

**RENATO MENDES GUIMARÃES**

**TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E CONDICIONAMENTO  
FISIOLÓGICO EM SEMENTES DE CAFEIRO (*Coffea arabica*, L.).**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2000**

**Aos meus pais, Nilson (in memoriam) e Edanéé (in memoriam), primeiras fontes das minhas motivações.**

**Aos meus irmãos Edilson, Rubens e Nilce pelo carinho e amizade**

**OFEREÇO**

A natureza da pessoa humana, com o objetivo de motivar e promover produção científica.

As Professoras Maria Laine Moreira de Carvalho, Édila Vilela de Resende Von Pinho e Vânia Dêa de Carvalho; Professores Antônio Carlos Fraga, Henk W.M. Hilhorst, José da Cruz Machado e Sebastião Carneiro Guimarães e Pesquisadores Antônio Rodrigues Vieira, João Almir Oliveira e Renato Delmondez de Castro, pelas sugestões e amizade.

Ao Professor Rubens José Guimarães, meu irmão, pelo incentivo, apoio

Aos colegas Reginaldo, Eliseu, Renatinha, Anderson, Túlio, Luciano e Leon Cesar, pela cooperação durante a execução dos trabalhos.

**À minha esposa Heloisa  
e meus filhos Nilson Cesar, Renata e Gabriel  
pelo amor, paciência e estímulo.**

A todos os colegas do curso de Pós-graduação em HPLC, especialmente a Professora Vany Ferraz pela orientação e apoio técnico, e a todos os colegas do curso de Pós-graduação em Química Analítica, especialmente a Professora Dilara, Ana Lúcia, Andréia, Maria de Fátima e Elza, pelo apoio, incentivo e convivência amiga.

**DEDICO**

## SUMÁRIO

### AGRADECIMENTOS

RESUMO.....

ABSTRACT.....

A DEUS

À Universidade Federal de Lavras - UFLA e à Fundação de Apoio a Pesquisa e Extensão – FAEPE pela oportunidade de realização do curso.

1.1 INT À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos , durante a primeira parte do curso.

2.2 De À Professora Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira pela orientação, amizade e desprendimento para emprestar sua sensibilidade relativa à natureza da pessoa humana, com o objetivo de motivar e promover produção científica

2.3.3 Às Professoras Maria Laene Moreira de Carvalho, Édila Vilela de Resende Von Pinho e Vânia Déa de Carvalho ; Professores Antônio Carlos Fraga, Henk W.M. Hilhorst, José da Cruz Machado e Sebastião Carneiro Guimarães e Pesquisadores Antônio Rodrigues Vieira, João Almir Oliveira e Renato Delmondez de Castro, pelas sugestões e amizade.

Ao Professor Rubens José Guimarães, meu irmão, pelo incentivo, apoio e amizade.

Aos colegas Reginaldo, Eliseu, Renatinha, Anderson, Túlio, Luciano e Nilson Cesar, pela cooperação durante a execução dos trabalhos.

À Professora Vany Ferraz pela colaboração nas análise com HP'LC.

A todos os colegas do setor de sementes, Amaral, Sttela, Brandão, Dinara, Ana Lúcia, Andréia, Maria de Lourdes e Elsa, pelo apoio incentivo e convivência amiga.

1. INTRODUÇÃO.....

# SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
CAPITULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERENCIAL TEORICO.....	3
2.1. Armazenamento de sementes de cafeeiro.....	3
2.2 Deterioração de sementes.....	7
2.3 Tolerância à dessecação em sementes.....	11
2.3.1 Avaliação da tolerância à dessecação durante a maturação de sementes.....	17
2.3.2 Água e tolerância à dessecação.....	22
2.3.3. Taxa de secagem – um fator vital na determinação do grau de desidratação que será tolerado.....	24
2.3.4 Dano de membrana induzido por dessecação.....	29
2.3.5. Alterações na composição química de membranas.....	32
2.3.6. Mecanismos de proteção.....	31
2.3.7. Proteção do citoplasma em células de sementes.....	46
2.3.8. Expressão gênica em relação à tolerância à dessecação.....	49
2.4. Condicionamento fisiológico de sementes.....	53
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
CAPÍTULO 2: Tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro ( <i>Coffea arabica</i> L.).....	106
RESUMO.....	106
ABSTRACT.....	107
1. INTRODUÇÃO.....	108



2.MATERIAL E METODOS.....	109
2.1 Localização do experimento.....	109
2.2 Colheita e preparo das sementes.....	109
2.3 Obtenção dos tratamentos.....	109
2.4 Determinação do grau de umidade das sementes.....	111
2.5 Teste de germinação e índice de velocidade de germinação.....	112
2.6 Teste de condutividade elétrica.....	112
2.7 Teste de emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência e $T_{50}$ .....	113
2.8 Determinação do conteúdo de açúcares.....	114
2.9 Análise eletroforética de LEA's proteínas.....	114
2.10 Análise estatística.....	113
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	116
3.1 Umidade dos frutos.....	116
3.2 Análise de variância dos dados.....	117
3.3 Teste de germinação.....	117
3.4 Índice velocidade de germinação.....	120
3.5 Condutividade elétrica.....	121
3.6 Teste de emergência de plântulas.....	123
3.1 índice de velocidade de emergência.....	125
3.8 Tempo médio para a ocorrência de 50% da germinação ( $T_{50}$ ).....	126
3.9 Análise eletroforética de LEA's proteínas.....	128
3.10 Análise cromatográfica de açúcares.....	130
4.CONCLUSÕES.....	133
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
CAPITULO 3: Condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro ( <i>Coffea arabica</i> L.) .....	139
RESUMO.....	139

ABSTRACT.....	140
1. INTRODUÇÃO.....	141
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	142
2.1 Localização do experimento.....	142
2.2. Condições iniciais das sementes.....	142
2.3. Tratamentos.....	142
2.4. Determinação do grau de umidade .....	144
2.5 Teste de germinação e índice de velocidade de germinação.....	144
2.6 Determinação do tempo para ocorrência de 50% germinação ( $T_{50}$ ) .....	145
2.7 Determinação do peso da matéria seca eixo do hipocótilo/radicula .....	145
2.8 Teste de condutividade elétrica.....	146
2.9 Determinação da atividade da enzima peroxidase.....	146
2.10 Determinação da atividade da enzima polifenoloxidase.....	147
2.11 Determinação de ácido clorogênico.....	147
2.12. Análise estatística .....	147
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	148
3.1 Observações preliminares.....	148
3.2 Grau de umidade das sementes.....	148
3.3 Porcentagem de germinação.....	151
3.4 índice de velocidade de germinação.....	154
3.5 Tempo para germinação de 50% das sementes ( $T_{50}$ ) .....	157
3.6 Peso da matéria seca do eixo hipocótilo radícula .....	159
3.7 Condutividade elétrica.....	161
4. CONCLUSÕES.....	168
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	168
ANEXOS.....	172

## RESUMO

GUIMARÃES, Renato Mendes. Tolerância à **dessecação** e condicionamento **fisiológico** em sementes **de** cafeeiro (*Coffea arabica*, L). Lavras: UFLA, 2000. 180p. (*Tese* – Doutorado em Fitotecnia)\*

Foram conduzidos dois experimentos sendo o primeiro relativo à avaliação de mecanismos de tolerância à dessecação e o segundo sobre metodologias de condicionamentos fisiológicos para recuperação de qualidade fisiológica de sementes de cafeeiro. Os ensaios foram realizados nos Laboratórios de Análise de Sementes e Técnicas Moleculares do Departamento de Agricultura da UFLA, de Cromatografia do Departamento de Química da UFMG e de Análises Bioquímicas da EPAMIG, em 1998 e 1999. Para estudar mecanismos de tolerância à dessecação, foram colhidas sementes de cafeeiro da cultivar Rubi em diferentes estádios do desenvolvimento (verde, verde cana e cereja) e avaliadas antes da secagem após secagem convencional e após secagem em ambiente com umidade controlada (higrostat). Os efeitos dos tratamentos foram testados pela germinação em rolo de papel, índice de velocidade de germinação, emergência em bandejas, índice de velocidade de emergência,  $T_{50}$ , condutividade elétrica, análises quantitativa e qualitativa de açúcares no eixo embrionário e análise eletroforética de LEA's proteínas também no *eixo* embrionário. No segundo experimento as sementes da cultivar Rubi colhidas no campo de produção da UFLA, foram armazenadas em câmara fria de maio a outubro, quando foram submetidas a condicionamentos fisiológicos sobre papel embebido ou por submersão em solução de Nitrato de Potássio ou PEG 6000 ambas com potencial hídrico de  $-1,1\text{Mpa}$  durante 8, 12, 16, 20 e 24 dias, e sobre papel ou por submersão em água por 8 dias. Sementes não condicionadas também foram testadas. As avaliações foram pelo teste de germinação,  $T_{50}$ , índice de velocidade de germinação, peso da matéria seca dos *eixos* hipocótilo/radícula, condutividade elétrica, pelo teor de ácido clorogênico e atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase. Pelos resultados pode-se concluir de uma maneira geral que as sementes de cafeeiro perdem vigor e viabilidade com a secagem, que essa redução ocorre principalmente no estágio de maturação verde e que existem mecanismos que conferem às sementes um grau intermediário de tolerância à dessecação.

---

Comitê Orientador: **Dr.**" Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira – UFLA (Orientadora), **Dr.**" Édila Vilela de Resende Von Pinho, **Dr.**" Maria Laene Moreira de Carvalho, **Dr.**" Vânia Déia de Carvalho, **Dr.**" Vany Perpetua Ferraz – UFMG.

Em relação aos métodos de condicionamento os resultados permitiram concluir que sementes de cafeeiro condicionadas em água por submersão **ou** sobre papel durante 8 dias, aumentaram a taxa e a velocidade de germinação, sobre papel propiciou os maiores incrementos na qualidade fisiológica das sementes; os solutos PEG 6000 e Nitrato de Potássio não são eficientes para o condicionamento de sementes de cafeeiro e que os parâmetros, testes condutividade elétrica, porcentagem de ácido clorogênico e atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase estão relacionados com o grau de estruturação de membranas e da qualidade fisiológica de sementes de cafeeiro.

## ABSTRACT

GUIMARÃES, Renato Mendes Desiccation tolerance and physiological Conditioning in coffee *seeds* (*Coffea arabica* L.). Lavras, UFLA, 2000. 180. (Thesis – Doctorate in Plant Science)\*.

