

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE SEMENTES**



**EFEITO DA ESPERMINA NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE
ALFACE**

SANDRA MULLER GARCIA

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Dario Munt de Moraes, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Sementes.

Pelotas, 2009

SANDRA MULLER GARCIA

**EFEITO DA ESPERMINA NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE
ALFACE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Sementes.

Orientador: Dario Munt de Moraes

Pelotas, 2009

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

G216e Garcia, Sandra Muller

Efeito da espermina na qualidade fisiológica de sementes de alface / Sandra Muller Garcia. - Pelotas. , 2009.

26f. : il.

Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2009, Dario Munt de Moraes; Orientador.

1.Reguladores de crescimento. 2 Qualidade fisiológica 3. Vigor 4. Sementes 5. Alface I. Titulo II. Moraes, Dario Munt de

CDD 635.52

Banca examinadora:

Prof. Dr. Dario Munt de Moraes (Orientador).

Prof. Dr. Luis Osmar Braga Schuch

Profa. Dra. Maria Ângela André Tillmann

Profa. Dra. Luciana Bicca Dode

*À minha querida mãe: Romilda Müller Garcia e a
minha família, razão da minha vida, por aceitarem as
minhas ausências, compreenderem os meus
momentos de dificuldades e, mesmo assim,
continuarem demonstrando seu amor diariamente.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente.

Ao Professor Dario Munt de Moraes pela oportunidade, confiança e contribuição decisiva na minha formação, como orientador e amigo.

Aos Professores do Programa de Ciência e Tecnologia de Sementes pela orientação, amizade, oportunidade e ensinamentos transmitidos.

Aos meus irmãos Sandro e Débora, pelo apoio e incentivo.

A todos os colegas do PPG em Ciência e Tecnologia de Sementes pela amizade e troca de experiências.

A meu pai João Carlos, minha irmã Débora e amigo Orley Jr. pela ajuda prestada.

As grandes amigas Vanessa Neumann e Viviane Kopp da Luz pelos momentos de descontração e auxílio nos experimentos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e suporte financeiro.

RESUMO

GARCIA, SANDRA MULLER. Universidade Federal de Pelotas, março de 2009.
Efeito da espermina na qualidade fisiológica de sementes de alface. Prof.
Orientador: Dario Munt de Moraes

O objetivo desse estudo foi investigar o desempenho dos reguladores do crescimento: ácido giberélico, espermina e ácido abscísico na germinação e no crescimento inicial de plântulas de alface cv. Grand Rapids. Para isso, as sementes foram tratadas com soluções de ácido giberélico na concentração de 0,05mM; espermina na concentração de 0,05mM e ácido abscísico na concentração de 0,04mM e avaliadas por meio dos testes de germinação, primeira contagem da germinação, emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência de plântulas, comprimento de parte aérea e raiz das plântulas, massas fresca e seca total de plântulas, teste de condutividade elétrica e atividade total da enzima da α -amilase. A espermina aplicada isoladamente embora tenha aumentado a atividade da enzima α -amilase teve pouco efeito na indução da germinação de sementes de alface, sendo que reduziu de maneira geral a viabilidade e vigor das sementes de alface. No entanto, quando foi combinada com o ácido giberélico ou abscísico induziu o crescimento da parte aérea superando quando presente a ação inibitória do ácido abscísico. O ácido abscísico apresentou efeito positivo na reorganização de membranas atenuando os efeitos dos outros dois reguladores. Com base nos resultados, pode-se inferir que os fitorreguladores não afetaram a viabilidade das sementes de alface cv. Grand Rapids; e que sementes tratadas com espermina apresentaram pior desempenho no vigor, menor emergência e índice de velocidade de emergência de plântulas, maior lixiviação de íons (condutividade elétrica) e inibição do crescimento das raízes.

Palavras-chave: reguladores de crescimento, qualidade fisiológica, vigor, semente de alface.

ABSTRACT

GARCIA, SANDRA MULLER. Universidade Federal de Pelotas, march 2009. **Effect of spermine on the physiological quality of seeds of lettuce.** Adviser: Dario Munt de Moraes.

The objective of this study was to investigate the performance of growth regulators: Gibberellic acid, spermine and abscisic acid on germination and early growth of seedlings of lettuce cv. Grand Rapids. For this, experiments were conducted in greenhouse and laboratory. The seeds were treated with test solutions of gibberellic acid at a concentration of 0.5mM, spermine at a concentration of 0.05mM and abscisic acid at a concentration of 0.04mM and assessed by the tests of germination, first count of germination, emergence, index speed of emergence, length of shoot and root, fresh and dry seedling mass, electrical conductivity and activity of α -amylase. The spermine applied individually while increasing the activity of α -amylase had little effect on the induction of germination of lettuce, which generally reduced the viability and vigor lettuce. However, when combined with gibberellic acid or abscisic acid induce the growth of shoots when this overcoming the inhibitory action of abscisic acid. The abscisic acid had positive effect on the reorganization of membranes mitigating the effects of two other regulators. Based on the results, we can infer that the growth regulators did not affect the viability of lettuce seeds cv. Grand Rapids, and that seeds treated with spermine showed worse performance, lower rate of emergence and speed of emergence, high values of the electrical conductivity and inhibition of root growth.

