



TABELA 4 - Número de folhas em plantas de D. composita dos padrões 1 e 2 nos vários períodos de tempo analisados.

	Períodos de tempo (dias)				
	0-19	20-39	40-59	60-79	80-100
nº total de folhas	37	33	28	42	63
média do nº folhas novas/planta	1,76	1,57	1,30	2,00	3,00
média do nº total folhas/planta	1,76	3,33	4,63	6,66	9,63

Com os dados da tabela 4 foi possível construir o gráfico da figura 11, que relaciona o número total de folhas na planta com o  $\log_{10}$  do tempo. Entre 0-19 dias, surgem 0,088 folhas.dia<sup>-1</sup>; a partir de 60 dias o valor é 0,100 folhas.dia<sup>-1</sup> e no período de 80-100 dias é de 0,125 folhas.dia<sup>-1</sup>.

## 2. Velocidade de crescimento das folhas.

A análise geral das curvas de crescimento das folhas em função do tempo (Figura 10) indica que as folhas que surgem entre 0-10 dias do experimento e que corresponde à primeira folha, apresentam um padrão de crescimento totalmente diferente das demais folhas da planta, pois os tipos de curvas são diferentes. Dois exemplos são vistos na figura 12, em que o comprimento foi plotado contra  $\log_{10}$  do tempo. Na figura 12A está representado o crescimento de uma das folhas 1 analisadas e na figura 12B, do mesmo modo, o crescimento de uma folha surgida mais tarde (folha 5). As demais folhas analisadas, tanto no caso das folhas 1 como das outras folhas, apresentaram os mesmos tipos de curvas de crescimento exemplificados na figura 12.

Foram calculadas as velocidades de crescimento para as fases rápida e lenta de todas as folhas 1 analisadas. A velocidade foi de 0,14 cm.dia<sup>-1</sup>, para a fase rápida e de 0,07 cm.dia<sup>-1</sup>, para a lenta. Assim, embora com as variações observadas, a velocidade da fase lenta é a metade daquela da rápida. Com relação ao tempo necessário para as folhas atingirem os tamanhos máximos observa-se pela tabela 5, onde os dados foram distribuídos em classes de intervalos de dois dias, que 40% das folhas 1 estabilizam o crescimento em 12-13 dias e 33% delas em 14-15 dias. Assim, para 73% das folhas analisadas

FIGURA 11 - Número de folhas surgidas em plantas de D. Composita em função do  $\log_{10}$  tempo.

FIGURA II

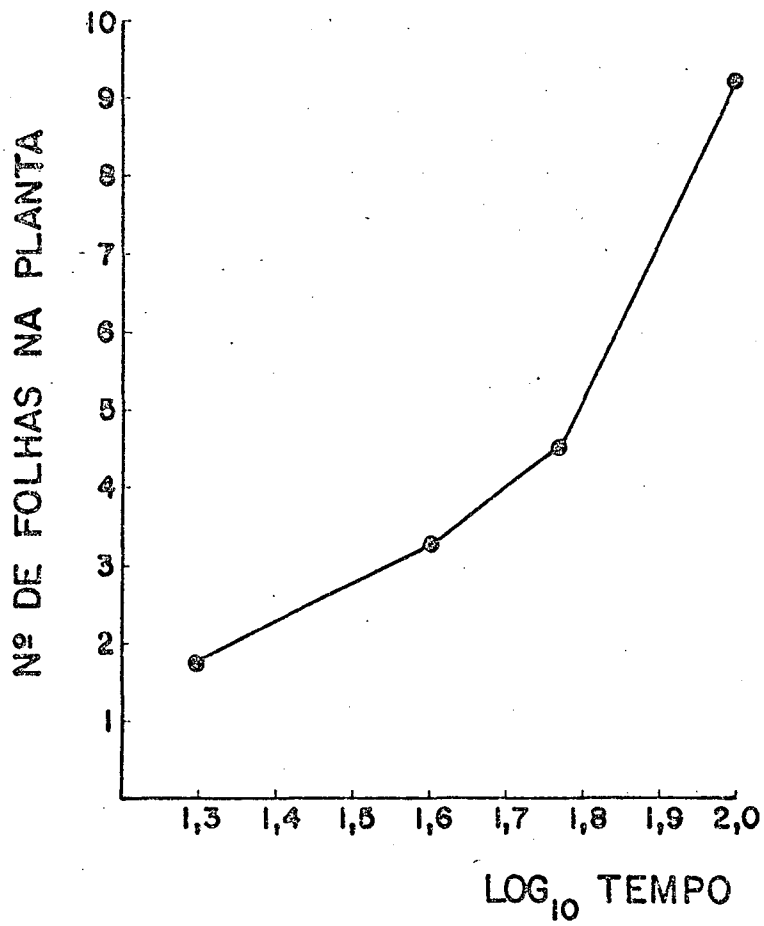


FIGURA 12 - Crescimento de uma folha 1 (A) e de uma folha  
5 (B) em plantas de D. composita.

FIGURA 12

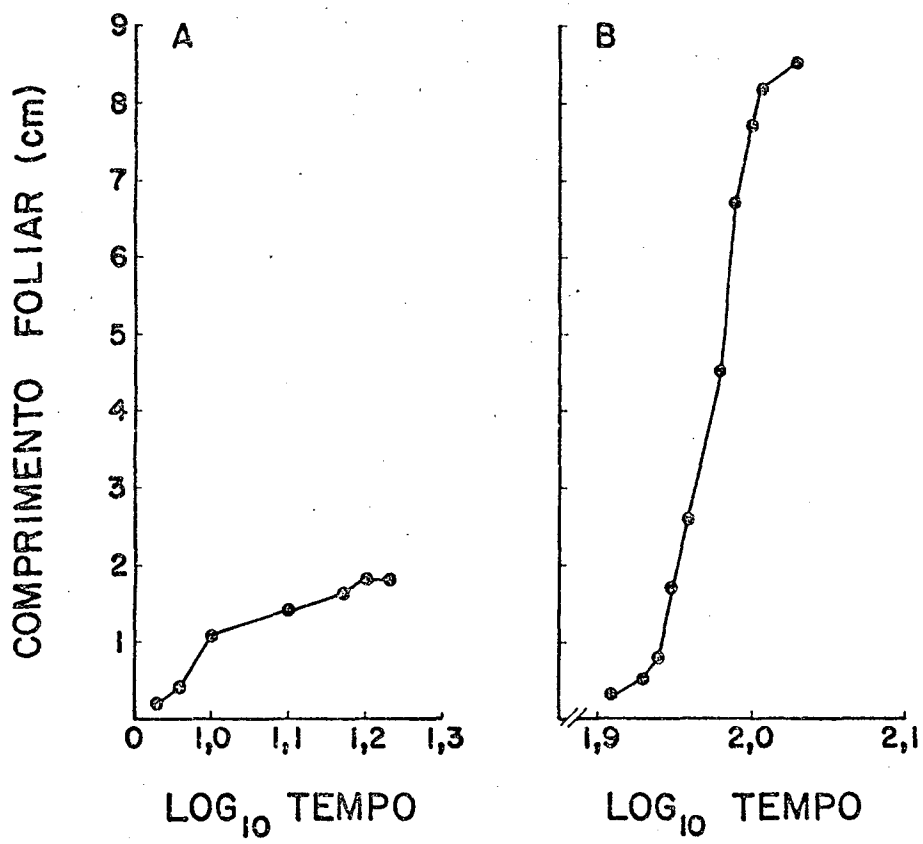


TABELA 5 - Tempo necessário (dias) para as folhas 1 de D. composita atingirem o comprimento máximo.

Valores de frequência (f) e de frequência relativa (fr) por intervalo de classe de 2 dias (f, número de indivíduos por classe; fr, número de indivíduos por classe/número total).

classes (dias)	f	fr
8-9	0	0
10-11	2	0,13
12-13	6	0,40
14-15	5	0,33
16-17	2	0,13
18-19	0	0
Nº Total	15	

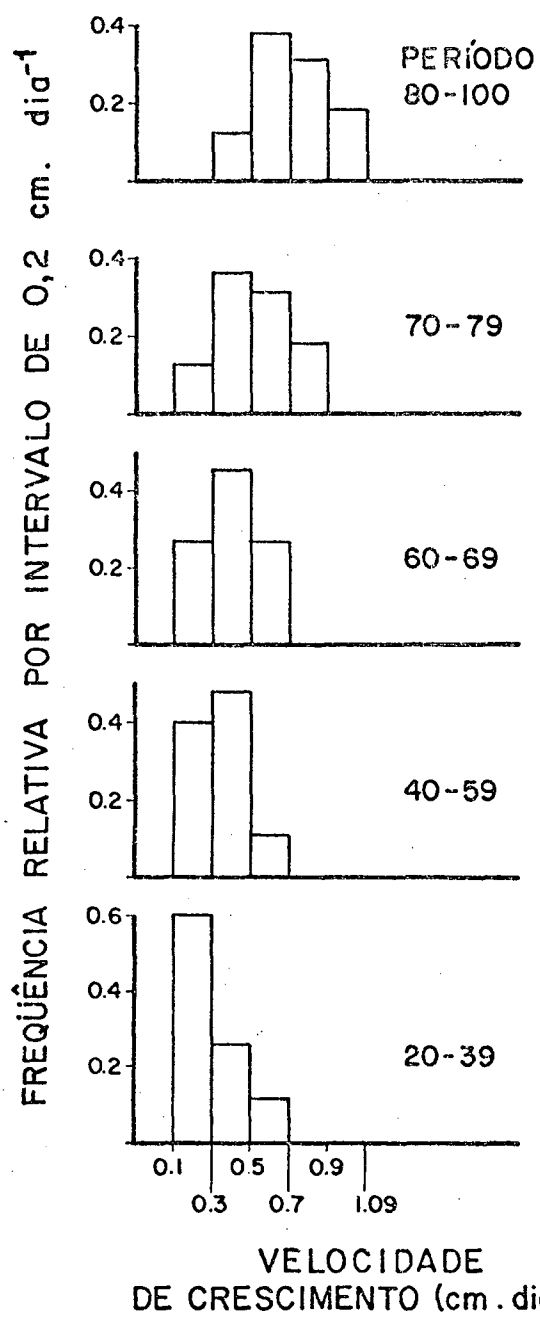
são necessários 15 dias para crescerem completamente. Das folhas restantes, 13% precisam de 10 dias e 13% de 16-17 dias.

Para a análise de velocidade de crescimento das folhas surgidas entre 20-100 dias, as frequências para cada período de tempo foram distribuídas em classes de intervalos de medidas de velocidade. O período de 60-79 dias foi subdividido para se ter uma idéia mais clara do período exato em que a parecem novas classes de velocidade de crescimento. Com os dados de frequência relativa foi construída a figura 13. Na figura 13 é possível observar que no período de 20-39 dias é maior a frequência relativa de folhas que crescem  $0,10-0,30 \text{ cm.dia}^{-1}$ , assemelhando-se ao crescimento da folha 1. Assim, 60% das folhas que aparecem na planta, neste período, apresentam esta velocidade de crescimento. A frequência desta classe diminui com o decorrer do tempo, de tal modo que as folhas que aparecem entre 80-100 dias já não crescem com esta velocidade. No caso das folhas que crescem  $0,30-0,49 \text{ cm.dia}^{-1}$  pode ser visto que as frequências relativas aumentam a partir do período 20-39 e também diminuem no período 80-100 dias. Assim, 48% das folhas que surgem entre 40-59 dias e 38% das que surgem entre 70-79 dias tem esta velocidade de crescimento. Por outro lado, é nítido o aumento no decorrer do tempo, das frequências relativas das folhas que crescem  $0,50-0,69 \text{ cm.dia}^{-1}$  e o surgimento de folhas que crescem  $0,70-0,89 \text{ cm.dia}^{-1}$  e  $0,90-1,09 \text{ cm.dia}^{-1}$ , entre 80-100 dias. Pela figura 13 pode ser visto que 100% das folhas que aparecem entre os dias 20-69 crescem com velocidades de  $0,10-0,69 \text{ cm.dia}^{-1}$ . Já a partir do período 70-79 dias estas folhas perfazem cerca de 80% do total



FIGURA 13 - Velocidade de crescimento de folhas de D. Com-  
posita durante os períodos analisados.

FIGURA 13



e entre 80-100 dias apenas 50% delas tem velocidade nesta faixa. A outra parte das folhas que nascem neste período (50%) parece crescer mais rapidamente, acima de  $0,70 \text{ cm.dia}^{-1}$ .

Na figura 14 estão representadas as médias das velocidades de crescimento foliar e os valores de  $\text{DMS}_{5\%}$  para cada par de períodos analisados. Nota-se que o valor de velocidade de crescimento das folhas que aparecem entre 80-100 dias é significativamente superior aos demais. Há também diferença significativa entre os períodos 60-69 e 70-79. Novamente aqui, as folhas que surgem entre 20-69 dias crescem com a mesma velocidade, mas as que aparecem entre 20-39 dias crescem significativamente menos que as folhas do período 60-100 dias. Deste modo, as folhas que surgem entre 80-100 dias crescem  $0,71 \text{ cm.dia}^{-1}$  três vezes mais rápido que as que surgem entre 20-39 dias e pelo menos duas vezes mais depressa que aquelas do período 40-69 dias.

Os dados de frequências relativas distribuídas por intervalos de número de dias necessários para as folhas estabilizarem o crescimento estão representados na tabela 6. Neste caso, os períodos 60-69 e 70-79 foram reunidos, pois a análise isolada não indicou diferenças entre os mesmos. A análise da tabela 6 indica que 53% das folhas que surgem no período 20-39 dias alcançam comprimentos máximos entre 10-13 dias. No período 40-59, 83% das folhas precisam de 12-19 dias para estabilizarem o crescimento e no período 60-79, 87% delas necessitam de 14-19 dias. Em ambos os casos, somente para 8-13% das folhas são necessários mais de 20 dias. Já no período 80-100 dias, 63% das folhas completam o crescimento entre 14-19 dias, mas 23% delas o fazem com mais de 20 dias. Desta forma parece

FIGURA 14 - Velocidade de crescimento de folhas de D. Com-  
posita em cada período analisado.  
Barras verticais representam  $DMS_{5\%}$ .

FIGURA 14

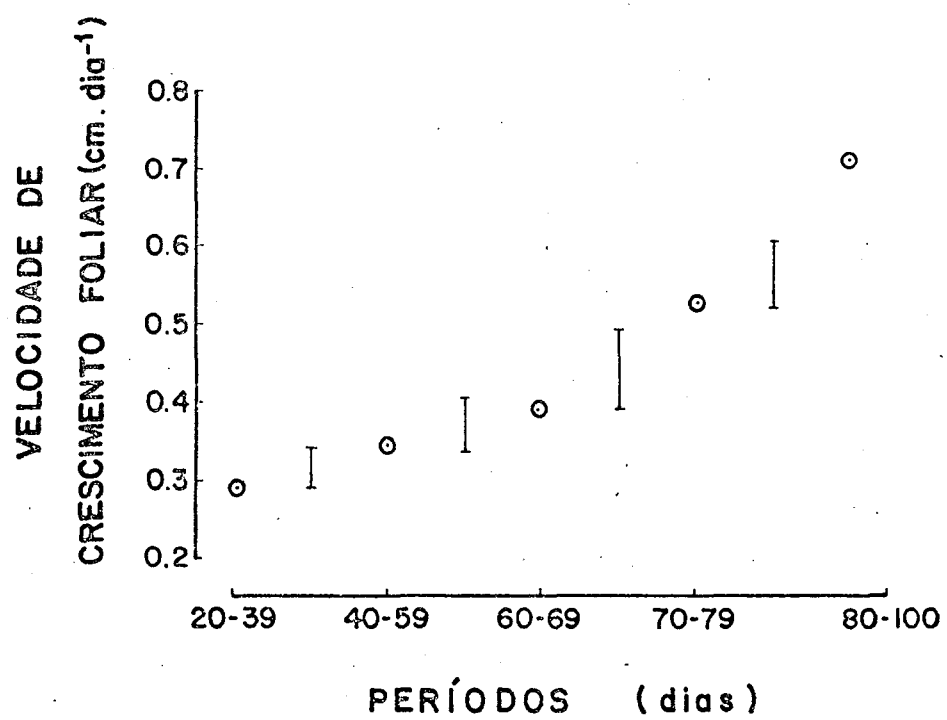


TABELA 6 - Tempo necessário (dias) para as folhas de D. composita estabilizarem o crescimento.

Valor de frequência (f) e frequência relativa (fr) por intervalos de classe de 2 dias.

Classes (dias)	Períodos de tempo (dias)							
	20-39		40-59		60-79		80-100	
	f	fr	f	fr	f	fr	f	fr
6-7	4	0,180	0	0	0	0	0	0
8-9	1	0,045	0	0	0	0	0	0
10-11	9	0,409	1	0,043	0	0	0	0
12-13	3	0,136	6	0,260	1	0,043	3	0,136
14-15	1	0,045	4	0,174	1	0,043	5	0,227
16-17	3	0,136	4	0,174	12	0,522	5	0,227
18-19	0	0	5	0,217	7	0,304	4	0,180
20-21	1	0,045	2	0,086	1	0,043	2	0,090
22-23	0	0	0	0	1	0,043	1	0,045
24-25	0	0	1	0,043	0	0	2	0,090
Nº Total	22		23		23		22	

que a partir do período 40-59 aumenta a porcentagem das folhas que necessitam de mais tempo para atingirem o comprimento máximo.

### 3. Tamanhos máximos atingidos pelas folhas

Foi calculada a frequência, frequência relativa e frequência relativa acumulada dos comprimentos máximos atingidos pelas folhas em cada período de tempo analisado. Com os dados de frequência relativa foi construída a figura 15. Observa-se que entre 0-19 dias as folhas se agrupam com maior frequência em duas classes de tamanho e correspondem à primeira folha da planta. As outras duas classes de frequência bem menores correspondem às segundas folhas que algumas plantas já possuíam neste período. A partir do período 20-39 aparecem folhas com comprimentos máximos diferentes o que pode ser constatado pelo aparecimento de novas classes. No decorrer do tempo nota-se que há diminuição de frequência das folhas de 2,0-6,0 cm e aumento da frequência de folhas maiores que 6 cm, isto a partir do período 40-59. Assim, no período de 80-100 dias é nítido o não surgimento de folhas com 2,0-5,0 cm, mas torna-se comum o aparecimento de folhas com 6,0-14,0 cm. Observa-se que no período de 0-19 dias as folhas alcançam comprimentos máximos menores, sendo que 81% das folhas surgidas neste período alcançam entre 1,0-2,9 cm de comprimento. Nos períodos posteriores as porcentagens para esta mesma classe caem para 54% (período 20-39 dias) e 17% (período 40-59 dias). Em compensação, a partir de 20-39 dias 46% das folhas alcançam de 3,0-5,9 cm e as porcentagens de folhas nas classes maiores co

FIGURA 15 - Comprimentos máximos alcançados pelas folhas de  
D. Composita durante os períodos analisados.



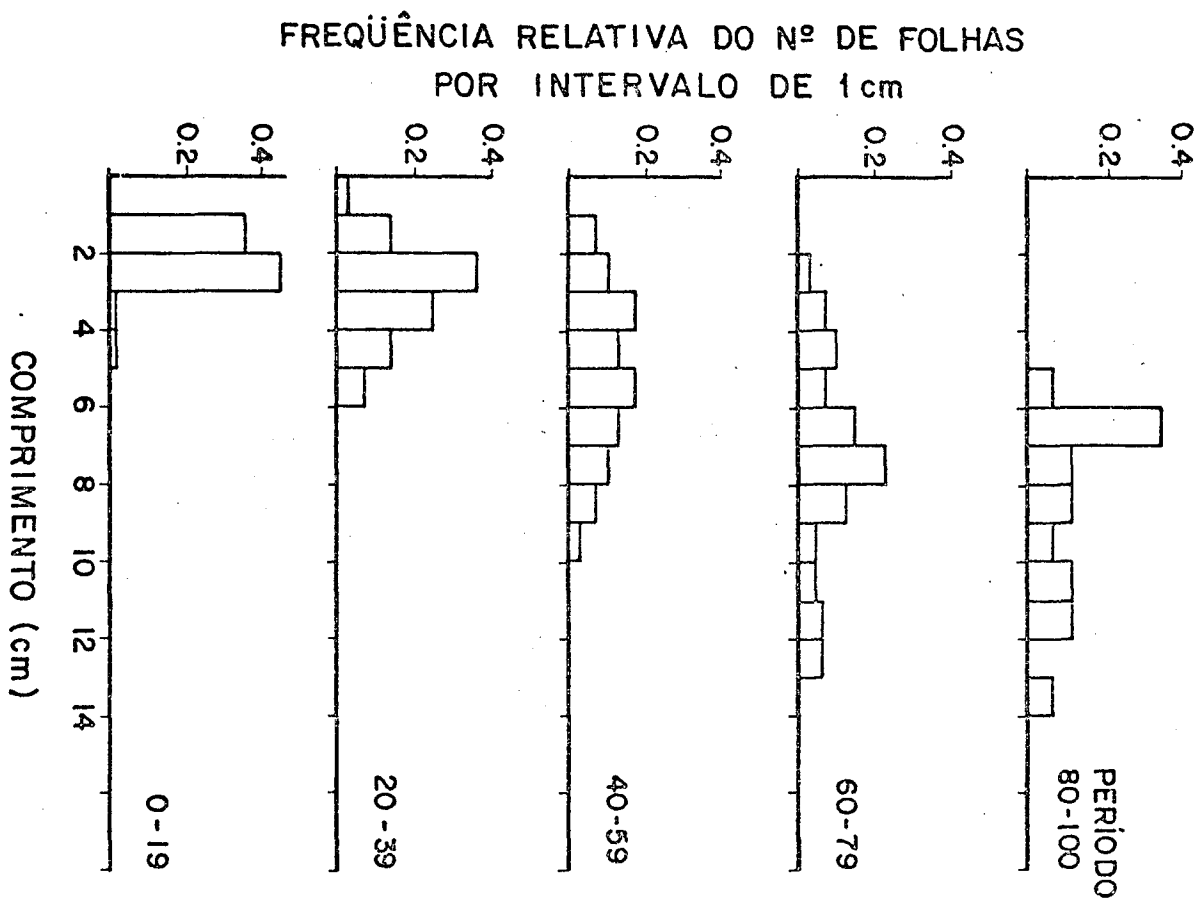


FIGURA 15

meçam a aumentar. Assim, no período 40-59, 34% das folhas atingem de 6,0-9,9 cm de comprimento, enquanto que 66% atingem de 1,0-5,9 cm. No período 60-79 dias, 73% das folhas surgidas alcançam de 6,0-12,9 cm e no período 80-100, 99,9% das folhas tem comprimentos máximos entre 6,0-13,9 cm. Desta forma, torna-se claro que a partir de 60 dias aumenta o número de folhas que alcançam comprimentos máximos maiores.

#### 4. Aumento em área e peso seco

Na tabela 7 estão representados os dados de área e peso seco foliar e a razão entre peso seco e área para plantas com diferentes idades. Verifica-se que no período de 80-120 dias a área foliar passa a ser de 10 a 27 vezes maior do que a verificada para 40 dias.

Com relação ao peso seco foliar, observa-se que a quantidade de matéria seca na folha, dobra de 20 para 40 dias. No período de 80-120 dias a parte aérea da planta acumula de 9 a 44 vezes mais matéria seca do que a verificada no período de 40 dias.

A análise estatística dos valores de razão entre peso seco e área, indica que a quantidade de matéria seca presente em 1 cm<sup>2</sup> de tecido foliar é igual até o dia 80. A partir de 100 dias, entretanto, há um acúmulo significativamente maior de matéria seca.

No período de 80-100 dias a área aumenta 1,45 vezes e peso seco 2,98 vezes e no período 100-120 dias área aumenta 1,71 e o peso seco 1,60 vezes. Isto faz com que a razão entre peso seco e área seja no dia 100, 1,90 vezes maior

TABELA 7 - Área foliar, peso seco foliar e razão entre peso seco e área de plantas de D. composita para vários períodos analisados.

Cada valor representa a média de 10 plantas ( $\bar{x} \pm$  intervalo de confiança).

	Períodos (dias)				
	20	40	80	100	120
área (cm <sup>2</sup> )	4,5 ± 0,4	5,9 ± 0,8	64,5 ± 14,6	93,9 ± 15,0	161,1 ± 25,8
peso seco (mg)	5,1 ± 0,6	10,7 ± 2,4	97,2 ± 23,1	290,2 ± 46,7	465,6 ± 60,8
peso seco/área (mg.cm <sup>-2</sup> )	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,7	1,6 ± 0,6	3,1 ± 0,2	2,9 ± 0,4

do que a do dia 80. No período 100-120 dias o aumento em área é de 1,7 vezes e o aumento em peso seco é de 1,6 vezes, o que faz com que a razão entre peso seco e área, no dia 120, seja 1,8 vezes maior do que a verificada para o dia 80 e da mesma grandeza que no dia 100.

Na tabela 8 estão representados os dados de velocidade de aumento da área e do peso seco foliar. No período 40-100 dias há um aumento de 21 vezes em relação ao período anterior. Já entre 100-120 dias a área foliar aumenta 2,4 vezes mais rapidamente do que no período imediatamente anterior. Com relação à velocidade de aumento de peso seco, observa-se que entre 20-40 dias a velocidade de acúmulo de matéria seca na folha é de  $0,28 \text{ mg.cm}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ . No período 40-80 dias, a velocidade de aumento do peso seco é 7,7 vezes maior do que no período de 20-40. A partir de 80 dias, a velocidade de aumento em peso seco é 4 vezes maior do que a verificada no período 40-80 dias. Entre 40-100 dias não há aumento na velocidade de crescimento em termos de área foliar, enquanto que a velocidade de aumento de matéria seca é 4 vezes maior.

Crescimento foliar: plantas cultivadas em canteiro

A transferência das plantas para o canteiro foi realizada após o dia 100 do experimento. Os novos caules começaram a aparecer após 30 dias, quando se iniciaram as medidas das folhas.

Na figura 16A-D estão representadas as curvas de crescimento das folhas em caules, para 4 das plantas analisadas. Na figura 16A, por exemplo, as letras representam a or-

TABELA 8 - Velocidade de aumento em área e em peso seco foliares para plantas de D. composita nos vários períodos analisados.

Velocidade	Períodos (dias)			
	20-40	40-80	80-100	100-120
área (cm <sup>2</sup> .dia <sup>-1</sup> )	0,07	1,46	1,47	3,36
peso seco (mg.dia <sup>-1</sup> )	0,28	2,16	9,60	8,0

FIGURA 16 - Curvas de crescimento de folhas de 4 plantas de D.composita (A-D) cultivadas em canteiro.

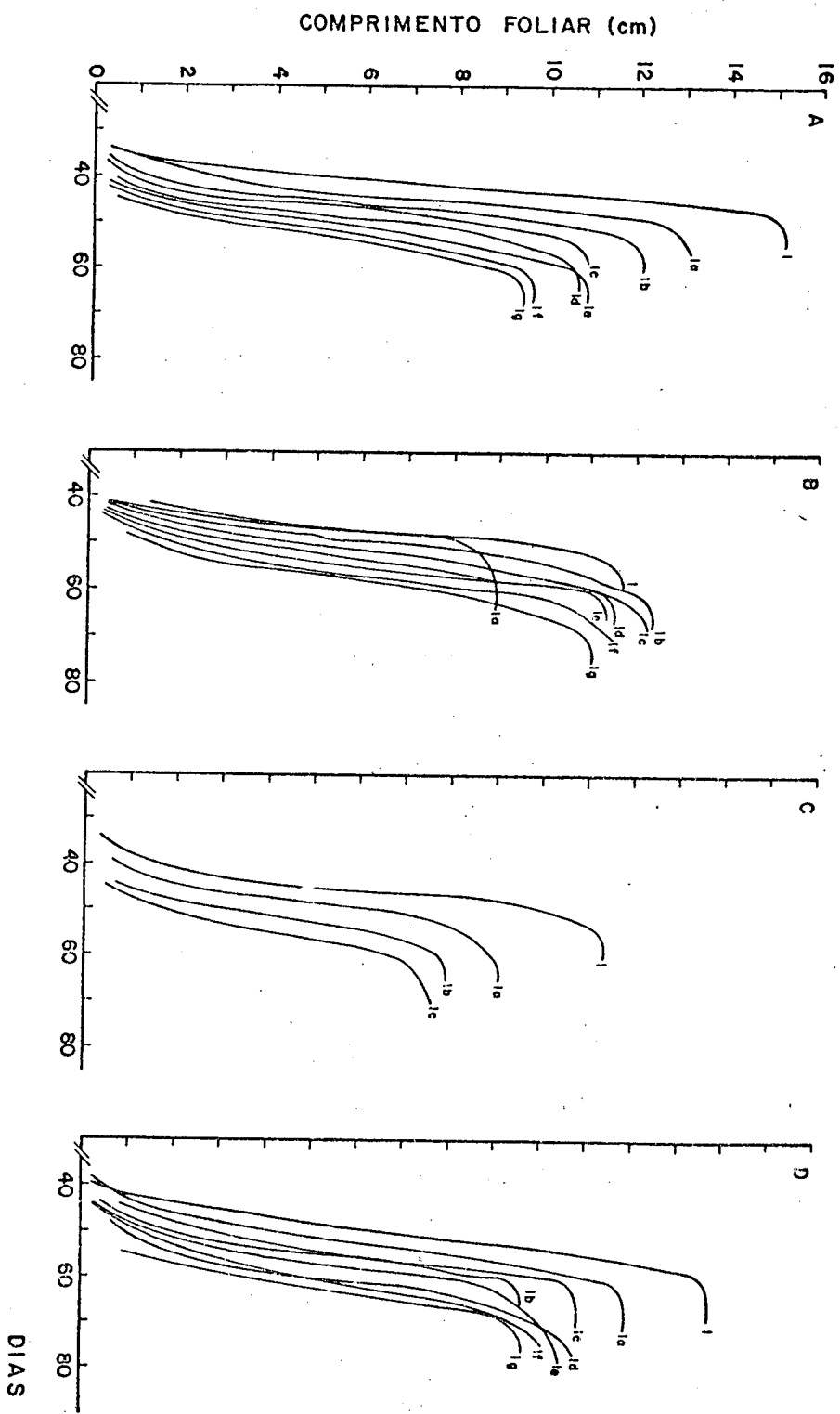


FIGURA 16

dem de aparecimento da folha no caule. Assim, a folha 1 é a que originou o caule, a folha 1a é a primeira folha do caule e a 1g é a última folha analisada desse caule. Observa-se neste caso, que as folhas que surgiram no caule alcançaram comprimentos menores que a primeira. O mesmo ocorreu com as folhas do caule da figura 16C. Contudo, esta tendência não é regra, pois no caso da figura 16B as folhas que surgem no caule alcançam comprimentos variados, independente da seqüência.

#### Análise de crescimento

As curvas de crescimento das folhas de posição correspondentes nos caules foram agrupados e dispostas em ordem de aparecimento (Figura 17A-E). Assim na figura 17A está representado o crescimento de todas as folhas que originaram caules, nas figuras 17B das primeiras folhas de um caule (folhas 1a) e assim por diante, até a 4ª folha, isto é, 1d (Figura 17D). Observa-se que todas as folhas do caule embora apresentem padrões de crescimento semelhantes, podem atingir comprimentos variados. Os comportamentos fisiológicos das folhas aqui assemelham-se com os das folhas que surgiram no período 80-100 dias em casa de vegetação. Neste caso o critério ordem de aparecimento, utilizado para agrupar as folhas, está fortemente ligado ao de idade fisiológica. Deste modo as análises do número, velocidade de aparecimento, velocidade de crescimento e comprimentos máximos atingidos pelas folhas, serão feitas considerando-se folhas de mesma idade.



FIGURA 17 - Curvas de crescimento das 5 primeiras folhas (A-E) surgidas nos caules de plantas de D. composita cultivadas em canteiro.

A: folhas que originaram caules

B: primeiras folhas de um caule: folhas la

C: folhas lb

D: folhas lc

E: folhas ld

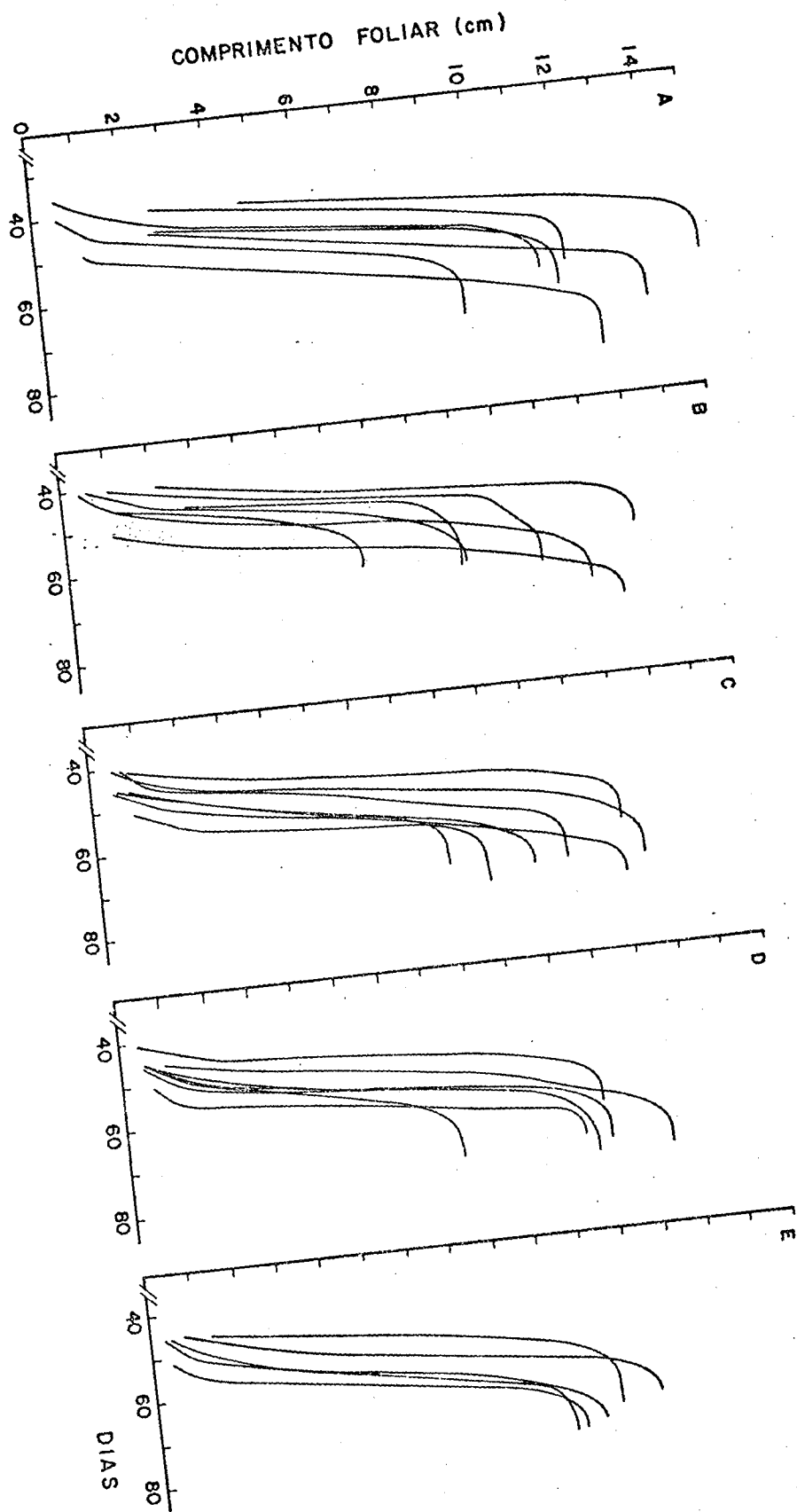


FIGURA 17

## 1. Número e velocidade de aparecimento das folhas

Foi contado o número de folhas que aparecem nos caules em um total de 61 dias. Com 61 dias os caules apresentam 16,5 folhas. Pela regressão linear foi possível construir a figura 18 que correlaciona o número de folhas que aparece nos caules em função do tempo para as seis plantas analisadas. Observa-se que o número de folhas aumenta rapidamente em função do tempo. As análises de correlação e regressão linear foram realizadas e o coeficiente de correlação ( $r$ ) é de 0,994 e de regressão linear ( $a$ ) é de 0,702. O valor médio de  $r$  indica alta correlação entre número de folhas e tempo. O coeficiente de regressão linear representa velocidade de aparecimento de folhas. Verifica-se que, na maioria das plantas analisadas a parecem  $0,7 \text{ folhas.dia}^{-1}$ , ou seja, o tempo entre o aparecimento das folhas é de 1,43 dias.