Two experiments were conducted the first one being concerning the evaluation of desiccation tolerance mechanisms and the other on physiological conditioning methodologies for recovering physiological quality of coffee seeds. The trials were performed in the laboratories of seed analysis and molecular technic of the UFLA Department of Agriculture of chromatography of the UFMG chemistry Department and Biochemical Analyses of EPAMIG em 1998 and 1999. To study desiccation tolerance mechanisms, coffee *seeds* of the cultivar Rubi at different developmental stages (green, yellow and red) were harvested and evaluated before drying, after conventional drying in controlled humidity environmental (higrostat). The effects of the treatments were tested by germination on paper roll, germination velocity index, tray emergence, emergence velocity index,  $T_{50}$ , electric conductivity quantitative and qualitative analyses of sugars in the embryonic axis and electrophoretic analysis of LEA's protein. In the second experiment, the seeds of the cultivar Rubi harvested in the UFLA cropland were stored in cold chamber from May to October, when they were submitted to physiological conditionings on embebed paper or by soaking in potassium nitrate or PEG 6000 solution both with water potential of 1.1. Mpa for 8, 12, 16, 20 and 24 days and on paper or by soaking in water for 8 days. Non-conditioned seeds were also tested., The evaluations were done by the germination tests,  $T_{50}$ , germination velocity index, weight of the *dry mather* of the axes hypocotil/radicle, eletric condutivity, by the chlorogenic acid content and ativity of polyphenoloxidase and peroxidase enzymes. From the results, it follows that, in general, coffee seeds **lose** their vigor and viability with drying, that this reduction **occurs** chiefly at the green maturation stage and that there are mechanisms which confer to seeds na intermediate degree of desiccation toelrance as regards the conditioning methods. The **results** allowed to conclude that coffee *seeds* conditioned in water by soaking air on paper for 8 days increased both the germination rate and velocity, on paper provided the highest increase in the physiological quality of seeds; the solutes PEG 6000 and

---

\*Guidance Committee: Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira – UFLA (Major Professor), Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho, Dra. Vânia Déia de Carvalho, Dra. Vany Perpétua Ferraz – UFMG.



## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

A importância da cafeicultura no Brasil é claramente evidenciada pela contribuição para o desenvolvimento sócio-econômico das regiões onde a atividade é estabelecida. Tanto para o abastecimento do mercado interno como para a exportação, a cafeicultura se apresenta como a mais tradicional e uma das mais importantes explorações agrícolas do país. Essa posição de destaque, alavancou o interesse e a necessidade de pesquisas e difusão de tecnologias específicas, de tal maneira que o nível tecnológico das lavouras tem se desenvolvido ao longo do tempo nas regiões onde a cafeicultura se insere.

Entretanto, essa evolução tecnológica positiva, parece não ter acontecido de maneira uniforme para todas as etapas de condução da lavoura, sendo mais significativa para as práticas desenvolvidas a partir do estágio de formação das mudas. Aspectos importantes como os estudos relativos às sementes, sua produção, fisiologia, análise e conservação, não disponibilizam respostas condizentes com as demandas geradas atualmente pelo alto nível tecnológico da cultura. A literatura sobre conservação de sementes de cafeeiro, por exemplo, contém diversos trabalhos, nos quais são considerados fatores como: condições de armazenamento, embalagem e umidade da semente. *Os resultados são* controversos não sendo possível concluir sobre a melhor metodologia.

As dificuldades relativas à germinação de sementes de cafeeiro, armazenadas, limitam os ganhos em produtividade nas lavouras. A necessidade de utilização de sementes novas para a formação das mudas condicionam a implantação da lavoura em épocas impróprias. Muitas vezes, o tempo de permanência das mudas, em condições climáticas favoráveis, após o plantio, é

muito curto, o que prejudica sensivelmente o estabelecimento da cultura, por causa das condições de baixas temperaturas e/ou secas subsequentes. Uma lavoura instalada em época apropriada pode, além de reduzir a porcentagem de replantio, antecipar a primeira colheita em até um ano, antecipando o retomo ao investimento realizado com a cultura e, **por** isso, reduzindo os custos financeiros.

Um outro aspecto relevante que justifica os esforços para aumentar o período de conservação das sementes de cafeeiro, refere-se à preservação do patrimônio genético em bancos de germoplasmas de maneira econômica e segura, principalmente considerando um previsível estreitamento da base genética das culturas comerciais graças à utilização de clones, tecnologia já adotada em *Coffea canefora*.

Estudos mais aprofundados considerando os mecanismos de tolerância à dessecação e eventos em nível molecular e bioquímico, podem conduzir a resultados que auxiliem no entendimento básico relativo ao desenvolvimento e a germinação.

Um outro enfoque a ser considerado na definição de alternativas para a recuperação do desempenho de sementes de cafeeiro armazenadas é a técnica de tratamentos pré-germinativos. Neste sentido, o controle da embebição em água ou em soluções osmóticas tem-se mostrado promissor e necessita de pesquisas que considerem parâmetros fisiológicos e bioquímicos modificados pelo tratamento, de modo a produzir resultados consistentes.

Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar aspectos relacionados com tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro, durante seu desenvolvimento, e estabelecer metodologias de condicionamento fisiológico para a recuperação da sua qualidade fisiológica.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Armazenamento de sementes de cafeeiro.

A manutenção da qualidade das sementes de cafeeiro, durante o armazenamento, constitui-se numa das maiores dificuldades encontradas pelos produtores de mudas. Isso se deve ao fato de que as sementes de café, mantidas sob condições ambientais, perdem a sua viabilidade rapidamente, dificultando a sua utilização por um prazo mais prolongado. Com isso, a semeadura fica limitada a um curto espaço de tempo após a colheita, concentrando a obtenção de mudas em épocas que nem sempre são as mais adequadas para o plantio (Camargo, Groth e Razera, 1993; Dias e Barros, 1993 e Miranda et al, 1993). As sementes de café foram inicialmente classificadas por Roberts (1973) como recalcitrantes, ou seja, perdem mais rapidamente a viabilidade quando armazenadas com o grau de umidade reduzido e em ambientes com temperaturas relativamente baixas. Recentemente, Ellis, Hong e Roberts (1990) observaram que estas sementes apresentavam características tanto do comportamento ortodoxo, no qual estão incluídas a maioria das espécies, como do recalcitrante, e sugeriram a sua inclusão numa nova categoria chamada de intermediária. Hong e Ellis (1995), em trabalho mais recente, constataram variações entre espécies do gênero *Coffea* quanto ao comportamento durante o armazenamento. As sementes classificadas como intermediárias são relativamente tolerantes à dessecação na fase pós-colheita, mas não resistirão à remoção de água para níveis tão baixos quanto as sementes ortodoxas. Estas sementes, particularmente de origem tropical, podem também ser sensíveis ao frio, mesmo no estado desidratado (Ellis, Hong e Roberts, 1990; Hong e Ellis, 1995). Várias tentativas têm sido realizadas para encontrar condições que permitam prolongar a

viabilidade das sementes de café durante o armazenamento, no entanto, os resultados nem sempre são concordantes.

Estudos, citados por Camargo, Groth e Razera (1993), Dias e Barros (1993) e Miranda et al. (1993) têm evidenciado, de um modo geral, que para a conservação de sementes de café, são necessários valores relativamente altos para o teor de água nas sementes. Nesse sentido, vários métodos de conservação têm sido sugeridos na tentativa de manter as sementes com um grau de umidade superior ao do equilíbrio com o ambiente, embora os métodos de armazenamento adequados à manutenção dessa umidade sejam, muitas vezes, difíceis e onerosos, inviabilizando a sua utilização prática. Outro aspecto a ser considerado na conservação de sementes de café com altos teores de água (30-40%) é que essa condição favorece a atividade de microrganismos que contribuem para o agravamento da deterioração (Miranda e Valias, 1984).

Amorin et al. (1977) citaram que a perda do poder germinativo da semente de café é devida às alterações impostas à estrutura e na organização das membranas celulares, com conseqüente perda da permeabilidade seletiva, ocasionadas por temperaturas extremas altas ou baixas, por variação na umidade do ar e por injúrias.

Muitos trabalhos, envolvendo técnicas de armazenamento, têm sido desenvolvidos para manter a performance da germinação das sementes de café, nos quais, pelos resultados notam-se duas opiniões bem distintas: uma delas, advoga a conservação em ambientes frios e secos como exemplo podem-se citar trabalhos de Bacchi (1958) (armazenamento sob condições de temperatura ambiente e sementes com grau de umidade de 10%), Wellman e Tolle (1960) (10° C com 50% de umidade relativa e sementes com 10% de umidade). Bendana (1962) (a 9° C com 50% de umidade relativa); Haarer (1962) (a 5° C com 35% a 55% de umidade relativa e umidade das sementes entre 7,5 e 11%). A outra opinião apresenta melhores resultados com sementes embebidas ou sub-

embebidas. Nesse sentido podem-se citar os trabalhos de Couturon (1980) (armazenamento 19° C com 100% de umidade relativa e umidade inicial das sementes, em tomo de 40%); Reddy (1987) (temperatura ambiente, em câmara úmida e sementes úmidas envolvidas por uma emulsão cerosa).

Couturon (1980), trabalhando com sementes de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. stenophylla*, observaram que as sementes armazenadas em condições ambientais (25°C), com grau de umidade de 15%, perdiam o poder germinativo em dois meses e no entanto, quando as sementes eram submetidas à temperatura de 19°C, o período de conservação aumentava para 26 meses para o *C. arabica* e 11 meses para a *C. canephora*, com o poder germinativo mantido em 90 e em 80-90% respectivamente. Andreoli (1992) verificou que a qualidade fisiológica das sementes de *C. canephora* foi melhor preservada quando armazenada com 35% de umidade em sacos de polietileno, independente do processo de secagem.

Nos anos 70, a comparação dos benefícios relativos entre armazenamento de sementes úmidas e sementes secas apresentavam balanço positivo para o armazenamento em ambiente úmido. Bouharmont (1971) reportou que 50% das sementes sobreviveram por 16 meses de armazenamento em temperatura ambiente com 100% de umidade relativa, e somente 6% sobreviveram a 60% de umidade relativa (sementes com 12% de umidade). Em outro trabalho, também sob temperatura ambiente, a viabilidade de sementes armazenadas com 13% de umidade foi completamente perdida após 8 meses, embora somente uma pequena redução tenha sido detectada após 12 meses de armazenamento em sementes com grau de umidade em tomo de 40% (Valio, 1976). Finalmente Vossen (1979), concluiu que a armazenagem a 15° C para semente com 41% de umidade era preferível que a armazenagem a 15°C para sementes com 11% de umidade.

Pesquisas mais recentes (Ellis, Hong e Roberts, 1990, 1991), têm buscado resolver essas informações contraditórias referentes a ambientes de armazenamento para sementes de café. Sementes de 13 lotes apesar de terem sobrevivido à dessecação, quando apresentavam graus de umidade entre 7,2 e 11,3%, tiveram a germinação reduzida. Esses resultados indicaram **que** pode haver um comportamento diferenciado entre **os** genótipos quanto à tolerância à dessecação com **reflexos** no comportamento durante o armazenamento. Além disso, o grau de tolerância das sementes à dessecação variou entre **os** lotes, possivelmente como resultado de diferenças na colheita e nos métodos de processamento das sementes.

Bacchi (1958) obteve **70% de germinação** em sementes de café armazenadas por 21 meses, mantendo o grau de umidade em torno de 10%. Para Costé (1969) a manutenção da viabilidade por mais **de 6 meses só é possível se** o grau de umidade da semente for reduzido para 10-12%, Miglioranza (1982) e Miranda e Valias (1984) obtiveram bons resultados com armazenamento das sementes por 9 meses em condições herméticas e com graus de umidade mais baixos, ou seja, entre **8 e 10% e 16%**, respectivamente.

Sementes secas até 35% de umidade e acondicionadas em polietileno mantiveram 70% de germinação após **8** meses de armazenamento, já aquelas com 15 e 25% de umidade, na mesma embalagem, apresentavam queda na germinação e vigor a partir de 4 meses, ficando o vigor próximo de zero (Vasconcelos, Groth e Razera 1992).