Index terms: growth regulators, physiological quality, vigour, lettuce seeds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Índice de velocidade de emergência de plântulas em casa de vegetação (IVE) de sementes de alface cv. Grand Rapids expostas aos diferentes tratamentos com os reguladores de crescimento ácido giberélico (AG ₃), espermina (ESP) e ácido abscísico (ABA).....	17
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soluções de Reguladores de Crescimento e suas Associações. Presença do regulador de crescimento (+) e ausência (-).....	12
Tabela 2. Primeira contagem de germinação (1 ^a CG%), porcentagem de germinação (G%) e emergência de plântulas em casa de vegetação (E%) de sementes de alface cv. Grand Rapids submetidas a diferentes tratamentos com ácido giberélico (0,5mM), espermina (0,05mM) e ácido abscísico (0,04mM).....	16
Tabela 3. Comprimento da parte aérea e da raiz (mm) de plântulas provenientes de sementes de alface cv. Grand Rapids submetidas a diferentes tratamentos com ácido giberélico (0,5mM), espermina (0,05mM) e ácido abscísico (0,04mM) em condições de laboratório (final do teste de germinação) e em casa de vegetação (final do teste de emergência de plântulas).....	19
Tabela 4. Massa da matéria fresca e seca de plântulas (mg pl ⁻¹) provenientes de sementes de alface cv. Grand Rapids submetidas a diferentes tratamentos com ácido giberélico (0,5mM), espermina (0,05mM) e ácido abscísico (0,04mM) em condições de laboratório (final do teste de germinação) e em casa de vegetação (final do teste de emergência de plântulas).....	20
Tabela 5. Condutividade elétrica $\mu\text{S.cm.g}$ de sementes de alface cv. Grand Rapids submetidas a diferentes tratamentos com ácido giberélico (0,5mM), espermina (0,05mM) e ácido abscísico (0,04mM).....	21
Tabela 6. Atividade total da enzima alfa amilase para os diferentes tratamentos com ácido giberélico (AG ₃), espermina (Esp) e ácido abscísico (ABA) nos estádios de semente e 5 e 7 dias após a germinação.....	22

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	8
SUMÁRIO	9
1. INTRODUÇÃO	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5. CONCLUSÕES	23
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

INTRODUÇÃO

Os eventos fisiológicos de crescimento e desenvolvimento que ocorrem nos vegetais representam um processo integrado, complexo e pouco conhecido, havendo, entretanto, uma estreita relação desses eventos com a ação de substâncias conhecidas como fitohormônios.

Os fitohormônios são definidos como compostos orgânicos endógenos que em baixas concentrações causam respostas fisiológicas nas plantas. Alguns fitohormônios são produzidos em um tecido e transportados para outro tecido, onde eles produzem respostas fisiológicas específicas, enquanto outros atuam dentro do mesmo tecido onde são produzidos. Os fitohormônios são também chamados de substâncias reguladoras do crescimento, alguns agindo no processo inibitório, outros estimulando (ARTECA, 1996).

Dentre os fitohormônios clássicos estão às auxinas, citocininas, etileno, ácido abscísico e giberelinas. Mais recentemente, alguns outros compostos que podem afetar o crescimento e o desenvolvimento vegetal têm sido descritos. São eles os brassinoesteróides, as poliaminas, os jasmonatos e o ácido salicílico (COLLI, 2004).

Entre os prováveis novos reguladores de crescimento encontram-se as poliaminas (putrescina, espermina e espermidina) envolvidas em processos celulares e sub celulares, sendo importantes moduladores de processos biológicos como na divisão celular, em respostas ao estresse e do desenvolvimento (KOETJE et al., 1993).

As poliaminas biogênicas putrescina ($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$), espermidina ($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$) e espermina ($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$), estão presentes em bactérias, plantas e tecidos animais, onde exercem importantes funções biológicas, sendo essenciais nos processos de crescimento e diferenciação de células eucariotas. As poliaminas putrescina, espermidina e espermina estão presentes em inúmeras etapas do crescimento e diferenciação das plantas, no processo de germinação, divisão celular, diferenciação das folhas, flores e raízes, bem como, na senescência de órgãos (GALSTON & KAUR-SAWHNEY, 1995).

O papel das poliaminas no metabolismo celular das plantas ainda não está bem definido, embora seu significado em processos bioquímicos, tais como síntese de proteínas, degradação de RNA (POPOVIC et al., 1979), replicação do DNA e

morfogênese (TABOR & TABOR, 1976 E BACHRACH, 1973), já tenha sido reconhecidos.

As poliaminas podem interagir com membranas celulares, eliminar radicais livres e alterar a expressão gênica (MATILLA, 1996). O conteúdo e a concentração de poliaminas, em sementes maduras, variam de acordo com a espécie, havendo uma distribuição entre os órgãos de reserva (cotilédones e endosperma) e eixo embrionário. Evidências indicam que o conteúdo de poliaminas aumenta durante os estágios iniciais da germinação (MATILLA, 1996). Em sementes de maçã (*Malus doméstica* L.) a putrescina e espermidina aplicadas exogenamente estimularam a germinação, enquanto que a espermina inibiu o processo favorecendo a manutenção da dormência, provavelmente por diminuir a produção endógena de etileno (SINSKA & LEWANDOSKA, 1991).

O Acúmulo de poliaminas tem sido observado em várias situações de estresse, tais como estresse ácido, estresse osmótico e estresse térmico. O aumento da concentração de putrescina, como consequência do estresse salino, é uma resposta bastante generalizada em plantas (SHEVYAKOVA et al., 1985; BASU E GOSH, 1991). Por outro lado, a tolerância ao estresse salino parece estar associada não apenas à capacidade de acumular putrescina, mas em manter ativo o metabolismo das demais poliaminas, incluindo-se aí a síntese de espermina e espermidina (TATTINI et al., 1993; WILLADINO et al., 1996).