## 2. Velocidade de crescimento das folhas

Na tabela 9 estão representados os dados de velocidade de crescimento para folhas surgidas nos caules crescidos em condições naturais. Verifica-se que as folhas (1a a 1d) que surgem no caule no campo, crescem em velocidades de  $0,6-0,7 \text{ cm.dia}^{-1}$  na fase linear de crescimento. Com relação ao tempo necessário para estabilizar o crescimento, de 28 folhas analisadas, 64% delas precisaram de 19-22 dias, 25% ao redor de 25 dias e 11% aproximadamente 15 dias.

FIGURA 18 - Número de folhas nos caules de 6 plantas de D.  
Composita cultivadas em canteiro.

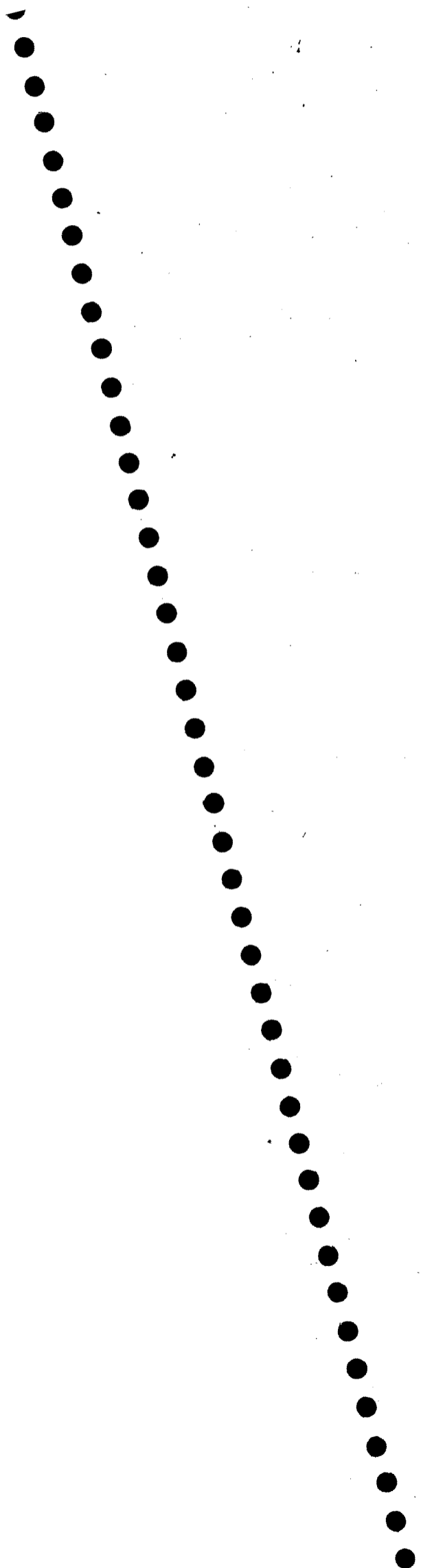


FIGURA 18

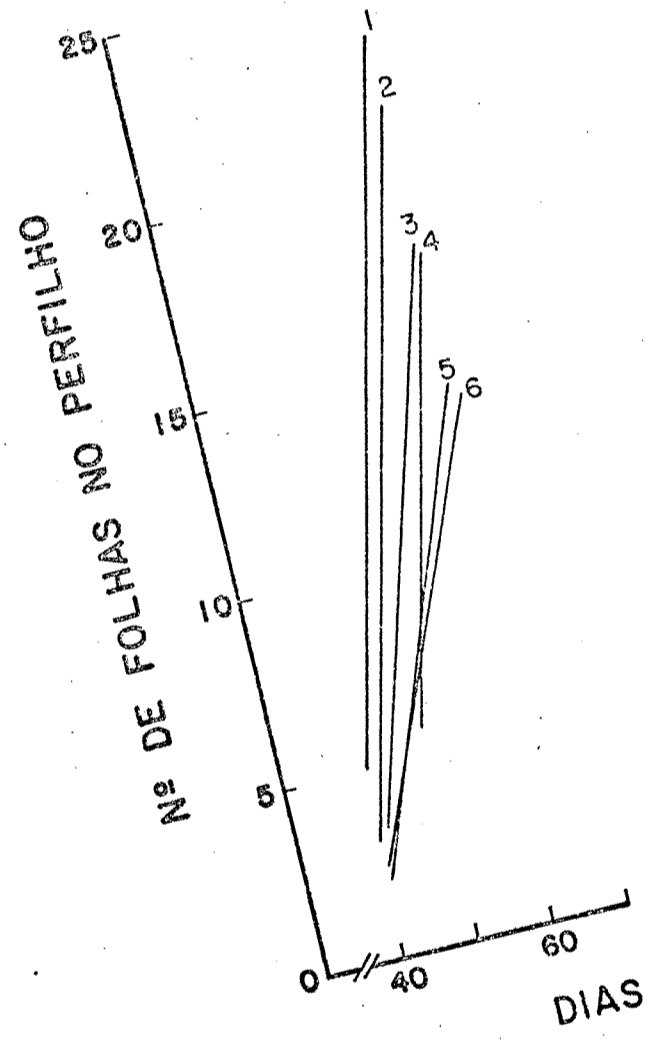


TABELA 9 - Velocidade de crescimento e comprimento máximo de 5 folhas surgidas em caules de 6 plantas de D. composita cultivadas em canteiro.

	Folhas				
	1	1a	1b	1c	1d
Velocidade crescimento (cm.dia <sup>-1</sup> )	0,803	0,762	0,644	0,707	0,626
Comprimento máximo (cm)	10,8	9,6	10,4	9,6	9,6

### 3. Comprimentos máximos atingidos pelas folhas

Na tabela 9 estão representados os comprimentos máximos alcançados pelas folhas, dispostas em ordem de aparecimento (folhas 1-1d) surgidas em caules de 6 plantas analisadas. Os comprimentos máximos alcançados pelas folhas são variáveis. Entretanto, quando se analisa os valores para cada folha (Tabela 9 verifica-se que as folhas 1 a 1d atingem comprimentos máximos semelhantes.

### Germinação

Determinação da viabilidade das sementes pelo teste do tetrazólio

A embebição das sementes por 24 horas facilitou o seccionamento das mesmas e a separação das lâminas de endosperma para a remoção dos embriões, em relação às sementes não embebidas.

#### 1. Teste do tetrazólio

A manutenção das sementes intactas em solução de tetrazólio 0,1, 0,5 e 1% por 24 e 48 horas a 37°C, não resultou na coloração dos embriões. No caso das sementes seccionadas transversalmente ao meio, mantidas em solução de tetrazólio a 0,1 e 1% por 12 e 24 horas a 37°C no escuro, foi verificado que apenas os embriões dos lotes que permaneceram em solução

a 1% por 24 horas apresentaram coloração satisfatória (vermelho brilhante). Os demais tratamentos induziram coloração in satisfatória (rosa claro) e não homogênea dos embriões, sugerindo má penetração do sal de tetrazólio.

Na tabela 10 estão representadas as porcentagens de embriões isolados corados com solução de tetrazólio a 0,1% por 24 horas a 37°C no escuro, após permanecerem embebendo por períodos de 1 a 8 dias. Verifica-se que no caso das sementes ar mazenadas por 4 anos e embebidas por 1 ou 2 dias, o teste não acusa resposta satisfatória ao tetrazólio. Após 4 dias de em bebição, entretanto, aumenta a porcentagem de embriões com co loração satisfatória (vermelho brilhante). Quando o teste é feito com sementes que permaneceram embebendo por 8 dias, 32% dos embriões coram-se satisfatoriamente. Neste caso, 3 horas são suficientes para se obter a resposta ao tetrazólio, mas es te período é insuficiente quando se utiliza sementes embebidas por 4-6 dias. Para as sementes recém coletadas, verifica-se que com 24 horas de embebição a porcentagem de embriões com coloração satisfatória é baixa e é alta a porcentagem de embriões com coloração insatisfatória. Com o aumento do período de embebição, principalmente após 6 dias, nota-se um amen to acentuado de sementes com coloração satisfatória. Estes da dos indicam que uma avaliação precisa da viabilidade das semen tes pelo teste do tetrazólio, apenas é possível quando se usam embriões isolados de sementes que permaneceram embebidas por 6-8 dias.



TABELA 10 - Viabilidade de embriões isolados de sementes de D. composita, armazenadas por 4 anos e recém coletadas, determinada pelo teste de tetrazólio. Embebição por períodos de 1 a 8 dias; sementes armazenadas por 4 anos a 25°C (a) e recém coletadas (b). Resultados em porcentagem.

Tipo de coloração do embrião	Tempo de embebição (dias)									
	1		2		4		6		8	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
satisfatória	0	16	0	52	16	68	24	88	32	92
insatisfatória	0	64	0	36	12	24	8	0	12	0
incolor	100	0	100	12	72	8	68	12	56	8

## 2. Padrões de coloração em embriões isolados

Na figura 19 estão ilustrados os padrões de coloração de embriões isolados. Foram consideradas viáveis as sementes com embriões completamente corados (Figura 19A) ou com a área de origem da plúmula e radícula corada e com o cotilédone com pequenas áreas não coradas (Figuras 19B, C, D). Embriões com radícula corada, mas com grande parte do cotilédone incolor (Figuras 19 E, F) foram consideradas inviáveis. Também foram considerados inviáveis os embriões incolores (Figura 19L), embriões com a área da plúmula e radícula incolores e com cotilédone completamente ou parcialmente corado (Figuras 19G, H, I, J, K).

### Embebição de sementes

Na figura 20A estão representadas as curvas de porcentagem de embebição de sementes mantidas em luz branca e escuro durante 12 dias. Verifica-se que em ambas as condições há uma fase rápida de absorção no primeiro dia, e a porcentagem de embebição alcança ao redor de 60%. A partir deste período a absorção é lenta estabilizando-se entre 70 e 90%, após 3 dias de embebição. A embebição em luz é semelhante a de escuro.

Na figura 20B está representada a curva de embebição para sementes mantidas em luz no período inicial de 12 horas. Verifica-se que é, mais especificamente, na primeira hora de embebição que a semente absorve água rapidamente, atingindo 40%.

A determinação do peso seco durante o período de 8

FIGURA 19 - Padrões de coloração pelo tetrazólio de embriões de D. composita.

ee - eixo embrionário; c - cotilédone

☒ resposta positiva ao tetrazólio

☐ resposta negativa ao tetrazólio

FIGURA 19

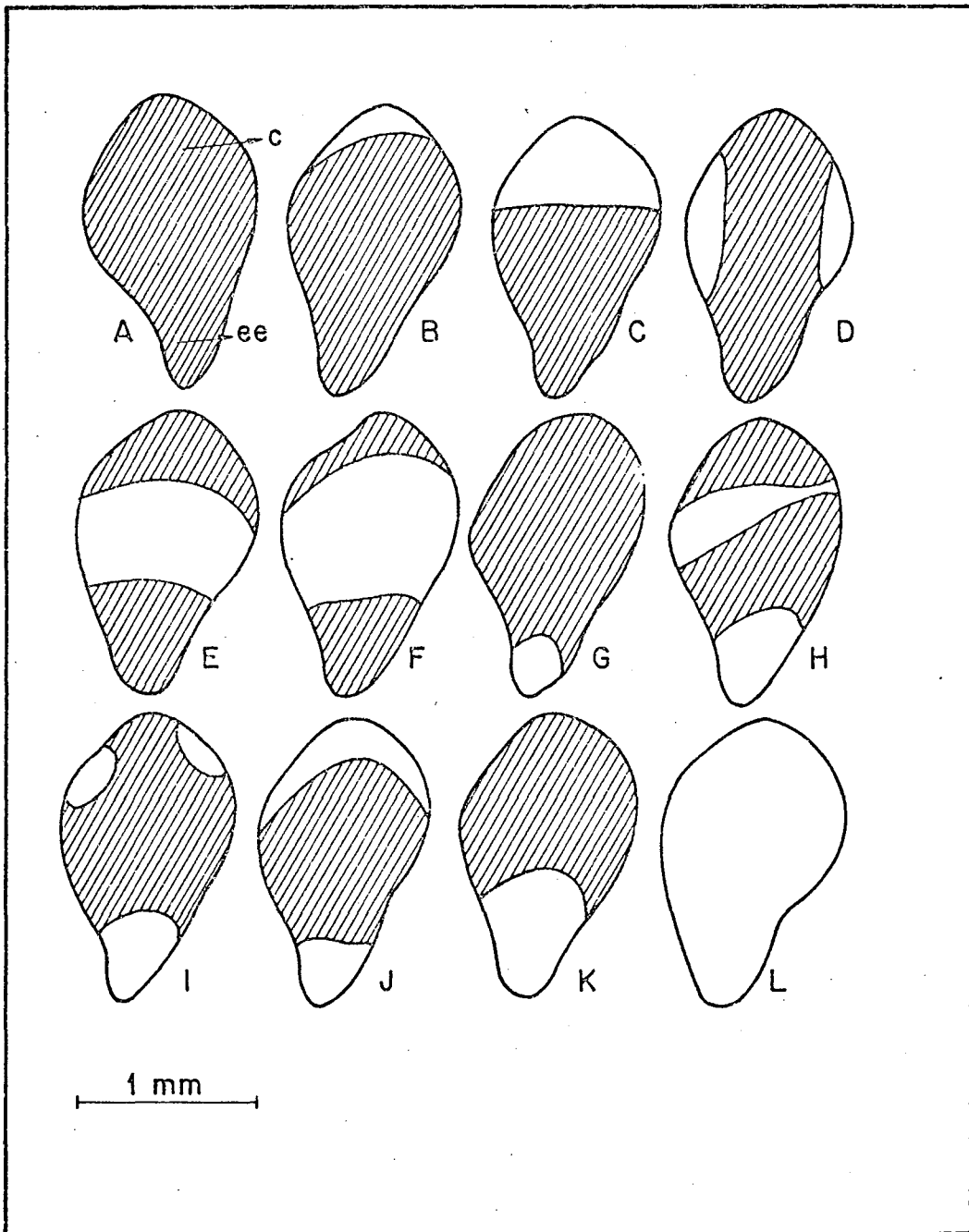


FIGURA 20 - Embebição de sementes de D. composita.

A - período de 1-12 dias

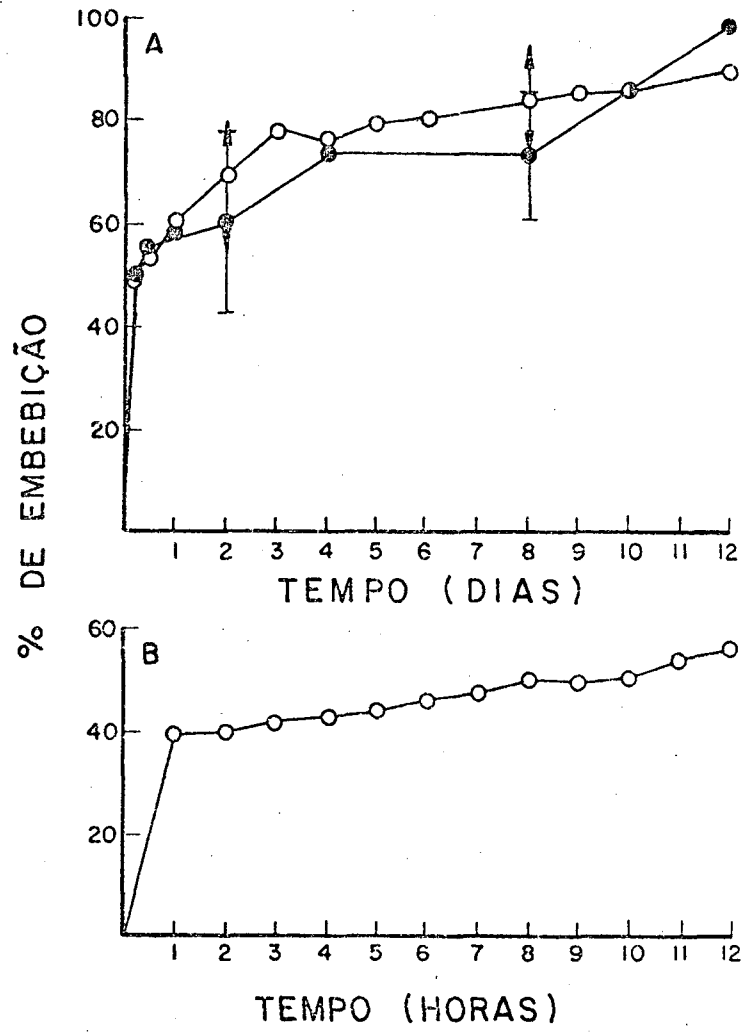
B - período de 0-12 horas

o luz

● escuro

As barras verticais representam os intervalos de confiança.

FIGURA 20



dias indicou que este não aumenta, permanecendo ao redor de 260 mg (dados não apresentados).

O teor de umidade das sementes recém coletadas e das sementes armazenadas por 4 e 5 anos era de 11 a 13%.

#### Efeito de alas na germinação

Na figura 21 estão representados os valores angulares de germinação em função do tempo de sementes (armazenadas por 4 anos) intactas ou sem alas, sob luz ou escuro, a 25°C. Observa-se que as primeiras sementes germinadas, com ou sem alas, em luz ou escuro, aparecem no 12º dia do experimento. A germinação para por volta do 24º dia. A análise estatística para o 26º dia não acusou diferenças significativas entre os valores máximos de germinação alcançados pelos tratamentos ( $F_{5\%}$  não significativo). A ala e a luz não afetam a germinação. Nos experimentos seguintes sempre foram usadas sementes intactas.

#### Efeito de temperaturas constantes na germinação.

Nestes experimentos as sementes armazenadas por diferentes períodos foram colocadas para germinar em temperaturas constantes de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45°C sob luz branca e escuro.

#### 1. Sementes armazenadas por 4 anos

Na figura 22A estão representadas as curvas de germinação para as várias temperaturas testadas sob luz branca.

FIGURA 21 - Efeito das alas na germinação de sementes de D.  
composita.

F<sub>5%</sub> não significativo

- sementes com ala, sob luz
- sementes sem ala, sob luz
- △ sementes com ala, sob escuro
- ▲ sementes sem ala, sob escuro



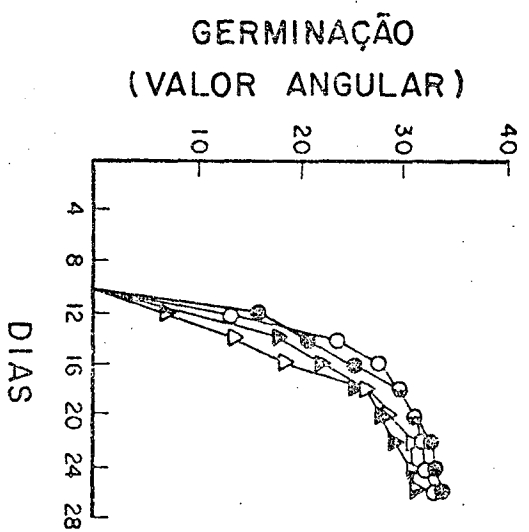


FIGURA 21

FIGURA 22 - Efeitos de temperaturas constantes na germinação de sementes de D. composita armazenadas por 4 anos.

A - luz

B - escuro

□ 5, 10, 15, 40 e 45°C

○ 20°C    ⊕ 25°C    Δ 30°C    ▲ 35°C

A barra vertical representa  $DMS_{5\%}$ .

$F_{5\%}$  não significativo para escuro.

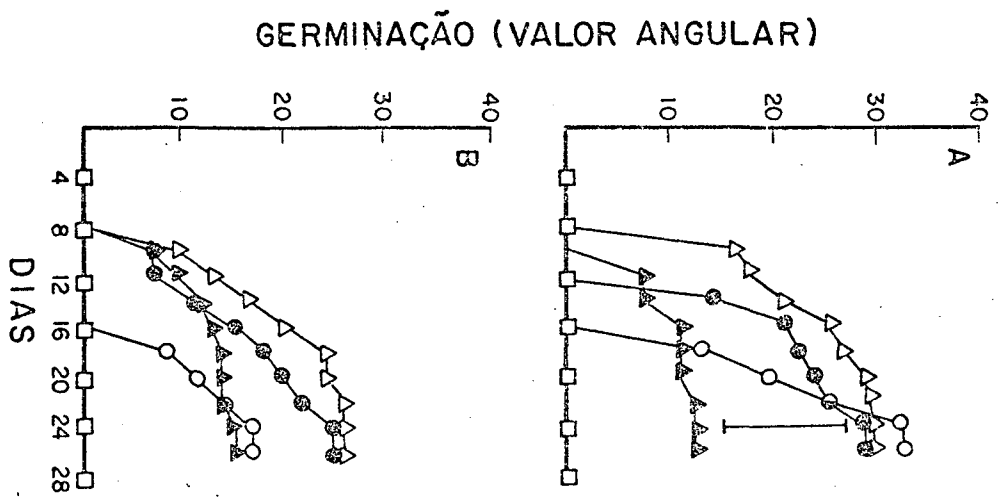


FIGURA 22

Verifica-se que a 20, 25 e 30°C a germinação estabiliza-se por volta do 24º dia. A temperatura de 35°C inibe a germinação sob luz. No escuro (Figura 22B) não há diferença significativa entre os valores finais de germinação das sementes mantidas a 20, 25, 30 e 35°C. A germinação também se estabiliza ao redor do 24º dia. Tanto na luz como no escuro o início da germinação a 20°C parece ser retardado. As sementes não germinam em temperaturas de 5, 10, 15, 40 e 45°C. Portanto, para sementes armazenadas por 4 anos, a germinação sob luz ou escuro ocorre acima de 15°C e abaixo de 40°C.

A relação entre a germinação final e temperatura sob luz e escuro está representada na figura 23. A análise estatística indicou interação entre luz e a temperatura de 20°C (ver  $DMS_{5\%}$ ). Assim, a germinação das sementes é significativamente promovida na luz, nesta temperatura. Nas temperaturas de 25, 30 e 35°C, as sementes são indiferentes à luz ( $F_{5\%}$  não significativo para a interação). Verifica-se que para sementes armazenadas por 4 anos a faixa ótima de temperatura de germinação na luz está entre 20 e 30°C e no escuro entre 25 e 30°C.

Os valores máximos de germinação em porcentagem observados, estão entre 25 e 33%. Para este lote de sementes foi feito o teste de tetrazólio, que acusou viabilidade de  $30,4 \pm 3,6\%$ .

## 2. Sementes armazenadas por 5 anos

Na figura 24A e B estão expressos os valores angulares de germinação em função do tempo de sementes mantidas sob

FIGURA 23 - Relação entre temperatura e luz na germinação máxima de sementes de D. composita, armazenadas por 4 anos.

□ - luz

▣ - escuro

A barra vertical representa  $DMS_{5\%}$ , para a interação luz x temperatura na decomposição luz dentro de cada temperatura.

FIGURA 23

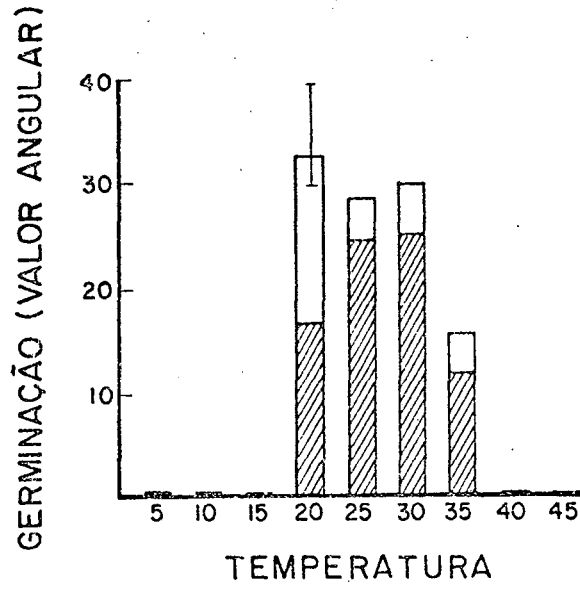


FIGURA 24 - Efeito de temperaturas constantes na germinação de sementes de D. composita armazenadas por 5 anos.

A - luz

B - escuro

□ - 5, 10, 15, 40 e 45°C

○ 20°C    ● 25°C    Δ 30°C    ▲ 35°C

F<sub>5%</sub> não significativo para as temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C sob luz ou escuro.





FIGURA 24

77

30 [ A

luz e escuro, em temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45°C. Nestes experimentos a germinação foi acompanhada até o 40º dia. A análise estatística dos valores alcançados nos 24º e 40º dias, indicou que não há diferença entre luz e escuro nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C e que não há diferença entre estas temperaturas. Em luz e em escuro, não ocorre germinação das sementes mantidas em temperaturas de 5, 10, 15, 40 e 45°C. As temperaturas de 20 e 35°C retardam o início do processo, que nas demais temperaturas ocorre no 14º dia do experimento.

Os valores angulares da germinação máxima atingida nas várias temperaturas testadas em relação à luz, estão representadas na figura 25. A análise estatística não indicou interação entre luz e temperatura. Portanto verifica-se que nas temperaturas em que ocorreu germinação, isto é, 20, 25, 30 e 35°C, as sementes são indiferentes à luz. Para as sementes armazenadas por 5 anos (4 anos a 25°C e 1 ano a 4°C) as temperaturas ótimas para a germinação parecem ser as de 20, 25, 30 e 35°C, sob luz e escuro.

Os máximos valores de germinação em porcentagem estão entre 10 e 15%. O teste de tetrazólio indicou viabilidade de  $15,0 \pm 3,2\%$ .

### 3. Sementes recém-coletadas

Na figura 26A estão representados os valores angulares da germinação em função do tempo, obtidos para sementes mantidas sob luz, em temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45°C. Verifica-se que no 24º dia do experimento sob luz, a

FIGURA 25

- Relação entre temperatura e luz na germinação máxima de sementes de D. composita armazenadas por 5 anos.

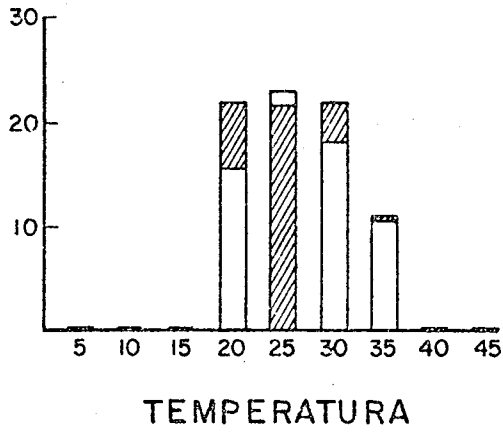
□ - luz

▣ - escuro

$F_{5\%}$  não significativo para a interação entre luz e temperatura.

GERMINAÇÃO (VALOR ANGULAR)

FIGURA 25



germinação a 25°C é significativamente maior que nas demais temperaturas. A 20 e 30°C a germinação é significativamente reduzida em relação a 35°C. No escuro, (Figura 26B), observa-se que as temperaturas de 25°C e 35°C promovem a germinação de forma significativa em relação a 20 e 30°C. Tanto na luz como no escuro não ocorre germinação a 5, 10, 15, 40 e 45°C. O início da germinação a 20°C é retardado para o 18º dia enquanto que nas demais temperaturas se dá aos 10 dias, portanto mais cedo do que nos casos mencionados anteriormente.

Os máximos valores de germinação observados nas diferentes temperaturas em relação à luz, estão representados na figura 27. A análise estatística indica que apenas na temperatura de 25°C a germinação na luz é significativamente maior do que no escuro. Nas temperaturas de 20, 30 e 35°C, as sementes são indiferentes à luz. Para as sementes recém-coletadas a temperatura que possibilita a máxima germinação é a de 25°C na luz. No escuro, isto ocorre a 25 e 35°C. Na temperatura de 25°C sob luz a porcentagem de germinação alcançada é ao redor de 70%. O teste do tetrazólio indicou uma viabilidade de de 96,2 ± 7,6%.

#### Efeito de temperaturas alternadas na germinação

Nestes experimentos, sementes armazenadas por diferentes períodos foram colocadas para germinar em regime de temperaturas alternadas de 5-25, 10-25, 15-25, 20-25, 30-25, 35-25, 40-25 e 45-25°C, sob luz e escuro.

FIGURA 26 - Efeito de temperaturas constantes na germinação de sementes de D. composita recém coletadas.

A - luz

B - escuro

□ - 5, 10, 15, 40 e 45°C

○ 20°C      ● 25°C      △ 30°C      ▲ 35°C

As barras verticais representam  $DMS_{5\%}$ .

FIGURA 27 - Relação entre temperatura e luz na germinação máxima de sementes de D. composita recém coletadas.

□ - luz

▣ - escuro

A barra vertical representa  $DMS_{5\%}$ , para a interação luz x temperatura na decomposição luz dentro de cada temperatura.

FIGURA 26

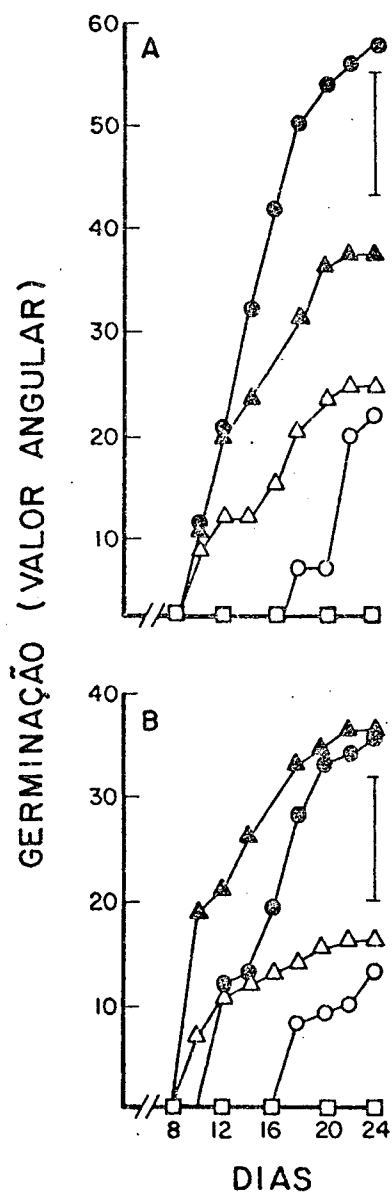
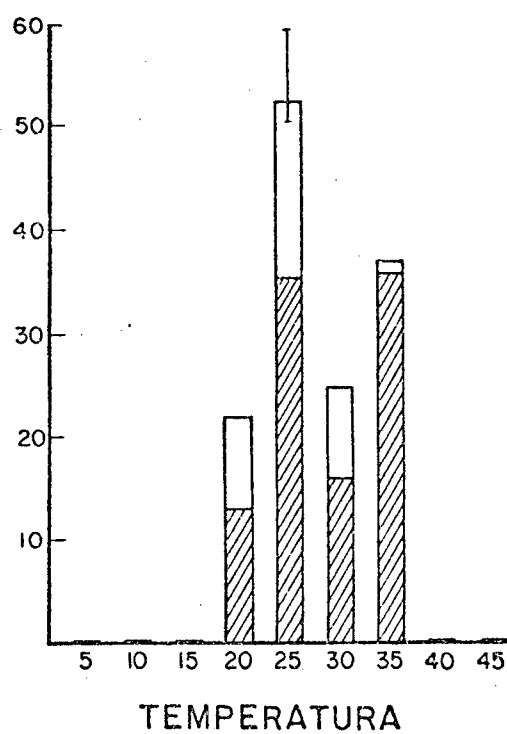


FIGURA 27



### 1. Sementes armazenadas por 4 anos

Na figura 28A estão representados os valores de germinação observados para sementes mantidas nas várias alternâncias de temperatura sob luz, e na figura 28B para escuro. Verifica-se que no 50º dia do experimento não há diferença significativa entre os valores de germinação no escuro, para as várias temperaturas testadas. Na luz a germinação a 15-25°C, é significativamente promovida em relação a de 30-25°C. A 40-25 e 45-25°C não ocorre germinação.

O início do processo é retardado para o 24º dia nas temperaturas de 5-25 e 10-25°C. No escuro isto também ocorre para a temperatura de 15-25°C.

Na tabela 11, estão representados os valores de velocidade de germinação para as curvas da figura 28. Observa-se que os mais altos valores de velocidade são obtidos na temperatura de 20-25°C e se aproximam dos verificados para a temperatura constante de 25°C sob luz e escuro.