Araújo (1988) armazenou **sementes do cv. Mundo Novo com 48,3; 21,6; 15,8 e 13,1%** de umidade em sacos de pano e de polietileno observando que o **melhor** tratamento foi de 48,3% de umidade em saco de pano, em condições de laboratório.

Pouco se conhece a respeito do controle da longevidade de sementes de café e estudos envolvendo as principais transformações degenerativas ocorridas durante o armazenamento são escassos.

## 2.2 Deterioração de sementes

O estudo da estrutura das membranas das organelas celulares dos embriões ao microscópio eletrônico revelou que nas sementes armazenadas secas ao ar ocorre, com o tempo, uma perda da integridade dessas membranas e que isso está intimamente associado ao processo de deterioração sendo, provavelmente, o primeiro passo na seqüência de eventos que ocorrem durante esse processo (Delouche e Baskin, 1973; Labouriau, 1983).

Muitas mudanças bioquímicas têm lugar nas sementes enquanto se deterioram e algumas delas poderiam estar associadas com a mudança nas propriedades do conjunto das membranas celulares. Entre essas poderia ser mencionado: o aumento de açúcares, aminoácidos e sais inorgânicos lixiviados, presumivelmente em razão do aumento da permeabilidade de plasmalema; redução na capacidade fosforilativa dos mitocôndrios, como consequência de alterações de suas membranas; redução na síntese de proteínas e carboidratos que poderia estar relacionadas à desorganização das membranas do retículo endoplasmático e dos corpúsculos de Golgi respectivamente e perda da permeabilidade seletiva do tonoplasto que delimitam os vacúolos resultando em perda da compartimentalização enzimática (Abdul-Baki e Baker, 1973; Koostra, 1973; Villier, 1973).

As sementes secas após um período de armazenamento, ao serem reidratadas, perdem solutos como açúcares, ácidos orgânicos, ions, aminoácidos e proteínas ao meio de embebição favorecendo e estimulando a ação de microrganismos que contribuem para o agravamento da deterioração. A

degradação dos fosfolipídeos tem sido atribuída ao aumento da atividade de fungos de armazenamento (Abdul-Baki e Baker, 1973; McGee, 1983).

Trabalhando com embriões de ervilha, Simon e Raja-Harum (1972) observaram a ocorrência de uma rápida lixiviação de solutos nos primeiros estádios da hidratação e, com o decorrer da embebição, uma brusca **redução** da lixiviação. Por outro lado, embriões previamente umedecidos, ou aqueles colhidos após a maturação antes da dessecação natural **não** perdiam eletrólitos quando imersos em água. Essas observações sugerem que a permeabilidade seletiva das membranas do tonoplasto e do plasmalema normalmente retém solutos dentro da célula, perdendo esta propriedade durante a secagem. Por outro lado, essas membranas podem se recuperar, tornando-se estáveis dentro de pouco tempo após o início da embebição.

**Outra** descoberta importante relacionada à deterioração foi que sementes quiescentes armazenadas por longo período, em condições ambientais sob equilíbrio com a umidade relativa do ar, produzem plântulas com numerosos casos de aberrações cromossômicas e que a frequência de mutantes em sementes se correlaciona muito com a diminuição da sua viabilidade (Roberts, 1973). Para as sementes conservadas embebidas, entretanto, a taxa de mutações permanece com o valores relativamente menores (Villiers, 1973).

Esses aspectos deslocaram o interesse para duas linhas correlacionadas de pesquisa: os mecanismos que envolvem a deterioração de sementes e os correspondentes processos de recuperação que ocorrem em sementes embebidas (Villiers, 1973).

Pesquisas revelam que ciclos de hidratação e desidratação, durante ou após o armazenamento, podem reparar os danos deteriorativos e que sementes dormentes, embebidas, podem ser armazenadas por longo período sem deterioração. Isso indica, a existência de efeitos positivos da umidade na

degradação dos fosfolípidos tem sido atribuída ao aumento da atividade de fungos de armazenamento (Abdul-Baki e Baker, 1973; McGee, 1983).

Trabalhando com embriões de ervilha, Simon e Raja-Harum (1972) observaram a ocorrência de uma rápida lixiviação de **solutos** nos primeiros estádios da hidratação e, com o decorrer da embebição, uma brusca **redução** da lixiviação. Por outro lado, embriões previamente umedecidos, ou aqueles colhidos após a maturação antes da dessecação natural não perdiam eletrólitos quando imersos em água. **Essas** observações sugerem que a permeabilidade seletiva das membranas do tonoplasto e do plasmalema normalmente retém solutos dentro da célula, perdendo esta propriedade durante a secagem. Por outro lado, essas membranas podem se recuperar, tornando-se estáveis dentro de pouco tempo após o início da embebição.

Outra descoberta importante relacionada à deterioração foi que sementes quiescentes armazenadas por longo período, em condições ambientais sob equilíbrio com a umidade relativa do ar, produzem plântulas com numerosos casos de aberrações cromossômicas e que a frequência de **mutantes** em sementes se correlaciona muito com a diminuição da sua viabilidade (Roberts, 1973). Para as sementes conservadas embebidas, entretanto, a taxa de mutações permanece com o valores relativamente menores (Villiers, 1973).

**Esses** aspectos deslocaram o interesse para duas linhas correlacionadas de pesquisa: **os** mecanismos que envolvem a deterioração de sementes e **os** correspondentes processos de recuperação que ocorrem em sementes embebidas (Villiers, 1973).

Pesquisas revelam que **ciclos de hidratação e desidratação, durante ou** após o armazenamento, podem reparar **os** danos deteriorativos e que sementes dormentes, embebidas, podem ser armazenadas por longo período sem deterioração. **Isso** indica, a existência de efeitos positivos da umidade na

atividade metabólica das sementes (Villiers e Edgcombe, 1975; Hegarty, 1977 e Heydecker, Higgins e Turner, 1975)

Hegarty (1977), definiu uma relação entre os teores de água da semente e os processos de deterioração e de ativação metabólica de reparo, sugerindo que em umidades de equilíbrio muito baixas, os danos nas membranas celulares podem ocorrer, em teores mais elevados, de forma geral, aumenta-se a possibilidade de deterioração e a ação de microrganismos e em umidade mais elevada ainda, ou seja, aquela próxima à requerida para a semente germinar, o processo de ativação e reparo começa a agir, podendo, em determinado ponto, superar a deterioração.

Delouche e Baskin (1973) relacionaram os eventos que caracterizam o processo de deterioração indicando como alteração bioquímica inicial a desestruturação do sistema de membranas ao nível celular. De acordo com a literatura, as reações oxidativas são, pelo menos em parte, responsáveis pela deterioração das sementes, sendo os lipídios o sítio principal destas reações produzindo radicais livres que, subsequentemente, atacam lipídios, proteínas e ácidos nucléicos em uma reação em cadeia. O processo pelo qual estes radicais se formam é consequência da reação de lipídeos estruturais, principalmente os polinsaturados, razão pela qual esse processo é designado como peroxidação de lipídeos (Wilson Jr. e McDonald Jr., 1986).

Com o avanço da deterioração, as atividades respiratórias e biossintéticas são reduzidas, a germinação se torna mais lenta, decresce o potencial de conservação e aumenta a sensibilidade da semente às condições de estresse, culminando com a perda do poder germinativo. Durante este processo, há a expressão da atividade de um grande número de enzimas que atuam no metabolismo de reservas (Copeland e McDonald, 1985).

Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991) investigando as principais alterações ocorridas durante o envelhecimento das sementes, observaram



decréscimo no teor de fosfolipídeos totais, de ascorbato, da atividade de peroxidase e aumento nos ácidos graxos totais e na atividade de fosfolipase-A, que segundo os autores, atua sobre fosfolipídeos de membrana e subsequente peroxidação de lipídios.

Jeng e Sung (1994) verificaram que o envelhecimento artificial das sementes estimulou a peroxidação de lipídeos e reduziu a atividade de enzimas removedoras de peróxido, tais como superóxido dismutase, catalase, peroxidase, ascorbato peroxidase, fosfatase ácida e fosfomonoesterase; estas duas últimas estão envolvidas no metabolismo de fosfato das sementes, mais especificamente os nucleotídeos, pontos chave na regulação metabólica.

Para Copeland e McDonald (1985) para detectar o início do processo de deterioração, as avaliações mais sensíveis são aquelas relacionadas à atividade de enzimas associadas com a biossíntese em tecidos novos. Deste modo, oxidases, catalases, peroxidases, fenolases (Crocker e Harrington, 1918) e amilase, citocromo oxidase, ácido glutâmico descarboxilase e desidrogenase, dentre outras, vêm sendo investigadas quanto à sua importância no processo de perda de viabilidade das sementes (Walter, 1963; Anderson, 1973). Segundo Priestley (1986), estudos eletroforéticos têm mostrado que mudanças em algumas isoenzimas tais como peroxidases, fosfatase ácida, desidrogenase, esterase e aminopeptidase podem ser associadas à deterioração em sementes de diversas culturas.

A eletroforese tem-se mostrado uma técnica adequada para a detecção de alterações na composição protéica e de enzimas específicas, podendo ser eficiente ferramenta para o acompanhamento das alterações da qualidade das sementes durante o armazenamento (Alfenas et al., 1991).

Chauran, Gopinathan e Babu, (1985), estudando a variação eletroforética de proteínas e enzimas de soja e cevada em relação à qualidade

das sementes, observaram que esterases, fosfatase ácida e transaminases funcionam como marcadores moleculares na avaliação da qualidade.

Algumas pesquisas têm sido feitas buscando detectar alterações nos padrões de proteínas totais e solúveis associando-as à deterioração das sementes (Prasad e Pathak, 1987; Nautiyal, Thapliyal e Purohit, 1985; Basavarajappa, Shetty e Prakash, 1991; Jeng e Sung, 1994; Dell'aquila, 1994; Aung e McDonald, 1995). Coello e Vazquez-Ramos (1996) observaram que a enzima DNA polimerase 2 pode ser incluída como um marcador molecular para monitorar a deterioração de sementes de milho.

No Brasil, Vieira (1996), Brandão Junior(1996), Camargo(1998) e outros autores, em estudo buscando identificar o nível de deterioração de sementes, utilizaram variações eletroforéticas em padrões de proteína e isoenzima. Os resultados indicaram que as enzimas tais como: fosfatase ácida, malato desidrogenase e esterase aumentaram a atividade com o decorrer do envelhecimento, enquanto que 6-fosfogluconato desidrogenase, hexoquinase, peroxidase e fosfoglucoase isomerase mostraram redução. Já as enzimas álcool desidrogenase, glutamato desidrogenase e glutamato oxaloacetato transaminase não tiveram seus padrões alterados. Pode-se assumir, portanto, que bandas de proteínas e isoenzimas podem atuar como marcadores bioquímicos em estudos sobre a deterioração dessas sementes.