A relação das poliaminas com outros reguladores de crescimento ainda não são completamente conhecidas, embora estudos conduzidos relacionando poliaminas e outros reguladores tenham mostrado correlação entre o aumento do conteúdo destas com o aumento dos outros fitohormônios (GEMICI et. al., 2006). Assim sendo, o presente trabalho teve por objetivo investigar o efeito da poliamina espermina e sua relação com os reguladores do crescimento ácido giberélico e abscísico sobre a qualidade fisiológica da semente e crescimento das plântulas de alface cv. Grand Rapids.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Análises de sementes da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, no Laboratório do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia e em Casa de Vegetação do Departamento de Solos, da Universidade Federal de Pelotas. Sementes de alface da cv. Grand Rapids com 97% de germinação, foram submetidas a soluções de ácido giberélico (AG_3), espermina (Esp) e ácido abscísico (ABA) nas concentrações de 0,5mM; 0,05mM e 0,04mM respectivamente conforme (Tabela 1). As concentrações dos reguladores do crescimento ácido giberélico e ácido abscísico foram baseadas em estudos realizados por Khan (1971) e a da espermina em estudos preliminares.

Tabela 1- Soluções de Reguladores de Crescimento e suas Associações. Presença do regulador do crescimento (+) e ausência (-).

Tratamentos	Reguladores do Crescimento		
	AG_3	Esp	ABA
	(0,5mM)	(0,05mM)	(0,04mM)
Controle	-	-	-
AG_3 + Esp + ABA	+	+	+
AG_3 +Esp	+	+	-
AG_3 + ABA	+	-	+
AG_3	+	-	-
ABA	-	-	+
Esp	-	+	-
Esp + ABA	-	+	+

Para a avaliação do efeito da espermina isolada ou em associação com o ácido giberélico e ácido abscísico sobre a qualidade fisiológica das sementes de alface foram utilizados os seguintes testes:

- **Teste de germinação (TG)** - Foram semeadas 50 sementes em cada gerbox totalizando 200 sementes por repetição, sendo utilizado como substrato papel mata borrão previamente umedecido com 15mL de cada solução teste e no

caso dos tratamentos com ausência do regulador do crescimento foi utilizado água destilada. Após a semeadura os gerbox foram colocados em câmara BOD na temperatura de 20°C. Foram realizadas duas contagens, aos quatro dias e sete dias após a semeadura. Os resultados foram expressos em porcentagem de germinação.

- **Primeira contagem de germinação** - foi realizada em conjunto com o teste de germinação, seguindo às especificações e recomendações contidas nas Regras para Análise de sementes (Brasil, 1992). Foi verificada a porcentagem de plântulas normais na primeira contagem do teste de germinação aos quatro dias após a semeadura. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

- **Emergência de plântulas em casa-de-vegetação** – Foram utilizadas 4800 sementes divididas em três repetições de 200 sementes, previamente embebidas nas soluções teste, por uma hora. As sementes foram semeadas em bandejas, em casa de vegetação, sendo utilizado substrato plantmax. Vinte e um dias após a semeadura foram observados e anotados o número de plântulas emergidas, obtendo-se a porcentagem de emergência de plântulas.

- **Índice de velocidade de emergência** – Foi utilizado a mesma instalação do teste de emergência das plântulas. A partir da emergência da primeira plântula, foram feitas observações diárias, contando-se o número de plântulas em cada linha, até que este permanecesse constante.

- **Comprimento da parte aérea e do sistema radicular das plântulas** – quarenta plântulas normais retiradas de cada repetição estatística do teste de germinação (7dias) e teste de emergência de plântulas em casa-de-vegetação (21 dias), foram retiradas do substrato e medidas à parte aérea e raiz das plântulas com o auxílio de uma régua, e os resultados expressos em milímetros (mm).

- **Massa da matéria fresca e seca total das plântulas** - quarenta plântulas normais foram retiradas de cada repetição estatística do teste de germinação (7dias) e emergência de plântulas em casa-de-vegetação (21 dias), realizando-se a pesagem delas para obter a biomassa fresca. A seguir, foram colocadas em sacos

de papel separados por repetição, por tratamento posto para secar em estufa 70°C durante 24hs. Após esse período as amostras foram retiradas da estufa e colocadas para esfriar em dessecador, pesadas em balança e determinando a massa da matéria seca (mg plantula^{-1}).

- **Condutividade elétrica (CE)** - Foram feitas três repetições de quatro subamostras de 50 sementes, por tratamento. Cada subamostra foi pesada e colocada por uma hora nos tratamentos com ácido abscísico, ácido giberélico e espermina, após esse período as sementes foram enxaguadas em água destilada e colocadas para embeber em um recipiente contendo 25mL de água deionizada, sendo mantidas em um ambiente à temperatura de 20°C. Foram realizadas as leituras da condutividade elétrica na solução as duas, quatro e seis horas após a embebição em água deionizada e os resultados foram em $\mu\text{S.cm.g}$ de sementes.