Como pode ser visto, sob luz, o valor máximo de germinação ocorre para a temperatura de 15-25°C, que entretanto, não é estatisticamente maior que 20-25°C. O fato da velocidade de ser maior a 20-25°C, faz com que os valores máximos sejam atingidos no 22º dia do experimento, o que indica que a germinação a 20-25°C é mais eficiente do que a 15-25°C, temperatura em que a máxima germinação é atingida ao redor do 42º dia.

Os valores finais de germinação para todos os regimes de temperaturas testados sob luz e escuro estão representados na figura 29. A análise estatística indicou interação



FIGURA 28 - Efeito de temperaturas alternadas na germinação de sementes de D. composita armazenadas por 4 anos.

A - luz

B - escuro

□ - 40-25 e 45-25°C

○ 5-25°C

● 10-25°C

△ 15-25°C

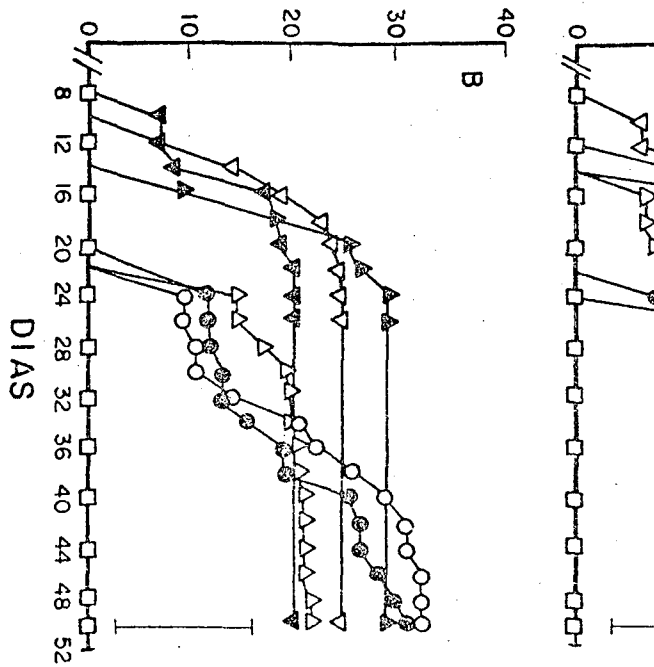
▲ 20-25°C

▽ 30-25°C

▼ 35-25°C

As barras verticais representam DMS<sub>5%</sub>.

# GERMINAÇÃO (VALOR



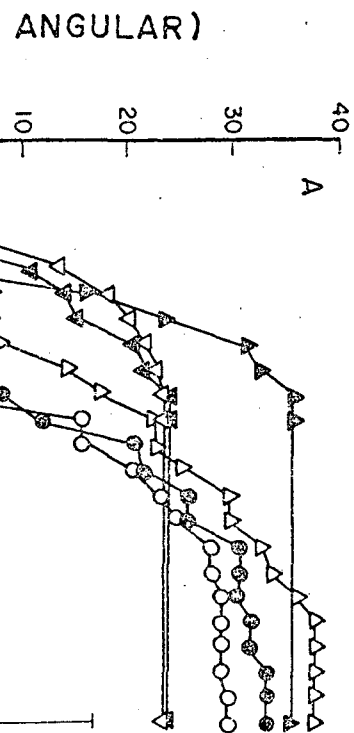


FIGURA 28

TABELA 11 - Efeito de temperaturas alternadas na velocidade de germinação de sementes de D. composita.

Temperaturas (°C)	Velocidade de germinação (número de sementes.dia <sup>-1</sup> )	
	luz	escuro
5-25	0,4	0,3
10-25	0,4	0,2
15-25	0,4	0,3
20-25	1,2	0,8
30-25	0,3	0,6
35-25	0,4	0,2
25°C	0,8	0,8

FIGURA 29 - Relação entre temperatura e luz na germinação máxima de sementes de D. composita armazenadas por 4 anos.

□- luz

▣- escuro

A barra vertical representa  $DMS_{5\%}$ , para a interação luz x temperatura na decomposição luz dentro de cada temperatura.

TEMPERATURA

GERMINAÇÃO (VALOR ANGULAR)

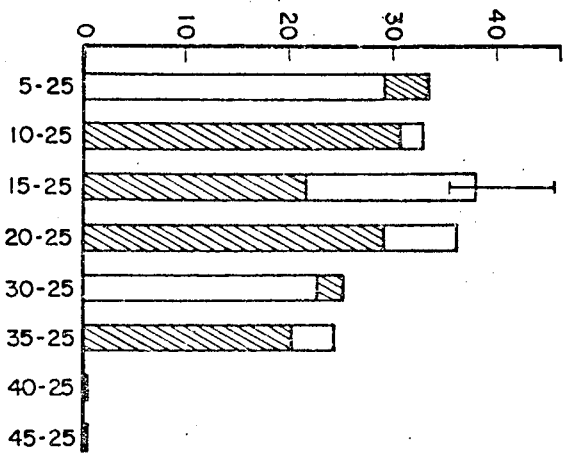


FIGURA 29

entre luz e a temperatura de 15-25°C. Nesta temperatura a luz promove significativamente a germinação em relação ao escuro. Para sementes armazenadas por 4 anos a máxima germinação é atingida no menor tempo com as temperaturas de 20-25°C sob luz.

## 2. Sementes armazenadas por 5 anos

Na figura 30A estão representados os valores angulares de germinação em função do tempo para sementes mantidas sob luz, nas diversas temperaturas alternadas testadas. A análise estatística para o 30º dia indica que temperaturas de 30-25 e 20-25°C promovem significativamente a germinação em relação a 5-25, 10-25 e 35-25°C. No escuro (Figura 30B) observa-se que a germinação a 20-25°C é significativamente igual a de 30-25°C. Na luz e no escuro a germinação se estabiliza, nas temperaturas de 30-25 e 20-25°C, no 28º dia do experimento. O início é retardado em temperaturas de 5-25, 10-25 e 15-25°C, na luz, e nas temperaturas de 5-25 e 15-25°C, no escuro. As sementes não germinam nas temperaturas de 40-25 e 45-25°C sob luz ou escuro e em temperatura de 10-25°C no escuro.

Os valores angulares da germinação máxima atingida em luz e escuro, para cada regime de temperatura alternada testado, estão representados na figura 31. A análise estatística não indicou interação entre luz e as alternâncias testadas. Verifica-se que para todas as temperaturas as sementes são in diferentes à luz.



FIGURA 30 - Efeito de temperaturas alternadas na germinação de sementes de D. composita armazenadas por 5 anos.

A - luz

B - escuro

□ 40-25°C e 45-25°C

○ 5-25°C    ● 10-25°C    Δ 15-25°C

▲ 20-25°C    ▼ 30-25°C    ▽ 35-25°C

As barras verticais representam  $DMS_{5\%}$ .

Obs.: Não houve germinação a 10-25°C no escuro.

FIGURA 31 - Relação entre temperatura e luz na germinação máxima de sementes de D. composita armazenadas por 5 anos.

□ luz

▣ escuro

$F_{5\%}$  não significativo entre luz e escuro para todas as temperaturas.

FIGURA 30

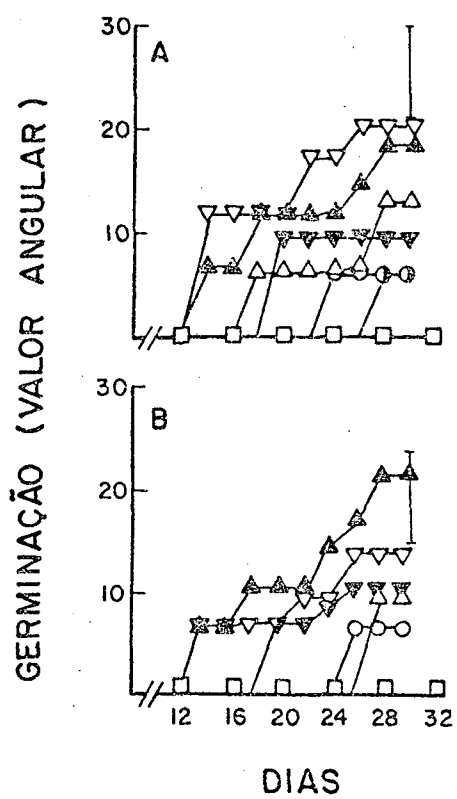
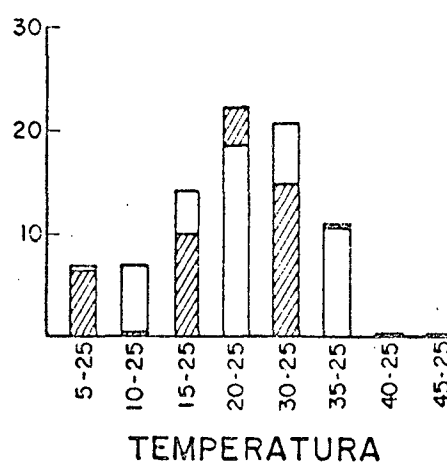


FIGURA 31



### Períodos curtos de temperaturas baixas e alta

Estes experimentos foram realizados com o objetivo de se verificar o efeito de tratamentos a 4°C por 5 e 10 dias e de 35°C pelos mesmos períodos na germinação de sementes recém coletadas previamente embebidas.

Na figura 32A estão representados os valores angulares da germinação, a 25°C sob luz, de sementes que permaneceram 10 dias a 4°C ou a 35°C. Observa-se que os valores alcançados no dia 28 não diferem significativamente do controle (25°C) ( $F_{5\%}$  não significativo). No escuro (Figura 32B) a análise estatística para o 28º dia não indicou diferença significativa entre o controle e os tratamentos ( $F_{5\%}$  não significativo). O início da germinação das sementes submetidas a 4°C é retardado em relação aos outros tratamentos (controle e 35°C).

Na figura 32 C,D estão representadas as curvas de germinação na luz para sementes mantidas 5 dias a 4°C ou a 35°C. Verifica-se que não há diferença significativa entre os valores máximos de germinação alcançados no 24º dia do experimento ( $F_{5\%}$  não significativo). No escuro (Figura 32D) a germinação das sementes tratadas também não difere significativamente do controle ( $F_{5\%}$  não significativo).

Na figura 33 estão representados os valores angulares da germinação final, sob luz e escuro, para sementes tratadas com temperatura alta ou baixa por períodos de 5 e 10 dias. Verifica-se que as sementes germinam significativamente mais na luz do que no escuro, com exceção do tratamento de 10 dias a 4°C. A análise estatística indicou que não houve efei

FIGURA 32 - Efeito de um período de temperatura baixa ( $4^{\circ}\text{C}$ ) ou alta ( $35^{\circ}\text{C}$ ) na germinação de sementes de D. composita recém coletadas e previamente embebi das.

- A - período de 10 dias; germinação sob luz.
- B - período de 10 dias; germinação sob escuro
- C - período de 5 dias, germinação sob luz.
- D - período de 5 dias; germinação sob escuro
- o - controle
- $\Delta$  -  $4^{\circ}\text{C}$
- $\nabla$  -  $35^{\circ}\text{C}$

$F_{5\%}$  não significativo para períodos de 5 ou 10 dias a  $4^{\circ}\text{C}$  ou  $35^{\circ}\text{C}$ .

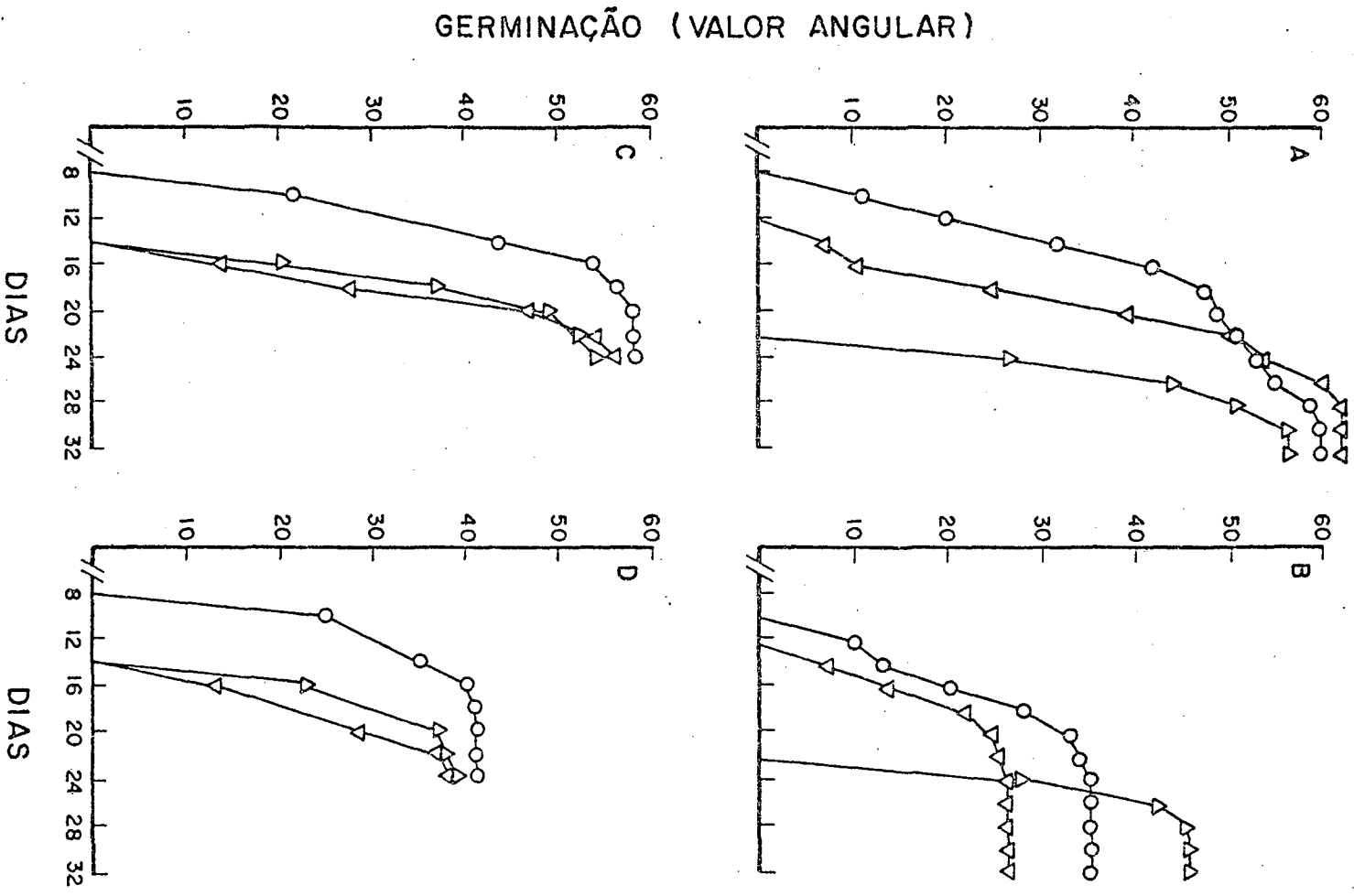


FIGURA 32

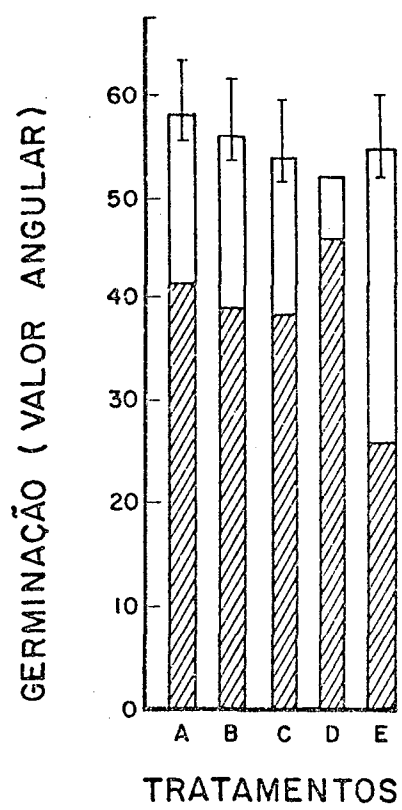
FIGURA 33 - Efeito de um período de temperatura baixa ( $4^{\circ}\text{C}$ ) ou alta ( $35^{\circ}\text{C}$ ) na germinação máxima de sementes de D. composita recém coletadas e previamente embebidas.

- luz
- ▣ escuro

As barras verticais representam  $\text{DMS}_{5\%}$ .

- A -  $25^{\circ}\text{C}$
- B - 5 dias a  $35^{\circ}\text{C}$
- C - 5 dias a  $4^{\circ}\text{C}$
- D - 10 dias a  $4^{\circ}\text{C}$
- E - 10 dias a  $35^{\circ}\text{C}$

FIGURA 33



to das temperaturas alta e baixa e nem do período de aplicação das mesmas. Não houve também interação significativa entre estes fatores.

Na tabela 12 estão representados os valores de velocidade de germinação para luz e escuro. No caso dos tratamentos por 10 dias, verifica-se que a germinação do controle e do tratamento com 35°C é quase duas vezes mais rápida na luz do que no escuro. A baixa temperatura retarda o início da germinação mas aumenta sua velocidade. Para os tratamentos por 5 dias a velocidade de germinação também é maior na luz do que no escuro.

#### Efeito do armazenamento

Com os dados dos experimentos realizados nas seções anteriores, foi possível construir as figuras mostradas a seguir, que possibilita uma visão comparativa mais clara de como o período de armazenamento afetou a germinação das sementes sob luz e escuro, em temperaturas constantes de 20, 25, 30 e 35°C e alternadas de 20-25, 30-25 e 35-25°C.

##### 1. Temperaturas constantes

Na figura 34A está representada a germinação a 25°C sob luz de sementes armazenadas por períodos diferentes. Verifica-se que para sementes armazenadas por 4 e 5 anos a germinação estabiliza ao redor do 24º dia do experimento. No caso das sementes recém coletadas a germinação estabiliza-se ao redor do 44º dia do experimento em valores maiores que os al-



TABELA 12 - Velocidade de germinação de sementes de D. composita recém coletadas, previamente embebidas e submetidas a períodos de temperatura baixa (4°C) ou alta (35°C).

Tratamentos	Velocidade de germinação (nº de sementes germinadas.dia <sup>-1</sup> )	
	luz	escuro
25°C	1,4	0,8
10 dias a 4°C	2,6	2,2
10 dias a 35°C	1,2	0,6
25°C	2,0	1,2
5 dias a 4°C	2,4	1,4
5 dias a 35°C	2,2	1,3

FIGURA 34 - Efeito de períodos de armazenamento na germinação de sementes de D. composita a 25°C.

A - luz

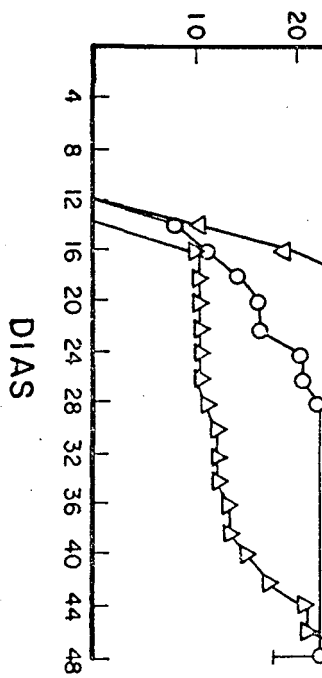
B - escuro

∇ - armazenamento por 4 anos

○ - armazenamento por 5 anos

△ - sementes recém coletadas

As barras verticais representam  $DMS_{5\%}$ .



GERMINAÇÃO (VALOR ANGULAR)

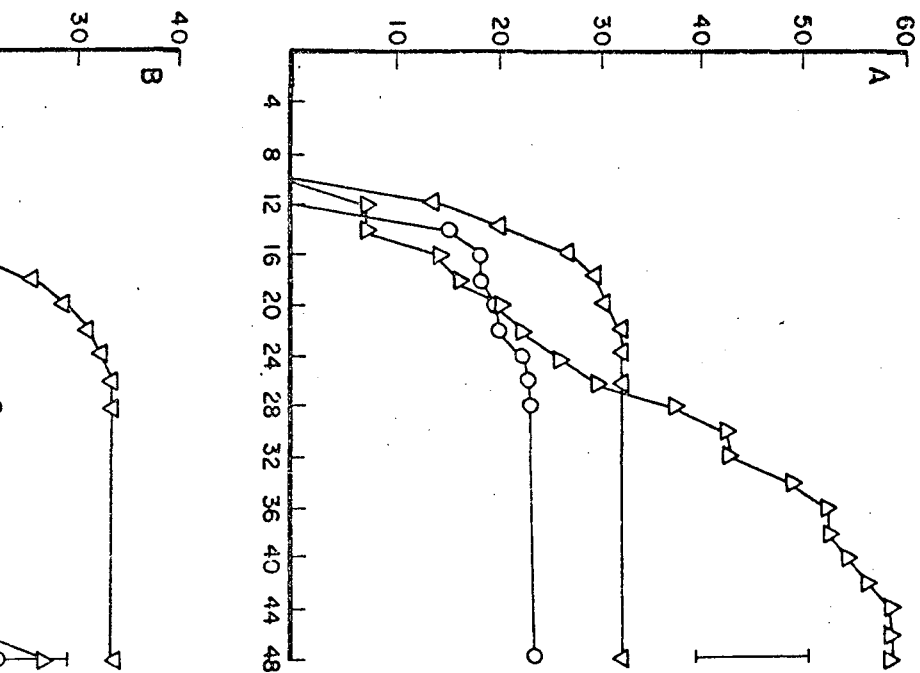


FIGURA 34

cançados nos outros casos. A análise de variância para o 48º dia, indica que os armazenamentos (iguais entre si) reduzem significativamente a germinação a 25°C na luz em relação às sementes recém coletadas. No escuro (Figura 34B) verifica-se que não há diferença significativa entre os valores angulares da germinação de sementes recém coletadas e armazenadas, no 48º dia do experimento. A germinação das sementes armazenadas estabiliza-se ao redor do 28º dia. Em luz e escuro a germinação inicia-se entre os dias 12 e 14 independentemente do tipo de armazenamento. Como pode ser visto o armazenamento torna as sementes, que quando recém colhidas são fotoblásticas positivas, indiferentes à luz.

As velocidades de germinação sob luz, para as sementes armazenadas por 4 anos e recém coletadas, foram de 0,8 e de 0,6 sementes.dia<sup>-1</sup>, respectivamente, o que indica que para as sementes recém coletadas, embora a germinação final seja mais alta, sua velocidade é menor.

Na figura 35A está representada a germinação de sementes mantidas a 20°C sob luz. A análise estatística para o 24º dia do experimento indica que as sementes armazenadas por 4 anos e as recém coletadas germinam significativamente melhor do que as armazenadas por 5 anos. No escuro, (Figura 35) não há diferença significativa entre os dados de germinação do dia 24. Para todos os tipos de armazenamento a germinação inicia-se na luz e no escuro, ao redor do dia 18.

Os resultados da germinação a 30°C na luz são mostrados na figura 35 C. As sementes armazenadas

FIGURA 35 - Efeito de períodos de armazenamento na germinação de sementes de D. composita nas temperaturas de 20, 30 e 35°C.

A - 20°C, sob luz

B - 20°C, sob escuro

C - 30°C, sob luz

D - 30°C, sob escuro

E - 35°C, sob luz

F - 35°C, sob escuro

∇ - armazenamento por 4 anos

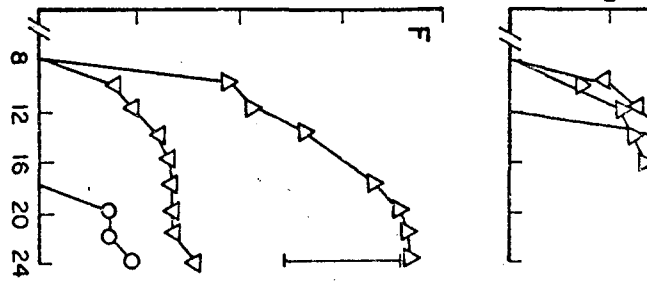
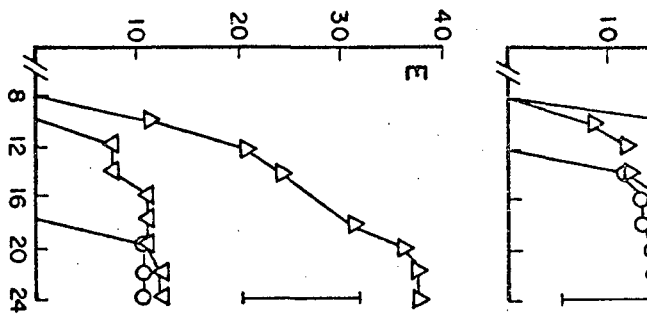
O - armazenamento por 5 anos

Δ - sementes recém coletadas

As barras verticais representam  $DMS_{5\%}$ .

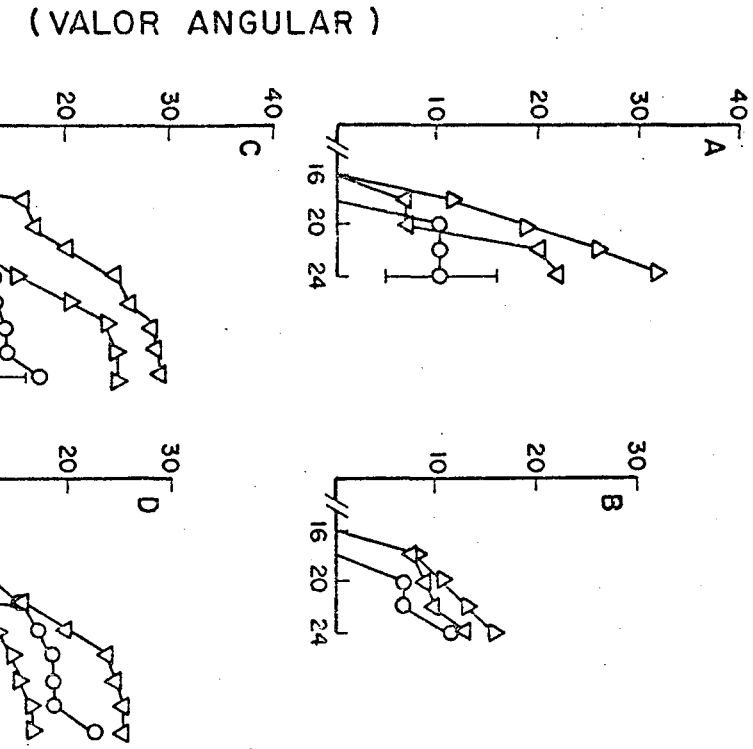
$F_{5\%}$  não significativo para as temperaturas de 20 e 30°C sob escuro.

GERMINAÇÃO



DIAS

FIGURA 35





por 4 anos, germinaram significativamente melhor do que as de 5 anos. No escuro (Figura 35D) não há diferença entre os períodos de armazenamento testados. Em luz e no escuro a germinação inicia-se no 10º dia para sementes recém coletadas e armazenadas por 4 anos e no 14º dia, para sementes armazenadas por 5 anos.

Na figura 35E, estão representados os valores angulares da germinação de sementes a 35°C em luz e na figura 35F para escuro. A análise estatística para o 24º dia indica que as sementes recém coletadas germinam significativamente melhor do que as armazenadas. A 35°C em luz e no escuro a germinação das sementes armazenadas por 5 anos inicia-se apenas no 20º dia do experimento.

A germinação máxima alcançada sob luz e escuro, para cada temperatura testada, está representada na figura 36. Verifica-se que a 20°C as sementes recém coletadas e as armazenadas por 4 anos germinam significativamente melhor na luz do que no escuro, enquanto que as armazenadas por 5 anos, são indiferentes. A 25°C as sementes recém coletadas, germinam significativamente mais na luz do que no escuro, enquanto que as armazenadas são indiferentes. Nas temperaturas de 30°C e 35°C não há diferença significativa entre a germinação em luz e escuro, tanto para as sementes recém coletadas como para as armazenadas por 4 e 5 anos.

## 2. Temperaturas alternadas

Na figura 37A estão representadas as curvas de germinação a 20-25°C de sementes armazenadas por 4 e 5 anos e man

FIGURA 36 - Efeito do armazenamento na germinação máxima de sementes de D. Composita mantida a 20, 25, 30 e 35°C sob luz e escuro.

A - armazenamento por 4 anos

B - armazenamento por 5 anos

C - sementes recém coletadas

□ - luz

▣ - escuro

As barras verticais indicam  $DMS_{5\%}$ .

$F_{5\%}$  não significativo entre luz e escuro

nas temperaturas de 30 e 35°C, para os 3 períodos de armazenamento; na temperatura de 25°C para armazenamento por 4 e 5 anos e de 20°C para armazenamento por 5 anos.

PERÍODO DE ALMACENAMIENTO

GERMINAÇÃO (VALOR ANGULAR)

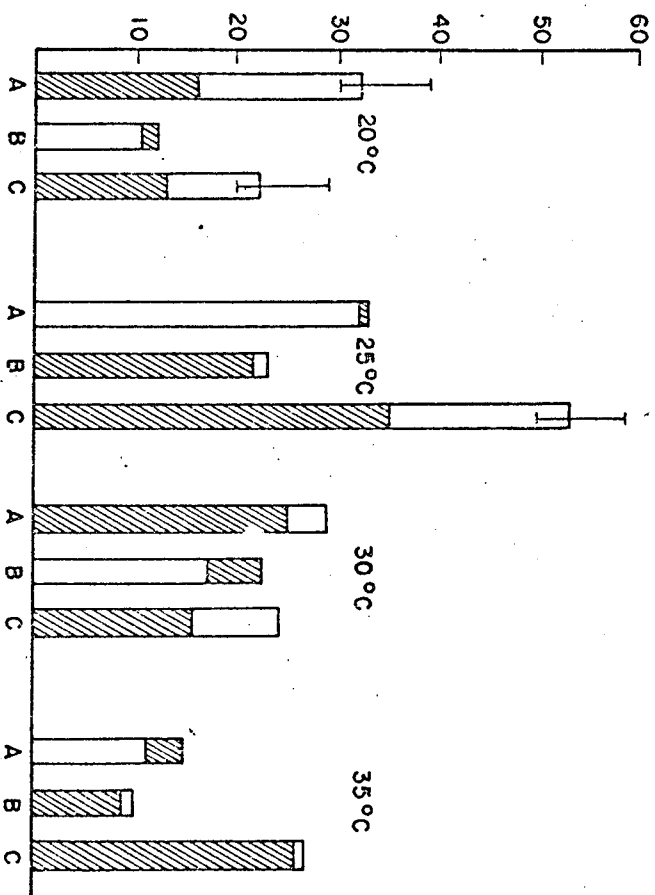


FIGURA 36

tidas sob luz. Observa-se que a germinação é significativamente promovida no caso das sementes armazenadas por 4 anos. No escuro (Figura 37B) a análise de variância indicou diferença significativa entre os valores de germinação alcançados em ambos os casos. Em temperatura de 30-25°C na luz (Figura 37C) observa-se que não há diferença significativa entre os valores de germinação do dia 24, ( $F_{5\%}$  não significativo), para sementes armazenadas por 4 e 5 anos. No escuro, contudo, (Figura 37D) a germinação das sementes armazenadas por 4 anos é significativamente promovida em relação à observada para sementes de 5 anos. Na Figura 37E estão representados os valores angulares de germinação observados para a temperatura de 35-25°C em luz. Verifica-se que a germinação é significativamente maior no caso das sementes armazenadas por 4 anos. No escuro (Figura 37F) a germinação das sementes armazenadas por 5 anos é significativamente reduzida em relação à das sementes armazenadas por 4 anos.

Como foi visto na figura 29 no caso de armazenamento por 4 anos, apenas na temperatura de 15-25°C a germinação é significativamente promovida na luz. Nas demais temperaturas as sementes são indiferentes. Também na figura 31 pode ser visto que as sementes armazenadas por 5 anos são indiferentes à luz em todas as temperaturas alternadas testadas. A análise estatística não indicou efeito de luz ou qualquer interação entre armazenamento e os demais fatores.

### 3. Períodos curtos de armazenamento

FIGURA 37 - Efeito de períodos de armazenamento na germinação de sementes de D. composita nas temperaturas de 20-25°C, 30-35°C e 35-25°C.

A - 20-25°C, sob luz

B - 20-25°C, sob escuro

C - 30-25°C, sob luz

D - 30-25°C, sob escuro

E - 35-25°C, sob luz

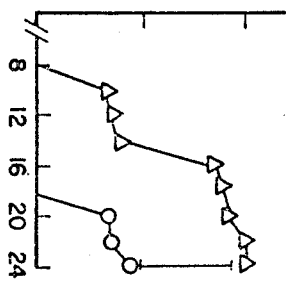
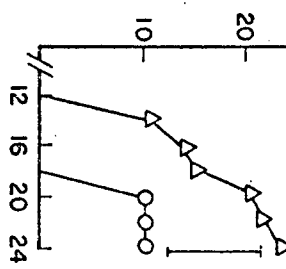
F - 35-25°C, sob escuro

∇ - armazenamento por 4 anos

○ - armazenamento por 5 anos

As barras verticais representam  $DMS_{5\%}$ .

$F_{5\%}$  não significativo para temperatura de 30-25°C sob luz.



DIAS

GERMINAÇÃO (VALOR ANGULAR)

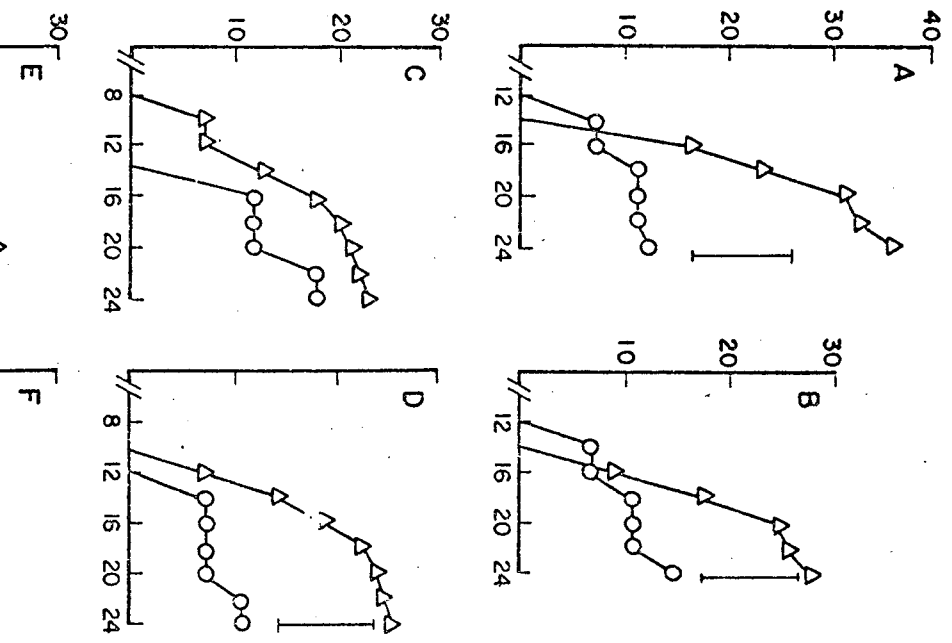


FIGURA 37



meses a 25°C foram postas para germinar sob luz e escuro.