### **2.3 Tolerância à dessecação em sementes**

Três estádios gerais são reconhecidos durante o desenvolvimento de sementes. O primeiro estágio é caracterizado pela fertilização, divisão celular e histodiferenciação de todos os principais tecidos (Raghavan, 1986). Durante o segundo estágio, ocorre uma acumulação maciça de proteínas, lipídios e amidos, comprovada por um aumento em peso *seco* das sementes. O estágio seguinte 'de maturação culmina com paralisação da deposição de reservas e

dessecação. A ocorrência *e* **extensão** desta secagem varia entre espécies, porém mais de **90%** da água original pode **ser** removida (Adams *e* Rinne, **1980**). Como consequência dessa secagem, o embrião da semente entra em um estado de quiescência, no qual o metabolismo permanece nulo *e/ou* não mensurável (Lynch *e* Clegg, **1986**), até que condições favoráveis de umidade o reativem *e* induzam a germinação. Antes que as sementes sofram essa severa perda de água, elas adquirem a habilidade para tolerar a dessecação. Muitas sementes sofrem uma rápida transição de uma fase de intolerância à tolerância à dessecação, aproximadamente no meio do **seu** desenvolvimento e precedendo ou coincidindo com a deposição de reservas (Kermode *e* Bewley, **1989**; Kermode, Oishi *e* Bewley, **1989**; Hong *e* Ellis, **1992**). Durante a germinação, a tolerância à dessecação é mantida por várias horas após o início de embebição. Antes da emergência da radícula, as sementes podem resistir à extrema secagem, mas à medida que a germinação progride, *esse* tratamento toma-se altamente danoso *e* finalmente letal (Crèvecoeur, Deltour *e* Bronchart, **1976**; Sargent, Mandi *e* Osborne, **1981**; Dasgupta, Bewley *e* Ueung, **1982**; Senaratna *e* McKersie, **1986**; Leprince et al., **1990**).

A dessecação é considerada necessária para a conclusão do ciclo da vida em sementes ortodoxas. É geralmente interpretada como uma adaptação estratégica para tornar a semente apta à sobrevivência durante o armazenamento, para garantir melhor disseminação das espécies *e* para prover tolerância às severas condições ambientais (Leopold, **1990**). Esse padrão de desenvolvimento ocorre em sementes de espécies Angiospermas, ortodoxas em relação a sua habilidade de resistir ao armazenamento com um reduzido conteúdo de umidade. Em contraste, sementes de outras espécies **não** podem sofrer uma secagem durante o desenvolvimento *e* maturação. **Seu** conteúdo de água deve permanecer alto durante todo o **seu** desenvolvimento, até a germinação; deste modo, já que não podem resistir à dessecação, **são** inaptas para o armazenamento por longos

períodos de tempo. Esse grupo de sementes é chamado de "recalcitrantes" e incluem muitas espécies de árvores tropicais (Farrant, Pammenter e Berjak, 1986, 1993), gramíneas aquáticas (Probert e Longley, 1989), e também algumas espécies de clima temperado, como o carvalho (Hong e Ellis, 1990; Pritchard, 1991; Hendry et al., 1992).

Na maioria das espécies, o crescimento e desenvolvimento das sementes é paralisado no final da maturação. Essa fase é marcada pela queda no conteúdo de água, que, provavelmente, é resultante da desconexão entre a semente e a planta mãe. Nessa fase de amadurecimento, a semente é preparada para sobreviver. A razão pela qual muitas espécies podem sobreviver à fase de maturação é que elas são tolerantes à dessecação (sementes ortodoxas). No final da maturação o conteúdo de umidade dessas sementes é de 5 a 10%.

A tolerância à dessecação parece ser mediada por sistemas protetores que previnem danos letais em diferentes componentes celulares incluindo membranas, proteínas e citoplasma. Três importantes sistemas têm sido caracterizados: (1) a acumulação de açúcares não reduzidos que estabilizam membranas e proteínas em condições de sementes secas. Existem evidências de que açúcares solúveis atuando como "substitutos da água" podem desenvolver um importante papel na tolerância à dessecação em sementes por proteger membranas de mudanças de fase lipídica induzida por dessecação e também proteger proteínas, e/ou pela formação de vidro a temperaturas fisiológicas (Leprince, Hendry e McKersie 1993). Contudo, diversos autores reportam alta concentração de sacarose e oligossacarídeos durante o desenvolvimento de sementes recalcitrantes (Farrant, Pammenter e Berjak, 1993) sugerindo que a habilidade para tolerar desidratação não é somente por causa da presença daqueles sacarídeos e que estão envolvidos sistemas mais complexos. (2) A habilidade para prevenir, tolerar ou reparar ataque de radicais livres durante a dessecação (Senaratna e McKersie, 1986; Leprince et al., 1990). Radicais livres

são naturalmente produzidos durante o metabolismo das plantas, particularmente em cloroplastos e mitocôndria (Halliwell, 1987; Puntarulo et al., 1991). As plantas são bem dotadas com moléculas anti-oxidantes e removedoras daqueles radicais. O assunto foi revisto por Burton e Ingold (1984), Halliwell (1987), Alscher (1989), Winston (1990), Hendry (1993). Moléculas removedoras de radicais livres incluem anti-oxidantes lipossolúveis (Ácido ascórbico, glutathione). As sementes contêm altas concentrações de tais substâncias variando em diferentes tecidos e diferentes sementes (Franzen e Haas, 1991). Sistemas enzimáticos processadores de radicais livres incluem superóxido dismutase (SOD) que cataliza a dismutação de superóxido ( $O_2^-$ ) em  $H_2O_2$  e  $O_2$  e aquelas enzimas envolvidas na desintoxicação de  $H_2O_2$  (isto é, catalase, glutathione redutase, ascorbato, e outras peroxidases). Sistemas enzimáticos são mais provavelmente envolvidos em uma resposta anti-oxidante inicial pela neutralização do Oxigênio ativado, potencialmente tóxico, formado durante a restrição hídrica. Diversos estudos têm demonstrado a ligação entre tolerância a estresse oxidativo, induzido por deficiência hídrica, e o aumento na concentração de anti-oxidante em plantas (Price e Hendry, 1991; Winston, 1990) mas o papel protetor de anti-oxidantes em sementes durante a dessecação ainda não é bem resolvido. Estudos examinando o papel de anti-oxidantes durante a germinação mostraram que mecanismos protetores contra o Oxigênio ativado são predominantemente enzimáticos. O sistema inclui SOD, catalase, peroxidase e glutathione redutase (Leprince et al., 1990; Puntarulo et al., 1991) e ascorbato peroxidase e sistema de reciclagem do ascorbato (Cakmak, Strbac e Marschner, 1993); todas as espécies mostram aumento da atividade enzimática associado à emergência da radícula. Em milho o metabolismo de glutathione e atividade de SOD e peroxidase são severamente prejudicados por dessecação imposta a radículas intolerantes à dessecação. (Leprince et al., 1990; Leprince, 1992). Um decréscimo de proteção enzimática contra ataque oxidativo também foi

associado à perda de viabilidade em sementes durante a secagem (Hendry et al., 1992). Estes autores reportaram dois padrões distintos na resposta do anti-oxidante de acordo com o tecido. Em cotilédones os mecanismos protetores foram principalmente enzimáticos, com alta atividade da **SOD** e glutathione redutase; em contraste, eixos foram geralmente dotados com anti-oxidantes de membrana e hidrossolúveis (tocoferol e ácido ascórbico, respectivamente). O papel do tocoferol na tolerância à dessecação e/ou perda de viabilidade sugere uma ligação entre esses dois eventos (Hendry et al., 1992). Em soja, durante a germinação, a perda de tolerância à dessecação foi associada à diminuição de anti-oxidantes lipossolúveis e de membranas microssomais, que foram mais susceptíveis à injúria por dessecação induzida por oxidação, como observado em estudos prévios in vitro (Senaratna, McKersie e Stinson, 1985a). A este respeito, Ramarathnan et al. (1986) observou uma correlação positiva entre concentração de um oxidante fenólico não caracterizado e a habilidade para germinar em sementes de duas cultivares de arroz, exibindo diferentes viabilidades de armazenamento, enquanto tocoferol não mostrou nenhuma correlação positiva. Da mesma forma, o padrão do metabolismo do tocoferol durante a germinação em radículas de milho, não mostrou nenhuma evidência convincente de que a diminuição no suprimento destes anti-oxidantes lipossolúveis foi a causa da perda de tolerância à dessecação (Leprince et al., 1990b). (3) Finalmente, proteínas LEA protetoras que *são* induzidas por **ABA** (Lane, 1991). Os recentes desenvolvimentos em Biologia molecular têm proporcionado muitos estudos durante os últimos anos sobre a expressão e regulação gênica, em resposta à severa perda de água durante a maturação de sementes. Mudanças no padrão de proteínas e mRNA durante os últimos estádios de maturação e o início da tolerância à dessecação tem sido investigado em diversas espécies, como por exemplo embriões de cevada (Bartels, Singh e Salamine, 1988), embriões de milho (Bohicchio et al., 1988) e sementes de soja (Blackman et al., 1991).

Diversos grupos de pequenos polipeptídeos têm sido correlacionados temporariamente com a transição da tolerância para intolerância. Tratamentos com ABA exógeno, que regula a aquisição de tolerância à dessecação, propiciaram o aparecimento dessas proteínas em embriões cultivados in vitro. A dessecação de sementes em desenvolvimento é caracterizada pelo acúmulo de um grupo particular de mRNA e proteínas correlatas (LEA ou late embryogenesis abundant). LEA mRNA aparece no tecido embrionário assim que começa a dessecação e toma-se a mais prevalente espécie de mRNA no estado seco, depois declina progressivamente algumas horas após a embebição da semente (Baker, Steele e Durs, 1988; Goldberg, Barker e Perez-Grau, 1989; Skriver e Mundy, 1990; Robertson e Chandler, 1992). A regulação do genes LEA parece ser principalmente transcricional onde o ABA desempenha um importante papel (Baker, Steele e Durs, 1988; Goldberg, Barker e Perez-Grau, 1989; Shiver e Mundy, 1990; Galau, Jakobsen e Hughes, 1991; Robertson e Chadler, 1992) mas, em alguns casos a regulação pós transcricional tem sido reportada (Williamson e Quatrano, 1988). Algumas proteínas LEA podem ser induzidas por uma dessecação prematura ou por diferentes tratamentos afetando o conteúdo de água na célula (Mundy e Chua, 1988; Bostock e Quatrano, 1992). Essas proteínas *são* largamente distribuídas em sementes de plantas superiores; diversos grupos de produtos de genes LEA têm sido detectados e caracterizados num grande número de espécies de sementes incluindo cevada, cenoura, algodão, milho, ervilha, nabo, arroz, girassol, tomate e trigo (Dure et al., 1989; Skriver e Mundy, 1990; Lane, 1991; Almoguera e Jordano, 1992; Robertson e Chandler, 1992). Elas têm sido classificadas em três diferentes grupos de acordo com a seqüência protéica. Grupo I inclui o gene Em (trigo), Grupo II, os genes RAB e Grupo III vários genes, tais como: DC3 e DC8 (cenoura), gene pHVal (cevada) e MLG3 (milho) (Dure et al., 1989; Robertson e Chandler, 1992; Thomann et al., 1992). As LEA proteínas são geralmente muito solúveis em

água, com alto nível de hidratação e provavelmente localizadas com exclusividade na fração citosol.

Estudos realizados com LEAs DI1 e DI13 de algodão têm demonstrado que elas desempenham um papel em sinergismo com açúcares solúveis na inibição da cristalização do citoplasma e na proteção da superfície das membranas, enquanto D29 e gD29 prenderiam ions caóticos (Baker, Steele e Durs, 1988). Um papel similar tem sido sugerido para proteína Em que poderia prover uma matriz de água ligada em sítios estratégicos, estabilizando a estrutura citoplasmática durante a dessecação de embrião de trigo (McCubbin e Kay, 1985; Lane, 1991).