- **Atividade total da enzima α -amilase** - Para a determinação da atividade enzimática as extrações foram feitas nos tempos zero (semente); aos quatro dias e aos sete dias após semeadura. Foram utilizadas quatro repetições de 0,5g de sementes (tempo zero) e quatro repetições de 0,5g de plântulas (aos cinco e sete dias). As sementes foram tratadas com os hormônios por uma hora e as plântulas foram obtidas de um substrato umedecido com as soluções. Após a obtenção das amostras estas foram maceradas em gral com 20mL de tampão acetato de potássio com pH 7,0, e a mistura centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em tubos de ensaio. Para a determinação da atividade da α -amilase o extrato obtido foi colocado em banho-maria à 70°C por 20 minutos. Após foram retirados quatro alíquotas de 0,5mL e colocados em tubos de ensaio juntamente com 0,5mL de tampão acetato de potássio, 1,0mL de solução de amido e incubado por cinco minutos à 30°C. Passado esse tempo foi adicionado 1,0mL de solução de $\text{Ia} + \text{KI}$ e 9,0mL de água destilada. As leituras serão realizadas em espectrofotômetro E - 225D a 620nm (AOA, 1983). Os dados das leituras foram transformados pela seguinte fórmula:

$$\text{A.T.} = \left[\frac{(\text{substrato a } 620\text{nm} - \text{leitura } 620 \text{ nm})}{5 \cdot x} \right] \cdot \left(\frac{20}{0,5 \cdot 0,5\text{g}} \right), \text{ onde } x = 1\mu\text{g de amido.}$$
 Os valores foram expressos em $\mu\text{g de amido hidrolizado min}^{-1} \text{ g de sem.}^{-1}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da primeira contagem da germinação (PCG%) e porcentagem de germinação (TG%) das sementes de alface cv. Grand Rapids (Tabela 2) expostas aos diferentes tratamentos com os reguladores do crescimento espermina (Esp), ácido giberélico (AG₃) e ácido abscísico (ABA), observa-se que de todas as combinações a única que diferiu estatisticamente foi à com ABA isoladamente, o qual induziu decréscimo na primeira contagem da germinação em comparação ao controle. Para a germinação a associação entre espermina, ácido giberélico e ácido abscísico não ocasionaram alterações na germinação das sementes de alface cv. Grand Rapids quando comparadas à aplicação isolada destas substâncias e ao controle. Os resultados obtidos para a porcentagem de germinação discordam com os encontrados por Sinska & Lewandoska (1991) que constataram que a aplicação de espermina inibiu o processo de germinação das sementes de maçã (*Malus domestica*). Em outro trabalho, a aplicação de espermina diminuiu a inibição da germinação de sementes de *Lotus japonicus* provocada pela adição de glicose, e estimulou a germinação das sementes na sua ausência (ZHAO et. al., 2009).

Os resultados médios do índice de velocidade de emergência das plântulas normais evidenciaram que os menores índices foram obtidos com as sementes tratadas com espermina (Figura 1). Para a emergência final das plântulas em casa de vegetação o tratamento com espermina também foi inferior aos demais tratamentos (Tabela 2). No entanto, em trabalho desenvolvido por Gemici et. al., (2006), a aplicação do precursor das poliaminas diminuiu o tempo de germinação estimulando o processo em sementes de *Capsicum annuum* L.

Em vários estudos o ABA demonstrou possuir papel preventivo na germinação precoce de sementes, sendo que, altos níveis de ABA aumentam a sensibilidade da semente diminuindo o potencial hídrico e conseqüentemente reduzindo a capacidade de germinação (ARTECA, 1996). Em trabalho desenvolvido por Garcarrubio et al. (1997), a adição de ABA em sementes não-dormentes de *Arabidopsis* inibiu a germinação. Estes autores sugeriram que essas sementes não germinaram devido ao ABA impedir a degradação de proteínas de reserva nas sementes, restringindo assim, a disponibilidade de energia e metabólitos. Em sementes de alfafa a aplicação de ABA retardou a germinação das sementes, porém não impediu a ocorrência do processo (CARNEIRO et al., 2001).

A emergência das plântulas em casa de vegetação (E%), mostrou uma tendência a decrescer para todos os tratamentos, exceto para o AG₃ que manteve a mesma porcentagem de emergência das plântulas que o controle (Tabela 2). Esse resultado confirma o papel das giberelinas na contribuição do processo de germinação por meio da ativação do crescimento do embrião, mobilização de reservas energéticas e enfraquecimento da camada do endosperma (TAIZ e ZEIGER, 2004). Em outro trabalho desenvolvido com sementes de alface, que foram colocadas para germinar em condições de escuro a 20°C, o ácido giberélico (AG₃) estimulou a germinação das mesmas, quando submetidas a concentrações de 25; 50; 100 e 200mgL⁻¹ (CUNHA & CASALI, 1989 apud ARAGÃO et al. 2003). O mesmo aconteceu em sementes de milho pré-embebidas em solução de 50mgL⁻¹ de ácido giberélico que levou a sua maior atividade metabólica, germinação e vigor (ARAGÃO et al., 2003).

Tabela 2. Primeira contagem de germinação (1ª CG%), porcentagem de germinação (G%) e emergência de plântulas em casa de vegetação (E%) de sementes de alface cv. Grand Rapids submetidas a diferentes tratamentos com ácido giberélico (0,5mM), espermina (0,05mM) e ácido abscísico (0,04mM).