Na figura 38A estão representadas as curvas de germinação sob luz. A análise estatística para o dia 24 indica que os valores de germinação, após 3 meses de armazenamento, são significativamente maiores em relação aos obtidos com sementes armazenadas por 1 e 2 meses. Para o 52º dia do experimento verifica-se entretanto, que não há diferença significativa entre os valores finais de germinação alcançados pelas sementes armazenadas por 1, 2, 3, 5, 8, 9, 10 e 11 meses.

No escuro (Figura 38B) observa-se que no 24º dia as sementes armazenadas por 1 mês germinam significativamente menos do que as demais. Neste caso, não foi realizado experimento para sementes com dois meses. No 52º dia do experimento, a análise estatística indica que as sementes armazenadas por 1, 3 e 8 meses apresentam taxas de germinação significativamente menores do que as armazenadas por 9 e 11 meses.

Na tabela 13 estão representados os valores de velocidade de germinação. As sementes armazenadas por períodos de 8 meses ou superiores germinam sob luz mais rapidamente do que as armazenadas por períodos de 1-3 meses, estabilizando a germinação em 20 dias, enquanto que no caso das últimas, isto ocorre a partir do 32º dia do experimento. No escuro a velocidade de germinação aumenta a partir do 9º mes.

Na figura 39 estão representados os valores angulares da germinação máxima alcançada em luz e escuro para cada período de armazenamento. Observa-se que em todos os períodos analisados a germinação é significativamente maior na luz do que no escuro, com exceção das sementes armazenadas por 9

FIGURA 38 - Efeito de períodos de armazenamento de 1 a 11 meses na germinação de sementes de D. composita.

A - luz

B - escuro

○ 1 mes    △ 2 meses    □ 3 meses

▽ 5 meses    ● 8 meses    ▲ 9 meses

▼ 10 meses    ■ 11 meses

Barras verticais representam  $DMS_{5\%}$ .

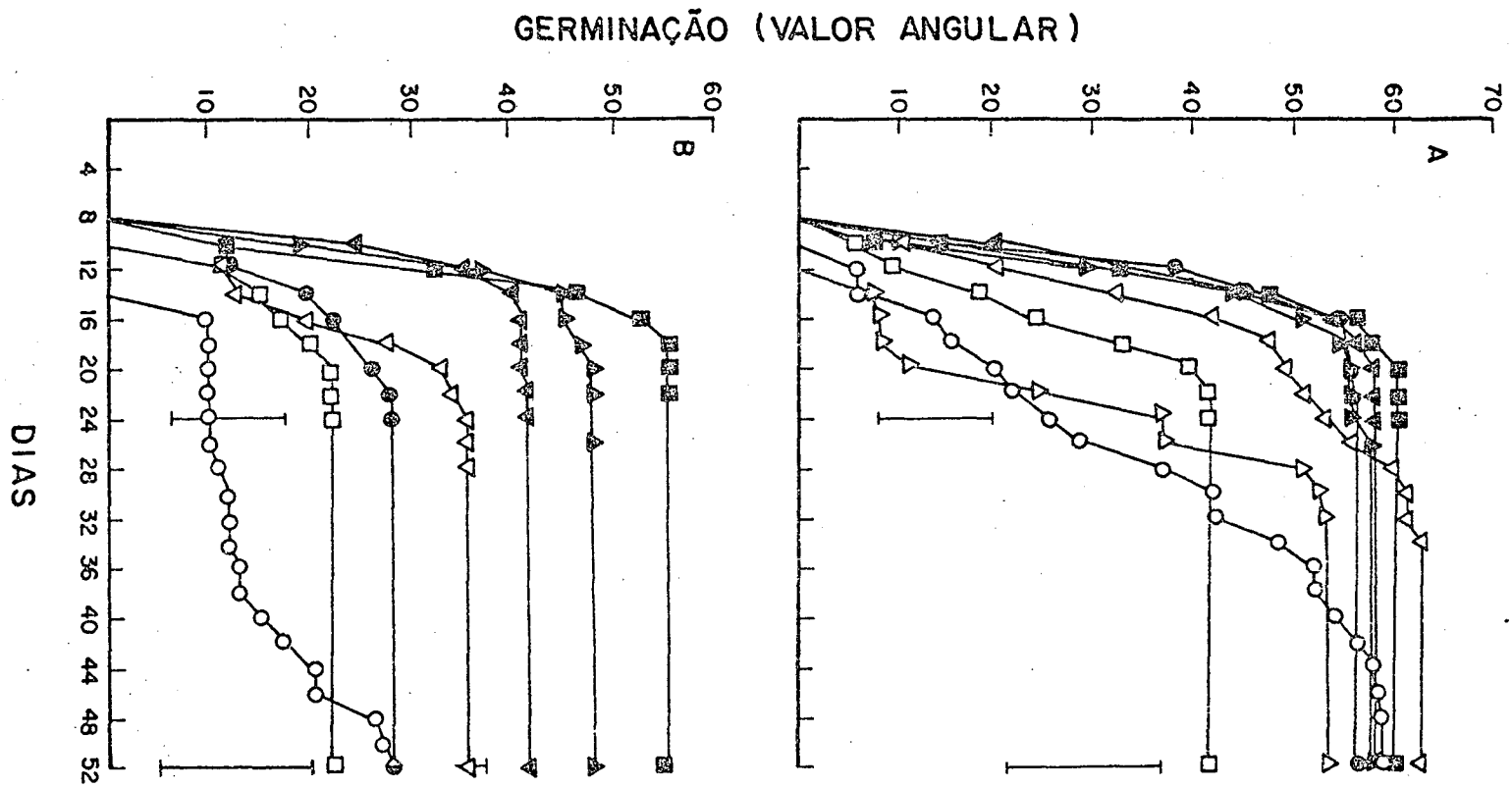


FIGURA 38

TABELA 13 - Velocidade de germinação de sementes de D. com-  
posita armazenadas por períodos de 1 a 11 meses.

Períodos de armazenamento (meses)	Velocidade de germinação (nº de sementes. dia <sup>-1</sup> )	
	luz	escuro
1	0,6	0,4
2	0,9	-
3	0,9	0,4
5	1,4	0,8
8	2,2	0,6
9	2,1	2,2
10	2,0	1,3
11	2,3	2,2

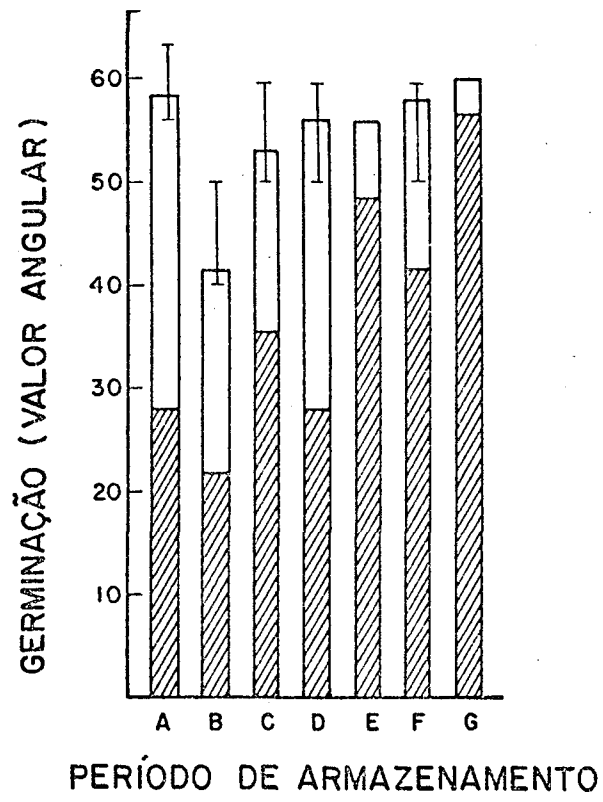
FIGURA 39 - Efeito de períodos de armazenamento de 1 a 11 meses na germinação máxima de sementes de D. Composita.

- A - armazenamento por 1 mes
- B - armazenamento por 3 meses
- C - armazenamento por 5 meses
- D - armazenamento por 8 meses
- E - armazenamento por 9 meses
- F - armazenamento por 10 meses
- G - armazenamento por 11 meses
- - luz
- ▣ - escuro

As barras verticais representam  $DMS_{5\%}$ .

$F_{5\%}$  não significativo entre luz e escuro para armazenamento por 9 e 11 meses.

FIGURA 39



e 11 meses, em que não há diferença significativa entre os valores de germinação sob luz e escuro.

É bom lembrar que sementes armazenadas por 4 e 5 anos são indiferentes à luz a 25°C.

#### 4. Tipo de armazenamento.

Nestes experimentos as sementes foram armazenadas por 9 meses em frasco de vidro a 4°C, em saco de plástico e em saco de papel a 25°C. Na figura 40A e B, estão representados os valores angulares da germinação sob luz e escuro respectivamente. A análise estatística para o 24º dia do experimento indica que sementes armazenadas a 4°C, apresentam germinação significativamente menor do que aquelas armazenadas em temperatura de 25°C. Não há diferença a 25°C, entre o armazenamento em saco de papel e de plástico.

Os valores angulares da germinação máxima sob luz e escuro estão representados na figura 41. Observa-se que em todas as condições de armazenamento as sementes germinam significativamente mais na luz do que no escuro.

O teste de tetrazólio realizado após 9 meses indicou que a porcentagem de sementes viáveis, no caso do armazenamento em saco de papel a 25°C, está ao redor de 90% e nos demais tipos de armazenamento, ao redor de 60%.

Em um experimento com sementes dos três tipos de armazenamento a porcentagem de germinação foi verificada e as sementes que não germinaram foram separadas em dois grupos: sementes contaminadas e não contaminadas por fungo. Estas últi

FIGURA 40 - Efeito do tipo de armazenamento na germinação de D. composita.

A - luz

B - escuro

Δ - saco plástico a 25°C

○ - frasco de vidro a 4°C

▽ - saco de papel a 25°C

As barras verticais representam DMS<sub>5%</sub>.

FIGURA 41 - Efeito do tipo de armazenamento na germinação máxima de sementes de D. composita.

A - saco de papel a 25°C

B - saco de plástico a 25°C

C - frasco de vidro a 4°C

□ - luz

∅ - escuro

As barras verticais representam DMS<sub>5%</sub>.



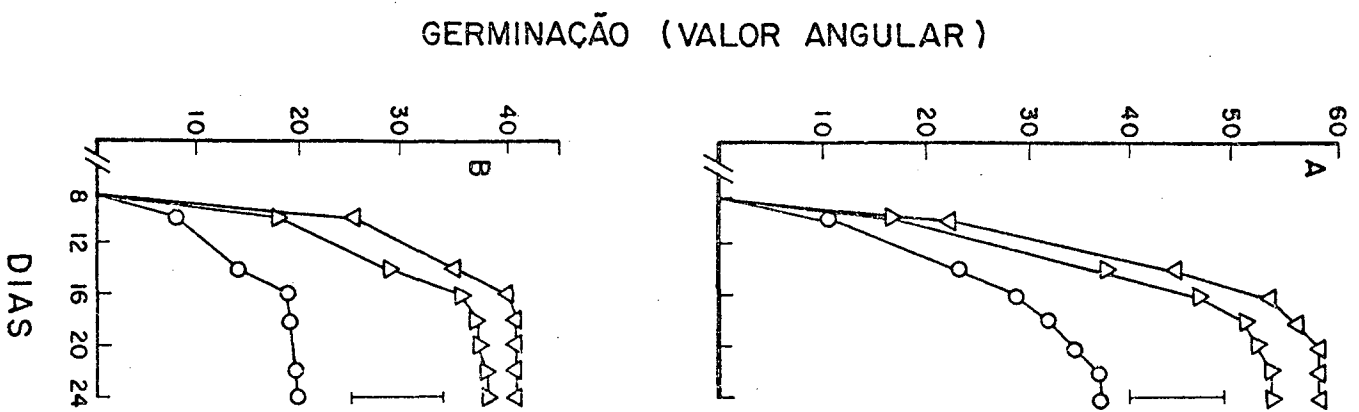
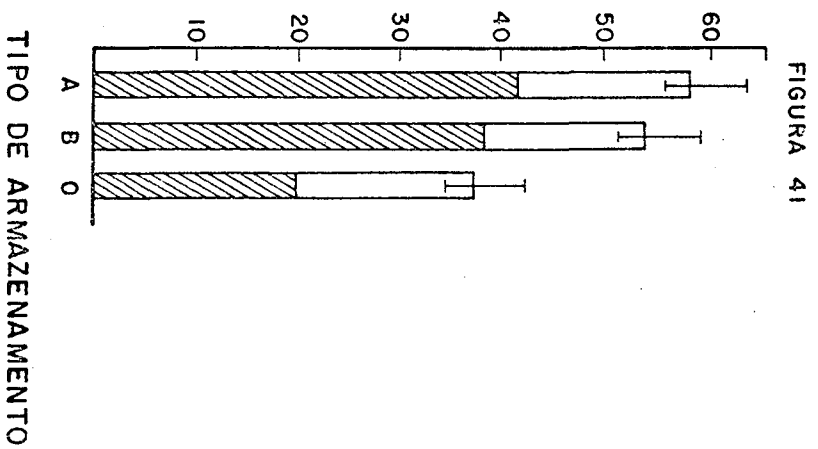


FIGURA 40



mas foram submetidas ao teste de tetrazólio e separadas em viáveis e não viáveis. Assim, o número total de sementes compreendia sementes germinadas e não germinadas (contaminadas por fungos viáveis e não viáveis).

Na tabela 14 estão expressas, para cada tipo de armazenamento, as porcentagens de sementes germinadas e não germinadas. É possível verificar que a porcentagem de sementes fungadas variou em torno de 20%. Entre as sementes não contaminadas a porcentagem maior de sementes não viáveis ocorreu no tratamento em que o armazenamento foi realizado em vidro a 4°C. A soma das porcentagens de sementes germinadas e das sementes viáveis não germinadas, para cada caso, aproxima-se dos valores obtidos pelo teste do tetrazólio. No caso das sementes armazenadas em temperatura de 25°C em saco de plástico, a porcentagem de sementes viáveis indicada pelo teste de tetrazólio está abaixo da obtida quando se soma a porcentagem de germinação verificada com a porcentagem de sementes viáveis não germinadas.

Efeito de reguladores de crescimento CEPA, AgNO<sub>3</sub> e AVG

Estes experimentos foram realizados com o objetivo de verificar o efeito de GA<sub>3</sub>, 6-BA, CEPA, AgNO<sub>3</sub> e AVG na germinação, a 25°C sob luz e escuro, de sementes recém coletadas.

Nos experimentos preliminares (Figuras 42, 43 e 44) foram usadas 3 repetições com 10 sementes. Foram inicialmente testadas soluções de GA<sub>3</sub> (180 e 360 mg.l<sup>-1</sup>), de 6-BA (25 e 50mg.l<sup>-1</sup>), de CEPA (0,75, 1,5, 3, 6 e 24 µl.l<sup>-1</sup>), de AgNO<sub>3</sub>

TABELA 14. - Porcentagem de sementes de D. composita germinadas e não germinadas ((a) contaminadas, (b) viáveis, (c) não viáveis) após diferentes tipos de armazenamento.

Tipo de armazenamento	Sementes germinadas	Sementes não germinadas		
		a	b	c
vidro 4°C	56	19	6	19
saco de papel 25°C	73	22	5	0
saco plástico 25°C	67	17	8	8

(62,5, 125, 250 e 500 mg.l<sup>-1</sup>) e de AVG (20 mM).

Na figura 42A está representada a germinação sob luz para sementes tratadas com os vários compostos. Verifica-se que o CEPA inibe significativamente a germinação em relação ao controle e aos demais tratamentos. No escuro (Figura 42B) não houve germinação no caso das sementes tratadas com CEPA e no controle. A análise estatística não indicou diferença significativa em relação aos tratamentos com GA<sub>3</sub> e 6-BA a 50 mg.l<sup>-1</sup>. O tratamento com 6-BA a 25 mg.l<sup>-1</sup> é estatisticamente diferente do tratamento com GA<sub>3</sub>.

Os resultados dos testes de germinação realizados com CEPA nas várias concentrações na luz, são mostrados na figura 43A. Observa-se que houve germinação no caso das sementes tratadas com CEPA 0,75, 1,5 e 3 μl.l<sup>-1</sup>, mas ela foi significativamente menor do que a observada no controle. No escuro (Figura 43B) o controle não germinou e as sementes germinaram com CEPA a 3 μl.l<sup>-1</sup>. Parece que CEPA inibe a germinação em luz. Na figura 44A estão representados os valores angulares de germinação na luz para as sementes tratadas com soluções de AgNO<sub>3</sub> em várias concentrações. A análise estatística não indicou diferença significativa entre os valores de germinação atingidos pelo controle e pelos demais tratamentos. No escuro (Figura 44B) houve germinação apenas na concentração de 62,5 mg.l<sup>-1</sup> e esta não diferiu significativamente do controle. Na figura 45A e B estão representados os valores angulares da germinação em luz e escuro obtida para sementes tratadas com solução de AVG 20 mM. Neste caso foram utilizadas 3 repetições com 25 sementes. Verifica-se que a germinação é significativamente reduzida em relação ao controle de água.

FIGURA 42 - Efeito de reguladores de crescimento e CEPA na germinação de sementes de D. Composita.

A - luz

B - escuro

∇ - controle

□ - CEPA  $24 \mu\text{l.l}^{-1}$

■ - CEPA  $6 \mu\text{l.l}^{-1}$

△ -  $\text{GA}_3$   $360 \text{ mg.l}^{-1}$

▲ -  $\text{GA}_3$   $180 \text{ mg.l}^{-1}$

○ - 6-BA  $50 \text{ mg.l}^{-1}$

● - 6-BA  $25 \text{ mg.l}^{-1}$

\* - Controle, CEPA  $24$  e  $6 \mu\text{l.l}^{-1}$ .

As barras verticais representam  $\text{DMS}_{5\%}$ .

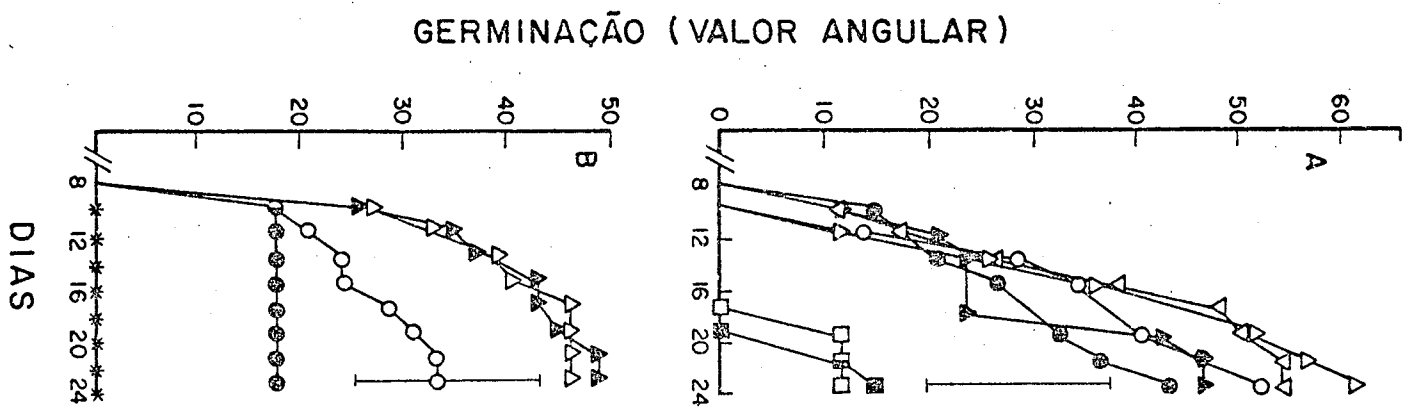


FIGURA 42

FIGURA 43 - Efeito de CEPA na germinação de sementes de D.  
composita.

A - luz

B - escuro

● - controle

○ - CEPA  $0,75 \mu\text{l.l}^{-1}$

△ - CEPA  $1,5 \mu\text{l.l}^{-1}$

▽ - CEPA  $3 \mu\text{l.l}^{-1}$

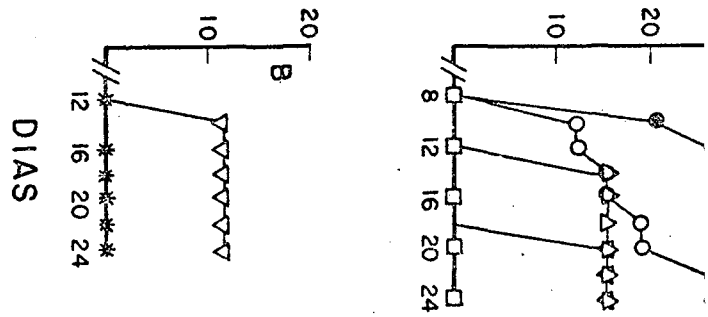
□ - CEPA  $6 \mu\text{l.l}^{-1}$

\* - Controle e CEPA  $0,75, 1,5, 6,0 \mu\text{l.l}^{-1}$

A barra vertical representa  $\text{DMS}_{5\%}$ .

$F_{5\%}$  não significativo para escuro.

GERMINAÇÃO (VALOR



DIAS



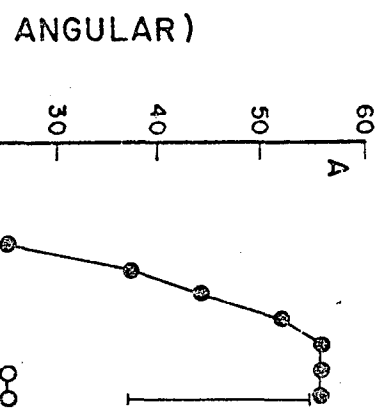


FIGURA 43

FIGURA 44 - Efeito de  $\text{AgNO}_3$  na germinação de sementes de D.  
composita.

A - Luz

B - escuro

● - controle

▽ -  $\text{AgNO}_3$  62,5  $\text{mg.l}^{-1}$

△ -  $\text{AgNO}_3$  125  $\text{mg.l}^{-1}$

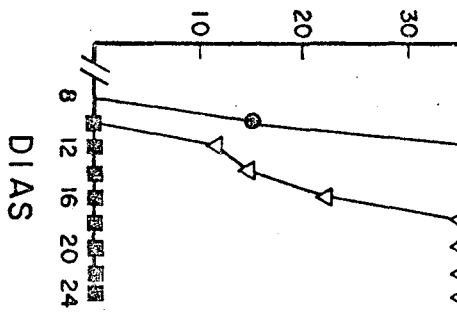
○ -  $\text{AgNO}_3$  250  $\text{mg.l}^{-1}$

□ -  $\text{AgNO}_3$  500  $\text{mg.l}^{-1}$

■ -  $\text{AgNO}_3$  125, 250 e 500  $\text{mg.l}^{-1}$

$F_{5\%}$  não significativo para luz e escuro

(Controle e  $\text{AgNO}_3$  62,5  $\text{mg.l}^{-1}$ ).



GERMINAÇÃO (VALOR ANGULAR)

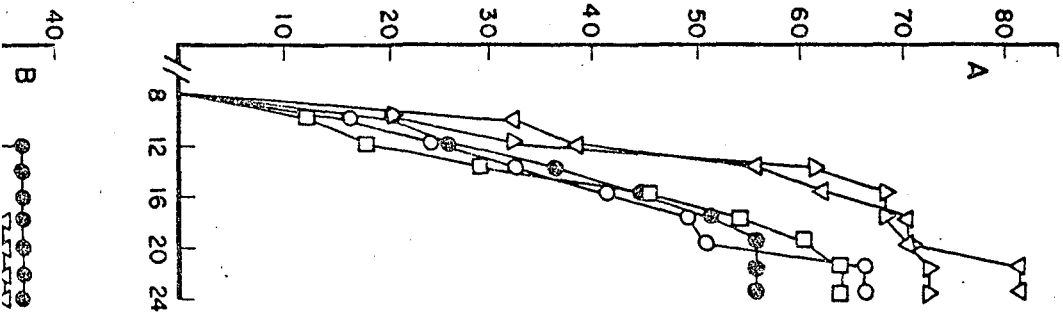


FIGURA 44

FIGURA 45 - Efeito de AVG na germinação de sementes de D.  
composita.

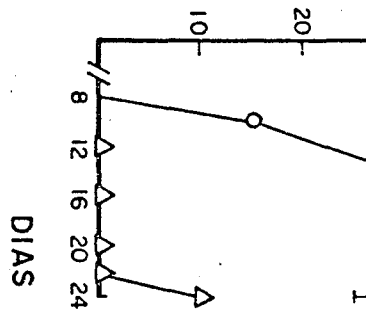
A - luz

B - escuro

o - controle

Δ - AVG 20 mM

As barras verticais representam  $DMS_{5\%}$ .



GERMINAÇÃO (VALOR ANGULAR)

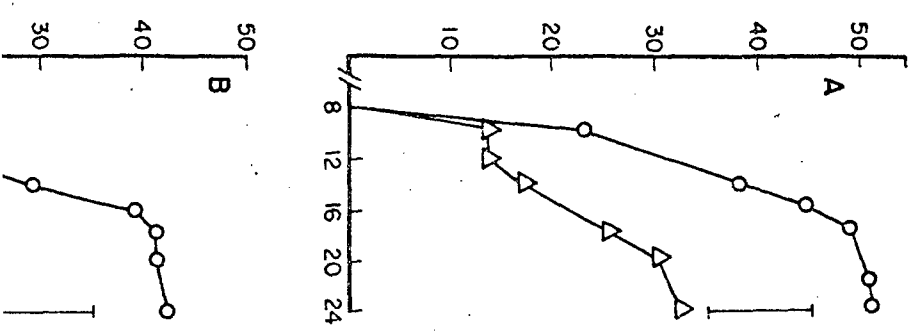


FIGURA 45

Diante desses resultados decidiu-se fazer outros experimentos com soluções de  $\text{AgNO}_3$   $62,5 \text{ mg.l}^{-1}$ , CEPA  $6 \mu\text{l.l}^{-1}$ ,  $\text{GA}_3$   $180 \text{ mg.l}^{-1}$  e testar AVG 10 mM.

Na figura 46A e B estão representados os resultados dos experimentos em que as sementes, sob luz e escuro, foram tratadas com  $\text{GA}_3$ , CEPA e  $\text{AgNO}_3$ . Verifica-se que no 24º dia o CEPA reduz significativamente a germinação em relação ao controle e aos demais tratamentos. Não há diferença significativa entre a germinação das sementes tratadas com  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{GA}_3$  e o controle.

Na figura 47, estão representados os valores angulares da germinação máxima verificada para luz e escuro, para cada tratamento. Observa-se que no controle e nos tratamentos com  $\text{GA}_3$  e  $\text{AgNO}_3$  as sementes apresentam germinação significativamente maior na luz do que no escuro. No tratamento com CEPA, entretanto, não há diferença significativa entre os valores de germinação em luz e no escuro.

Na figura 48A estão representados os resultados de um experimento em que as sementes foram tratadas com  $\text{AgNO}_3$  a  $62,5 \text{ mg.l}^{-1}$ , em seguida transferidas com CEPA a  $6 \mu\text{l.l}^{-1}$  e colocadas para germinar sob luz. Verifica-se que as sementes tratadas com  $\text{AgNO}_3$  e então transferidas para CEPA não germinaram, enquanto que a germinação, no 24º dia, das sementes tratadas apenas com CEPA, foi significativamente menor do que a observada para o controle e para as sementes tratadas apenas com  $\text{AgNO}_3$ . No escuro (Figura 48B), as sementes tratadas com CEPA



FIGURA 46 - Efeito de  $GA_3$ , CEPA,  $AgNO_3$  na germinação de sementes de D. composita.

A - luz

B - escuro

○ - controle

▽ -  $GA_3$  180 mg.l<sup>-1</sup>

△ -  $AgNO_3$  62,5 mg.l<sup>-1</sup>

□ - CEPA 6 μl.l<sup>-1</sup>

As barras verticais representam  $DMS_{5\%}$

FIGURA 47 - Efeito de  $GA_3$ , CEPA e  $AgNO_3$  na germinação máxima de sementes de D. composita.

A - controle

B -  $GA_3$  180 mg.l<sup>-1</sup>

C -  $AgNO_3$  62,5 mg.l<sup>-1</sup>

D - CEPA 6 μl.l<sup>-1</sup>

□ - luz

▣ - escuro

As barras verticais representam  $DMS_{5\%}$ .

$F_{5\%}$  não significativo entre luz e escuro para o tratamento com CEPA 6 μl.l<sup>-1</sup>.

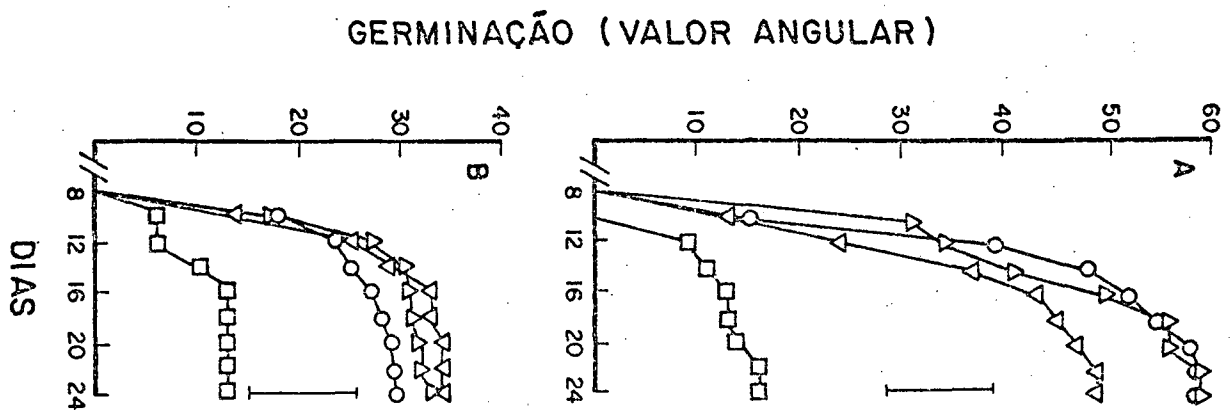


FIGURA 46

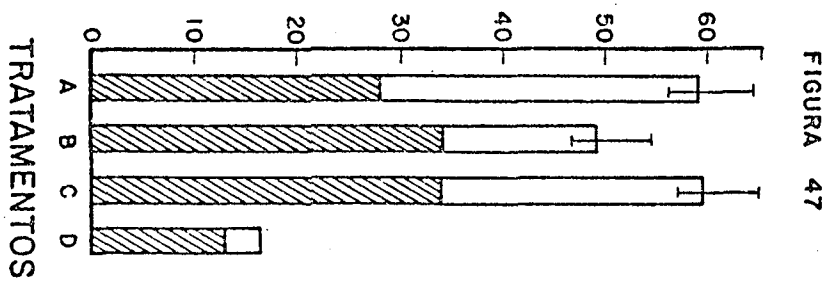


FIGURA 48 - Efeito de CEPA,  $\text{AgNO}_3$  e CEPA +  $\text{AgNO}_3$  na germinação de sementes de D. composita.

A - luz

B - escuro

O - controle

$\nabla$  -  $\text{AgNO}_3$   $62,5 \text{ mg.l}^{-1}$

$\square$  - CEPA  $6 \mu\text{l.l}^{-1}$

$\Delta$  -  $\text{AgNO}_3$   $62,5 \text{ mg.l}^{-1}$  + CEPA  $6 \mu\text{l.l}^{-1}$

As barras verticais representam DMS 5%.

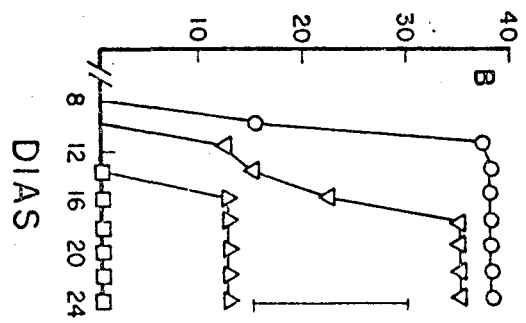
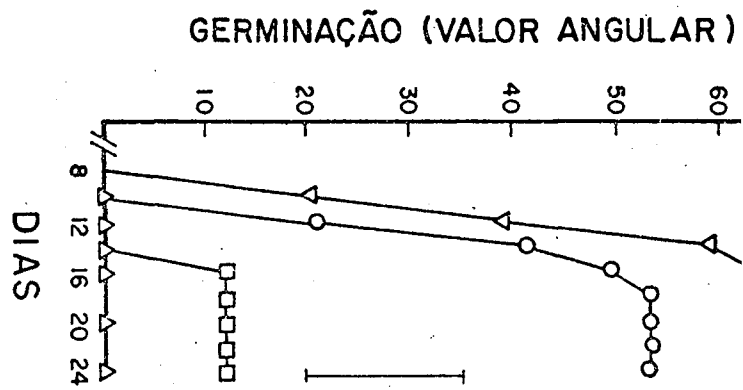


FIGURA 48



não germinaram e as tratadas com  $\text{AgNO}_3$  e CEPA germinaram significativamente menos do que o controle e do que as tratadas apenas com  $\text{AgNO}_3$ . Na figura 49, estão representadas as curvas de germinação, na luz, para sementes tratadas com  $\text{AgNO}_3$ , CEPA e para sementes que foram tratadas com  $\text{AgNO}_3$  ou CEPA e no 4º dia do experimento transferidas, respectivamente, para placas de Petri com CEPA e  $\text{AgNO}_3$ . Verifica-se que as sementes do controle e as tratadas com  $\text{AgNO}_3$  ou com  $\text{AgNO}_3$  e CEPA, germinaram significativamente mais do que as tratadas com CEPA ou com CEPA e  $\text{AgNO}_3$ , resultado que não está de acordo com o da figura 48. Para todos os tratamentos, exceto com CEPA, a germinação iniciou-se no 8º dia.