Entretanto, nenhum desses mecanismos anteriormente citados consegue estabelecer a tolerância à dessecação completamente ou exclusivamente. Acredita-se que a tolerância à dessecação provavelmente não pode ser atribuída a um simples mecanismo de proteção; ao contrário, ela parece ser um fenômeno multifatorial em que cada componente é igualmente crítico, agindo em sinergismo e controlado pelo genôma (Leprince, Hendry e McKersie, 1993).

Oliver e Bewley (1997) enfatizaram a contribuição dos sistemas de reparos para a tolerância à dessecação, subsequente à desidratação e reidratação, comparado aos mecanismos de proteção que limitam os danos, durante a perda de água. Os mecanismos protetores podem ser constitutivos ou induzidos, mas em angiospermas tolerantes à dessecação parece que a proteção é mais importante do que o reparo.

### **2.3.1 Avaliação da tolerância à dessecação durante a maturação de sementes**

Ainda não se pode afirmar se a tolerância à dessecação é desenvolvida antes ou em resposta à perda de água durante a maturação. De acordo com o ponto de vista de Bewley (1979), uma semente é tolerante quando sobrevive à



rápida dessecação, suspendendo o metabolismo e revivendo após reidratação. Várias formas são usadas para avaliar a tolerância. Quando sementes inteiras são testadas, geralmente avalia-se sua capacidade para germinar após uma dessecação experimental. Sementes secas ou em desenvolvimento, que não germinam após reidratação, são classificadas como "intolerantes". Contudo, a **utilização** da capacidade germinativa para testar tolerância à dessecação nem sempre tem-se mostrado como um parâmetro eficiente, porque as sementes adquirem a habilidade de germinar em um estágio específico preciso do desenvolvimento. Dessa forma, essa habilidade pode ser adquirida coincidentemente com a tolerância à dessecação ou antes dela. No primeiro caso acredita-se que a dessecação desvia o programa de desenvolvimento para um programa de germinação (Kermode, Oishi e Bewley, 1989). No segundo caso, as sementes podem germinar mesmo antes de sofrerem secagem e por isso, quando **são** colhidas e deixadas em condições de umidade para prevenir a perda de água, germinam precocemente. Nesse caso, a tolerância à dessecação não é uma característica absoluta, um "tudo-ou-nada", mas é quantitativa e progressivamente adquirida durante o desenvolvimento, e mesmo durante a secagem após a maturação (Ellis, Hong e Roberts, 1991). Ainda não se pode afirmar que estes padrões refletem dois diferentes programas de desenvolvimento, porque interagem diversos fatores fisiológicos e metodológicos. Entre estes, cinco fatores são bem identificados até agora: - O primeiro fator é a escolha do regime de secagem. Em muitas espécies quando sementes inteiras são secas lentamente (isto é, diversos dias em alta ou decrescentes umidades relativas), elas adquirem tolerância à dessecação, coincidentemente com a capacidade germinativa; em contraste, em outras espécies, sementes secas rapidamente (isto é, máximo de 24 horas em presença de agente dessecante ou em atmosfera ambiente), adquirem o poder germinativo antes da aquisição da tolerância. Segundo Ellis, Hong e Roberts (1987) e

Kermod e Bewley, (1989), a taxa de secagem artificial determina o grau de tolerância à dessecação. Em algumas sementes recalcitrantes, a expressão de tolerância à dessecação é também dependente da taxa de secagem. Pammenter, Vertucci e Berjak, (1991) mostraram que desidratação até baixo percentual de umidade pode ser alcançada por "secagem rápida" (40 minutos), sem dramática perda de viabilidade, enquanto uma taxa de desidratação mais lenta (2 dias), causou dano letal em sementes com o mesmo conteúdo de água. Embora a secagem lenta seja amplamente usada como um método para simular a dessecação que ocorre por maturação fisiológica, pode-se considerar que a secagem rápida é a forma mais satisfatória para avaliar o grau de tolerância à dessecação em um estágio específico do desenvolvimento. Na verdade, como a tolerância à dessecação é uma característica quantitativa, conseguida progressivamente, sementes secas lentamente, por vários dias, continuam a metabolizar e desenvolver-se até que um nível crítico de umidade seja alcançado, e portanto pode-se esperar um aumento da tolerância durante este processo de secagem lenta. Assim, a avaliação da tolerância à dessecação, após a secagem lenta, não corresponderá necessariamente ao estágio de desenvolvimento em que se encontrava a semente antes do início da secagem. Como apontado por Farrant, Pammenter e Berjak, (1993), as estruturas circundantes podem determinar a taxa de perda de água pelos tecidos da semente. A capacidade de germinação também é um atributo adquirido progressivamente. Embora a dessecação lenta, em estágio apropriado, pareça acentuar a germinação em diversas espécies de sementes (Kermonde, Oishi e Bewley, 1989), fatores adicionais têm sido observados em algumas espécies. Sabe-se que diversos fatores inibem a germinação, permitindo ao embrião completar a maturação: os tecidos que circundam o embrião (Bewley, Kermod e Misra, 1989; Berry e Bewley, 1991), baixos potenciais hídricos (Long, Dale e Sussex, 1981; Finkelstein e Crouch, 1986; Fischer et al., 1988; Xu e Bewley,

1991) e altas concentrações de ABA (Long, Dale e Sussex, 1981; Ackerson, 1984; Finkelstein et al., 1985; Prevost e Le Page-Degivry, 1985; Quatrano, 1986; Koormneef et al., 1989; Xu e Bewley, 1991). Se a capacidade de germinação é fortemente inibida por um desses fatores, a avaliação da tolerância à dessecação, por este método, torna-se impossível. Por exemplo, se a semente é inapta para germinar em um dado estágio de desenvolvimento, não é possível avaliar a tolerância à dessecação por medição da perda de uma característica que não é expressada, ou seja, a germinação. As sementes podem sofrer danos durante a embebição. Quando, para testar tolerância à dessecação, sementes são secas durante seu desenvolvimento, e a seguir, reidratadas, uma rápida entrada de água nos primeiros minutos de embebição pode resultar em alterações prejudiciais às membranas celulares. Tais alterações determinam a taxa de germinação e vigor e, portanto, a dimensão da tolerância à dessecação. Estudando dessecação e injúrias por embebição em sementes de *Zizania palustris* (arroz selvagem), as quais eram inicialmente tidas como recalcitrantes, Kovach e Bradford (1992a) demonstraram que a tolerância à dessecação poderia ser induzida por uma desidratação lenta, a temperaturas maiores que 25° C, e evitando-se injúrias por embebição, mediante reidratação lenta, por três semanas. Neste caso particular, a tolerância à dessecação foi dependente de condições apropriadas de secagem e germinação. -A perda ou aquisição de tolerância à dessecação não é sincronizada entre os diferentes tecidos embrionários. Por exemplo, em sementes de *Brassica campestris*, em desenvolvimento, aos 28 dias após a polinização, os cotilédones permaneceram viáveis após secagem e subsequente reidratação, por outro lado, as radículas, neste mesmo estágio, foram muito pouco resistentes à dessecação (Leprince, 1992). Da mesma forma, em sementes de milho em desenvolvimento, a tolerância à dessecação na camada de aleurona (medida por atividade de  $\alpha$ -amilase); ocorreu 14 dias antes de ocorrer no embrião (Oishi e Bewley, 1990).

Durante germinação, Koster e Leopold (1988) demonstraram que coleóptilo e tecidos apicais de *Zea mays* e *Glycine max*, respectivamente, mantiveram alguma tolerância após um período de embebição, enquanto que as radículas correspondentes foram completamente intolerantes à dessecação. Portanto, a avaliação da tolerância à dessecação pode revelar a tolerância de apenas um tecido na semente.

A aquisição de tolerância à dessecação não é um processo sincronizado entre sementes individuais. Pequenas variações no tempo necessário para o início da tolerância à dessecação foram registradas entre sementes em desenvolvimento de *Brassica campestris* (Leprince, Bronchart e Deltour, 1990) e seis espécies de leguminosas (Ellis, Hong e Roberts, 1987). Similarmente, o processo em sementes de *Sinapis alba* ultimou aos 14 dias de maturação (Fischer et al., 1988). O uso de lotes de sementes altamente homogêneos constitui uma real vantagem para o estudo de mecanismos de tolerância à dessecação.

Considerando tais complicações e interações, diversos autores optam por avaliar a perda de eletrólitos como um parâmetro para expressão de tolerância à dessecação (Pammenter, Vertucci e Berjak, 1991; Berjak, Pammenter e Vertucci, 1992), embora ela não integralize todos os aspectos necessários, tais como respiração ou o ressurgimento da síntese de DNA. Outros autores têm investigado os mecanismos de tolerância à dessecação usando sistemas fisiológicos mais convenientes. O recente isolamento e caracterização de mutantes de *Arabidopsis thaliana* com reduzida "responsividade" ou insensibilidade ao ABA (Koorneef et al., 1989; Meurs et al., 1992), e o desenvolvimento de sistemas de cultura de tecidos para a produção sincronizada de grandes quantidades de embriões somáticos em alfafa (McKersie et al., 1989; Senaratna, McKersie e Bewley, 1989), oferecem poderosas ferramentas alternativas nessas investigações, desde que a aquisição de tolerância à

dessecação possa ser manipulada nesses sistemas, usando ABA, seus análogos ou vários carboidratos.

### 2.3.2 Água e tolerância à dessecação

O conteúdo final de água em sementes secas (juntamente com a temperatura), parece ser importante na determinação da sobrevivência por longos períodos de armazenamento (Roberts e Ellis, 1989). Além disso, propriedades da água em tecidos de sementes secas parecem ser de fundamental importância na tolerância à dessecação. Diversos estudos sobre a termodinâmica de hidratação em sementes secas têm documentado a função das ligações hídras como um componente de tolerância à dessecação. Diferentes conceitos têm sido usados para caracterizar propriedades da água em tecidos das plantas. O termo “água ligada” é definido como água associada à matriz celular. Ela é tão fortemente estruturada que sua termodinâmica e/ou propriedades motoras diferem da água livre (Vertucci e Leopold, 1987; Leopold e Vertucci, 1989).