Tratamentos	1ªCG (%)	G (%)	E (%)
Controle	97a	97a	97a
AG ₃ + Esp +ABA	93ab	94a	92ab
AG ₃ +Esp	96ab	96a	88ab
AG ₃ + ABA	94ab	96a	95ab
AG ₃	97a	97a	97a
ABA	89 b	92a	92ab
Esp	96a	97a	85 b
Esp + ABA	92ab	94a	93ab
CV	3,09	2,65	4,05

* Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade

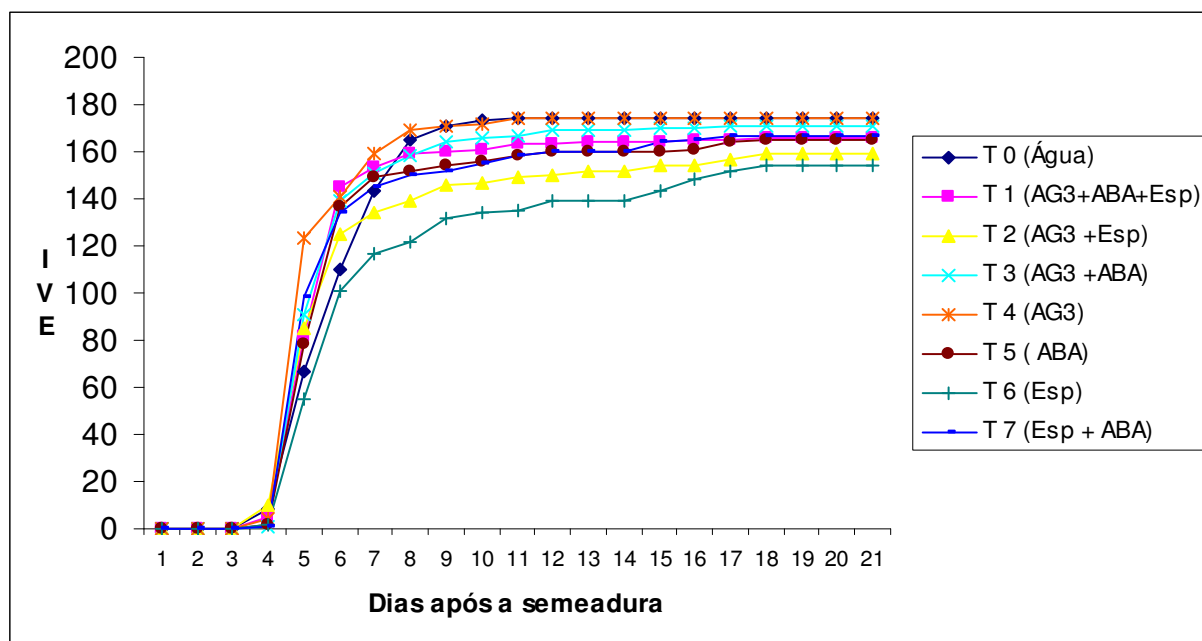


Figura 1. Índice de velocidade de emergência de plântulas em casa de vegetação (IVE) de sementes de alface cv. Grand Rapids expostas aos diferentes tratamentos com os reguladores de crescimento ácido giberélico (AG_3), espermina (Esp) e ácido abscísico (ABA).

O comprimento da parte aérea das plântulas ao final do teste de germinação (Tabela 3) foi superior as médias obtidas para o controle, quando as sementes de alface foram submetidas à aplicação de AG_3 , $AG_3 + Esp$ e $AG_3 + Esp + ABA$ (Tabela 3). A espermina não teve efeito no comprimento da parte aérea mas causou redução do comprimento do sistema radicular das plântulas em laboratório. Em casa de vegetação os comprimentos da parte aérea e das raízes não foram afetados pela presença da espermina (Tabela 3). Esses resultados estão de acordo com as observações de Salisbury e Ross (1991), que afirmaram que o ácido giberélico exerce influência no alongamento celular de caules da maioria das espécies. Já se tem conhecimento que as giberelinas promovem o crescimento pelo aumento da plasticidade da parede celular seguida pela hidrólise do amido em açúcar, reduzindo o potencial hídrico na célula, resultando na entrada de água no seu interior e promovendo o alongamento Arteca, (1996). Em trabalho desenvolvido com cultivares de alface Mimosa e Regina onde foi aplicado ácido giberélico associado ao condicionamento osmótico os resultados mostraram acréscimos no comprimento da parte aérea das plântulas (Menezes et al., 2006). Segundo Dias e Gomes (1995) o tratamento de sementes com AG_3 provocou efeitos positivos sobre a estatura de plantas para determinados cultivares de arroz.

Enquanto que o ácido abscísico é conhecido pelo seu efeito inibidor no crescimento das plantas, sendo este responsável pela dormência das gemas do caule, pelo bloqueio do crescimento das plantas no inverno e pelo fenômeno de dormência das sementes. Porém, quando aplicado junto à Esp há uma indução no crescimento, sugerindo que a Esp em combinação com outros reguladores estimula a divisão ou alongamento celular. Resultados obtidos por Gemici et al. (2006) demonstram que a aplicação do precursor das poliaminas promove o desenvolvimento de plântulas de *Capsicum annuum* L., sendo esse efeito intensificado quando aplicado juntamente com a cinetina e NAA (Ácido naftaleno-acético).

Mesmo sendo comprovado o efeito indutor do AG₃ no processo de alongamento o seu uso não impediu o efeito inibitório causado pelo ABA, sendo que a combinação desses dois reguladores obteve a menor média de comprimento de plântula (13 e 35mm), ou seja, a interação do ABA + AG₃, não foi o suficiente para superar a ação do efeito inibidor do ABA, mas a associação da Esp + ABA superou a ação inibitória do ABA. Assim sendo, pode-se inferir que a aplicação isolada de espermina não tem efeito na indução do crescimento da parte aérea, mas quando aplicada com qualquer um dos outros dois reguladores utilizados (AG₃ ou ABA) ela interage estimulando o crescimento e revertendo a ação do ABA.