Na figura 50A estão representados os valores de germinação sob luz para sementes tratadas com AVG 10 e 20 mM. Verifica-se que o AVG 20 mM inibe significativamente a germinação no 24º dia em relação ao controle e ao AVG 10 mM, que alcançam valores estatisticamente iguais. No escuro (Figura 50 B), o AVG 20 mM inibe significativamente a germinação em relação ao AVG 10 mM e ao controle. A germinação com AVG a 20mM também é significativamente menor do que a verificada no controle.

Na figura 51, estão expressos os valores da máxima germinação, sob luz e escuro, verificada para sementes tratadas ou não com AVG 10 e 20 mM. Observa-se que no controle as sementes são indiferentes à luz, assim como no caso do tratamento com AVG 20 mM. A germinação com AVG 10 mM é significativamente maior na luz do que no escuro.

FIGURA 49 - Efeito de CEPA,  $\text{AgNO}_3$ , CEPA +  $\text{AgNO}_3$  e  $\text{AgNO}_3$  + CEPA na germinação de sementes de D. composita sob luz.

○ - controle

□ -  $\text{AgNO}_3$  62,5  $\text{mg.l}^{-1}$  + CEPA 6  $\text{l.l}^{-1}$

▽ -  $\text{AgNO}_3$  62,5  $\text{mg.l}^{-1}$

△ - CEPA 6  $\mu\text{l.l}^{-1}$

▲ - CEPA 6  $\mu\text{l.l}^{-1}$  +  $\text{AgNO}_3$  62,5  $\text{mg.l}^{-1}$

A barra vertical representa  $\text{DMS}_{5\%}$ .

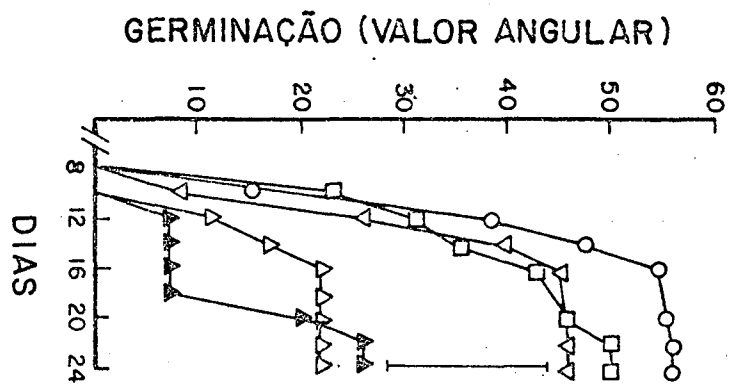


FIGURA 49



FIGURA 50 - Efeito de AVG na germinação de sementes de D. composita.

A - luz

B - escuro

O - controle

$\Delta$  - AVG 10 mM

$\nabla$  - AVG 20 mM

As barras verticais representam  $DMS_{5\%}$ .

FIGURA 51 - Efeito de AVG na germinação máxima de sementes de D. composita.

A - controle

B - AVG 10 mM

C - AVG 20 mM

$\square$  - luz

$\boxtimes$  - escuro

A barra vertical representa  $DMS_{5\%}$ .

$F_{5\%}$  não significativo entre luz e escuro para o controle e o tratamento com AVG 20 mM.

FIGURA 50

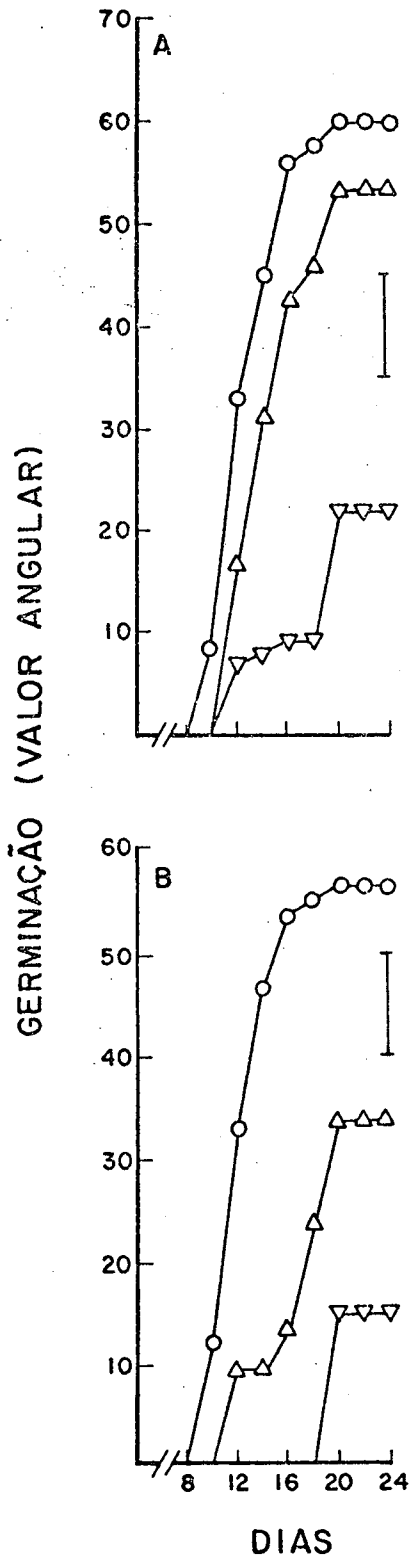
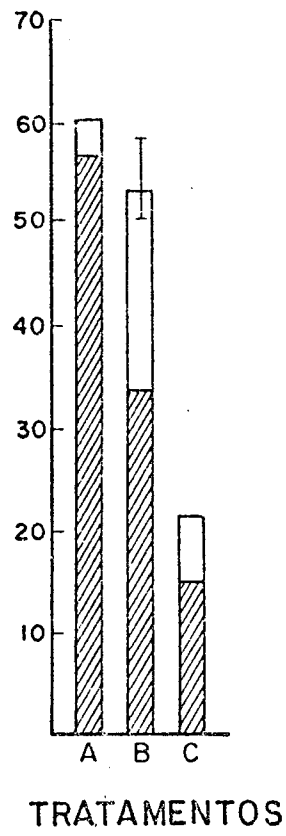


FIGURA 51



### Enraizamento

Nesta parte do trabalho são apresentados resultados dos experimentos individuais para se ter uma idéia da variação encontrada.

Efeito da aplicação de IBA.

Nos experimentos a seguir, IBA foi utilizado em diferentes concentrações.

Na tabela 15, estão representadas as porcentagens máximas de estacas enraizadas, para 5 experimentos, em função das concentrações de IBA variando de 2,5 a 20 mg.g<sup>-1</sup>. Observa-se que as taxas de enraizamento verificadas para concentrações de IBA de 5 mg.g<sup>-1</sup> e abaixo são, em geral, menores que 50% e que IBA 20 mg.g<sup>-1</sup> inibe a formação de raízes. Assim, a concentração de 10 mg.g<sup>-1</sup> parece ser a mais efetiva entre as testadas, promovendo enraizamento em mais que 60% das estacas. Assim, nos outros experimentos foi utilizada a concentração de 10 mg.g<sup>-1</sup>. Nunca houve enraizamento no controle.

Na tabela 16, estão representadas as porcentagens de enraizamento de estacas tratadas com IBA 10 mg.g<sup>-1</sup> em 10 experimentos realizados. Em todos os experimentos o enraizamento no controle foi nulo. Observa-se que o IBA, apesar da variação verificada, promove o enraizamento das estacas. Em apenas dois experimentos a porcentagem de estacas enraizadas foi inferior a 40%.

TABELA 15 - Enraizamento de estacas de D. composita tratadas com várias concentrações de IBA.

Porcentagem de estacas enraizadas em cinco experimentos.

IBA (mg.g <sup>-1</sup> )	Experimentos				
	1	2	3	4	5
	%				
2,5	8	-	33	0	30
5,0	14	46	25	33	50
10,0	63	83	75	16	100
20,0	8	0	16	0	90

- : não realizado.

TABELA 16 - Enraizamento de estacas de D. composita tratadas com IBA.

Porcentagem de estacas com raízes em 10 experimentos no período de 40-49 dias.

Experimentos	% de enraizamento
1	43
2	75
3	91
4	75
5	91
6	8
7	8
8	100
9	100
10	40

O IBA induz o enraizamento através da formação prévia de calos. Na Tabela 17 estão as porcentagens de estacas tratadas com IBA que formaram calos. Observa-se que em 12 de les a formação dos calos ocorre entre 10-19 dias e as maiores porcentagens de estacas com calos são verificadas, de modo geral, entre 20-29 dias. Em 5 experimentos a porcentagem de estacas com calos foi menor que 70%. A diminuição do número de estacas com calos com o decorrer do tempo é devida ao posterior enraizamento. As estacas não tratadas (controle) não enraizaram. Nas tabelas a seguir, em alguns casos, a porcentagem observada de estacas com calos não coincide com a porcentagem máxima de enraizamento pois nem todas as estacas haviam formado calos no período da contagem (20-29 dias).

Na tabela 18 estão representadas as porcentagens de estacas tratadas com IBA enraizadas durante o decorrer de 10 experimentos realizados. Em nenhum dos experimentos ocorreu enraizamento das estacas nos primeiros 20 dias, mas entre 30-39 dias todos os experimentos apresentaram estacas enraizadas. As porcentagens máximas de enraizamento são atingidas, para a maioria dos experimentos, após 40 dias.

Na tabela 19 estão representadas as porcentagens observadas de estacas que formaram calos, acompanhadas dos períodos em que isto foi detectado, e as porcentagens máximas de estacas enraizadas. É apresentada também a porcentagem de senescência. Apenas nos experimentos 5, 6 e 11, houve senescência de estacas antes do período 20-29 dias o que indica que nestes casos foram eliminadas estacas que não formaram calos. De modo geral, durante o período em que o maior número possível de estacas com calos foi detectado, não houve senescência, mas com o decorrer do tempo este processo se estabeleceu, eliminando estacas que já haviam formado calos. Isto contribui para

TABELA 17 - Formação de calos em estacas de D. composita tratadas com IBA.

Porcentagem de estacas com calos em 15 experimentos.

Experimentos	Períodos (dias)					
	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59
	% de estacas com calos					
1	14	78	-	28	28	21
2	0	33	-	16	0	0
3	0	50	83	58	33	8
4	0	50	75	75	66	50
5	0	70	70	80	0	0
6	0	0	20	20	0	0
7	0	60	90	0	0	0
8	0	60	80	70	10	0
9	0	60	100	80	10	0
10	0	60	80	70	20	10
11	63	81	18	20	0	0
12	0	0	0	25	41	25
13	0	58	50	33	8	0
14	16	58	75	75	66	50
15	0	0	10	20	30	-

TABELA 18 - Enraizamento de estacas de D. composita tratadas com IBA.

Porcentagem de estacas com raízes em dez experimentos.

Experimentos	Período (dias)			
	20-29	30-39	40-49	50-59
	% de estacas enraizadas			
1	0	28	28	36
2	0	45	75	73
3	58	83	91	83
4	0	50	75	75
5	16	75	75	91
6	0	8	8	8
7	0	8	8	8
8	30	80	100	100
9	10	40	100	100
10	0	20	30	40

Obs.: período de 0-19, porcentagem de estacas enraizadas igual a zero.



TABELA 19 - Porcentagens de formação de calos, enraizamento e senescência de estacas de D. composita tratadas com IBA.

Dados de onze experimentos

% de estacas			
Experimentos	calos *	enraizamento	senescência
1	78 (10-19)	43	43
2	81 (10-19)	73	27
3	41 (40-49)	16	50
4	83 (20-29)	75	16
5	58 (10-19)	91	8
6	75 (20-29)	8	33
7	75 (20-29)	8	41
8	80 (30-39)	100	0
9	90 (20-29)	100	0
10	80 (20-29)	30	50
11	80 (20-29)	40	50

Obs.: os números entre parênteses representam o período de observação (dias)

\*: ver página 122, primeiro parágrafo.

diminuir a eficiência de transformação de estacas com calos em estacas enraizadas. Assim por exemplo no experimento 10, 80% das estacas tratadas com IBA formaram calos mas apenas 30% destas formaram raízes. Como houve 50% de senescência, as demais estacas senesceram ou permaneceram vivas com calos sem formarem raízes. Desta forma, os maiores valores de senescência parecem estar associados às baixas taxas de transformação de estacas com calos em enraizadas e vice-versa. Assim, a senescência parece ser um fator que impede que todas as estacas que formam calos, enraizem.

Nos experimentos 6 e 7, entretanto, houve formação de calos em 75% das estacas tratadas no período 20-29 dias. Como a porcentagem de senescência não foi tão alta, subentende-se que as estacas com calos permaneceram vivas. Neste caso então parece que a baixa taxa de enraizamento não estaria relacionada à acentuada senescência.

Efeito da aplicação de IBA com 6-BA

Como já foi dito, parece que a senescência das estacas é um fator que limita a transformação de estacas com calos em enraizadas. Por esta razão decidiu-se verificar o efeito de 6BA, na concentração de  $22,5 \text{ mg.l}^{-1}$ , na senescência.

Na tabela 20 estão representadas as porcentagens de senescência de estacas que não foram tratadas com IBA ou 6-BA em 15 experimentos realizados. Verifica-se que a senescência inicia-se entre 10-19 dias e no período de 40-59 dias mais da metade dos experimentos apresentam taxa de senescência maior que 70%. Baixas taxas de senescência são observadas no expe-

TABELA 20 - Senescência de estacas de D. composita não tratadas com IBA ou 6-BA.

Porcentagem de senescência em 15 experimentos.

Experimentos	Períodos (dias)				
	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59
	% de senescência				
1	0	0	40	40	46
2	0	0	27	75	75
3	0	30	38	-	84
4	8	-	50	83	100
5	41	41	83	100	100
6	0	8	83	83	100
7	0	8	100	100	100
8	0	0	0	0	0
9	0	8	8	8	8
10	0	0	0	10	10
11	0	60	100	100	100
12	10	10	10	10	10
13	0	0	0	0	0
14	0	0	20	30	30
15	0	60	80	100	100

- : não observado

Obs.: 0-9: % de senescência igual a zero.

rimentos 8, 9, 10, 12 e 13, mesmo depois de dois meses do início do experimento.

Na tabela 21, estão representadas as porcentagens de senescência de estacas que receberam pulverizações de 6-BA em dias alternados. Nos primeiros nove dias não ocorreu senescência. No período 20-29 dias apenas 4 dos experimentos apresentam estacas senescentes. No período 40-59 dias a senescência é maior que 70% em apenas dois dos experimentos e não ultrapassa 58% nos demais. Portanto, 6-BA retarda a senescência das estacas já que 40-59 dias, no controle (Tabela 20) as estacas de pelo menos metade dos experimentos realizados haviam senescido completamente. No tratamento com 6-BA no mesmo período, apenas dois experimentos apresentam taxa de senescência maior que 50%. É importante ressaltar que o IBA, pela indução do enraizamento também parece ter efeito no retardamento da senescência. Na tabela 22, estão representadas as porcentagens de senescência de estacas tratadas apenas com IBA para 15 experimentos. A senescência inicia-se entre 10-19 dias. No período 20-29 dias apenas 5 experimentos apresentam estacas senescendo. No período 40-59 dias a maioria dos experimentos apresentam senescência, mas em apenas dois deles ela é maior que 70%; isto indica que o IBA retarda a senescência em relação ao controle.

Nos experimentos a seguir, 6-BA foi aplicado em dias alternados. Os resultados da aplicação conjunta de IBA e 6-BA podem ser observados na tabela 23. A senescência inicia-se após nove dias. Verifica-se que entre 40-59 dias apenas dois experimentos apresentam mais que 50% de estacas senescendo. Nos demais experimentos a porcentagem de senescência é de no

TABELA 21 - Senescência de estacas de D. composita tratadas com 6-BA.

Porcentagem de senescência em quatorze experimentos.

Experimentos	Períodos (dias)				
	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59
	% de senescência				
1	0	0	0	7	7
2	0	0	0	0	25
3	0	0	8	33	83
4	0	0	25	58	91
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	8	8
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	10	10
10	0	50	50	50	50
11	0	50	50	50	50
12	0	10	20	20	20
13	20	40	50	50	50
14	0	0	10	10	10

Obs.: período de 0-9: % de senescência igual a 0.

TABELA 22 - Senescência de estacas de D. composita tratadas apenas com IBA.

Porcentagem de senescência em dezesseis experimentos.

Experimentos	Períodos (dias)				
	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59
	% de senescência				
1	14	-	36	43	43
2	0	27	27	27	27
3	0	0	0	0	0
4	0	0	42	92	100
5	0	0	42	50	50
6	0	0	8	16	16
7	0	0	0	8	8
8	0	8	16	33	33
9	0	0	16	33	41
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	10	10	10	10
13	0	0	0	0	0
14	0	0	20	30	30
15	0	20	90	100	100
16	0	20	50	50	50

- : não observado

Obs.: período de 0-9: % de senescência igual a zero.

TABELA 23 - Senescência de estacas de D. composita tratadas com IBA e 6-BA.

Porcentagem de senescência em quinze experimentos.

Experimentos	Períodos (dias)				
	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59
	% de senescência				
1	7	7	7	7	7
2	0	0	8	8	8
3	8	25	25	25	42
4	8	8	16	16	25
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	8	16
7	0	0	0	16	33
8	0	8	8	8	8
9	0	0	60	100	100
10	0	0	0	0	0
11	0	20	50	50	50
12	0	0	10	10	10
13	0	0	20	20	20
14	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0

Obs.: período 0-9: % de senescência igual a zero.

máximo 42%. Assim, quando aplicado conjuntamente com IBA o 6BA é efetivo em retardar a senescência. A formação de calos em estacas tratadas com IBA e 6-BA no decorrer de 15 experimentos pode ser analisada na tabela 24. Verifica-se que a porcentagem máxima de estacas que formam calos é atingida no período de 20-39 dias, na maioria dos experimentos. Em apenas 4 deles a taxa de estacas que formaram calos está acima de 60%. Estes dados sugerem que há diminuição da porcentagem de estacas que formaram calos em relação à observada quando apenas IBA é aplicado. Neste caso, como visto anteriormente, (Tabela 17) em apenas 5 experimentos a porcentagem de estacas com calos foi menor que 70%. A aplicação de 6-BA parece retardar e diminuir a formação de calos.

Na tabela 25 estão representadas as porcentagens de estacas enraizadas após tratamento com IBA e 6-BA. Foram detectadas estacas enraizadas apenas após 30 dias. As porcentagens máximas de estacas enraizadas são obtidas, para a maioria dos experimentos, no período de 50-59 dias. Em apenas dois experimentos as taxas máximas estão entre 70 e 100%. Assim, o 6-BA parece retardar e diminuir as taxas de estacas enraizadas. Como pode ser visto pela tabela 18, quando as estacas são tratadas apenas com IBA, estacas enraizadas são detectadas já no período 20-29 dias, as taxas máximas de enraizamento são obtidas no período 40-49 dias e variam de modo geral entre 70-100%.

Nos experimentos a seguir o 6-BA foi aplicado em dias alternados desde o início do experimento ou de 1 a 3 semanas após o início dos experimentos, em estacas tratadas com IBA.



TABELA 24 - Formação de calos em estacas de D. composita tratadas com IBA e 6-BA.

Porcentagem de estacas com calos em quinze experimentos.

Experimentos	Períodos (dias)					
	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59
	% de estacas com calos					
1	7	50	14	35	14	14
2	0	0	16	0	0	0
3	0	25	33	25	25	41
4	8	83	91	91	75	58
5	0	60	70	40	-	-
6	0	8	-	50	8	0
7	0	0	-	8	0	0
8	0	8	33	33	41	41
9	8	41	50	66	66	50
10	0	30	30	0	0	0
11	0	50	60	0	0	0
12	0	10	20	30	-	-
13	0	0	10	50	40	-
14	0	50	80	70	20	-
15	0	0	10	50	40	30

-: não observado.

TABELA 25 - Enraizamento em estacas de D.composita tratadas com IBA e 6-BA.

Porcentagem de estacas enraizadas em dez experimentos.

Experimentos	Período (dias)		
	30-39	40-49	50-59
	% de enraizamento		
1	50	50	78
2	0	58	75
3	8	8	16
4	0	0	8
5	0	0	0
6	8	16	33
7	0	0	0
8	0	10	10
9	10	60	60
10	0	10	50

Obs.: período de 0 a 29 dias: % de enraizamento igual a zero.

Na tabela 26 estão representadas as porcentagens de senescência de estacas tratadas somente com 6-BA, em 4 experimentos. Verifica-se que quando 6-BA é aplicado após 2 ou 3 semanas do início do experimento as porcentagens de senescência das estacas aumentam em relação aos casos em que 6-BA é aplicado alternadamente desde o início ou logo após a primeira semana.

Na tabela 27, estão representadas as porcentagens de senescência de estacas tratadas com IBA e 6-BA em 4 experimentos. Observa-se que a aplicação de 6-BA após três semanas faz com que as taxas de senescência, de modo geral, aumentem em relação aos outros tratamentos. Assim a aplicação de 6-BA após três semanas não seria efetiva em diminuir a senescência. Parece, por estes dados, que uma interação foi estabelecida entre IBA e 6-BA. Com a aplicação isolada o tratamento após duas semanas não inibe a senescência e quando IBA e 6-BA são usados conjuntamente, a aplicação de 6-BA, após duas semanas é efetiva em retardar a senescência.

Na tabela 28 estão representadas as porcentagens de estacas com IBA e 6-BA que formaram calos. Verifica-se que as porcentagens de estacas com calos, nos tratamentos em que 6-BA é aplicado em dias alternados duas ou três semanas após o início do experimento, são altas, parecendo que a aplicação tardia de 6-BA não interfere na formação dos calos.

A análise dos dados da tabela 29, que representam as porcentagens máximas de enraizamento obtidas, indica que as taxas de enraizamento foram sensivelmente maiores nos tratamentos em que a 6-BA foi aplicada duas ou três semanas mais tarde. A aplicação de 6-BA após a primeira semana do início do experi

TABELA 26 - Senescência de estacas de D. composita tratadas com 6-BA aplicado alternadamente desde o início (a) ou a partir de uma semana (b), duas semanas (c) e três semanas (d) do início do experimento. As estacas não eram tratadas com IBA. Porcentagem de senescência em quatro experimentos.

Experimentos	Períodos de aplicação de 6-BA			
	% de senescência			
	(a)	(b)	(c)	(d)
1	0	0	75	83
2	0	8	58	75
3	20	50	20	60
4	50	0	40	20

TABELA 27 - Senescência de estacas de D. composita tratadas com IBA e 6-BA aplicado alternadamente desde o início (a) ou a partir de uma semana (b), duas semanas (c) e três semanas (d), do início do experimento. Estacas tratadas com IBA. Porcentagem de senescência em quatro experimentos.

Experimentos	Períodos de aplicação do 6-BA			
	% de senescência			
	(a)	(b)	(c)	(d)
1	16	16	41	25
2	8	25	0	50
3	10	20	20	70
4	20	10	20	50

TABELA 28 - Formação de calos em estacas de D. composita tratadas com IBA e 6-BA aplicado alternadamente desde o início (a) ou a partir de uma semana (b) das semanas (c) e três semanas (d) do início do experimento.

Porcentagem de estacas com calos em quatro experimentos.

Experimentos	Períodos de aplicação de 6-BA			
	% de estacas com calos			
	(a)	(b)	(c)	(d)
1	66	91	83	91
2	91	75	100	83
3	30	10	60	40
4	50	70	90	90

TABELA 29 - Enraizamento em estacas de D. composita tratadas com IBA e 6-BA aplicado alternadamente desde o início (a) ou a partir de uma semana (b), duas semanas (c) e três semanas (d) do início do experimento.

Porcentagem de enraizamento em quatro experimentos.

Experimentos	Período de aplicação de 6-BA			
	% de enraizamento			
	(a)	(b)	(c)	(d)
1	0	16	83	66
2	33	8	50	33
3	0	10	33	30
4	10	40	70	50

mento parece interferir no processo de formação de calos e conseqüentemente no enraizamento. Assim, a época mais propícia para a aplicação de 6-BA sem que a taxa de enraizamento seja prejudicada, parece ser duas semanas após o início do tratamento com IBA, tempo suficiente para que haja formação de calos nas estacas.

#### Fatores endógenos

##### 1. Efeito do pulvino e caule

Na tabela 30 estão representadas as porcentagens de estacas sem pulvino (a), apenas com pulvino (b) e estacas com pulvino e caule (c), que formaram calos e enraizaram. Observa-se que quando IBA é aplicado, há formação de calos e raízes apenas nas estacas em que o pulvino está presente (independente da presença de caule), o que indica que o tecido sensível ao IBA está localizado nesta região da estaca.

##### 2. Efeito da redução da área foliar

A tabela 31 mostra as porcentagens de estacas com lâminas foliares intactas ou reduzidas pela metade, que formaram calos e enraizaram após tratamento com IBA. Verifica-se que a redução da lâmina foliar não parece afetar o potencial de formação de calos nas estacas. Do mesmo modo, a análise das taxas de enraizamento não indica drástica redução no enraizamento das estacas com lâminas foliares reduzidas.

Não foi verificado atraso na formação de calos ou



TABELA 30 - Formação de calos e enraizamento de estacas de D. composita tratadas ou não com IBA, sem pulvino (a), com pulvino (b) e com pulvino e caule (c).

Tratamentos	Calos (%)			Enraizamento (%)		
	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)
controle	0	0	0	0	0	0
IBA	0	80	73	0	53	47

TABELA 31 - Formação de calos e enraizamento em estacas de D. composita com lâmina foliar reduzida ou intacta, tratadas com IBA.

Porcentagens de quatro experimentos.

Experimentos	Calos (%)		Enraizamento (%)	
	reduzida	intacta	reduzida	intacta
1	78	81	42	63
2	33	41	0	16
3	83	58	75	91
4	75	75	8	8

no enraizamento de estacas com lâminas foliares reduzidas. Portanto, estacas deste tipo podem ser utilizadas sem causar prejuízo.

### 3. Efeito da localização da folha no caule

Na tabela 32 estão representadas as porcentagens máximas de estacas das regiões basais; média e superior, que formaram calos e enraizaram em três experimentos. Verifica-se, num único experimento realizado com folhas não completamente expandidas (região superior), que 60% das estacas com folhas maiores que 3,5 cm formaram raízes. Com relação às estacas da porção média do caule há formação de calos em 73-80% delas nos três experimentos. As taxas de enraizamento variam entre 40-73%. Nas estacas da parte basal do caule há formação de calos em 60-73% e enraizamento em 10% delas, no máximo.

Esses dados indicam que as estacas das regiões média e basal apresentam o mesmo potencial de formação de calos quando tratadas com IBA  $10 \text{ mg.g}^{-1}$ , mas o enraizamento é prejudicado nas estacas basais.

Na tabela 33 estão representadas as porcentagens de estacas das regiões média e basal que formaram calos durante o decorrer dos três experimentos. Verifica-se que as porcentagens de estacas da região basal que formam calos é máxima entre 10-19 dias. No caso das estacas da região média, isto só ocorre entre 20-29 dias, sugerindo que o processo é mais lento para as estacas desta região.

Pela tabela 34 observa-se que no período 40-49 dias

TABELA 32 - Formação de calos e enraizamento em estacas de D. composita, tratadas com IBA, das regiões superior, média e basal do caule.

Porcentagens de três experimentos.

Experimentos	Calos (%)			Enraizamento (%)		
	superior	média	basal	superior	média	basal
1	40	73	73	60	47	6
2	-	80	60	-	40	0
3	-	80	60	-	73	10

- : não realizado.

TABELA 33 - Formação de calos em estacas de D. composita tratadas com IBA, da região média e basal do caule.

Porcentagens de estacas com calos para três experimentos.

Experimentos	Localização	Períodos (dias)			
		% de estacas com calos			
		10-19	20-29	30-39	40-49
1	média	60	80	20	10
	basal	60	60	10	0
2	média	53	73	17	0
	basal	60	26	0	0
3	média	-	80	40	13
	basal	73	33	0	0

- : não observado

Obs.: período 0-9 dias: % de formação de calos igual a zero.

TABELA 34 - Enraizamento de estacas de D. composita, tratadas com IBA, da região média e basal do caule, durante o decorrer do experimento.

Porcentagem de enraizamento para 3 experimentos.

Experimentos	Localização	Períodos (dias)		
		% de enraizamento		
		20-29	30-39	40-49
1	média	0	20	30
	basal	0	10	0
2	média	20	40	47
	basal	10	0	0
3	média	6	47	73
	basal	6	6	0

Obs. período entre 0-19 dias : % de enraizamento igual a zero.

as porcentagens de estacas da região média que enraizam é máxima. Estacas da região basal formam raízes no período 20-29 dias, mas a taxa não aumenta no decorrer dos experimentos. Em ambos os casos não houve formação de raízes antes do dia 20. Estes dados indicam que as folhas da região média enraizam melhor.

Na tabela 35 estão representadas as porcentagens máximas de senescência de estacas das regiões média e basal em dois experimentos realizados. Os dados indicam que tanto no controle como nas estacas tratadas com IBA a senescência é duas vezes maior nas estacas da região basal do que nas estacas da região média do caule. Quando se analisa a senescência das estacas durante o decorrer do experimento (Tabela 36) verifica-se que nos casos das estacas da região basal tratadas com IBA a porcentagem de senescência já é de 90% no período 30-39 dias chegando a 100% entre 40-49 dias. Isto explíca a baixa taxa de enraizamento verificada. Tanto no controle como para o IBA a senescência começou a ocorrer após o 29º dia. A porcentagem de senescência das estacas não tratadas com IBA indica que maior porcentagem de estacas da região média resistem quando destacadas da planta. Desta forma apesar das estacas das regiões média e basal terem o mesmo potencial de formação de calos, a transformação destas estacas em estacas enraizadas é prejudicada pela alta senescência, no caso das estacas da região basal.

#### 4. Efeito da presença de gemas florais

Na tabela 37 estão representadas as porcentagens má

TABELA 35 - Senescência das estacas de D. composita das regiões média e basal para o período 40-49 dias. Porcentagens de senescência de dois experimentos.

Experimentos	Senescência (%)			
	Controle		IBA	
	média	basal	média	basal
1	60	100	47	100
/ 2	30	100	50	100



TABELA 36 - Senescência das estacas de D. composita das regiões média e basal, durante o decorrer do experimento.

Porcentagens de senescência em dois experimentos.

Tratamentos	Períodos (dias)			
	% de senescência			
	30-39		40-49	
	média	basal	média	basal
IBA	20	90	30	100
Controle	50	80	50	100

Obs.: Período de 0-29 dias: porcentagem de senescência igual a zero.

TABELA 37 - Formação de calos e enraizamento de estacas de D. composita vegetativas ou com gemas florais. Cada valor é a média de três experimentos.

Tratamento	Porcentagem	
	calos	enraizamento
estaca com gema floral < 1,5 cm	49	49
estaca com gema floral > 1,5 cm	8	4
estaca com gema floral > 1,5 cm removida	8	8
estaca vegetativa	78	72

ximas de estacas vegetativas ou com gemas florais que formaram calos e enraizaram. Verifica-se que estacas com gemas florais menores que 1,5 cm formam calos e enraizam, mas menos do que estacas vegetativas. A presença de gemas florais maiores que 1,5 cm parece inibir a formação de calos e de raízes em relação às estacas vegetativas, mesmo quando as gemas são removidas.

A análise da média de senescência das estacas, com o decorrer do tempo, para três experimentos realizados (Tabela 38) indica que a senescência das estacas com gemas florais de até 1,5 cm não é acentuada (ao redor de 22%). Isto elimina a hipótese da porcentagem de enraizamento ser baixa devido à senescência. A senescência inicia-se depois do 29º dia do experimento.

Na tabela 39 estão representadas as médias das porcentagens de estacas vegetativas ou com gemas florais que enraizaram no decorrer dos três experimentos. Não ocorre enraizamento antes do 20º dia e tanto no caso de estacas com gemas florais como no caso das estacas vegetativas a máxima porcentagem de estacas enraizadas ocorre entre 40-49 dias. Desta forma, a presença de gemas florais menores que 1,5 cm não atrasa a formação de calos ou de raízes em relação às estacas vegetativas, mas reduz a taxa de enraizamento. Tanto para estacas vegetativas como com gemas florais a porcentagem máxima de estacas com calos ocorre entre 10-29 dias (dados não mostrados).

##### 5. Efeito do diâmetro do caule

Estes experimentos foram realizados com o objetivo

TABELA 38 - Senescência de estacas de D. composita com gemas florais menores que 1,5 cm, tratadas com IBA.

Porcentagem de senescência (média de dois experimentos).

Tratamentos	Períodos (dias)		
	% de senescência		
	30-39	40-49	50-59
estacas com gema floral	11	16	22
estaca vegetativa	5	19	27

TABELA 39 - Enraizamento de estacas de D. composita com gemas florais tratadas com IBA.

Porcentagem de enraizamento (média de três experimentos).

Tratamentos	Períodos (dias)		
	% de enraizamento		
	20-29	30-39	40-49
estaca com gema floral	16	41	49
estaca vegetativa	5	42	67

de verificar o potencial de enraizamento de estacas obtidas de caules de mesma idade fisiológica, mas originários de tubérculos de 1 ano (caule com 0,2 cm de diâmetro) e 2 anos (caule com 0,5 cm de diâmetro).

Na tabela 40 estão representadas as porcentagens de estacas de ambos os tipos, que formaram calos e enraizaram, em três experimentos realizados. Verifica-se que nas estacas de 0,5 cm de diâmetro a formação de calos é nula em dois experimentos ou chega no máximo a 30% no terceiro. Nas estacas com 0,2 cm de diâmetro entretanto, a formação de calos varia de 70-90% nos três experimentos. Do mesmo modo, as porcentagens de estacas enraizadas é acentuadamente maior entre as estacas de caule de 0,2 cm de diâmetro.

Na tabela 41 estão representadas as porcentagens de senescência dos dois tipos de estacas. Observa-se que as porcentagens de senescência das estacas de 0,5 cm é acentuadamente maior desde o período 10-19 dias; chega a alcançar 80% no período 30-39 dias, em dois experimentos, contra no máximo 40% para as estacas de 0,2 cm no mesmo período. Estacas com 0,5 cm de diâmetro parecem ter menor potencial para formação de calos e enraizamento do que as estacas de 0,2 cm de diâmetro.

#### Translocação de IAA e IBA

Os experimentos anteriores sugeriram que provavelmente o baixo potencial de enraizamento das estacas com 0,5 cm de diâmetro estaria associado à baixa eficiência de translocação do IBA já que estas estacas formaram calos quando este re

TABELA 40 - Formação de calos em estacas de D. composita de 0,5 e 0,2 cm de diâmetro, tratadas com IBA. Porcentagem de estacas com calos em três experimentos.