Um método conveniente para estudar a “água ligada”, em sementes, é o uso de isotermas de adsorção. As curvas são construídas baseando-se em dados coletados quando amostras de tecidos biológicos são expostas a várias umidades relativas providas por diferentes tipos de soluções saturadas de sais. (Leopold e Vertucci, 1986; Vertucci e Leopold, 1987a,b; Ishida et al., 1988; Roberts e Ellis, 1989). De acordo com tais curvas, são classificados, no mínimo, 5 estados da água ou níveis de hidratação em tecidos de sementes recalcitrantes e ortodoxas (Berjak, Pammenter e Vertucci, 1992; Pammenter, Vertucci e Berjak, 1991). No nível 1 (de 0 a 8 -10% g de H<sub>2</sub>O/ g peso seco), as moléculas de água estão fortemente associadas com as superfícies macromoleculares por ligações iônicas, comportando-se mais como uma ligação do que como um solvente. A energia de atração é estimada em -50kJ mol<sup>-1</sup>. No nível 2 (8-22%g de H<sub>2</sub>O/g de peso seco), a água adquire sua propriedade de formar vidro (Williams e Leopold,

1989) e a energia de atração decresce para  $-2 \text{ kJ mol}^{-1}$ , sugerindo uma fraca interação com as superfícies macromoleculares (Vertucci, 1990). Acima de 22% g de  $\text{H}_2\text{O/g}$  de peso seco, a água ganha suas propriedades solventes e algumas atividades metabólicas são possíveis. As propriedades térmicas do nível 3 de hidratação (22-33%g de  $\text{H}_2\text{O/g}$  de peso seco), parecem ser como de uma solução concentrada. Águas congeláveis entre  $-18^\circ\text{C}$  e  $-38^\circ\text{C}$ , têm energia de atração desprezível e pode-se dizer que iniciam pontes sobre sítios hidrofóbicos. Neste nível de hidratação a respiração é mensurável (Leopold e Vertucci, 1989). No nível 4 (33-55% g de  $\text{H}_2\text{O/g}$  de peso seco) e 5 (acima de 55% g de  $\text{H}_2\text{O/g}$  de peso seco), a água exibe propriedades térmicas semelhantes àquelas de uma solução diluída. Acima de 55% de umidade, os tecidos das sementes são considerados completamente hidratados e os processos de germinação são possíveis.

Considerando estes dados, parece que a água matricial, caracterizada pelas ligações fortes na região 1, está associada com a sensibilidade à dessecação. Contudo, a quantidade e o papel da água ligada (ou água não congelável) em relação à tolerância à dessecação não está ainda elucidada. Existe evidência de que a tolerância à dessecação não pode ser interpretada tendo em vista a proporção de água não congelável, mas preferivelmente considerando as diferentes respostas à remoção deste tipo de água. Berjak, Pammenter e Vertucci, (1992) e Pammenter, Vertucci e Berjak, (1991) observaram que em sementes recalcitrantes de *Landolphia kirkii*, os diferentes tipos de água exibiram similaridades com àquelas de sementes tolerantes à dessecação. Eles sugeriram que a taxa de secagem tem efeitos mais marcantes sobre sensibilidade à dessecação do que as proporções de diferentes tipos de água. Além disto, Van Acker e McKersie (citados por (Leprince, Hendry e McKersie, 1993) mostraram que embriões secos, somáticos e zigóticos, de alfafa exibiram diferenças nas ligações fortes, mas não na tolerância à

dessecação. Eles sugeriram que aquelas diferenças foram devidas à quantidades e tipos de reservas armazenadas, as quais diferem entre embriões somáticos e seus zigóticos correspondentes. Assim, pode não ser possível generalizar o papel da água em tolerância à dessecação, antes de uma apuração da natureza celular dos diferentes locais de ligação e dos efeitos deletérios das taxas de secagem sobre as estruturas celulares (Leprince, Hendry e McKersie, 1993).

### **2.3.3. Taxa de secagem – um fator vital na determinação do grau de desidratação que será tolerado**

O conceito de um conteúdo crítico de água, abaixo do qual a viabilidade será perdida, tem gerado algumas controvérsias. A maioria dos dados da literatura apresentando resultados da desidratação de sementes sensíveis à dessecação referem-se ao 'conteúdo crítico' da água como sendo característico das espécies sob estudo, enquanto ignoram o tempo gasto para a água ser perdida ou a temperatura, em que os experimentos de secagem foram conduzidos. A influência da temperatura na secagem é subsequente armazenamento foi demonstrada por diversos autores em *Zizania* spp. (Kovack e Bradford, 1992b; Berjak et al., 1994; Vertucci et al., 1994; Ntuli et al., 1997) indicando que este fator deve ser importante também para outras espécies. Entretanto, considerando apenas a taxa de secagem, verifica-se que em manipulação experimental de sementes sensíveis à dessecação, ou eixos excisos destas sementes, a taxa de secagem determina o tempo gasto para o material passar por uma série de patamares nos conteúdos de água. Quanto mais rapidamente uma desidratação é atingida, menor é o conteúdo de água crítico para estas sementes ou eixos. (Normah, Chin e Hor, 1986; Berjak, Pammenter e Vertucci, 1993; Fu et al., 1990; Pammenter, Vertucci e Berjak, 1991). Esta observação conduziu ao desenvolvimento de uma técnica de secagem rápida (Berjak, Farrant e Pammenter, 1990), por meio da qual eixos embrionários

excisos são desidratados muito rapidamente. **Os eixos** de muitas espécies podem sobreviver a essa secagem, até conteúdos de água, nos quais quase toda a água restante é não-congelável (Pammenter, Vertucci e Berjak, 1991; 1993; Pritchard, 1991; Finch-Savage, 1992; Berjak, Vertucci e Pammenter, 1993; Pritchard e Manger, 1998), e presumivelmente ligada a superfícies das estruturas intracelulares e macromoléculas.

Durante a secagem lenta, sementes recalcitrantes avançam no processo de germinação, o **que** conseqüentemente acentua a destruição de mecanismos de tolerância à dessecação, conduzindo à perda da viabilidade em conteúdos de água maiores do que material rapidamente seco. (Farrant, Berjak e Pammenter, 1985; Berjak, Farrant e Pammenter, 1989). **Além** disso, outros processos deletérios, relacionados com perda de água, podem estar presentes em conteúdos intermediários de água, como por exemplo o descontrole do metabolismo ou da ausência de sistemas antioxidantes. (Côme e Corbineau, 1996). **Os** teores de água marcadamente menores, **que** podem ser atingidos por uma secagem muito rápida, de eixos excisos, são simplesmente uma conseqüência da desidratação, sendo atingida tão rapidamente **que** o período durante o qual as reações deletérias, que ocorrem em conteúdos de água intermediários são minimizadas (Pammenter, Vertucci e Berjak, 1991; Berjak e Pammenter, 1997; Pritchard e Manger, 1998).

Não há padrão de secagem rápida para tecido sensível à dessecação, mas há um limite inferior ao qual não pode sobreviver, que é sempre maior em conteúdo de água do que aquele tolerado pelas sementes ortodoxas e intermediárias (Pammenter, Vertucci e Berjak, 1991; Berjak, Vertucci e Pammenter, 1993; Pammenter, Vertucci e Berjak, 1993; Pritchard e Manger, 1998). Estes autores sugerem que sementes verdadeiramente recalcitrantes não sobrevivem à renoção de qualquer água associada à estrutura, embora existam casos de eixos de sementes recalcitrantes que sobrevivem em conteúdos de água



variando de  $0.11-0.16 \text{ g.g}^{-1}$ , (Fu et al., 1990; Chaudhury, Radhmani e Chandel, 1991; Kioko et al., 1998), os quais são provavelmente menores do que o nível de água não congelável. Danos que ocorrem nas sementes com menores conteúdos de água podem ser caracterizados como danos de dessecação “*stricto sensu*”, e não deve ser confundido com o metabolismo desregulado que ocorre quando a água requerida para manter a integridade das estruturas intracelulares é removida (Pammenter e Berjak, 1999); este é o dano que ocorre como consequência da remoção de água não congelável, mesmo se a viabilidade é mantida, nesse nível de hidratação, após uma secagem rápida (Pammenter, Vertucci e Berjak, 1991).

A influência da secagem tem sido relatada também em sementes inteiras (Farrant, Berjak e Pammenter, 1985; Pritchard, 1991), embora o efeito seja muito menos marcado do que em eixos excisos. Isso pode ser simplesmente em razão do fato de a maioria das sementes inteiras serem tão grandes para secarem suficientemente rápido para o efeito tomar-se pronunciado, embora Finch-Savage (1992) tenha apontado a possibilidade da resposta à desidratação de eixos isolados ser influenciada pela remoção destes do material cotiledonar. Nem todas as sementes recalcitrantes são tão grandes, ou perdem água tão lentamente, de modo a impossibilitar a realização de diferentes taxas de secagem. Em estudos recentes, em sementes inteiras de *Eckbergia capensis*, taxas de secagem rápida (< 24h) e lenta (10d) foram atingidas colocando-se as sementes em sílica gel, com o endocarpo removido ou intacto, respectivamente (Pammenter et al., 1998). Sementes lentamente secas perdem a viabilidade com conteúdos de água elevados nos eixos embrionários (aprox.  $1.25 \text{ g.g}^{-1}$ ), enquanto aquelas que foram desidratadas rapidamente mantiveram uma completa germinabilidade com um conteúdo de água no eixo de  $0.7 \text{ g.g}^{-1}$ . Por meio desses dados confirma-se que estudos com eixos excisos apresentam resposta confiável à taxa de secagem, já que não houve efeito da remoção dos eixos embrionários das sementes. As observações ao microscópio eletrônico sugerem que em

diferentes taxas de secagem, diferentes mecanismos deletérios produziram danos intracelulares. Em eixos de sementes lentamente secas, com conteúdo de água na região de  $1.1 \text{ g.g}^{-1}$  e viabilidade de 37%, houve uma avançada degradação das membranas, particularmente de plastídeos e também uma anormalidade dos corpos de lípidios. Estes danos tomaram-se cada vez piores com secagem mais lentas, até um conteúdo de água no eixo de  $0.6 \text{ g.g}^{-1}$  e zero de viabilidade, quando restaram apenas fragmentos de componentes intracelulares. **Eixos** com conteúdos de água de  $0.57 \text{ g.g}^{-1}$ , de sementes secas rapidamente (viabilidade de 80%), não apresentaram sinais de danos intracelulares. Foi somente em conteúdos de água do eixo, consideravelmente menores, que sinais de deterioração intracelular foram notados, coincidente com um declínio da viabilidade de sementes secas rapidamente. No entanto, a degradação massiva que caracteriza as células do eixo de sementes lentamente secas não ocorreu. Estas observações são coerentes com o ponto de vista de que, se o material sensível à dessecação é seco lentamente (permanecendo um longo período em conteúdos de água intermediários), o dano que se acumula é diferente daquele que ocorre se esse material é rapidamente seco e atinge menor conteúdo de água, antes da perda da viabilidade. **O** problema com essa interpretação é que os processos degradativos não param quando as sementes perdem a viabilidade, e a severa degradação observada em sementes lentamente secas pode ser mais uma consequência do tempo do que do conteúdo de água do qual resultam danos. **Há** também uma explicação alternativa para o efeito da taxa de secagem na viabilidade: é possível que **sob** condições de rápida secagem, os tecidos do eixo embrionário sequem desuniformemente e **os** tecidos essenciais para germinação (meristemas) mantenham-se com maior conteúdo de água. Certamente, em sementes inteiras há uma desuniforme secagem dos eixos e tecidos de armazenamento (Pammenter et al., 1998; Tompsett e Pritchard, 1998) e a possibilidade de secagem desuniforme dentro de um órgão não ocorreria.

Medidas independentes da atividade metabólica e da distribuição da água dentro dos tecidos durante a secagem são necessárias para resolver estas explicações conflitantes do efeito da taxa de secagem.