Segundo Taiz e Zeiger (2004) as giberelinas em geral possuem pouco efeito no crescimento do sistema radicular. Já Zeevart e Creelman (1988) discutem o efeito contraditório de ABA sobre a raiz, podendo tanto inibir quanto estimular seu crescimento. Mulkey et al. (1983) observaram que a concentração de ABA, no intervalo de 0,01 a 1mM, apresentou efeito estimulatório, de duração aproximada de 12 horas, no crescimento da raiz, seguido de um período de inibição, e, após 24 horas, de um período de estímulo. Medições de comprimento de radícula de plântulas de angico vermelho tratado com ABA mostraram comprimento médio superior ao do controle (Borges et al.,1990).

A espermina aplicada isoladamente ou em conjunto com o ABA e AG₃ reduziu o comprimento radicular. A combinação dos três reguladores foi o tratamento que obteve menor desenvolvimento radicular (14mm).

Dessa forma, concluiu-se que quando aplicada exogenamente a espermina tem efeito negativo para o crescimento radicular da cultivar Grand Rapids independente da sua combinação com outros reguladores.

Tabela 3. Comprimento da parte aérea e da raiz (mm) de plântulas provenientes de sementes de alface cv. Grand Rapids submetidas a diferentes tratamentos com ácido giberélico (0,5mM), espermina (0,05mM) e ácido abscísico (0,04mM) em condições de laboratório (final do teste de germinação) e em casa de vegetação (final do teste de emergência de plântulas).

Tratamentos	Laboratório		Casa de Vegetação	
	CPA (mm)	CR (mm)	CPA (mm)	CR (mm)
Controle	15 b	49a	40bc	85a
AG ₃ + Esp +ABA	35a	14d	44abc	73a
AG ₃ +Esp	32a	19cd	51a	83a
AG ₃ + ABA	13b	14d	35c	123a
AG ₃	35a	35b	48ab	60a
ABA	16b	32bc	40bc	78a
Esp	16b	23bcd	36c	83a
Esp + ABA	16b	19cd	47ab	71a
CV	11,46	22,54	8,6	28,12

* Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade

Para a massa da matéria fresca total das plântulas obtida ao final do teste de germinação (Tabela 4), verifica-se que a espermina não tem efeito e que apenas o tratamento com AG₃ diferiu da testemunha, sendo que os demais tratamentos não diferiram entre si e a testemunha. Esses resultados para o ácido giberélico estão de acordo com o encontrado em sementes de milho superdoce tratadas com AG₃ (100mg L⁻¹) onde foi observado aumento na massa de matéria fresca da parte aérea em relação ao controle (ARAGÃO et al., 2001). Moraes & Lopes (1998), também verificaram que a aplicação de AG₃ proporcionou aumentos de massa de matéria fresca e seca de plântulas de coentro. Já, a massa da matéria seca total não mostrou diferença estatística entre os tratamentos utilizados em laboratório (final do teste de germinação) e em casa de vegetação (final do teste de emergência) (Tabela 4).

Tabela 4. Massa da matéria fresca e seca de plântulas (mg pl^{-1}) provenientes de sementes de alface cv. Grand Rapids submetidas a diferentes tratamentos com ácido giberélico (0,5mM), espermina (0,05mM) e ácido abscísico (0,04mM) em condições de laboratório (final do teste de germinação) e em casa de vegetação (final do teste de emergência de plântulas).

Tratamentos	Laboratório		Casa de Vegetação	
	MF (mg pl^{-1})	MS (mg pl^{-1})	MF (mg pl^{-1})	MS (mg pl^{-1})
Controle	109 bc	7a	4900a	490a
AG ₃ + Esp + ABA	122b	8a	3800a	410a
AG ₃ +Esp	111 bc	7a	4300a	370a
AG ₃ + ABA	79 c	6a	4900a	410a
AG ₃	151a	8a	4600a	360a
ABA	92 bc	7a	4800a	450a
Esp	107 bc	8a	3900a	370a
Esp + ABA	116bc	6a	5200a	510a
CV	15,05	27,21	12	19,58

*Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A condutividade elétrica da solução controle e da somente com ABA, foram os únicos tratamentos em que se observaram as menores lixiviações de solutos e conseqüentemente maior velocidade de reorganização das membranas celulares (Tabela 5). A presença de Esp ou AG₃ aumentou a lixiviação de solutos. Esse resultado contradiz os encontrados por Timm et.al., (2008) em que sementes de um dos lotes de aveia preta submetidas a concentrações de 0; 50;100 e 150mgL⁻¹de AG₃ tiveram diminuição na quantidade de lixiviados com o aumento da concentração de ácido giberélico, mostrando o efeito positivo da giberelina na velocidade de reorganização das membranas celulares.

O aumento da lixiviação de solutos provocados pela Esp foi parcialmente revertido quando o ABA estava presente o que sugere que o ABA tem efeito positivo na reorganização de membranas atenuando os efeitos da Esp.

Tabela 5. Condutividade elétrica ($\mu\text{S.cm.g}$ de semente) de sementes de alface cv. Grand Rapids submetidas a diferentes tratamentos com ácido giberélico (0,5mM), espermina (0,05mM) e ácido abscísico (0,04mM).