Experimentos	calos (%)		enraizamento (%)	
	0,5	0,2	0,5	0,2
1	0	70	0	80
2	0	90	0	20
3	30	80	30	50

TABELA 41 - Senescência de estacas de D. composita de 0,5 e 0,2 cm de diâmetro com folhas completamente expandidas.

Porcentagem de senescência em três experimentos.

Experimentos	Períodos (dias)							
	10-19		20-29		30-39		40-49	
	% de senescência							
	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2
1	40	0	70	0	80	40	100	60
2	10	0	10	0	30	0	-	-
/ 3	-	0	80	0	80	0	-	-

- : não observado



gulador foi aplicado próximo à axila da folha. Estes experimentos tiveram como objetivo verificar a translocação de IAA e IBA em segmentos de caules de 0,2-0,3 cm e de 0,5 cm de diâmetro utilizando-se blocos de agar como doador e receptor do regulador de crescimento.

#### 1. Cromatografia sobre camada delgada

Na figura 52, estão esquematizados os resultados da cromatografia dos extratos de blocos de agar com IAA e IBA (controle) e de extratos de blocos de agar receptores e doadores que estiveram em contato com segmentos de caules de 0,5 cm e 0,2-0,3 cm. Verifica-se que, no desenvolvimento em butanol; metanol; água 8:4:1(v/v) (figura 52 A, B) a mancha do padrão de IAA (bloco de agar com IAA) é detectada no  $R_f$  0,48 e aparece com coloração rosa após pulverização com o reagente de Salkowsky. Manchas semelhantes em cor e em  $R_f$  foram obtidas no caso das cromatografias dos extratos de blocos doadores com IAA e dos respectivos blocos receptores, que estiveram em contato com caules de 0,5 cm e de 0,2-0,3 cm de diâmetro (Figuras 52 A, B).

A cromatografia do extrato de blocos contendo padrão de IBA em butanol : metanol : água 8 : 4 : 1 v/v seguida da pulverização com reagente de Salkowski resultou em mancha amarela no  $R_f$  0,56 (Figuras 52 A, B). No caso dos extratos de blocos doadores com IBA e dos respectivos blocos receptores que estiveram em contato com caules de 0,2-0,3 cm as manchas detectadas coincidem com a do padrão de IBA (Figura 52 B). Já a cromatografia dos extratos de blocos receptores que estiveram em contato com caules de 0,5 cm de diâmetro, que por sua vez esta

vam em contato com blocos doadores com IBA, resultou em mancha no mesmo  $R_f$  que o IBA padrão, mas de coloração azul, após pulverização com reagente de Salkowsky (Figura 52 A).

No desenvolvimento em clorofórmio : acetato de etila: ácido acético 60:40:45 (v/v) (Figura 52 C e D) a cromatografia dos extratos de blocos contendo IAA e dos extratos de blocos doadores de IAA<sup>e</sup> dos respectivos blocos receptores, resultou em mancha rosa no  $R_f$  0,59, para os dois tipos de caules (Figura 52 C, D). No caso do IBA, entretanto, a mancha amarela obtida para o controle foi localizada no  $R_f$  0,65 (Figura 52 C,D). A cromatografia dos extratos de blocos doadores com IBA que estiveram em contato com os caules de 0,2-0,3 e de 0,5 cm resultou em manchas coincidentes com a do padrão. No caso do caule de 0,5 cm a cromatografia dos blocos receptores resultou, novamente, em mancha azul mas de mesmo  $R_f$  (Figura 52 C).

Em todos os casos a cromatografia dos extratos de blocos doadores e receptores, que não continham IAA ou IBA, mas que estiveram em contato com os dois tipos de caule, não resultou em aparecimento de qualquer tipo de substância sensível ao reagente utilizado.

## 2. Enraizamento de Phaseolus aureus

Na tabela 42 estão representados os números de raízes formadas em estacas de Phaseolus aureus tratadas com IBA  $20 \text{ mg.l}^{-1}$  e água. A análise estatística indicou que o IBA promove significativamente o aparecimento de raízes nas estacas, nesta concentração.

FIGURA 52 - Cromatograma de extratos obtidos de blocos de agar após a translocação de IBA e IAA por segmentos de caule de D.composita.

Sistemas de solventes:

A e B - butanol : metanol : água (8:4:1)

C e D - acetato de etila : ácido acético : água (60:40:45)

$R_f$  de IAA : 0,48 (A, B); 0,59 (C, D).

$R_f$  de IBA : 0,56 (A, B); 0,65 (C, D).

1. extratos de blocos com IAA (controle).
2. extratos de blocos doadores de IAA.
3. extratos de blocos receptores de IAA.
4. extratos de blocos com IBA (controle).
5. extratos de blocos doadores de IBA.
6. extratos de blocos receptores de IBA.

A e C - caules de 0,5 cm

B e D - caules de 0,2 cm

FIGURA 52

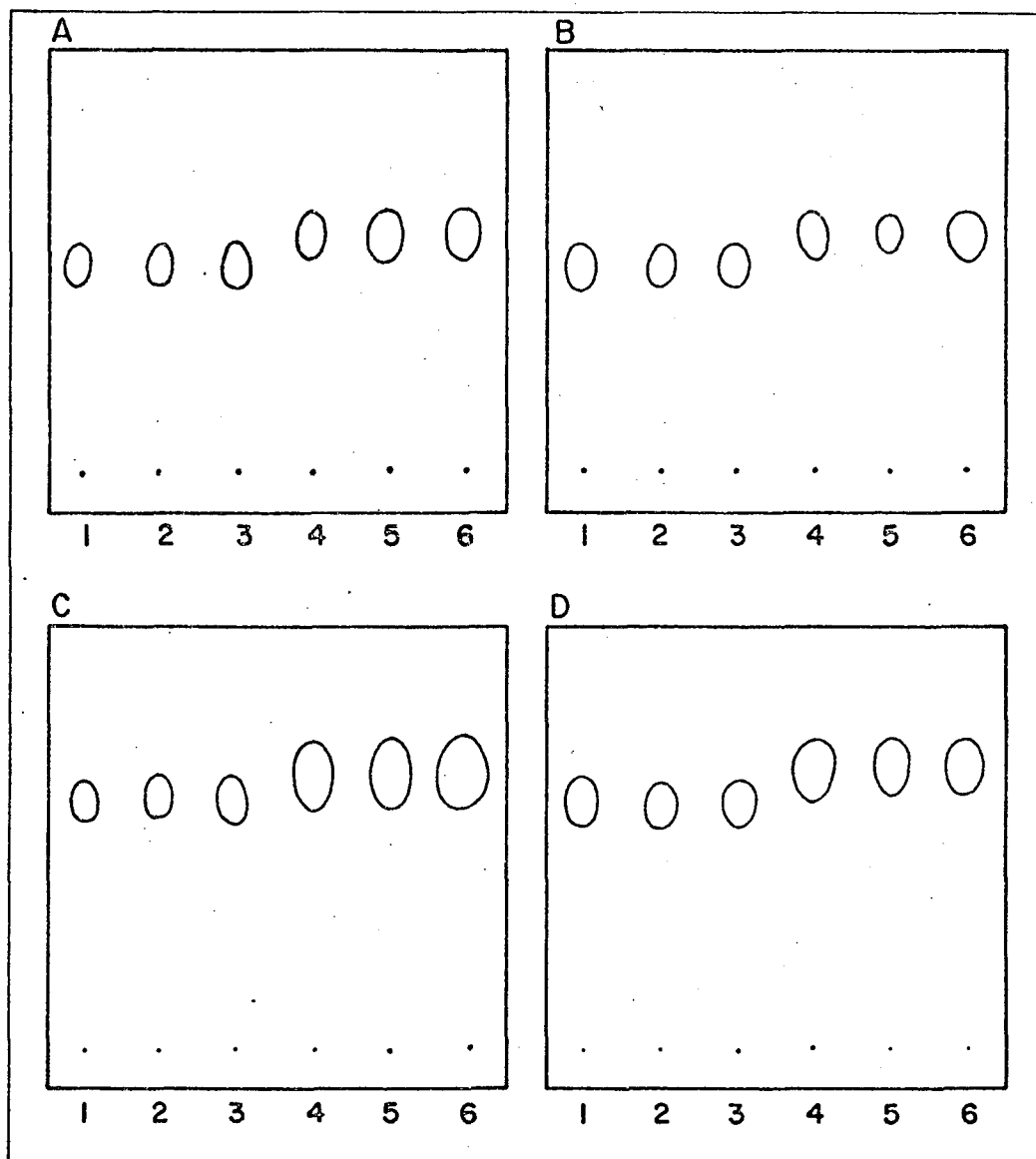


TABELA 42 - Número de raízes em estacas de Phaseolus aureus tratadas com IBA e água.

Teste T significativo ( $p < 0,001$ ).

Repetições	Tratamentos	
	IBA	água
1	13	1
2	13	1
3	14	2
4	17	1
5	15	7
6	7	2
7	14	4
8	14	5
9	10	6
10	5	7
$\bar{x}$	12,2	3,6

Na tabela 43 estão representados os números de raízes formadas em estacas de Phaseolus aureus tratadas com água e com extratos de blocos receptores de IBA e receptores do controle (sem IBA) que estiveram em contato com caules de 0,5 cm de diâmetro. A análise estatística indicou que os extratos de blocos receptores de IBA promoveram significativamente o aparecimento de raízes em relação aos tratamentos com água e aos extratos dos blocos receptores sem IBA. Os extratos dos blocos do controle, também promovem significativamente o aparecimento de raízes em relação ao tratamento com água. O IBA parece ser translocado pelas estacas de 0,5 cm de diâmetro apesar de ser detectado na cromatografia como uma mancha de coloração diferente do padrão.

#### Análise anatômica.

O enraizamento de estacas de D. composita tratadas com IBA ocorre na axila da folha, na região do pulvino (Figura 53A). A análise em corte longitudinal de uma estaca com calo (Fig. 53B, 54A) indica que este se forma na região da gema axilar, que é envolvida por bainhas. À medida que o calo cresce, essas bainhas se abrem e a estrutura torna-se exposta. Pela figura 54 B, é possível verificar que na base da gema axilar há um grupo de células em divisão, que não ocorre no material não tratado (que não foi fotografado), o que sugere que o IBA induz a proliferação celular nesta região. A análise da figura 54 C, que representa o corte longitudinal de uma estaca enraizada, confirma esta hipótese, pois, nota-se que as raízes saem dessa região. O mesmo pode ser verificado na figura

TABELA 43 - Número de raízes em estacas de Phaseolus aureus tratados com extratos de blocos receptores do controle sem IBA (A), com extratos de blocos receptores do tratamento com IBA (B) e com água (C). Caules de 0,5 cm de diâmetro. F significativo a 5%.

Repetições	Tratamentos		
	A	B	C
1	12	24	1
2	12	33	1
3	5	26	2
4	8	20	1
5	7	19	7
6	12	13	2
7	10	16	4
8	9	17	5
9	10	22	6
10	8	10	7
$\bar{x}$	9,3 <sup>b</sup>	20,0 <sup>c</sup>	3,6 <sup>a</sup>

\* as letras comparam os diferentes tratamentos

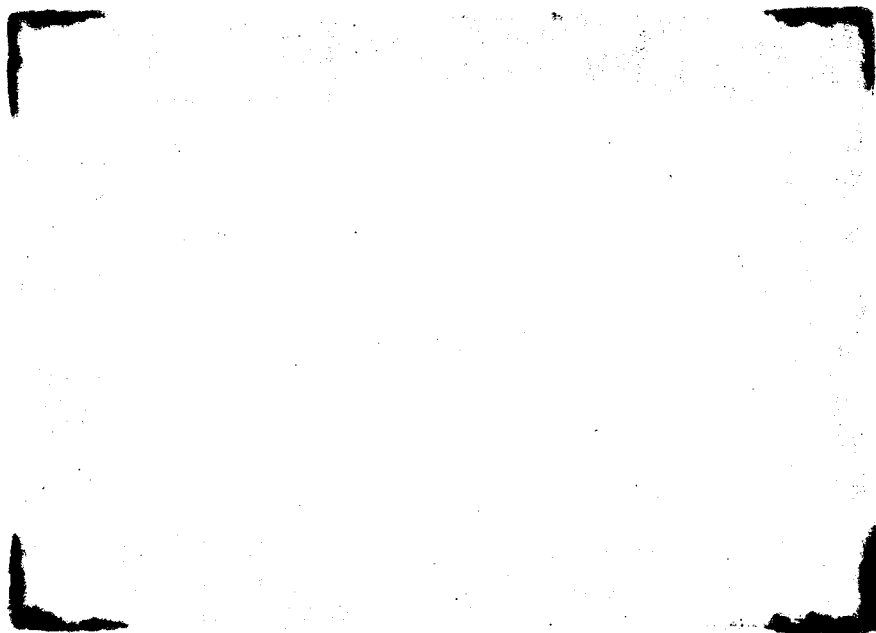


FIGURA 53 - Estaca de D. composita enraizada e diagramas de cortes anatômicos de estacas enraizadas.

A - Estaca enraizada. A seta indica a região da gema axilar com calos e raízes.

B - Diagrama de um corte longitudinal ao caule

C - Diagrama de um corte transversal ao caule.

r - raiz

g - gema

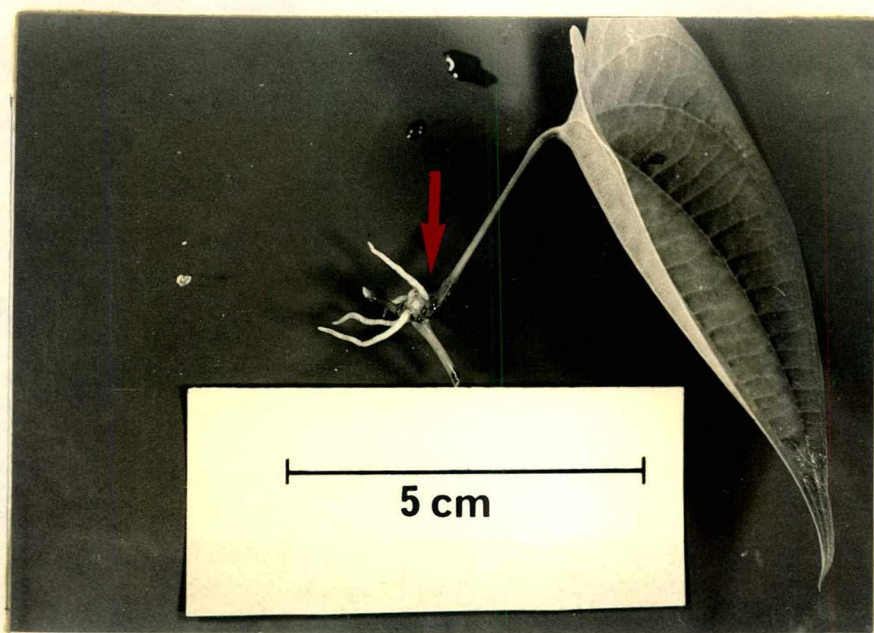
fvc- feixe vascular do caule

c - caule

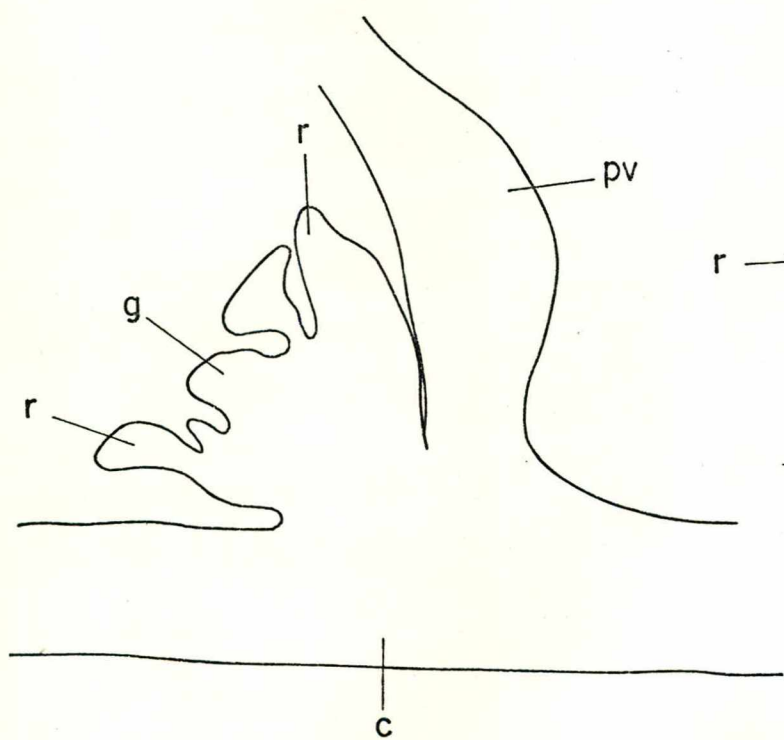
pv- pulvino



A



B



C

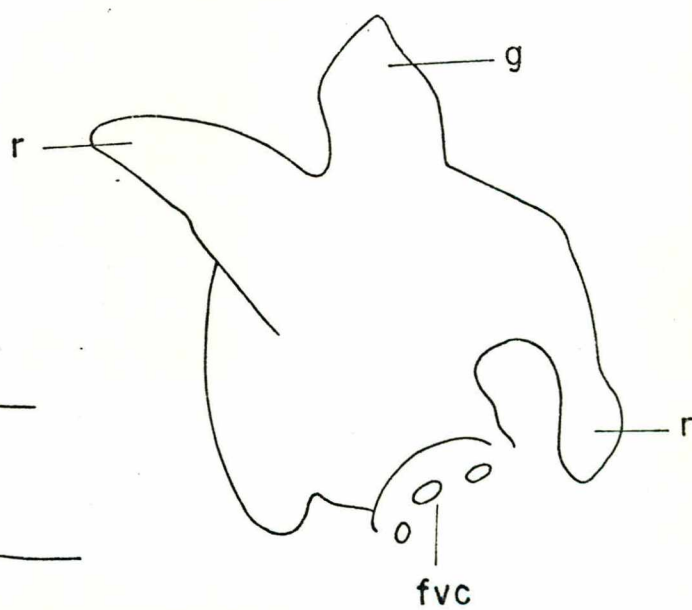


FIGURA 54 - Aspectos de estacas de D. composita com calos e enraizada.

A. Secção longitudinal. Calo mostrando agrupamento de células em divisão na base da gema (2,5 x 1,25 x 3,2)

B. Secção longitudinal. Detalhe mostrando células em intensa atividade meristemática. (6,3 x 1,25 x 3,2).

C. Secção longitudinal. Raiz com feixe vascular saindo da base da gema (2,5 x 1,25 x 3,2).

D. Secção transversal. Raiz com feixe vascular saindo da base da gema (2,5 x 1,25 x 3,2).

a - agrupamento de células em divisão.

c - calo

cd - células em divisão.

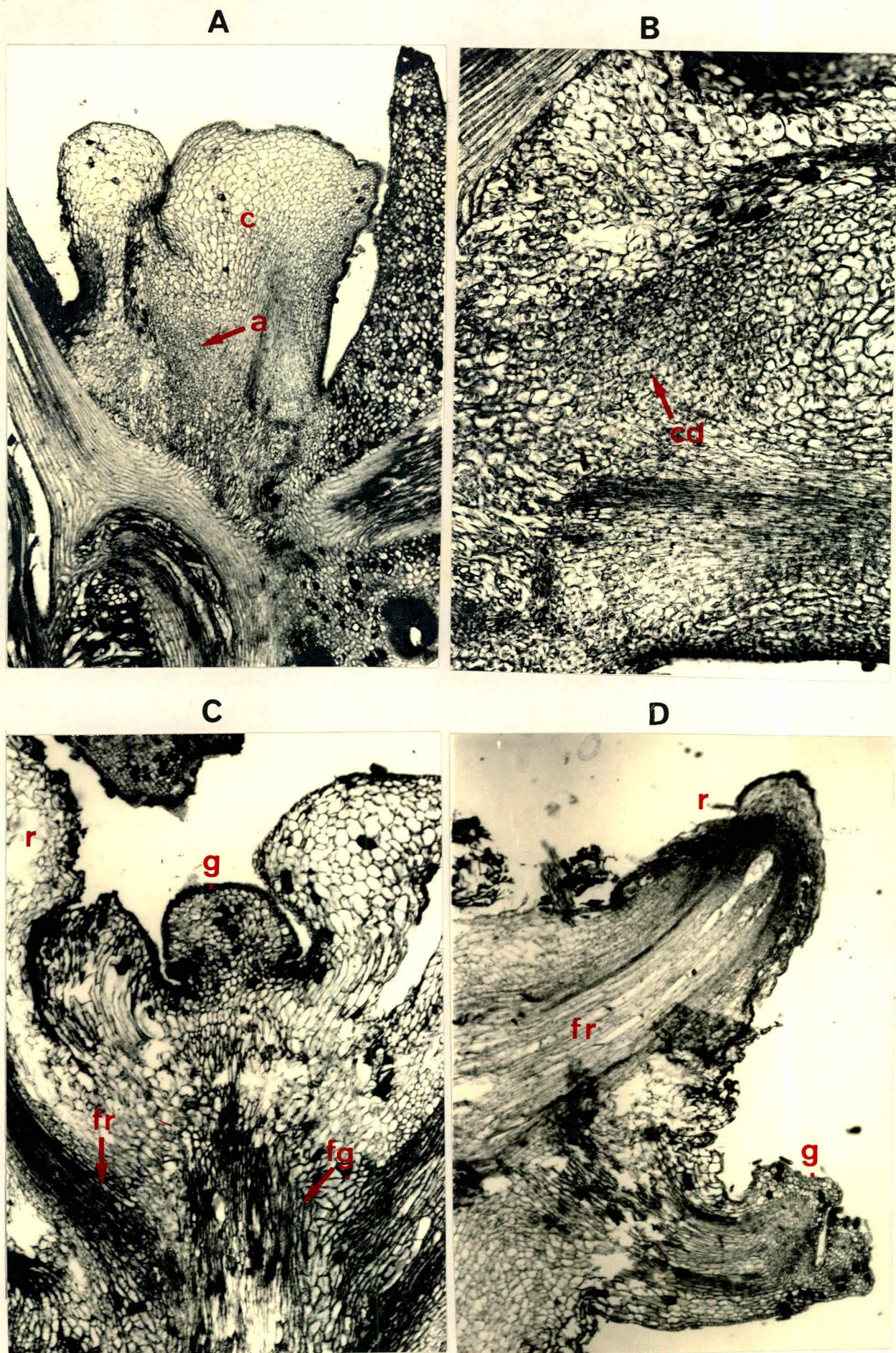
r - raiz

g - gema

fr - feixe vascular de raiz

fg - feixe vascular da gema.

FIGURA 54



54 D, que mostra uma seção transversal de uma estaca enraizada (ver diagrama na Figura 53C).

Efeito de 6-BA, GA<sub>3</sub>, IAA e CCC no desenvolvimento de gemas e tubérculos de estacas enraizadas

Na tabela 44 estão representadas as porcentagens de estacas com gemas e/ou tubérculos dois meses após o tratamento com os reguladores de crescimento. No caso dos tratamentos com 6-BA, GA<sub>3</sub> e controle, cada valor representa a média das porcentagens verificadas em quatro experimentos e no caso dos tratamentos com CCC e IAA, a média é de dois experimentos. No controle 25% das estacas já enraizadas, formaram tubérculos e gemas. Observa-se que o GA<sub>3</sub> a 200 mg.l<sup>-1</sup> inibe a formação de tubérculos e o desenvolvimento das gemas nas estacas. O 6BA a 50 mg.l<sup>-1</sup> possibilitou o desenvolvimento das gemas em 40% das estacas e o tratamento com CCC a 1000 mg.l<sup>-1</sup> induz formação apenas de tubérculos em 50% das estacas tratadas. O IAA inibe a formação de tubérculos e o desenvolvimento de gemas.

### Diosgenina em folhas

#### Separação e dosagem de diosgenina

Na figura 55 estão representados os resultados da cromatografia sobre camada delgada analítica do eluato da faixa hidrófoba detectada na placa preparativa em R<sub>f</sub> coincidente com o do padrão de diosgenina (R<sub>f</sub> 0,31). Neste caso também foi cromatografada uma alíquota do extrato bruto. Após o desenvolvimento em diclorometano : metanol 98 : 2 v/v e reve-

TABELA 44 - Efeito de reguladores de crescimento no desenvolvimento da gema e ou tubérculo em estacas de D. composita enraizadas.

Dados em porcentagem.

Tratamentos	% de estacas com gema e/ou tubérculo
controle	25 (tubérculos e gemas)
6-BA	40 (sô gemas)
GA <sub>3</sub>	0
IAA	0
CCC	50 (sô tubérculos)

lação com mistura de ácido clorosulfônico : ácido acético 1:3 (v/v) são detectadas, sob luz ultra violeta, manchas fluorescentes laranja avermelhadas características de diosgenina. É possível verificar que as manchas correspondentes ao material recromatografado coincidem com a mancha do extrato bruto e do padrão ( $R_f$  0,36). Nos casos em que o extrato bruto ou o material recromatografado são aplicados junto com o padrão, o resultado é uma mancha única.

Na figura 56 estão representados os resultados obtidos para o desenvolvimento ascendente em hexano : acetato de etila 4:1 (v/v) e depois em clorofórmio, na mesma direção. Verifica-se que mancha fluorescente que é detectada no extrato bruto está no mesmo  $R_f$  (0,21) das manchas obtidas para o material recromatografado e para o padrão. Também neste caso, quando o eluato é aplicado misturado com o padrão continua aparecendo uma única mancha.

Na figura 57 A, B e C, estão representados os resultados da cromatografia nos mesmos sistemas de solventes usados anteriormente, mas com o desenvolvimento ascendente realizado em duas direções. Verifica-se a presença de apenas uma mancha fluorescente tanto no caso do eluato puro ou misturado com padrão, em  $R_f$  semelhante ao do padrão puro.

O espectro de ressonância magnética nuclear protônica obtido para a faixa hidrófoba de  $R_f$  0,31 após desenvolvimento da placa preparativa em diclorometano: metanol 98:2 (v/v) está representado na figura 58.

Após revelação com vapor d'água, as placas foram secas em estufa a 50°C por 24 horas e uma área de silicagel cor

FIGURA 55 - Resultados de cromatografia sobre camada delgada após desenvolvimento em diclorometano : metanol 98 : 2 (v/v) e revelação com ácido cloro sulfônico : ácido acético 1 : 3 (v/v).

1. extrato
  2. extrato + diosgenina padrão
  3. eluato do  $R_f$  0,31
  4. eluato do  $R_f$  0,31 + diosgenina padrão
  5. diosgenina padrão
- ⊗ mancha com fluorescência laranja avermelhada.

FIGURA 56 - Resultado de cromatografia sobre camada delgada após desenvolvimento em hexano : acetato de etila 4 : 1 (v/v) seguido de desenvolvimento em clorofórmio e revelação com ácido clorosulfônico : ácido acético 1 : 3 (v/v).

1. extrato
  2. eluato do  $R_f$  0,31
  3. diosgenina padrão
  4. eluato do  $R_f$  0,31 + diosgenina padrão.
- ⊗ mancha com fluorescência laranja avermelhada.

FIGURA 55

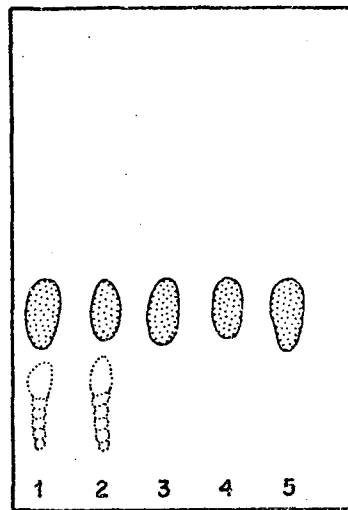


FIGURA 56

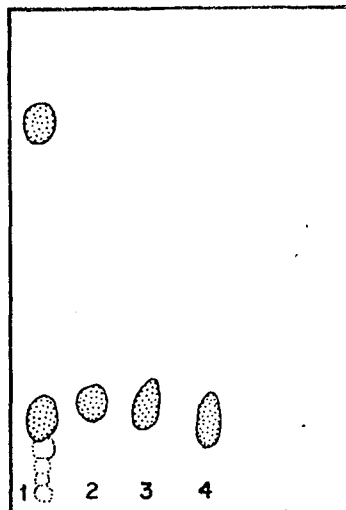




FIGURA 57 - Resultados de cromatografia sobre camada delgada após desenvolvimento em hexano : acetato de etila 4 : 1 (v/v) na primeira direção e clorofórmio na segunda. Revelação com ácido cloro-sulfônico : ácido acético 1 : 3 (v/v).

a. eluato do  $R_f$  0,31

b. diosgenina padrão

c. eluato do  $R_f$  0,31 + diosgenina padrão.

FIGURA 57

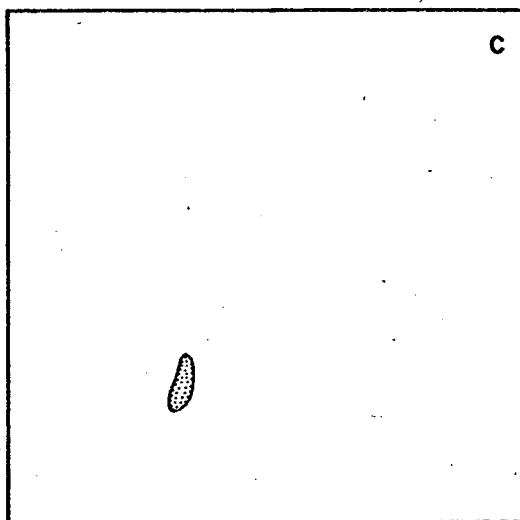
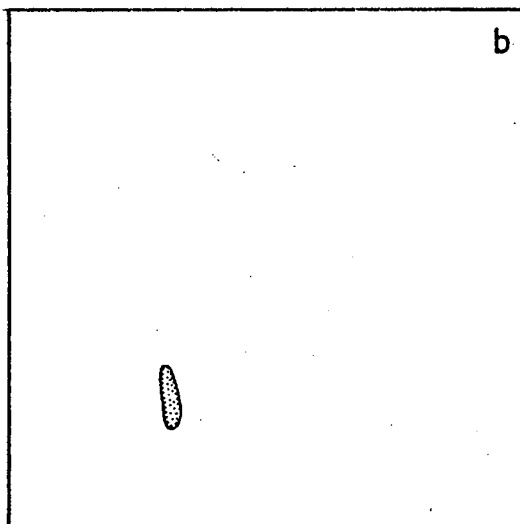
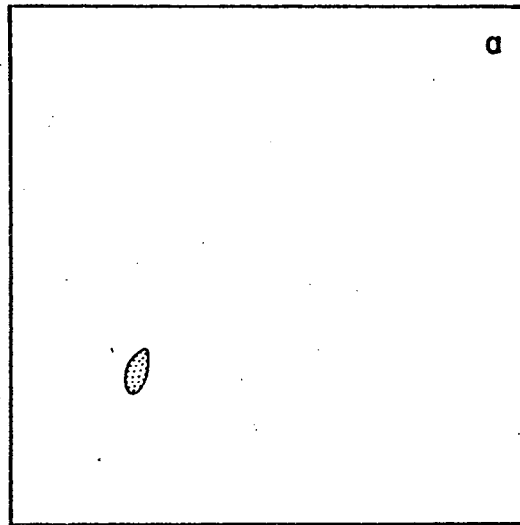
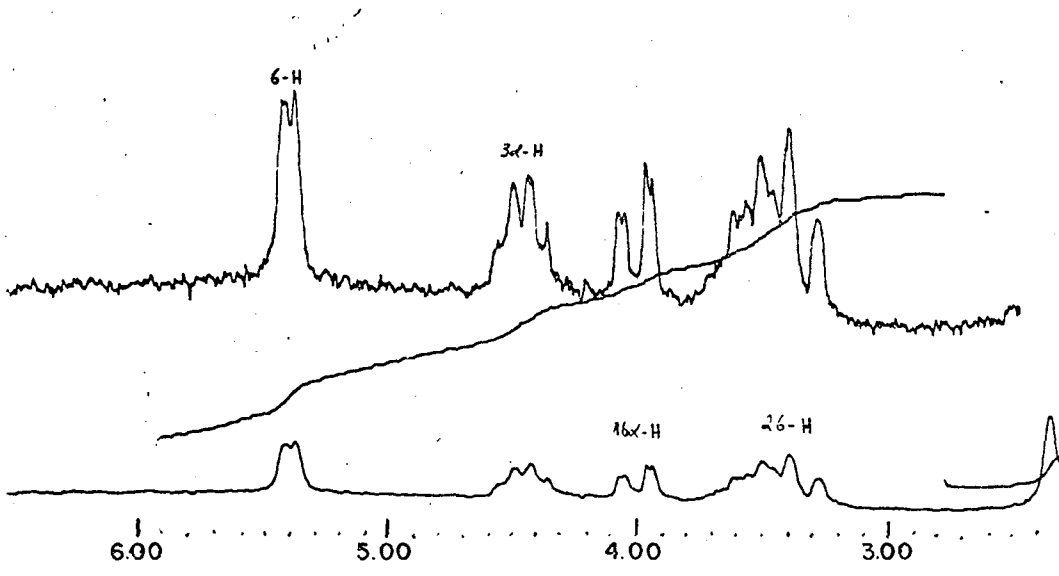
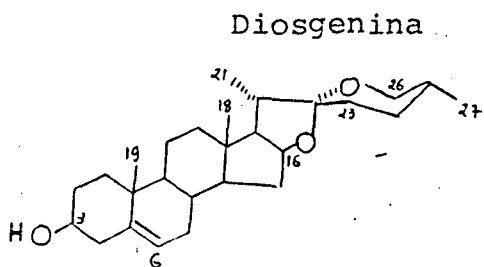
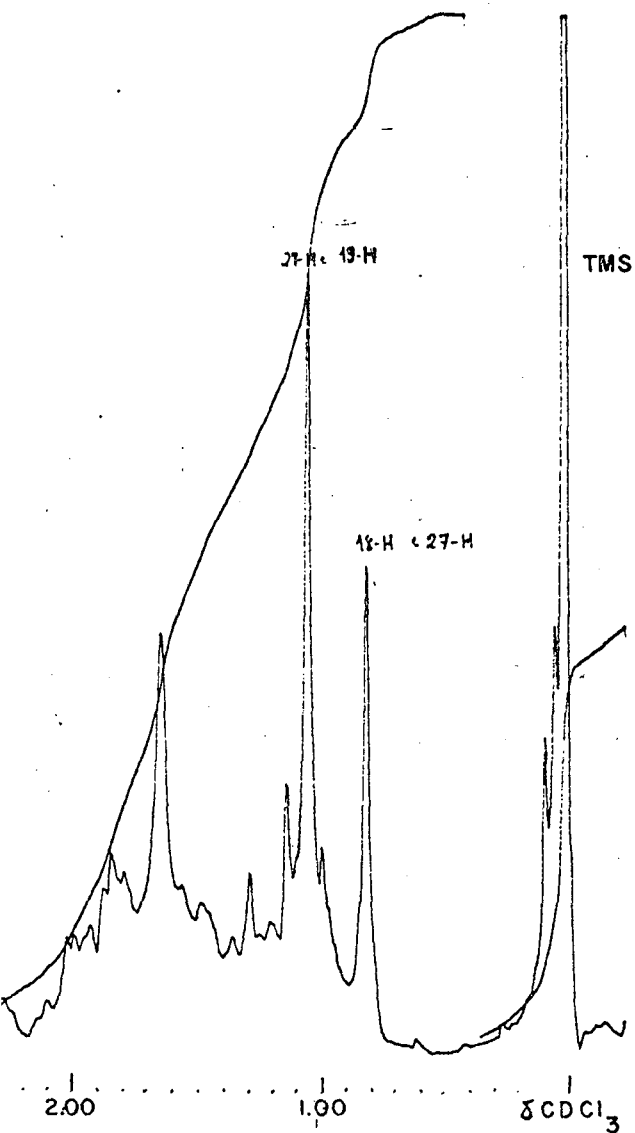


FIGURA 58 - Espectro de ressonância magnética nuclear protonica a 100 MHz do eluato de  $R_f$  0,31.