A taxa de secagem também influencia a resposta à desidratação de sementes ortodoxas em desenvolvimento (Bewley e Black, 1994; Harada, 1997) e a tolerância à dessecação de tecidos vegetativos (Oliver e Bewley, 1997). Em ambos os casos, uma melhor sobrevivência à desidratação com secagem lenta é observada, presumivelmente devido ao tempo suficiente que é concedido para a indução e operação dos mecanismos de proteção. Em algumas briófitas o efeito da taxa de secagem afeta mais o tempo de recuperação do que o conteúdo de água tolerado; material rapidamente seco se recupera mais lentamente na reidratação. Foi sugerido que a secagem rápida impede os processos de recuperação e é necessário mais tempo para os reparos na reidratação (Oliver e Bewley, 1997). As diferentes respostas para a taxa de secagem das sementes recalcitrantes e sementes ortodoxas em desenvolvimento enfatizam a diferença fundamental destes tecidos.

Há um interessante aspecto das respostas das sementes recalcitrantes à desidratação que é provavelmente mais freqüentemente observado do que registrado, e este é o efeito da secagem por curto período. Na secagem de sementes imaturas de *Litchi chinensis* houve um aumento inicial de vigor antes de o dano ter sido evidente (Fu et al., 1994). Secagem parcial, seguida por tratamento a frio, em sementes maduras de *Aesculus hippocastanurn* aumentou a velocidade de germinação assim como a germinação total (Tompsett e Pritchard, 1998). Isto foi atribuído à continuação do processo de maturação, e o mesmo pode ser verdade para as sementes imaturas de *L. chinensis*. Um efeito semelhante foi observado em sementes maduras de *Ekebergia capensis* rapidamente secas (Pammenter et al., 1998); secagem leve (para conteúdo de água maior do que aquele no qual o dano é aparente) aumenta a taxa de

germinação embora o tempo de secagem envolvido (4-6h) não justifique o envolvimento dos processos de maturação. A razão para essa resposta, é desconhecida mas merece mais estudos.

### 23.4 Dano de membrana induzido por dessecação

Estudos ultraestruturais de tecidos, após dessecação, têm revelado que membranas celulares são um dos principais locais de injúrias. Dessecação imposta a embriões de *Phaseolus vulgaris* em estágio imaturo de desenvolvimento, intolerantes à dessecação, induziu um colapso de membranas, em contraste com células de embriões tolerantes, onde as membranas mantiveram sua integridade (Dasgupta, Bewley e Ueung, 1982). Em sementes de milho, durante a germinação, a dessecação foi associada com um irreversível colapso de membranas nucleares e plasmáticas, em radículas sensíveis à dessecação, enquanto aquelas radículas tolerantes permaneceram intactas (Crèvecoeur, Deltour e Bronchart, 1976; Sargent, Mandí e Osborne, 1981). Um indicador precoce de dano induzido por dessecação em membranas é a lixiviação de várias soluções citoplasmáticas (ions, açúcares e proteínas) que ocorrem na reidratação de tecidos dessecados (Seneratna e McKersie, 1983, 1986; Crowe et al., 1989). A taxa e extensão de lixiviado plasmático está possivelmente relacionada com o grau de sensibilidade à dessecação (Seneratna e McKersie, 1983, 1986). Experimentos sobre cinética de lixiviados refletem uma parcial perda de semi-permeabilidade de membranas, sugerindo que injúrias de dessecação estão associadas à disfunção de membranas (Seneratna e McKersie, 1986). O efeito de dessecação sobre a organização física da dupla camada lipídica foi investigado em diversos sistemas experimentais, incluindo modelo de membranas isoladas de tecidos vivos (Crowe et al., 1986; Seneratna e McKersie, 1986), ou preparadas com base em misturas de lipídios puros (Crowe et al., 1988; McKersie, Hoekstra e Krieg, 1990).

Em membranas biológicas de células não estressadas, a dupla camada lipídica hidratada *está* num estado líquido-cristalino à temperaturas fisiológicas com significativo movimento rotacional e lateral das cadeias de ácidos graxos dos fosfolípeos dentro da dupla camada. A secagem causa alterações nas propriedades *físicas* dos fosfolípeos da membrana, como mostrado, por exemplo, **por** alterações na temperatura de transição de fase dos lípeos (TM). TM é definida como a temperatura na qual os lípidios passam da fase gel lamelar (L $\beta$ ) para a fase lamelar líquido-cristalina (L $\alpha$ ). É calculada considerando o ponto médio de transição das fases, durante aquecimento por espectroscopia de infravermelho (Hoekstra, Growe e Growe, 1990), **ou** como o início da transição entre a fase líquido-cristalina e gel, sob congelamento, usando amplo ângulo de difração de raio X (Seneratna, McKersie e Stinson, 1984). A TM da camada dupla, fosfolipídica, varia de acordo com um número de fatores, incluindo composição dos lípidios e graus de hidratação. **Por** exemplo, a TM de "dipalmitolphosphatidilcolina" (DPPC) é 41°C, mas a desidratação causa um aumento da TM para 70°C **ou** mais, dependendo do conteúdo final de água. Por outro lado, membranas biológicas contêm uma complexa mistura de lípidios e, conseqüentemente, os fosfolípeos têm uma faixa extensa de TM, 30°C **ou** mais. A secagem tem dois efeitos distintos sobre as propriedades das fases da dupla camada da membrana em relação: uma direta, reversível, e uma indireta, irreversível alteração de TM. Em pólen de *Typha latifolia*, a desidratação *â*umenta a TM, medida por espectroscopia de infravermelho de -9°C para 32°C, em tecidos intactos; e de -6°C para 58°C, em membranas microssômicas isoladas (Hoekstra, Crowe e Crowe, 1991). Em geral, um lípidio hidratado, que *está* na fase líquido-cristalina, à temperatura fisiológica, *estará* na fase **gel**, à mesma temperatura, se água for removida das cabeças polares dos fosfolípeos. Essa transição é completamente reversível quando os fosfolípeos *são* reidratados, portanto *esta* é uma característica física da membrana lipídica.

Membranas lipídicas apresentam diferentes valores de TM conforme o grau de insaturação de seus ácidos graxos. Durante a desidratação, pode-se esperar que diferentes fosfolípidos passem para a fase gel, a diferentes níveis de hidratação. Quando um tipo de lipídio de membrana passa para a fase gel em determinadas condições de dessecação, ocorre uma descontinuidade no plano da membrana e prevalece a fase gel. A formação de distintas fases gel dominantes e a conseqüente descontinuidade na estrutura da membrana lipídica são altamente danosas tanto para as membranas como para as proteínas associadas a ela, e contribuem para a perda geral de funções como: permeabilidade, compartimentalização e atividades de enzimas ligadas às membranas.

Alterações indiretas e irreversíveis em TM são observadas em frações de membranas isoladas de eixos de sementes letalmente dessecadas (Seneratna, McKersie e Stinson, 1984). O padrão de ângulo de difração de raio X de membranas microsossomais, isoladas de eixos de soja, indicaram uma TM de 7°C para aqueles tolerantes à dessecação, e 9°C para eixos intolerantes (germinando antes da dessecação). Embora não tenham sido observadas mudanças em TM, após a dessecação de eixos tolerantes, em eixos intolerantes, dessecados, a TM aumentou para 47°C. Evidências de alterações em propriedades físicas de membranas têm sido obtidas também por microviscosidade. Membranas microssomais, isoladas de eixos de sementes de soja, sensíveis à dessecação, durante a germinação, tiveram sua microviscosidade aumentada para 90%, após a dessecação letal (Seneratna, McKersie e Borochoy, 1987). Em outras palavras, a dessecação letal aumentou a viscosidade e alterou a TM de membranas de tecidos sensíveis, provavelmente como conseqüência de mudanças na composição dos lipídios, que são irreversíveis a curto prazo, e detectadas em membranas completamente hidratadas.

### **2.3.5. Alterações na composição química de membranas**

Em eixos de soja germinando, Senaratna, McKersie e Stinson (1984); Senaratna, McKersie e Borochoy (1987) reportaram diversas mudanças importantes na composição de fração da membrana microsomal, após dessecação letal, incluindo um aumento de 10 vezes na relação ácido graxo livre por fosfolípídeos (FFA:PL); um decréscimo de 4 vezes na relação de fosfolípídeos por esteróis (PL:esteróis); e uma perda aleatória de fosfolípídeos. Por outro lado, a razão de ácidos graxos saturados em relação a ácidos graxos insaturados, a quantidade de esteróis individuais e a proporção de fosfolípídios e lysofosfatídios não foram afetadas. Do mesmo modo, em radículas de milho germinando, aumentos relativos da quantidade de ácidos graxos livres também foram correlacionadas com injúrias por dessecação (Leprince et al., 1992). Esses dados sugerem fortemente que, durante a dessecação letal, ocorre uma de-esterificação de cadeias de ácidos graxos do glicerol e da cabeça polar, em membranas fosfolípídicas, juntamente com a liberação de produtos de degradação no meio (Senaratna, McKersie e Borochoy, 1987). Essas mudanças não ocorrem após a dessecação de tecidos tolerantes.

Nestes sistemas tem sido possível correlacionar de-esterificação com modificações na composição química e propriedades físicas da membrana (McKersie et al, 1988). Recentes estudos sobre membranas senescentes indicaram que a presença de lipídios neutros causaram a formação de fase lipídica gel dominante e aumentaram extremamente a temperatura de transição em lipossomos preparados com base em fosfolípídios de membranas microsomais (McKersie e Thompson, 1979). Usando a mesma metodologia de lipossomo, Senaratna, McKersie e Borochoy, (1987) demonstraram que um aumento na  $T_M$ , juntamente com um aumento da microviscosidade, poderiam ser induzidos pela adição de uma mistura de ácido graxo livre insaturado na camada dupla fosfolípídica. Ambos os parâmetros alcançaram valores similares

àqueles da fração de membranas microsossomais isoladas de eixos germinados submetidos à dessecação, quando correspondentes quantidades de ácidos graxos livres foram adicionadas. Portanto, os aumentos irreversíveis na TM e viscosidade são conseqüência da acumulação de ácidos graxos livres na camada dupla de lipídio, o que ocorre como um resultado de de-esterificação de fosfolipídios:

Outra alteração significativa na composição da membrana, é a acumulação de lipídios peroxidizados, um indicador molecular de injúria de membrana e degradação de lipídios insaturados. Em radículas de milho dessecadas, a perda de tolerância à dessecação, durante a germinação, foi acompanhada por aumento de 5 vezes em MDA (malondialdeído), uma medida de dano peroxidativo em cadeias de ácil-lipídios (Leprince et al., 1990b). Na restauração do suprimento de água, a peroxidação de lipídios foi aumentada em material intolerante, resultando num aumento de 30 vezes em MDA (Leprince et al., 1990). Em contraste, radículas tolerantes não acumularam peróxidos de lipídios. Sintomas semelhantes de injúria foram associados à perda de viabilidade em embriões recalcitrantes dessecados de castanha, durante secagem (Hendry et al. 1992).