Tratamentos	Condutividade Elétrica ($\mu\text{S.cm.g}$ de sementes)		
	2h	4h	6h
Controle	187,10 b	199,83c	206,36 b
AG ₃ + Esp +ABA	287,60 ab	305,5abc	312,83 ab
AG ₃ +Esp	365,11 a	395,83 a	400,47 a
AG ₃ + ABA	340,96 a	369,89 ab	378,5 a
AG ₃	313,46 ab	324,76abc	351,19 a
ABA	201,87 b	210,46 c	217,30 b
Esp	343,45 a	367,02 ab	381,07 a
Esp + ABA	247,45 ab	266,24 bc	275,77 ab
CV	16,49	14,85	14,79

*Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A atividade total da enzima α -amilase (Tabela 6), apresentou uma curva padrão da atividade da enzima para todos os tratamentos, ou seja, atividade menor na semente (zero dias), maior atividade após ativação do processo germinativo (quatro dias após a germinação) e posterior redução da atividade aos sete dias após a germinação. A Esp e Esp+ABA, foram os reguladores que mostraram menor indução na atividade da enzima α -amilase no tempo zero (semente), no entanto, foram os que induziram maior atividade aos quatro dias após a germinação. Todos os tratamentos nos quatro dias após a germinação tiveram médias superiores ao controle o que indica que a presença dos reguladores favoreceu a atividade da α -amilase.

Aos sete dias após a germinação não se observou grande diferença entre os diversos tratamentos (Tabela 6) sendo que somente ABA, AG₃ e AG₃+Esp diferiram estatisticamente do controle obtendo maior atividade enzimática. A α -amilase promove a conversão do amido em açúcar, que é utilizado para o crescimento do eixo embrionário (ARTECA, 1996).

Embora o tratamento com AG₃ tenha promovido maior atividade da α -amilase somente no sétimo dia após a germinação trabalhos utilizando técnicas moleculares comprovaram que as giberelinas aumentam a transcrição de genes que

codificam a α -amilase, por meio do maior teor de mRNA dessa enzima observada (HIGGINS et al., 1976 e CHANDLER et al., 1984).

O resultado obtido com o tratamento com ABA difere do encontrado por Nolan & Ho (1988) que verificaram redução na atividade de α -amilase em sementes de aveia tratadas com ABA. Ny & Bradford (1992) propuseram que baixos níveis de ABA podem apenas diminuir a atividade da enzima, enquanto que altas concentrações poderiam inibir completamente a sua atividade.

Tabela 6. Atividade total da enzima alfa amilase (μg de amido hidrolizado min^{-1} g de sem.⁻¹) para os diferentes tratamentos com ácido giberélico (AG_3), espermina (Esp) e ácido abscísico (ABA) nos estádios de semente e 4 e 7 dias após a germinação.

Tratamentos	Atividade α -amilase (μg de amido hidrolizado min^{-1} g de sem. ⁻¹).		
	Semente	4º dia	7º dia
Controle	8,39 ab	21,28 c	13,44 b
AG_3 + Esp + ABA	6,20 bc	24,32 b	13,36 b
AG_3 +Esp	6,08 bc	25,58 b	14,78 a
AG_3 + ABA	11,46 a	25,98 b	13,99 ab
AG_3	3,55 cd	23,85 b	15,07 a
ABA	4,78 cd	24,26 b	14,7 a
Esp	2,41 d	29,86 a	14,3 ab
Esp + ABA	2,08 d	28,98 a	13,98 ab
CV	21,34	3,30	3,0

*Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

CONCLUSÃO

- Os fitorreguladores não afetaram a viabilidade das sementes de alface cv. Grand Rapids;
- sementes de alface cv. Grand Rapids tratadas com espermina apresentaram pior desempenho no vigor, menor emergência e índice de velocidade de emergência de plântulas, maior lixiviação de íons (condutividade elétrica) e inibição do crescimento das raízes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOSA - ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS (Ed.) **Seed vigour testing handbook**. Contrib. n.32 to the Handbook on seed testing. 1983. 88p.
- ARAGÃO, C.A; LIMA, M.W.P; MORAIS, O.M;ONO, E.O; BOARO, C.S.F;RODRIGUES, J.D; NAKAGAWA, J; CAVARIANI, C. Fitorreguladores na germinação de sementes e no vigor de plântulas de milho super doce. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.1, p.62-67, 2001.
- ARAGÃO, C.A.; DANTAS, B.F.; ALVES, E.; CATANEO, A.C.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA,J. Atividade amilolítica e qualidade fisiológica de sementes armazenadas de milho super doce tratadas com ácido giberélico. **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.1, p.43-48, 2003.
- ARTECA, R. D. **Plant growth substances: principles and applications**. New York: Chapman e Hall, 1996. 332p.
- BACHRACH, U. Function of naturally occurring polyamines. **New York: Academic Press**, 1973.
- BASU, R. and GOSH, B. Polyamines in various rice genotypes with respect to sodium chloride salinity. **Plant Physiology**, v.82, p.575-581, 1991.
- BORGES, E E.L; NOVAIS, A.B; BORGES, R.C.G. Controle da germinação de sementes de angico vermelho (*Piptadenia peregrina*) pelo ácido abscísico. **Revista Brasileira de Sementes**, v.12, n. 2, p. 9-16, 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992, 365 p.
- CARNEIRO, L. M.T.A., RODRIGUES, T. J. D., FERRAUDO, A. S; PERECIN, D. Ácido abscísico e giberélico na germinação de sementes de alfafa (medicago sativa l.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p.177-185, 2001.
- CHANDLER, P.M.; ZWAR, J.A.; JACOBSEN, J.V.; HIGGINS, T.J.V. & INGLIS, A.S. The effect of gibberellic acid and abscisic acid on α -amilase mRNA levels in barley aleurone layers. Studies usind na α -amilase cDNA clone. **Plant Molecular Biology**, London, v.3, n.6, p.407-418, 1984.
- COLLI, S. Outros reguladores: Brassinoesteróides, Poliaminas, ácidos Jasmônico e Salicílico. In: **Fisiologia Vegetal**. SP, 2004. p.333-340.
- DIAS, A. D; GOMES, A. da S. Efeito do tratamento de sementes com ácido giberélico sobre o desempenho da cultura do arroz irrigado. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.1, n.2, p.97-102, Mai.-Ago., 1995.
- GALSTON, A. W.; KAUR-SAWHNEY, R. Polyamines as endogenous growth regulators. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 280-295, 1995.