FIGURA 58





correspondente à mancha hidrófoba, foi eluída em 5 ml de clorofórmio por 2 horas em temperatura ambiente e sob agitação. Foi observado que a não secagem das placas reveladas com vapor d'água, parece interferir na recuperação da diosgenina através da eluição. A seguir os eluatos eram centrifugados, o sobrenadante evaporado completamente para eliminação total do clorofórmio e o resíduo ressuspense em 1 ml de etanol para posterior reacção colorimétrica. Foi observado que a não remoção completa do clorofórmio interfere com a reação colorimétrica, de tal forma que as absorbâncias do padrão cromatografado passam a ser maiores do que as do padrão não cromatografado. Por esta razão os padrões não cromatografados após serem distribuídos nos tubos de ensaio, também eram mantidos em estufa para eliminação completa do clorofórmio.

Na figura 59 estão representadas as curvas padrão de diosgenina não cromatografada e eluída. Com base na análise de regressão linear das curvas padrão de três experimentos, foi possível calcular as porcentagens de diosgenina recuperada para cada concentração (Tabela 45). Verifica-se que a porcentagem de recuperação da diosgenina aplicada está na faixa de 70-80% para 2 horas de eluição.

#### Nível de diosgenina

Na tabela 46 estão representados os valores de concentração de diosgenina ( $\mu\text{g. mg de peso seco}^{-1}$ ) em folhas de plantas masculinas e femininas analisadas na época de abril/maio e dezembro-janeiro. Verifica-se que na época de abril/maio a quantidade de diosgenina presente nas folhas das plantas mascu

FIGURA 59 - Densidades ópticas de várias concentrações de diosgenina padrão.

• diosgenina não cromatografada.

o diosgenina cromatografada e eluída.

Cada valor é média de 3 repetições.

FIGURA 59

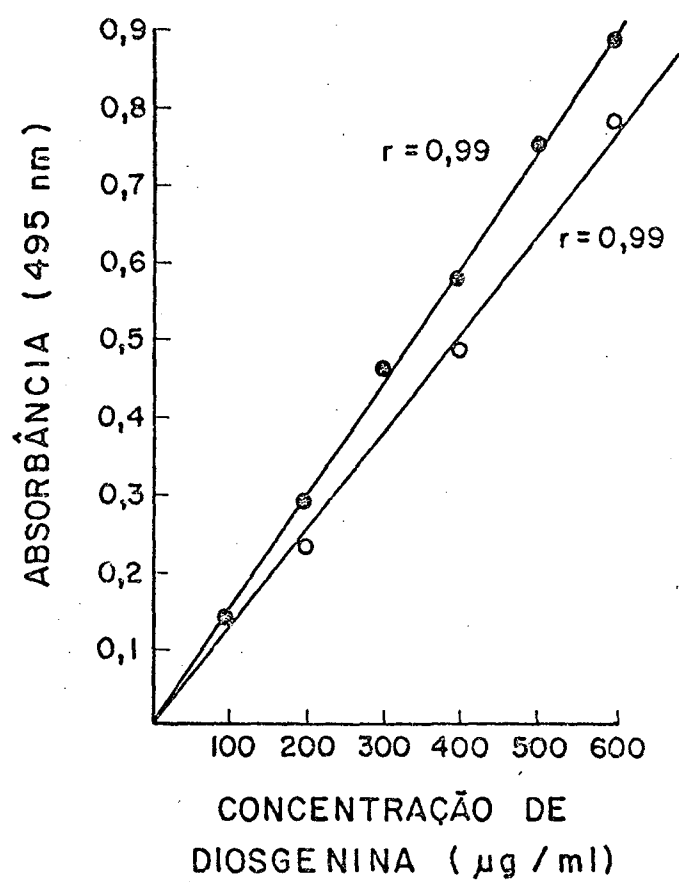




TABELA 45 - Diosgenina pura recuperada após eluição de várias quantidades de diosgenina aplicada (100 - 600  $\mu\text{g}$ ).

Estes valores foram calculados a partir da análise de regressão linear de três experimentos. Porcentagens de recuperação em três experimentos.

Quantidade de diosgenina aplicada ( $\mu\text{g}$ )	% de diosgenina recuperada			$\bar{x}$
	1	2	3	
100	80	70	60	70
200	85	75	70	77
300	86	76	76	79
400	83	75	82	80
500	84	76	86	82
600	85	70	88	81

TABELA 46 - Concentração de diosgenina em folhas de plantas masculinas e femininas de D. composita crescidas em condições naturais, em abril/maio e dezembro/janeiro.

Teste T significativo para o período maio/abril ( $p < 0,001$ ).

Período	planta	Diosgenina ( $\mu\text{g} \cdot \text{mg peso seco}^{-1}$ )		% do peso seco	
		masculina	feminina	masculina	feminina
abril/maio	1	2,97	3,04	0,29	0,30
	2	5,84	1,33	0,58	0,13
	3	4,37	1,10	0,44	0,11
	4	3,69	0,82	0,37	0,08
	5	5,48	1,08	0,55	0,11
	6	3,73	1,90	0,37	0,19
	7	4,58	1,40	0,46	0,14
	$\bar{x}$	4,30	1,50	0,43	0,15
dez/jan.	1	4,90	4,50	0,49	0,45
	2	2,10	1,50	0,21	0,15
	3	5,80	0,50	0,58	0,05
	4	4,20	2,70	0,42	0,27
	5	1,20	1,90	0,12	0,19
	$\bar{x}$	3,64	2,22	0,36	0,22

linas é de 4,30  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}$  de peso seco<sup>-1</sup> e é significativamente maior que a das plantas femininas analisadas no mesmo período. No período dezembro-janeiro não houve diferença significativa entre plantas masculinas e femininas e quantidade de diosgenina é de 2,22 a 3,64  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}$  de peso seco<sup>-1</sup>. É possível afirmar que com exceção das plantas femininas analisadas no período abril/máio, as folhas de D. composita apresentam de 2,22 a 4,30  $\mu\text{g}$  de diosgenina . mg de peso seco<sup>-1</sup>.

#### IV - DISCUSSÃO

A morfologia externa de plantas de D. composita nos estádios iniciais de desenvolvimento assemelha-se à descrita para D. deltoidea (SHARMA, 1976), D. floribunda (SHARMA, 1980), D. glabra (SHARMA, 1974), D. bulbifera e D. odorantissima (LAWTON e LAWTON, 1967). LAWTON e LAWTON (1967) chamam a folha 1 de cotilédone emergente; nos trabalhos mencionados acima os autores concordam com LAWTON e LAWTON. Neste trabalho usa-se a denominação folha 1 para esse órgão que é a primeira folha da planta (GRAZIELA M. CARDOSO, comunicação pessoal).

O fato da planta de 40 dias de idade duplicar em peso seco sem que a parte aérea dobre de peso, sugere que as folhas, que acumulam  $0,045 \text{ mg.dia}^{-1}$  de matéria seca devem ter produzido quantidade suficiente de fotossintatos para exportar, parte para o cotilédone em expansão, que acumula  $0,045 \text{ mg.dia}^{-1}$  entre 20-40 dias e parte para início do processo de tuberização. Desta forma, a queda de peso seco da parte aérea de 29% em relação ao peso seco total concomitante ao aumento de 23% do peso seco do cotilédone e ao crescimento do tubérculo, sugere a relação entre os processos de produção de fotossintatos e sua exportação para regiões da planta em desenvolvimento. O possível envolvimento da folha 1 nos processos subsequentes de expansão do cotilédone e crescimento do tubérculo é apoiado pelo fato deste processo se dar entre 20-40 dias, exatamente no período em que a folha 1 alcança, seguramente, pelo menos 80% de seu tamanho máximo o que assegura taxas máximas de fotossíntese (THAINE et al., 1959; HOPKINSON, 1964; GIAQUINTA, 1978; METIVIER e DALE, 1977).

No caso, o surgimento e desenvolvimento de novas fontes de consumo quando a planta tem área fotossintética restrita (no máximo 2 folhas.planta<sup>-1</sup>) se dá em detrimento do acúmulo de matéria seca pela parte aérea. Isto tem sido observado para Helianthus tuberosus em que a perda de peso seco do caule está relacionada com o crescimento dos tubérculos (INCOLL e NEALES, 1970).

A diferença no padrão de crescimento da primeira folha em relação às demais, caracterizado por ser mais lento e com as folhas alcançando tamanhos máximos mais uniformes, deve-se provavelmente ao crescimento que ocorre às expensas das reservas cotiledonares que devem ser constantes, do ponto de vista quantitativo e mobilizadas na mesma velocidade. Isto explicaria a limitação imposta ao crescimento desta folha. A grande variação dos comprimentos atingidos pelas folhas de uma mesma planta, em todas as fases do desenvolvimento, parece ser característica de algumas espécies de Dioscorea que apresentam heteroblastia e polimorfismo foliar (BARROSO et al., 1974).

A observação de que a parte aérea da planta, que acumulava 2-3 vezes mais matéria seca do que o tubérculo nos primeiros 60 dias, passando a acumular 6,8 vezes mais após este período, indica que por volta de dois meses a área foliar é suficiente para suprir a acumulação de reservas no tubérculo, pois a taxa de acumulação de matéria seca neste, em cada período, continua sendo 5-6 vezes maior que no período anterior.

Uma outra evidência a favor desta hipótese é o fato das velocidades de aumento da área foliar serem iguais para o período de 40-100 dias, enquanto que a velocidade de aumento

em peso seco, entre 80-100 dias é 4 vezes maior, o que indica que neste período as folhas crescem mais pelo acúmulo de matéria seca do que pelo aumento em área. Disto decorre uma razão maior entre peso seco/área para 100-120 dias. A constatação de que entre 20-80 dias a concentração de matéria seca nas folhas é menor do que a verificada entre 100-120 dias, sugere que naquele período, parte dos fotossintatos estaria sendo desviada para o tubérculo. Como a área foliar, naquele período, não seria suficiente para produzi-los em quantidade adequada, que possibilitasse o crescimento normal da planta, o crescimento da parte aérea é comprometido, sendo lento por volta dos dois primeiros meses. Apenas entre 100-120 dias é detectado um acúmulo maior de matéria seca por unidade de área foliar. Isto indica que ao redor de 60-80 dias, foi atingida área foliar suficiente para propiciar o crescimento do tubérculo sem prejuízo do crescimento das folhas, tanto é que entre 100-120 dias, a velocidade de aumento de matéria seca é a mesma que entre 80-100 dias, mesmo com a planta duplicando a área foliar. A partir deste período então, as folhas surgem e crescem mais rapidamente, alcançando tamanhos máximos e portanto áreas maiores, o que implica em acentuado aumento de peso seco.

HOZYO (1970) tem apresentado evidências de que o desvio de fotossintatos é necessário para o crescimento de raízes tuberosas em Ipomoea trifida e as atividades fotossintéticas, conteúdo de clorofila e de NPK são maiores na parte aérea das variedades que tuberizam mais. O surgimento e desenvolvimento de novas fontes de consumo quando a planta tem área fotossintética restrita, se dá em detrimento do acúmulo de matéria seca pela parte aérea. Isto tem sido observado para Helian-

thus tuberosus em que a perda do peso seco do caule está relacionada com o crescimento dos tubérculos (INCOLL e NEALES, 1970). A supressão do crescimento da parte aérea em benefício do processo de formação de órgãos de reserva tem sido observada para batata (MILTHORPE, 1963) em que há parada completa do crescimento de folhas novas. Do mesmo modo, o processo de tuberação não ocorre sem que haja área foliar adequada, pois tem sido visto que estacas de Ipomea batatas tuberizam mais facilmente quando as folhas estão completamente expandidas do que quando estão em crescimento (SIHACHAKR et al., 1982 a, b).

Em relação ao teste de tetrazólio para sementes, de acordo com DELOUCHE et al. (1962), sempre é necessário colocar as sementes em contato com um substrato úmido para proporcionar um amolecimento suficiente. Isto facilita a dissecação ou corte. Em alguns casos em que as sementes podem ser seccionadas ainda secas isso não é necessário. Este período de embebição deve ser o mais curto possível, desde que possibilite o amolecimento do tegumento. Para as espécies de grandes culturas é necessário um período ao redor de 4 horas e para a maioria das sementes florestais, de 16-20 horas (ANÔNIMO, 1976).

Neste trabalho, verificou-se que sementes de D. composita devem permanecer embebendo por um período de 6-8 dias para que o teste seja satisfatório. Para a remoção do tegumento, 24 horas são suficientes. Como o teste do tetrazólio geralmente indica correlação entre redução deste sal, respiração e vigor da plântula (BEWLEY e BLACK, 1982) é de se supor, pela ausência de coloração satisfatória do embrião antes do 6º dia, que a respiração não seria suficiente para promover a redução do tetrazólio. Assim, a atividade das desidrogenases

apenas é suficiente para reduzir o tetrazólio a formazan após 6 dias de embebição. Em D. composita a fase rápida de embebição se dá na primeira hora. Seguramente, após 24 horas a semente está com pelo menos 60% de embebição. Estes fatos indicam que é longo o período entre a hidratação completa e a detecção da atividade das enzimas desidrogenases. A passagem da água através das lâminas de endosperma deve ser um processo lento e a hidratação do embrião deve ocorrer mais tardiamente. Os tecidos do endosperma também poderiam funcionar como uma barreira à passagem do oxigênio. Como a respiração aumenta com o aumento da hidratação (MAYER e POLJAKOFF MAYBER, 1982), este processo estaria comprometido temporariamente. Assim, para a determinação de uma metodologia para avaliar a viabilidade de sementes de cada espécie, deve-se considerar o metabolismo da semente em questão. A ausência de coloração verificada pelos métodos normais propostos para a condução do teste, poderia facilmente indicar a inviabilidade de uma semente que não seria inviável.

Diferentes espécies apresentam diferentes requisitos de temperatura para germinar. Normalmente existe uma faixa de temperatura em que ocorre a germinação e nesta faixa uma temperatura ótima, acima ou abaixo da qual a germinação é retardada. A temperatura ótima é considerada aquela em que a máxima taxa de germinação é alcançada no menor período de tempo (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1982).

A faixa de temperaturas constantes que possibilita a germinação de sementes de D. composita, está entre 20 e 35°C, independentemente da idade das sementes. A temperatura de 25°C assegura a melhor germinação em todos os casos. As temperatu-



ras muito baixas (5, 10 e 15°C) e altas (40 e 45°C) impedem a germinação. A razão pela qual as sementes não germinam em baixas temperaturas é ainda obscura e as explicações mais comuns são as mudanças nas membranas ou a desnaturação de proteínas (BEWLEY e BLACK, 1982). As temperaturas limitantes poderiam ter um efeito sobre a lixiviação de açúcares e aminoácidos prejudicando a germinação. A ausência de hidratação normal da membrana (abaixo de 20%) impede que os lipídios formem a estrutura lamelar dupla e a barreira semi-permeável (BERRY e RAISON, 1981). BRAMLAGE *et al.* (1978) demonstraram que para embriões de soja a lixiviação de substâncias dos embriões, que são colocados para embeber em temperatura baixa, é rápida, provavelmente por modificar o seu estado físico-químico. Quando cotilédones com 30% de umidade (secos) são submetidos a 5°C e 25°C a taxa de lixiviação é maior a 5°C. Entretanto, quando o nível de umidade do cotilédone é de 45% não há diferença. O embrião com 23-30% de umidade submetido a baixa temperatura apresenta uma porcentagem de germinação menor do que quando seu teor de umidade é de 35-50%. Isto indica que um período curto de embebição em baixa temperatura pode reduzir a germinação e o crescimento. Assim, embebição em baixa temperatura alteraria os padrões de lixiviação devido à estrutura molecular dos lipídios, que permite a intensa saída de solutos, inclusive de reservas, o que retardaria a germinação. Muitos sistemas enzimáticos podem se perder na fase inicial da embebição (HENDRICKS e TAYLORSON, 1976).

A inibição da germinação acima de 35°C poderia também estar relacionada com a lixiviação de compostos de reserva, que além de diminuí-la, aumenta o ataque por fungos. A li

xiviação parece ser um processo que cresce em temperatura acima de 30 e 35°C para as espécies que são sensíveis a alta temperatura (BERRY e RAISON, 1981). Espécies resistentes a altas temperaturas não apresentam grandes alterações na membrana e este processo não ocorre. Em sementes de D. composita este processo pode ter ocorrido pois a sementes estavam com baixa umidade.

A germinação verificada para 5-25, 10-25 e 15-25°C indica que quando se trata de temperaturas alternadas os danos causados pela embebição nas baixas temperaturas não são suficientes para reduzir a germinação. A lentidão do processo nessas temperaturas se daria por razões metabólicas, já que a germinação é lenta em baixas temperaturas (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1982).

Em algumas espécies como em Vitis vinifera (PEREIRA e MAEDA, 1981) a germinação é melhor em regimes de alternância de temperaturas. Em outras, o efeito da própria alternância faz com que a germinação aumente em relação a cada temperatura aplicada isoladamente (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1982). Em D. composita, contudo, a alternância não encurtou o período do início da germinação e nem melhorou a germinação em relação a 25°C. Apesar da condição artificial em que foram conduzidos os experimentos, a análise dos resultados do ponto de vista ecológico faz sentido, pois sendo D. composita uma espécie nativa das florestas tropicais e subtropicais a melhor alternância observada para sua germinação (20-25°C) aproxima-se das mudanças diurnas e noturnas de temperatura.

As espécies selvagens variam muito com relação à necessidade da luz para a germinação (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER,

1982). A sensibilidade a luz em sementes, resulta primariamente da atividade do sistema fitocromo (VIDAVER, 1977). Em D. composita a germinação não é inibida no escuro mas dependendo da temperatura é promovida na luz. As interações entre luz e temperaturas verificadas para D. composita a 20, 25 e 15-25°C são comuns para algumas espécies cuja dormência desaparece com o aumento da temperatura, ocorrendo germinação no escuro, e que em baixa temperatura requerem luz para germinar (BEWLEY e BLACK, 1982). O efeito da temperatura seria devido a mudanças no potencial de germinação, resultado de uma alteração no requisito do fitocromo na forma ativa. Certas espécies como Lactuca sativa, às vezes, germinam melhor na luz do que no escuro, dependendo da temperatura (FRANKLAND e TAYLORSON 1983). Assim, nestas temperaturas a ação do fitocromo na forma ativa seria inadequada no escuro e a exposição à luz a tornaria adequada, aumentando a quantidade de fitocromo na forma ativa (FRANKLAND e TAYLORSON, 1983).

A germinação em uma temperatura pode ser alterada pela incubação prévia em outras. Poucas horas ou dias em baixas temperaturas pode aumentar a germinação de algumas sementes que necessitam de luz. O tratamento de frio poderia atuar retardando a passagem do fitocromo na forma ativa para a forma inativa. O tratamento em temperatura alta pode inibir a germinação das sementes que é melhor em baixa temperatura (FRANKLAND e TAYLORSON, 1983). A exposição à alta temperatura aumenta a porcentagem de germinação de muitas sementes (BERRY e RAISON, 1981). Para D. composita, os tratamentos com temperaturas baixa e alta não promoveram a germinação em relação ao controle. As porcentagens de germinação quando as se-

mentes são embebidas a 25°C e depois mantidas após 5 ou 10 dias a 35°C ou 4°C, são tão altas quanto o controle e maiores que a germinação verificada quando as sementes permanecem continuamente a 35°C ou 5°C. Isto confirma a idéia de que a temperatura de embebição poderia estar diminuindo a porcentagem de germinação a 35°C ou inibindo-a a 5°C. O fato do tratamento por 10 dias a 4°C favorecer igual germinação na luz ou no escuro pode estar relacionado com o retardamento da conversão do fitocromo da forma ativa para a inativa, fazendo com que as sementes mantenham níveis adequados de fitocromo na forma ativa, não dependendo da luz para germinar. Espécies de Dioscorea nativas do Japão, originárias de zonas temperadas, precisam de tratamento com baixa temperatura para que haja germinação e a temperatura ótima para a germinação de algumas delas como D. tokoro (14, 20 ou 17°C) varia com a época em que a semente é coletada. Nestas espécies a luz inibe a germinação (OKAGAMI e KAWAI, 1982). Para D. opposita (espécie chinesa) a germinação também é aumentada pelo tratamento prévio com baixa temperatura e a dormência na luz é quebrada por tratamento com ácido giberélico e baixas temperaturas (YAKUNA et al., 1981).

O armazenamento das sementes de D. composita por períodos longos altera o potencial de germinação dependendo da temperatura. Em temperaturas altas as sementes armazenadas por 4 ou 5 anos germinam pouco, enquanto que as recém-coletadas mantêm o potencial de germinação nestas temperaturas. Em temperaturas mais baixas (20°C) as sementes mais novas (com menos de 4 anos) também mantêm melhor o potencial de germinação na luz. As sementes mais novas (armazenadas 4 anos) também apresentam maior potencial de germinação tanto nas alternâncias

altas como nas baixas.

O armazenamento das sementes pode ocasionar processos de deterioração e alterações das organelas celulares e das membranas, que refletiriam num lento crescimento (BEWLEY e BLACK, 1982). Essas modificações poderiam explicar a alteração da sensibilidade das sementes de D. composita à luz, dependendo da temperatura. Nas sementes armazenadas por 5 anos pode ter havido um processo de deterioração do sistema que responde à luz em determinada temperatura.

As sementes recém-coletadas de D. composita apresentam dormência tanto na luz como escuro nos primeiros meses. Essa dormência é perdida com o decorrer do tempo e parece que é susceptível ao tratamento com baixa temperatura (4°C). Em outras espécies têm sido detectados dois tipos de dormência que envolvem diferentes mecanismos: a dormência do embrião e a imposta pelo tegumento (BEWLEY e BLACK, 1982). No caso de D. composita, o tegumento não parece oferecer barreira à germinação. Como a dormência do embrião tem sido mostrada para outras espécies como D. rotundata e D. opposita (SADIK e OKEREKE, 1975; YAKUNA et al., 1981), certamente seria este o caso para D. composita. As sementes necessitam de um período de pós-amadurecimento de aproximadamente 9 meses para que a germinação ocorra por volta do 10º dia e atinja o máximo no 20º dia do experimento, independentemente de luz ou escuro. CABANILLAS et al. (1964b) trabalhando com D. composita mostraram que as sementes apresentam dormência na época da colheita que termina 4 semanas depois, resultado que não coincide com os obtidos neste trabalho. Algumas espécies precisam de muitos anos para que ocorra o pós-amadurecimento como Cyperus. Sementes re-

cêm colhidas de alface e Rumex têm requisitos diferentes para a germinação depois de um período de armazenamento (MAYER e POLJAKOFF MAYBER, 1982). O armazenamento também altera o fotoblastismo de Cucumis anguria, semente fotoblástica negativa (NORONHA et al., 1976).

No caso de D. composita a exigência pela luz é o requisito que desaparece com o armazenamento a seco em temperatura ambiente.

O período de pós-amadurecimento pode ser necessário para que ocorram modificações anatômicas, morfológicas ou químicas. Em algumas espécies o embrião pode atingir a maturidade durante o processo de germinação (BEWLEY e BLACK, 1982). Em Annona crassiflora a semente demora cerca de 200 dias para germinar, até que o embrião amadureça (RIZZINI, 1973). Para sementes de D. composita embebidas em placa de Petri, isto parece ocorrer em 50 dias (período em que é alcançada a germinação máxima) e a luz é necessária para o processo.

O armazenamento de sementes de D. composita (11-15% de umidade) em temperatura ambiente por um ano, mantém a viabilidade, enquanto que a 4°C esta é perdida. Este resultado assemelha-se com o obtido por MAEDA et al. (1985) no caso de Vitis vinífera, em que a melhor temperatura para o armazenamento de sementes frescas (16% de umidade) foi a de 20°C. Para Citrus limonia o armazenamento a 4°C é efetivo em manter a viabilidade de sementes com 6% de umidade por 32 meses. Neste caso, o armazenamento a 25°C é prejudicial, pois em 8 meses as sementes perdem a viabilidade (USBERTI e FELIPPE, 1980).

Em D. composita a perda da viabilidade parece ser mais lenta quando a semente é mantida em temperatura ambiente, pois sementes com 4 anos ainda mantêm 30% de viabilidade. Isto talvez seja devido ao baixo teor de umidade que atingem naturalmente. Talvez, neste caso a diminuição ainda mais da umidade possibilite o armazenamento a 4°C. CRUZADO et al. (1964b) mostraram que para D. composita o armazenamento de sementes em refrigerador em frascos com até 60% de umidade relativa resultou em 83% de viabilidade após dois anos, dado que não coincide com os obtidos neste trabalho.

A dormência de sementes em plantas superiores é controlada por hormônios (VILLIERS, 1975). O ácido giberélico pode substituir os requisitos de luz, induzindo a germinação no escuro, e de frio, na germinação de algumas espécies como por exemplo Dioscorea opposita (YAKUNA et al., 1981). As gibberelinas teriam um papel na indução da germinação, apesar de haver pouca evidência de alterações no nível endógeno dessas substâncias, após o tratamento com luz, nas sementes que necessitam desta condição para germinar. Os efeitos da aplicação de gibberelinas não estariam relacionados com os mecanismos naturais da indução da germinação. (FRANKLAND e TAYLORSON, 1983). Em Rumex obtusifolius há um aumento de gibberelinas endógenas após choque de luz vermelha ou de temperatura alta (FELIPPE et al., 1970).

O papel das citocininas substituindo a necessidade do tratamento com frio tem sido detectada em sementes de Acer saccharum (THOMAS, 1977). Também, em certas espécies cuja germinação é inibida no escuro e alta temperatura, as citocininas podem quebrar a dormência. Além disso estão envolvidas no me

canismo de dormência de sementes sensíveis à luz como Rumex obtusifolius, podendo assim como as giberelinas estimular a germinação (VAN STADEN e WAREING, 1972). Em D. composita o ã eido giberélico e o 6-BA não promoveram a germinação no escuro, não alterando os requisitos de luz pela sementes. Como os experimentos com reguladores foram realizados na época em que as sementes já estavam germinando rapidamente, apesar de ainda manterem o fotoblastismo, não foi possível verificar seu e feito no período de pós-amadurecimento.

O etileno estimula a germinação em muitas sementes sensíveis à luz, como em Cucumis anguria (CARDOSO, 1982) apesar de não haver evidência de que o fitocromo na forma ativa controla a produção de etileno (FLANKLAND e TAYLORSON, 1983). Além disso, o etileno aumenta a germinação de sementes de Malus doméstica Barb. que requer estratificação para os pós amadurecimento se aplicado durante este período, parecendo estar envolvido na liberação da dormência desta espécie (KETRING, 1977). Em D. composita o etileno impede a germinação das sementes em luz e escuro. Esta constatação levou ao raciocínio de que talvez a baixa germinação no escuro fosse devida à alta produção de etileno, assim como o alto nível desta substância na semente também poderia ser responsável pela necessidade de um período de 12 dias aproximadamente, para a semente co meçar a germinar. O  $\text{AgNO}_3$  é um antagonista da ação do etileno, que age através de uma mecanismo de ação ainda desconhecido e funciona como um receptor com capacidade de se ligar ao etileno, impedindo sua ação (YANG, 1985). Sua efetividade em reduzir a ação do etileno diminui com o aumento da concentração (YANG, 1985). Em D. composita a aplicação do  $\text{AgNO}_3$  não a



pressou o início da germinação e também não aumentou a germinação no escuro para os mesmos níveis observados na luz, o que indica que o etileno não estaria envolvido neste processo ou que o nível de etileno seria alto o suficiente que o  $\text{AgNO}_3$  não estaria sendo efetivo em inibir sua ação completamente. O AVG é um inibidor da produção de etileno mais precisamente da enzima ACC, ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano sintase, que é uma enzima que requer piridoxal fosfato para sua máxima atividade. O AVG é um forte inibidor das enzimas dependentes de piridoxal fosfato (YANG, 1985). Em D. composita o AVG inibiu a germinação no escuro. Nesta fase as sementes do controle já não mostravam fotoblastismo, mas o tratamento com AVG 10 ppm devolveu a sensibilidade à luz às sementes, sugerindo que a inibição da síntese de etileno nesta fase de amadurecimento da semente poderia estar associado com as modificações na sensibilidade.

A inibição de germinação com AVG 20 mM em luz e escuro parece indicar que o etileno é necessário para o processo. É entretanto difícil argumentar porque isso não é verificado quando se aplica AVG a 10 mM.

O efeito do AVG 20mM pode ser devido à ação desta substância no próprio metabolismo das sementes, pois pela sua natureza, poderia estar influenciando nas reações de transaminação que levam à formação de aminoácidos a partir do ácido glutâmico, que são ativados por isoenzimas do tipo piridoxal fosfato (CONN e STUMPF, 1979).

O enraizamento de estacas com caule é um importante meio de propagação vegetativa utilizado em reflorestamento

e horticultura para produção em massa de material geneticamente melhorado (NANDA e ANAND, 1970). A utilização de auxinas para estimular o enraizamento de estacas foi a primeira aplicação prática dos hormônios vegetais na agricultura (EPSTEIN e LAVEE, 1984). Auxinas sintéticas e naturais induzem a formação de raízes em estacas de caules. O IBA é a auxina geralmente usada como estimulador de enraizamento por ser uma auxina fraca e não ser tão susceptível às enzimas que destroem auxinas. Outra auxina frequentemente usada é o NAA (ácido nafenaleno acético), mas é mais tóxico. O IAA é muito instável e pode ser destruído pela luz. Em alguns casos as substâncias promotoras do enraizamento são mais efetivas quando utilizadas conjuntamente (WEAVER, 1972). O IBA tem sido usado com sucesso na indução de raízes adventícias em espécies como Pinus radiata (SMITH e THORPE, 1975), Prunus persica (L.) Botsch (FACHINELLO et al., 1982) e Phaseolus vulgaris (BRIDGLALL e VAN STADEN, 1985).

Em D. composita o IBA foi mais efetivo em promover o enraizamento em relação ao composto Rootone F utilizado por MARTIN e DELPIN (1969). Apesar da concentração de  $20 \text{ mg.l}^{-1}$  ter sido inibitória, os resultados concordam com a observação de GORTER (1968) de que altas concentrações de auxina (até  $10 \text{ mg.l}^{-1}$ ) induzem maior número de células parequimatosas não diferenciadas a se diferenciar em primórdio radicular e raízes. Para outras espécies de Dioscorea como D. alata a porcentagem de enraizamento depende da variedade (CABANILLAS e MARTIN, 1978). Nas espécies que enraizam sem qualquer tratamento como D. spiculiflora, o enraizamento e a formação de novas plantas ocorrem depois de 10-15 dias (PRESTON e HAUN, 1962), o que é um pe

ríodo razoavelmente rápido comparado com o verificado para D. composita.

O efeito retardador do 6-BA na senescência das estacas de D. composita é conhecido para outras espécies. Esta substância é a mais efetiva em retardar a degradação de clorofila quando aplicada por pulverização, sendo empregada na conservação de hortaliças (WEAVER, 1972).

A inibição da formação de calos e do enraizamento em estacas de D. composita tratada com IBA e 6-BA, indica a presença da conhecida mas inexplicada interação entre estes reguladores, confirmada por vários autores (BRIDGLALL e VAN STADEN, 1985). É sabido que a aplicação de 6-BA em alguns casos também pode promover o enraizamento (BACHELARD e STOWE, 1963).

Tem sido verificado que estacas de Phaseolus vulgaris após tratamento com IBA apresentam níveis elevados de citocininas na lâmina foliar em relação ao controle, cujas estacas apresentam nível elevado de citocininas endógenas no pecíolo. A baixa concentração destas substâncias após tratamento com IBA permitiriam o enraizamento (BRIDGLALL e VAN STADEN, 1985). A maior concentração de citocininas na lâmina foliar após tratamento com IBA poderia explicar a baixa senescência das estacas tratadas somente com este regulador.

Em Pinus radiata uma redução de 60% no enraizamento foi observada nas estacas encubadas na presença de IBA e cinetina (SMITH e THORPE, 1975). Em D. composita o 6-BA reduz o enraizamento por prejudicar e retardar a formação dos calos, pois quando aplicado tardiamente não interfere no desenvolvimento dos primórdios radiculares. Isto também tem sido veri-

ficado para estacas de plântulas de Helianthus annuus; quanto mais tarde o 6-BA é aplicado menos efetiva é a inibição do enraizamento, o que indica que atua no período que precede a formação dos meristemóides (SMITH e THORPE, 1975; FABIJAN et al., 1981b).

Estudos realizados com sementes de Phaseolus vulgaris, Zea mays e Pinus silvestris e plantas jovens de Phaseolus, mostram que o tratamento com cinetina aumenta o nível endógeno de IAA mais provavelmente porque estimularia a síntese de IAA ou atuaria inibindo a IAA oxidase. Em outros sistemas as citocininas poderiam dirigir o transporte de auxina (SALEH e HEMBERG, 1980).

O efeito inibitório das citocininas na formação dos primórdios radiculares depende da concentração em que é utilizada. Assim, em estacas de plântulas de Pisum sativum as concentrações acima de  $10^{-6}$  M inibem a iniciação e a emergência das raízes adventícias ao passo que concentrações abaixo de  $10^{-6}$  M promovem a indução (WIGHTMAN et al., 1980). No caso de estacas de Helianthus annuus foi mostrado que o cotilédone tem papel importante na formação de raízes adventícias no hipocótilo e quando é tratado com 6-BA esta capacidade é inibida. Os testes mostraram que 6-BA tem muito pouca mobilidade neste sistema, o que indicou que a ação desta substância foi devido à manutenção do cotilédone como fonte de consumo, impedindo o movimento de princípios ativos do enraizamento para baixo ou aumentando a taxa de movimento destas substâncias para cima (FABIJAN et al., 1981b).

Este processo pode ter ocorrido no caso das estacas

de D. composita. Como a pulverização foi completa, pode também ter havido contato do 6-BA com os tecidos do caule e talvez sua ação pudesse também ser no local de aplicação. NANDA et al. (1971) mostraram que a habilidade de estacas enraizarem é determinada pelo balanço entre fatores nutricionais e substâncias reguladoras de crescimento. O enraizamento não ocorre mesmo quando a concentração de um deles é muito alta. Assim, em Populus nigra, segmentos sem folha não enraizam mesmo quando tratados com IBA ou IAA. A adição de glicose 1% com IAA estimula o processo. Outros autores como Went e Pearse consideram que as folhas suprem as estacas com substâncias necessárias para a iniciação da raiz (NANDA et al., 1971). O enraizamento obtido para estacas de D. composita com metade da lâmina foliar, sugere que a metade da área fotossintética é suficiente para fornecer as substâncias necessárias para o enraizamento. Estes dados não concordam com os obtidos para D. spiculiflora de que a remoção de partes da folha se dá em detrimento do processo de enraizamento (PRESTON e HAUN, 1962).

Por outro lado, parece que a diminuição do enraizamento das estacas basais deve estar associada com o metabolismo de suas folhas. As folhas da região basal funcionam como exportadoras de fotossintatos. Esta atividade inicia-se quando as folhas atingem de 30-50% de seu tamanho máximo (GIAQUINTA 1983). Portanto, as folhas da região basal devem estar com o nível de fotossintatos muito reduzido e que é suficiente para manter a folha viva apenas até à fase de formação de calos. O processo subsequente do desenvolvimento de raízes seria prejudicado.

O baixo enraizamento e senescência verificados nos

experimentos 6 e 7 da tabela 20 pode estar relacionado com a baixa temperatura verificada no período maio-julho. NANDA e ANAND (1970) indicam que para Populus nigra, o baixo enraizamento no inverno poderia estar relacionado com a baixa atividade das enzimas que mobilizam amido em açúcares solúveis. Assim, deve haver energia para o processo de formação de calos mas não para a diferenciação e desenvolvimento das raízes. A grande variação entre os experimentos pode ter sido devida ao fato de terem sido desenvolvidos em diferentes épocas do ano. Estes mesmos autores supõem que a efetividade da auxina em promover o enraizamento varia com a época do ano. Depende do estágio de desenvolvimento dos ramos e do nível endógeno de auxina na folha e de seu efeito na mobilização de reservas, causada pelo aumento da atividade enzimática. A taxa de enraizamento um pouco menor verificada para estacas de D. composita com gemas florais menores que 1,5 cm pode estar relacionada às características fisiológicas das folhas.

Nos trabalhos de MARTIN e DELPIN (1969) sobre D. composita e de PRESTON e HAUN (1962) sobre D. spiculiflora é mencionado o efeito sazonal no enraizamento mas a ausência de dados sobre o que acontece com as estacas que não enraizaram torna difícil a discussão. O mesmo pode ser dito em relação às observações sobre o potencial de enraizamento das folhas basais. Para D. alata a época do ano não afeta o enraizamento (CABANILLAS e MARTIN, 1978).

De acordo com PRESTON e HAUN (1962) em D. spiculiflora a presença de gemas florais reduz o enraizamento. Possivelmente o desenvolvimento das inflorescências utilizaria o suprimento nutricional que poderia, de outra forma, se tornar

disponível para o enraizamento. Outra possibilidade seria que a produção de algum material na folha suprimiria o desenvolvimento das raízes. Em D. composita contudo, a remoção das gemas maiores que 1,5 cm não resultou no enraizamento das estacas, o que elimina a hipótese de que o enraizamento estaria impedido pela ação dos ramos florais como fontes de consumo.

As mudanças morfológicas ligadas à floração e induzidas pelo comprimento do dia ocorrem no meristema das gemas axilares ou terminais. Estas alterações morfológicas constam de diferenciação das gemas e ocorrem após os eventos bioquímicos que acontecem nas folhas, modificando o seu estado fisiológico e levando à produção do estímulo floral (VINCE-PRUE, 1975).

Para as espécies de modo geral a auxina induz atividade meristemática através da desdiferenciação das células na região da endoderme e periciclo adjacente ao floema (GORTER, 1968). No caso de D. composita o IBA induz desdiferenciação das células da base da gema axilar e desta forma a necessidade da manutenção da região do púlvino, já mencionada por MARTIN e DELPIN (1969), pode assim ser explicada. No caso de D. composita é possível que as estacas com gemas florais maiores que 1,5 cm não enraizem devido à mudança da sensibilidade do tecido da base da gema ao IBA, com o advento do processo de diferenciação do sistema vascular do pedúnculo do ramo floral. Talvez no caso da estaca com gema floral menor este processo não esteja tão avançado e o tecido sensível ao IBA ainda mantém esta propriedade.

Muitas espécies florestais e frutíferas, tropicais e subtropicais, respondem pouco aos reguladores de crescimento

quando as estacas são obtidas de plantas com mais de dois anos de idade (WEAVER, 1972). O não enraizamento de estacas velhas está, do ponto de vista anatômico, associado ao alto grau de esclerificação dos tecidos (ESAU, 1965). Este não parece ser o caso para D. composita já que as estacas de 0,5 cm tem a mesma idade fisiológica do que aquelas que enraizam facilmente. Também, como o enraizamento se dá na base da gema axilar o problema da esclerificação pode ser eliminado. A ausência de enraizamento deve estar relacionada com o diferente metabolismo do IBA nas estacas de 0,5 cm de diâmetro, o que é suportado pelos resultados da cromatografia sobre camada delgada. O fato de ter havido indução de enraizamento em estacas de Phaseolus aureus não significa que haveria a mesma indução nas estacas de D. composita. EPSTEIN e LAVEE (1984) conduzindo estudos com estacas de Vitis vinifera e duas variedades de Olea europea (uma fácil de enraizar e outra difícil de enraizar) mostram que o IBA aplicado às estacas é convertido em IAA com o decorrer do tempo. As estacas consideradas difíceis de enraizar fazem essa conversão mais rapidamente do que as outras. Nestas o IBA permanece na base da estaca e lentamente vai sendo convertido em IAA necessário para o processo de enraizamento. Em D. composita entretanto, a mancha detectada não coincide com o Rf do IAA e portanto a explicação acima não parece estar ocorrendo neste sistema. Talvez o IBA seja convertido em outro composto nas estacas de 0,5 cm que não seria tão efetivo em promover o enraizamento.

O sucesso para a obtenção de plantas a partir de estacas enraizadas variou de acordo com a espécie de Dioscorea estudada. Para D. alata 5 semanas são suficientes para o de-



desenvolvimento de ramos e raízes em 16 e 88% das estacas (ZAAG e FOX, 1981). No caso de D. belizensis ocorre depois de 2 ou 3 meses em 70% das estacas (BLUNDEN et al., 1966). Para D. spiculiflora, que enraiza sem qualquer tratamento, o ácido naftalenoacético induz o brotamento das estacas; a produção de plantas ocorre entre 3 e 8 semanas (PRESTON e HAUN, 1962). Os dados obtidos neste trabalho sugerem que a obtenção de plantas em D. composita a partir de estacas enraizadas é demorada, confirmando os resultados de MARTIN e DELPIN (1969) de que os ramos começam a aparecer depois de 4 semanas.

O efeito inibitório do ácido giberélico em promover o desenvolvimento das novas plantas em estacas de D. composita é conhecido para D. spiculiflora (PRESTON e HAUN, 1962) e para outros tipos de plantas como Dahlia, Helianthus tuberosus e Begonia evansina (WAREING, 1983). PEREIRA e VÁLIO (1984), mostraram o efeito inibidor desta substância na tuberização aérea das estacas de Solanum tuberosum, indicando que o ácido giberélico inibe a acumulação de amido nas gemas axilares. A aplicação de ácido giberélico em Ipomoea batatas também induziu pouca tuberização e Mc DAVID e ALAMU (1980) observaram que a matéria seca ficou acumulada na base do pecíolo.

O efeito promotor do cloreto de 2-cloroetiltrimetilamônio na formação de tubérculos em D. composita também é conhecido para outras espécies, como batata e Dahlia e seria devido a sua ação antagônica ao ácido giberélico (WAREING, 1983). Em Ipomoea batatas a aplicação desta substância não foi efetiva na tuberização (Mc DAVID e ALAMU, 1980).

As citocininas são necessárias para a tuberização em

batata, e estariam envolvidas neste processo devido à necessidade de divisão celular ativa (WAREING, 1983). Em cultura "in vitro" de Dioscorea bulbifera a cinetina estimula a formação de tubérculos (UDEBO, 1971). Em D. composita o efeito promotor do 6-BA não foi evidente.

As dificuldades para a separação de misturas de sapogeninas devido à alta quantidade de isômeros levaram ao desenvolvimento de vários sistemas de cromatografia sobre camada delgada. Isto porque os outros métodos cromatográficos, como cromatografia de papel ou cromatografia gasosa tem se mostrado ineficiente na separação dos isômeros, além de em alguns casos serem demorados. Métodos complexos, envolvendo várias fases são necessários para a separação, por exemplo, das sapogeninas monohidroxiladas que incluem diosgenina e iamogenina (ELMUNAJJED et al., 1965).

BLUNDEN et al. (1968) utilizando destes métodos mostraram que nas folhas de D. composita não existe iamogenina e a diosgenina é o único grupo presente.

O espectro de ressonância nuclear magnética obtido para a mancha do  $R_f$  0,31, após desenvolvimento com diclorometano:metanol 98:2 (v/v) coincide com o obtido para diosgenina padrão (WILLIAMS e BHACCA, 1965). O desenvolvimento em hexano:acetato de etila 4:1 (v/v) é utilizado para separação de esteróis que possam estar misturados com as sapogeninas (BLUNDEN et al., 1968) e no caso deste trabalho sempre resultou no aparecimento de uma única mancha na placa.

Essas evidências conjuntamente com os dados de BLUNDEN et al. (1968), permitem deduzir que o desenvolvimento em di-

clorometano:metanol 98:2 (v/v), no caso de D. composita separa a diosgenina, o que torna o método de separação mais simples e rápido.

O nível de diosgenina nas folhas de D. composita aproxima-se ao de 0,28% do peso seco obtido por BLUNDEN et al. (1968).

As variações verificadas em torno deste valor podem estar relacionadas com os diferentes métodos aplicados para dosagem ou com as condições climáticas em que cresceram as plantas. Apesar do nível de diosgenina nas folhas ser bem menor do que o do tubérculo, de 3 a 12% do peso seco, ainda se compara à quantidade de outras sapogeninas encontradas em algumas espécies de Yucca, Agave, (MARKER et al., 1943b) ou de diosgenina em sementes de Trigonella foenum-graecum (NOWAK et al., 1980) de 0,2 a 0,7%. Esta última espécie vem sendo utilizada atualmente como fonte de diosgenina (AMMIRATO, 1984). Deste modo a parte aérea de Dioscorea composita também poderia ser fonte desta matéria prima, durante o período em que o tubérculo ainda não atingiu o tamanho ideal para a colheita.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivos, investigar o crescimento inicial, germinação, enraizamento e o nível de diosgenina na parte aérea de plantas de D. composita.

O crescimento inicial é lento. O desenvolvimento da parte aérea é afetado pelo crescimento do tubérculo nos primeiros 3 meses. A partir de então, aumentam as taxas de aparecimento, crescimento e os tamanhos máximos alcançados pelas folhas, assim como o acúmulo de matéria seca na parte aérea.

As sementes de D. composita reagem ao sal de tetrázólio depois de 6-8 dias de embebição. Há necessidade de um período de pós amadurecimento de aproximadamente 5 meses para que taxas máximas de germinação sejam obtidas no menor tempo. O período de pós amadurecimento modifica a necessidade de luz e as sementes passam a ser indiferentes 11 meses após a colheita. As sementes germinam nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C. As temperaturas que promovem a germinação variam de acordo com o período de armazenamento, mas a de 25°C, em todos os casos, parece ser a mais adequada. Os regimes de temperaturas alternadas de 5-25, 10-25, 15-25, 20-25, 30-25 e 35-25°C possibilitam a germinação, sendo que o de 20-25°C é o mais apropriado. Há interação entre luz e temperaturas de 20, 25 e 15-25°C. Períodos curtos de choques de temperatura de 4°C e 35°C não modificaram o padrão de germinação, assim como os reguladores de crescimento. O ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA) inibe o processo. O armazenamento de sementes com 11-13% de umidade em geladeira

reduz a viabilidade e a melhor condição é em temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ).

O enraizamento de estacas é promovido pelo ácido indolil-3-butírico (IBA) a  $10 \text{ mg.g}^{-1}$ . A 6-benziladenina (6-BA) retarda a senescência das estacas, mas interfere com o processo de enraizamento, devendo ser aplicada duas semanas após o início do experimento. A redução da área foliar das estacas não afeta o potencial de enraizamento. A integridade da região do pulvino é necessária para o processo porque este abriga a gema e o tecido sensível ao IBA. As estacas da região média do caule apresentam maior potencial de enraizamento. A presença das gemas florais maiores que  $1,5 \text{ cm}$  inibe a formação de raízes. As estacas com caules de  $0,5 \text{ cm}$  de diâmetro apresentam baixo potencial de enraizamento sendo recomendadas estacas com caules mais finos.

O ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) e o ácido indolilacético (IAA) inibem a tuberização de estacas enraizadas, enquanto que o cloreto de 2-cloroetiltrimetilamônio (CCC) parece promovê-la.

A diosgenina das folhas de D. composita pode ser separada por cromatografia sobre camada delgada, através de desenvolvimento em diclorometano : metanol 98:2 (v/v). O nível desta substância nas folhas varia de  $2-4 \mu\text{g. mg de peso seco}^{-1}$  e parece independe da estação do ano. A parte aérea da planta poderia ser utilizada anualmente para obtenção diosgenina diminuindo os gastos com o tutoramento.

## V - LITERATURA CITADA

- ABELES, F. B. 1973. Ethylene in Plant Biology. Academic Press, London.
- AMMIRATO, P. V. 1984. Yams. In: Ammirato, P. V., Evans, D. A., Sharp, W. R. e Yamada, Y. (eds). Handbook of Plant Cell Culture, vol. 3, Crop Species. Macmillan, New York, p. 327-354.
- ANÔNIMO. 1976. Regras para Análise de Sementes. Ministério da Agricultura. DNPV, Brasília, 188p.
- ANÔNIMO. 1981. Finalmente hay investigation sobre el ñame. Ceres 14 : 6-7.
- AYENSU, E. S. 1972. Comments on old and new world Dioscoreas of commercial importance. Primer Simposio Internacional sobre Dioscoreas, p 77-81.
- BACHELARD, E. P. e STOWE, B. B. 1963. Rooting of cuttings of Acer rubrum L. and Eucalyptus camaldulensis Dehn. Aust. J. Biol. Sci. 16: 751-767.
- BARROSO, G. M., SILVA, J. B., SUCRE, D., GUIMARÃES, E. F., CARVALHO, L. F., ROSENTHAL, F. R., VALENTE, M. C., BARBOSA, C. M., SILVA, J. D., ROSEIRA, A. N., BARTH, O. M. e BARBOSA, A. F. 1974. Flora da Guanabara. Família: Dioscoriaceae, Sellowia 25: 9-256.
- BERRY, J. A. e RAISON, J. K. 1981. Responses of Macrophytes to Temperature. In: Lange, O. L., Nobel, P. S. e Osmond, C.B. (eds). Encyclopedia of Plant Physiology New Series vol.12A

- Physiological Plant Ecology I. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg p. 300-338.
- BEWLEY, J. D. e BLACK, M. 1982. Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination. vol. 2. Viability, Dormancy and Environmental Control. Springer-Verlag, 375p.
- BEYER, Jr. E. M. 1976. A potent inhibitor of ethylene action in plants. Plant Physiol. 58: 268-271.
- BEYER, Jr. E. M. 1979. Effect of silver ion, carbon dioxide and oxygen in ethylene action and metabolism. Plant Physiol. 63: 169-173.
- BLUNDEN, G. C., BRIGGS, J. B. e HARDMAN, R. 1968. Steroidal constituents of the aerial parts of Dioscorea and Tamus species. Phytochemistry 7:453-458.
- BLUNDEN, G., HARDMAN, R. e TREASE, G. E. 1966. Some observations on the propagation of Dioscorea belizensis Lundell and / other steroid-yielding Yams. Planta Med. 14: 84-89.
- BLUNDEN, G., JAFFER, J. A., JEWERS, K. e GRIFFIN, W. J. 1981. Steroidal sapogenins from leaves of Cordyline species. J. nat. Prod. 44 : 441-447.
- BRIDGLALL, S. S. e VAN STADEN, J. 1985. Effect of auxin on rooting and endogenous cytokinins levels in leaf cuttings of Phaseolus vulgaris L. J. Plant Physiol. 117: 287-292.
- CABANILLAS, E. e MARTIN, F. W. 1978. The propagation of edible yams from cuttings. J. Agric. Univ. Puerto Rico, 62: 249-254.
- CARDOSO, V. 1982. Luz e substâncias de crescimento na germinação de Cucumis ancuria L. Tese de Mestrado, UNICAMP, 125pp.

- CONN, E. E. e STUMPF, P.K. 1976. Outlines of Biochemistry  
John Willey and Sons, New York, 629 pp.
- COURSEY, D. G. 1967. Yams. An account of the nature, origins, cultivation and utilization of the useful members of Dioscoreaceae. Longmans, London. 230pp.
- CRUZADO, H. J., DELPIN, H. e ROARK, B. 1964a. Effects of various vine supports and spacing distances on steroid production of Dioscorea composita. Trop. Agric. 41: 345-349.
- CRUZADO, H. J., CABANILLAS, E., MARTIN, F. W. e DELPIN, H. 1964b. Seed-rest and seed-viability in medicinal Dioscorea species. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 84: 436-440.
- DALE, J. E. 1982. The growth of leaves. E. Arnold, London.
- DELOUCHE, J. C., STILL, T. W., RASPET, M. e LIENHARD, M. 1962. The tetrazolium test for seed viability. Technical Bulletins 51, State College, Mississippi, 53pp.
- DÓSTAL, R. 1967. On integration in plants. Harvard Univ. Press Massachussets.
- EHMANN, A. 1977. The Van-Urk-Salkowski reagent-a sensitive and specific reagent for silicagel thin layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. J. Chromatogr. 132: 267-276.
- ESAU, K. 1965. Plant Anatomy (2n edn). John Willey and sons, New York.
- ELMUNAJJED, D. T., FAYES, M.B.E. e RADWAN, A.S. 1965. Steroid sapogenins IX. Thin Layer chromatography. Phytochemistry 4: 587-592.
- EPSTEIN, E. e LAVEE, S. 1984. Conversion of Indole-3-butyric acid to Indole-3-acetic acid by cuttings of grapevine (Vitis vinifera) and olive (Oliva europea). Plant & cell Physiol. 25(5): 697-703.



- FABIJAN, D., TAYLOR, J.S. e REID, D.M. 1981a. Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (Helianthus annuus) Seedlings. II. Action of gibberelins, cytokinins, auxins and ethylene. Physiol. Plant. 53: 589-597.
- FABIJAN, D., YEUNG, E., MUKHERJEE, I. e REID, D. M. 1981b. Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (Helianthus annuus) seedlings. I. Correlative influences and developmental sequence. Physiol. Plant. 53: 578-588.
- FACHINELLO, J.C., KERSTEN, E. e MACHADO, A.A. 1982. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas lenhosas do pessegueiro. Pesq. Agropec. Bras. 17 : 247-252.
- FELIPPE, G. M. 1978. Effects of temperature on germination of Rumex obtusifolius. Rev. do Museu Paulista 25: 173-181.
- FELIPPE, G. M., GHERARDI, E., PENTEADO, L. B. K., ANNES, V. C. S. e SENE, C. M. 1970. Detecção de giberelinas durante a germinação de Rumex obtusifolius L. Arq. Inst. Biol., 37: 177-187.
- FRANKLAND, B. e TAYLORSON, R. 1983. Light control of seed germination. In: Shropshire, W. e Mohr, H. (eds). Encyclopedia of Plant Physiology New Series vol 16A. Photomorphogenesis. Springer-Verlag- Berlin Heidelberg. p. 428-449.
- GIAQUINTA, R. 1978. Source and sink leaf metabolism in relation to phloem translocation. Plant Physiol. 61: 380-385.
- GIAQUINTA, R. 1983. Phloem loading of sucrose. Ann. Rev. Plant Physiol. 34: 347-387.
- GORTER, C. J. 1968. Hormone translocation and rooting. In: Vardar, Y. (ed). The Transport of Plant Hormones, North-Holland, Amsterdam, pp. 293-308.

- HENDRICKS, S. B. e TAYLORSON, R. B. 1976. Variation in germination and aminoacid leakage of seeds with temperature released to membrane phase change. Plant Physiol. 58: 7-11.
- HOPKINSON, J. M. 1964. Studies on the expansion of leaf surface IV. The carbon and phosphorus economy of leaf. J. Exp. Bot. 15: 125-137.
- HOZYU, Y. 1970. Growth and development of tuberous root in sweet potato. Proc. 2nd. Inter. Symp. on Tropical Root and Tuber. Crops pp. 22-23
- INCOLL, L. D. e NEALES, T. T. 1970. The stem as a temporary sink before tuberization in Helianthus tuberosus L. J. Exp. Bot. 21: 469-476.
- JANSEN, D. H. 1980. Ecologia Vegetal nos Trópicos. EDUSP. São Paulo, 79pp.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant Microtechnique. Mc Graw Hill Book /Company. New York.
- JONES, R. L. e STODDART, J. L. 1977. Gibberelins and Seed Germination. In: Khan A. A. (ed). The Physiology and Biochemistry of seed Dormancy and Germination. Elsevier/North-Holland, Amsterdam, pp 77-109
- KETRING, D. L. 1977. Ethylene and seed Germination. In: Khan, A. A. (ed). The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination. Elsevier/North Holland, Amsterdam p. 157-178.
- LAWTON, J.R. S. e LAWTON, J. R. 1967. The morphology of the dormant embryo and young seedlings of five species of Dioscorea from Nigeria. Proc. Linn. Soc. Lond. 178: 153-159.

- MAEDA, J.A., PEREIRA, M.F.D.A. e TERRA, M.M. 1985. Condições de armazenamento na viabilidade e dormência de sementes de videira. Bragantia, 44: 245-254.
- MARCONDES-FERREIRA, W. e FELIPPE, G. M. 1984. Effects of light and temperature on the germination of spores of Cyanthea delgadii. Rev. Brasil. Bot. 7: 53-56.
- MARKER, E. L., GOLDSMITH, D. P. J. e RUOF, C. H. 1943a. Sterols CLVII. Sapogenins LXIX. Isolation and structures of thirteen new steroidal sapogenins, new sources for known sapogenins. J. Am. Chem. Soc. 65: 1199-1209.
- MARKER, R. E., TSUKAMOTO, T. e TURNER, D. L. 1940a. Sterols. C. Diosgenin. J. Am. Chem. Soc. 62: 2525-2532.
- MARKER, R. E., TURNER, D. L. e ULSHAFFER, P. R. 1940b. Sterols CIV. Diosgenin from certain American Plants. J. Am. Chem. Soc. 62: 2542-2543.
- MARKER, R. E., WAGNER, R. B., GOLDSMITH H., ULSHAFFER, D. P. e RUOF, C. H. 1943b. Sterols. CLV. Sapogenins LXVII. Pennogenin, Nologenin and fesogenin, three new sapogenins from Beth root. J. Am. Chem. Soc. 65: 1248-1249.
- MARKER, R. E., WAGNER, R. B., ULSHAFFER P. R., WITTBECKER, E.L. GOLDSMITH, D. P. J. e RUOF, C. H. 1947. Steroidal sapogenins. J. Am. Chem. Soc. 69: 2167-2230.
- MARTIN, F. W. 1969. The species of Dioscorea containing sapogenin. Economic Botany 23: 373-379.
- MARTIN, F. W. 1972. Potencialidades para mejorar os ñames que contienen sapogeninas. Primer Simposio Internacional sobre Dioscoreas p. 90-110.
- MARTIN, F. W. e DELPIN, H. 1969. Techniques and problems in the propagation of sapogenin-bearing yams from cuttings.

- J. Agr. Univ. Puerto Rico, 53: 191-198.
- MARTIN, F. e GASKINS, M. H. 1968. Cultivation of sapogenin-bearing Dioscorea species. Production research Report 103, Agr. Rec. Service, U. S., Dept. of Agriculture, 19pp.
- MARTIN, F. W., CABANILLAS, E. e GASKINS, M. H. 1966. Economics of the sapogenin-bearing yam as a crop plant in Puerto Rico. J. Agric. Univ. Puerto Rico 50: 53-64.
- MATUDA, E. 1954. Las Dioscoreas de Mexico. Ann. do Inst. Biol. 24: 1-390.
- MAYER, A. M. e POLJAKOFF-MAYBER, A. 1982. The Germination of Seeds (3rd ed.). Pergamon Press.
- Mc DAVID, C. R. e ALAMU, S. 1980. The effect of growth regulators on tuber initiation and growth in rooted leaves of two sweet potato cultivars. Ann. Bot. 45: 363-364.
- METIVIER, J. R. e DALE, J. E. 1977. The effects of grain nitrogen and applied nitrate on growth, photosynthesis and protein content of the first leaf of barley cultivars. Ann. Bot. 41: 1287-1296.
- METIVIER, J. R. e VIANA, A. M. 1979. The effect of long and short day length upon the growth of whole plants and the level of soluble proteins, sugars and stevioside in leaves of Stevia rebaudiana Bert. J. Exp. Bot. 30: 1211-1222.
- MILTHORPE, F. L. 1963. Some aspects of plant growth, an introductory survey. In: Ivins, J. D. e Milthorpe, F. L. (eds). The Growth of the Potato Butterworths, London, p. 3-16.
- MITCHELL, J. W. e LIVINGSTON, G. A. 1968. Methods of studying plant hormones and growth-regulating substances. Agriculture

- Handbook U.S. Dept. of Agriculture, nº 336, 139pp.
- MORS, W. B. e SHARAPIN, N. 1973. A obtenção de esteróides do sisal. Rev. Brasil Tec. 4: 153-165.
- NANDA, K. K. e ANAND, V. K. 1970. Auxin effects on rooting. Physiol. Plant. 23: 99-107.
- NANDA, K. K., JAIN, M. K. e MALTROTA, S. 1971. Effects of glucose and auxins in rooting etiolated stem segments of Populus nigra. Physiol. Plant. 24: 387-391.
- NORONHA, A., VICENTE, M. e FELIPPE, G. M. 1976. Effect of storage and growth conditions on photoblasticity of seed of Cucumis anguria. Hoehnea 6: 7-10.
- NOWAK, A., KRAHEWSKA, A. e DEDIO, I. 1980. Metoda ilôsciowego oznaczana diosgeniny w surowcach rôslinnych. Herba Polonica 26: 39-45.
- OKAGAMI, N. e KAWAI, M. 1982. Dormancy in Dioscorea: differences of temperature responses in seed germination among six japonese species. Bot. Mag. Tokyo 95: 155-166.
- PAL, A. e SHARMA, A. R. 1980. Analysis of cytotypes of Dioscorea and scope of increasing the diosgenin content. La Cellule 73 : 117-134.
- PEREIRA, M. F. A. e MAEDA, J. A. 1981. Germinação em sementes de uva: efeito de luz e temperatura. Primeiro Congresso de SBSP. Resumo de trabalhos técnicos, p.20.
- PEREIRA, M. F. A. e VÁLIO, I. F. M. 1984. Gibberellic acid and the inhibition of aerial tuberisation in Solanum tuberosum L. Plant Growth Reg. 2: 41-47.
- PERI, C. S. e BERRY, J. A. 1980. Membrane phospholipid phase

- separations in plants adapted to or acclimated to different thermal regimes. Plant Physiol. 66: 238-241.
- PRESTON, W. H. Jr. e HAUN, J. R. 1962. Factors involved in the vegetative propagation of Dioscorea spiculiflora Hemsl. from vines. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci. 80: 417-429.
- RANDI, A. M. 1980. Germinação de Stevia rebaudiana Bert. Tese de mestrado, UNICAMP, 88p .
- RIZZINI, C. T. e MORS, W. B. 1976. Botânica Econômica Brasileira. EPU-EDUSP, São Paulo, 207 pp.
- RIZZINI, C. T. 1973. Dormancy in seeds of Anona crassiflora. Mart. J. Exp. Bot. 24: 117-123.
- SADIK, S. e OKEREKE, O. U. 1975. Flowering, pollen grain germination and seedling development of white yam Dioscorea rotundata Poir. Ann. Bot. 39: 597-604.
- SALEH, A. N. e HEMBERG, T. 1980. The influence of kinetin on the endogenous content of indoleacetic acid in swelling seeds of Phaseolus, Zea and Pinus and young plants of Phaseolus. Physiol. Plant. 50: 99-102.
- SCHUBERT, B. C. 1972. Aspects of taxonomy in the genus Dioscorea. Primer Simposio Internacional sobre Dioscoreas, p1-42.
- SHARMA, O. P. 1974. Anatomy, origin and development of tuber of Dioscorea glabra. Phytomorphology 24: 297-305.
- SHARMA, O. P. 1976. Anatomy, origin and development of the rhizome of Dioscorea deltoidea Wallich. Proc. Indian Acad. Sci. 84: 50-55.
- SHARMA, O. P. 1980. Ontogeny and morphology of the tuber of Dioscorea floribunda Mart. et Gal. Proc. Indian Acad. Sci.

- (Pl. Sci.) 89: 47-55.
- SIHACHAKR, D., ROSSIGNOL, L., ROSSIGNOL, M. e NOZERAM, R.  
1982a. Rôle de différents territoires foliaires dans le phénomène de la tubérisation chez la patata douce. Can. J. Bot. 60: 2659-2664.
- SIHACHAKR, D., ROSSIGNOL, L., ROSSIGNOL, M e PRIOUL, J.L.  
1982b. Analyse de la tubérisation chez la patata douce (Ipomoea batatas (L) Lam.), à partir de bouturres de feuilles. Physiol. Veg. 20: 53-71.
- SMITH, O. E. e PALMER, C. E. 1970. Cytokinin induced tuber formation on stolons of Solanum tuberosum. Physiol. Plant. 23: 599-606.
- SMITH, D. R. e THORPE, T. A. 1975. Root initiation in cuttings of Pinus radiata seedlings. J. Exp. Bot. 26 : 193-202.
- SNEDECOR, G. H. e COCHRAN, W. G. 1967. Statistical methods. / The Iowa State University Press, AMES, Iowa.
- THAINE, R., OVEDEN, S. L. e TURNER, I. S. 1959. Translocation of labelled assimilates in the soybean. Aust. J. Biol. Sci. 12: 349-372.
- THOMAS, T. H. 1977. Cytokinins, Cytokinin-active compounds and seed Germination. In: Khan A. A. (ed). The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination. Elsevier/ North Holland, Amsterdam, p. 111-143.
- TOOLE, U. K. 1973. Effects of light, temperature and their interactions on germination of seeds. Seed. Sci. Technol. 1: 389-396.
- UDEBO, A. E. 1971. Effect of external supply of growth subs-

- tances on axillary poliferation and development in Dioscorea bulbifera. Ann. Bot. 35: 159-163.
- USBERTI, R. e FELIPPE, G. M. 1980. Viabilidade de sementes de Citrus limonia Osb. com baixo teor de umidade, armazenadas em diferentes temperaturas. Pesq. Agropec. Bras. 15 : 393-397.
- VAN STADEN, J. e WAREING, P. F. 1972. The effect of light on endogenous cytokinin levels in seeds of Rumex obtusifolius. Planta 104: 126-133.
- VARANDA, E. M. 1984. Especies of Yucca L., cultivadas no Brasil como fontes de sapogeninas esteroidais. Rev. Brasil. Bot. 7: 37-39.
- VIDAVER, W. 1977. Light and Seed Germination. In: Khan, A. A. (ed). The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination. Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp 181-191.
- VILLIERS, T. A. 1975. Dormancy and the survival of plants. Studies in Biology nº 57. Camelot Press Ltd., Southampton, 67pp.
- VINCE-PRUE, D. 1975. Photoperiodism in Plants. McGraw Hill, UK.
- WAREING, P. F. 1983. Hormonal Control of Stolon and Tuber Development, Especially in the Potato Plant. In: Meudt, W. J. (ed). Beltsville Symposia in Agricultural Research vol.6. Strategies of Plant Reproduction. Granada Publishing, London, pp.181-195.
- WEAVER, R. J. 1972. Plant Growth Substances in Agriculture. W. H. Freeman and Co., San Francisco.
- WIGHTMAN, F., SCHNEIDER, E. A. e THIMAN, V. K. 1980. Hormonal



factors controlling the initiation and development of lateral roots. Physiol. Plant. 49: 304-314.

WILLIAMS, D. H. e BHACCA, N. S. 1965. Solvent effects in NMR spectroscopy. II. Solvent shifts in some steroidal sapogenins. Tetrahedron 21 : 1641-1645.

YAKUNA, T., HARADA, T., KASAI, N. e ARAKI, H. 1981. Studies on the botanical characteristics of genus *Dioscorea*. II. On the formation and germination of the seed in chinese yam (c.v. Nagaimo). J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 60 : 220-226.

YANG, F. 1985. Biosynthesis and action of ethylene. Hortscience 20 : 41-45.

ZAAG, P. V. e FOX, R. L. 1981. Field production of yams (*Dioscorea alata*) from stem cuttings. Trop. Agric. (Trinidad) 58 : 143-144.

ZEEVART, J. A. D. 1966. Reduction of the gibberelin of *Pharbitis* seeds by CCC and after-effects in the progeny. Plant Physiol. 41: 856-862.