GARCIARRUBIO, A.; LEGARIA, J.P; COVARRUBIOS, A.A. Absciscic acid inhibits germination the availability of energy and nutrients. **Planta**, Berlim, v.203, n.2. p.182-187, 1997.

GEMECI, M; ÜNAL, D; AZERI, F.N; TAN, K. Correlation between polyamines and growth regulators. **JFS, Copyright, E.U.F.F. (Turkey)**, v.29 p. 13-23, 2006.

HIGGINS, T.J.V.; ZWAR, J.A. & JACOBSEN, J.V. Gibberellic acid enhances the level of translatable mRNA for α -amilase in barley aleurone layers. **Nature**, London, v.260 p.166-169, 1976.

KHAN, A.A. Cytokinins: Permissive role in seed germination. **Science**, v.171, n.3974, p.853-859, 1971.

KOETJE, D.S.; KONONOWICZ, H.; HODGES, T.K. Polyamine metabolism associated with growth and embryogenic potencial of rice. **Journal of Plant Physiology**, v.141, p.215-220, 1993.

MATILLA, A.J. Polyamines and seed germination. **Seed Science Research**, v.6, p.81-93, 1996.

MENEZES, N.L; ESPINDOLA, M.C.G; PASQUALLI, L.L; SANTO, C.M.R; FRAZIN, S.M. Associação de tratamentos pré-germinativos em sementes de alface. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.13, n.1, p. 1-11. 2006.

MORAES, D.M; LOPES, N.F. Germinação e vigor de sementes de coentro (*Coriandrum sativum* L.) submetidas a reguladores de crescimento vegetal. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n.1, p.93-99 - 1998

MULKEY, T.J.; EVANS, M.L. & KUSMAROFF, K.M. The Kinetics of absciscic acid action on root growth and gravitropism. **Planta**, v.157, p.150-7, 1983.

NI, B.R; BRADFORD, K.J. Quantitative models characterizing seed germination responses to abscísico acid and osmoticum. **Plant physiology**, Rockville, v.98, p.1057-1068, 1992.

NOLAN, R.C. & HO, T.D. Hormonal regulation of α -amylase expression in barley aleurone layers. **Plant Physiol.**, v.88, p.588 -93, 1988.

POPOVIC, R. B.; KYLE, D. J.; COHEN, A. S.; ZALIK, S. Stabilization of thylakoid membranes by spermine during stress-induced senescence of barley leaf discs. **Plant Physiology**, v.64, p.721-726, 1979.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. Belmont: Wadsworth, 1991. 682p.

SINSKA, I.; LEWANDOWSKA, U. Polyamines and ethylene in the removal of embryonal dormancy in apple seeds. **Physiologia Plantarum**, v.81, p.59-64, 1991.

SHEVYAKOVA, N.I.; STROGONOV, B.P. and KIRYAN, G.I. Metabolism of polyamines in NaCl-resistant cell lines from *Nicotiana sylvestris*. **Plant Growth Regulation**, v.3, p.365- 369, 1985.

TABOR, C. W.; TABOR, H. 1,4 Diaminobutane (putrescina), Spermidine and Spermine. **Annual. Review of Biochemistry** n.45, p.285, 1976.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TATTINI, B.Y.; HEIMLER, D.; TRAVERSI, M.L. and PIERONI, A. Polyamine analysis in salt stressed plants of olive. **Journal of Horticultural Science**, v.68, p.613-617, 1993.

TIMM, Fabiane C; GARCIA, Sandra M; SILVA, Vanessa.N; DODE, Juliana; BERALD, Clauber M.P; MORAES, Dario M. Qualidade fisiológica de sementes de lotes de *Avena strigosa* Sch. submetidas ao ácido giberélico. In; XXVIII REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA. Abril 2008, Pelotas. Anais da: **XXVIII Reunião da comissão brasileira de pesquisa de aveia**. Pelotas – UFPEL,2008. p.311-314.

WILLADINO, L.; CAMARA, T.R; BOGET, N.; CLAPAROLS, I. and TORNE, J.M. Polyamine and free amino acid variations in NaCl-treated embryogenic maize callus from sensitive and tolerant cultivars. **Journal of Plant Physiology**, v.147, p.179-185, 1996.

ZHAO, M-G; LIU, R-J; CHEN, L; TIAN, Q-Y; AHANG, W-H. Glucose-induced inhibition of seed germination in *Lótus japonicus* is alleviated by nitric oxide and spermine. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p. 213-218, 2009.

ZEEVART, J.A.D. & CREELMAN, R.A. Metabolism and physiology of abscisic acid. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v.39, p.439-73, 1988.