Todas essas alterações na composição química, as quais têm sido correlacionadas com danos em membranas e prejudicado a retomada do crescimento após desidratação, são provavelmente de origem comum. A presença de radicais livres altamente reativos, provavelmente oxigênio ativado, é sugerida por diversas linhas de evidências. Alguns herbicidas como o paraquat são tóxico para plantas fotossintéticas graças a sua propensão em desviar elétrons da fotossíntese diretamente para o oxigênio e promover a produção de oxigênio ativado (Halliwell, 1987, 1991). Sua aplicação em folhas de feijão induziu a formação de fase gel e foi ainda correlacionada com um aumento na produção de ions superóxidos, em cloroplastos sob iluminação (Chia, McRae e



Thompson, 1982). Evidência semelhante foi obtida após tratamento com ozônio, o que promoveu ataque oxidativo sobre membranas "in vitro", desencadeando a formação de fase gel dominante (Pauls e Thompson, 1981). Ataque oxidativo, resultando em de-esterificação de fosfolípidios e alterações em propriedades físico-químicas de membranas, foi produzido "in vitro", por exposição de membranas microssomais (microsoma = uma pequena inclusão, consistindo de ribossomos e fragmentos de retículo endoplasmático, no protoplasma da célula), ao oxigênio ativado, gerado pela xantina oxidase. Microssomas de eixos de soja, que ainda apresentavam alguma tolerância à dessecação foram menos susceptíveis ao dano de oxigênio ativado (Senaratna, McKersie e Stinson, 1985), Senaratna, McKersie e Borochoy (1987). Conclui-se, então, que alterações de propriedades físico-químicas de membranas após dessecação letal pode ser conseqüência de um ataque oxidativo por radicais livres. São várias as evidências do envolvimento direto de radicais livres na perda de viabilidade de sementes, embora seja difícil a identificação e quantificação dos tipos de radicais livres. Além disso, a ação dos radicais livres diferem quantitativa e qualitativamente entre tecidos vivos e mortos; e quanto mais tempo decorre da morte da semente, mais difícil se toma a correlação entre a ação dos radicais livres e a perda de viabilidade (Hendry, 1993). Usando técnica de EPR (electron paramagnetic resonance), Buchavarov e Gantcheff (1984); Priestley et al. (1985), verificaram o aumento de radicais livres durante a perda de viabilidade e envelhecimento natural e acelerado, em vários tecidos de sementes, incluindo o cotilédone e eixos de soja, bem como o endosperma e embrião de milho. Contudo, Hepburn et al. (1986), não conseguiram correlacionar as concentrações de radicais livres em diferentes cultivares de Brassica e espécies de leguminosas com viabilidade de sementes e vigor de plântulas. Recentemente, Hendry et al. (1992) mostraram que radicais livres estáveis, detectados por EPR, se acumulam no eixo embrionário de castanhas, *Quercus robur* (comportamento

recalcitrante no armazenamento), correlacionando positivamente com perda de umidade e viabilidade. Uma das duas espécies de radicais detectada foi semelhante a um radical livre estável, formado em musgos intolerantes à dessecação (Seel et al., 1991). Em milho, uma resposta EPR semelhante àquela de musgos e sementes de castanha foi obtida em radículas germinando, dessecadas. (Leprince et al., 1990). Contudo, a amplitude do sinal aumentou dramaticamente, cinco vezes, com a mudança de tolerantes para intolerantes. Além disso, um aumento significativo nos radicais também ocorreu em tecidos dessecados e intolerantes, após 8 horas de reidratação (Leprince, 1992). A identidade dos radicais livres em musgo dessecado e outros tecidos parece ser uma quinona (dicetona aromática, cristalina, amarela, com cheiro penetrante - form.:  $C_6H_4O_2$ ) (Leprince, 1992; Hendry, 1993). O dano oxidativo de membranas, refletido pela alta em MDA, de-esterificação fosfolipídica e acúmulo de radicais livres, pode ser consequência da formação de superóxidos pela qual, provavelmente, o radical hidroxil é o responsável devido. Diversos estudos têm demonstrado a formação de superóxido quando cloroplastos ou membranas tilacoide isoladas após estresse de água são expostos à iluminação. Por exemplo, um aumento de superóxido foi detectado em cloroplasto de trigo após 5 dias de privação de água, concomitantemente com um aumento de 2,3 vezes da quantidade de ferro, perda de clorofila e alta em lipídios peroxidizados (Price, Atherton e Hendry, 1989; Price e Hendry, 1991). Em tecidos fotossintetizantes de um musgo intolerante à dessecação, a resposta à EPR, após dessecação, juntamente com a perda de clorofila e alta de peroxidação de lipídio foi largamente associada à irradiação de luz (Seel et al., 1991). Em vista desses resultados, sugeriu-se uma correlação entre taxa de produção de peróxido e condições que influenciam a fotossíntese, indicando um funcionamento prejudicado do sistema de transporte de elétrons do tilacoide, durante estresse, causando desvio de elétrons para oxigênio molecular. Em tecidos de plantas não

fotossintéticas, peróxido de hidrogênio e superóxido são produzidos pela mitocôndria e microsomas isoladas. Concentrações de tais radicais aumentam durante a germinação de sementes de soja, associadas a um aumento da taxa de respiração (Puntarulo et al., 1991; Simontacchi e Puntarulo, 1992), mas a evidência direta da formação de peróxido induzido pela dessecação, relacionada à perda de tolerância à dessecação, ainda não existe. Em sementes de milho, germinando, Leprince et al. (1992), mostraram uma correlação negativa entre a taxa de respiração e tolerância à dessecação e uma correlação positiva entre a respiração e o acúmulo de um radical livre estável. Eles sugeriram que o desenvolvimento da respiração na mitocôndria poderia contribuir para a perda de tolerância à dessecação. A dessecação de mitocôndria, respirando ativamente, pode desviar o transporte de elétrons da cadeia respiratória para iniciar danos peroxidativos nas membranas. Em radículas secas de milho, intolerantes à dessecação, o prejuízo no transporte de elétrons mitocondrial foi significativo na desidrogenase NAD(P)H do complexo "I" e na oxidase do citocromo "c" (complexo I:V) (Leprince, 1992) e a capacidade de respiração-foi totalmente perdida, contrastando, acentuadamente, com material tolerante à dessecação, no qual a entrada de oxigênio foi reativada na reidratação. A relevância da respiração sobre a sensibilidade à dessecação durante maturação de sementes ortodoxas e recalcitrantes não foi avaliada. Ela é, todavia, digna de nota já que Rogerson e Matthews (1977), mostraram que, em sementes de ervilha de jardim, em desenvolvimento, a aquisição de tolerância à dessecação foi acompanhada por uma queda na taxa de respiração coincidente com a secagem na maturação, enquanto a respiração foi mantida completamente no desenvolvimento de sementes recalcitrantes de *Avicennia marina* (Farrant, Pammenter e Berjak, 1992). Portanto, altas taxas de respiração podem ser um fator adicional, associado à sensibilidade à dessecação.

Além das alterações em membranas lipídicas, mudanças qualitativas e quantitativas em proteínas associadas às membranas têm sido relacionadas a injúrias induzidas por dessecação, embora os dados sejam escassos. Após dessecação, foi observado um decréscimo no conteúdo de proteínas das frações subcelulares e microssomais, de eixos sensíveis de soja (Senaratna, McKersie e Borochoy, 1987). Além disso, mudanças qualitativas detectadas com o uso de um tiol específico, prova fluorescente, indicaram que a dessecação letal resultou em uma perda de grupos tiol de proteínas da membrana de frações macrossomais (Leprince, Hendry e McKersie, 1993).

Concluindo, pode-se propor que injúrias de membranas, por dessecação, são mediadas por um ataque oxidativo, que promove de-esterificação fosfolipídica e/ou peroxidação de lipídios. Prejuízos na respiração podem agir como uma fonte importante de oxigênio ativado. Severos ataques oxidativos poderiam resultar em perda de organização da membrana, com conseqüente perda de compartimentalização celular. Portanto, deduz-se que tolerância à dessecação requer reduzida produção de radicais livres (baixa taxa de metabolismo), e também um acúmulo de removedores de radicais livres (scavengers) (Leprince, Hendry e McKersie, 1993).

### **2.3.6. Mecanismos de proteção**

#### **a) proteção por defesa antioxidante**

Vários processos antioxidantes ocorrem em sementes ortodoxas e tecidos vegetativos tolerantes à dessecação (Hendry, 1993; Leprince, Hendry e McKersie, 1993; Oliver e Bewley, 1997). O papel dos processos antioxidantes na limitação de danos durante a secagem foi revisado por McKersie (1991) e Smirnof (1993), Vertucci e Farrant (1995), os quais sugeriram, que é particularmente na variação de conteúdo de água, correspondendo a potenciais hídricos de -11 a -3 MPa (água tipo 3), que os eventos metabólicos

desordenados resultam na geração das primeiras ondas de radicais livres, embora o limite superior seja maior. Desta forma, é durante os estádios iniciais da fase de secagem, durante a maturação, que os sistemas de limpeza teriam máxima eficiência, sementes ortodoxas, embora pareça haver poucos estudos diretamente relacionados a esta questão (ver, por exemplo Arrigoni et al., 1997). Em tecidos vegetativos, a remoção de produtos citotóxicos, resultantes dos eventos oxidativos, é considerada de principal importância para sobrevivência ao estresse hídrico. Em tecidos tolerantes, os genes que codificam os sistemas enzimáticos tomam-se ativados na presença desses citotóxicos. (Ingram e Bartels, 1996). Na planta de ressurreição *Craterostigma plantagineum*, um inibidor da lipoxigenase (a sua atividade resulta na formação de hidropemxido de lipídios) acumula-se nas folhas durante a dessecação (Bianchi et al., 1992), e em *C. wilmsii* e *Xerophyta viscosa*, a atividade da peroxidase ascorbato aumenta durante a desidratação e a da SOD e glutianona redutase aumenta durante a reidratação (Sherwin e Farrant, 1998).

O dano metabólico induzido, associado com a desidratape-de sementes recalcitrantes, foi pesquisado por Côme e Corbineau (1996). A geração de radicais livres como uma consequência do metabolismo desorganizado, subsequente a um espectro de lesões letais, pode ser um dos principais fatores de injúrias, durante a desidratação relativamente lenta de sementes recalcitrantes, (Côme e Corbineau, 1996). As sementes recalcitrantes (ou seus embriões) parecem possuir mecanismos antioxidantes (Hendry et al., 1992; Finch-Savage et al., 1993; Finch-Savage, Hendry e Atherton, 1994). No entanto, esses mecanismos protetores podem tomar-se prejudicados sob condições de estresse hídrico (Smith e Berjak, 1995); certamente eles são inefetivos em termos de proteção contra danos de dessecação. Durante a desidratação dos eixos, da espécie temperada recalcitrante *Quercus robur*, um rápido acúmulo de radicais livres foi acompanhado pela diminuição da atividade das enzimas antioxidantes

e de um declínio no conteúdo de a-tocoferol (Hendry et al., 1992; Finch-Savage et al., 1993). O acúmulo de radical livre estável tem também acompanhado a desidratação nos eixos desta espécie, assim como de *Castanea sativa* e *Aesculus hippocastanum*, ambas são espécies temperadas que produzem sementes recalcitrantes (Finch-Savage, Hendry e Atherton, 1994). A geração de um ânion superóxido (um radical livre) acompanhando danos na membrana, foi registrada para a espécie altamente recalcitrante *Shorea robusta* (Chaitanya e Naithani, 1994). Para as sementes da gramínea aquática *Zizania palustris*, a formação de hidroperóxido acompanhou a desidratação, em todas as temperaturas testadas, embora maiores produções, tenham sido registradas em 37 °C do que a 25 °C e o teste de tetrazólio tenha indicado que a viabilidade foi severamente afetada pela perda de água em alta temperatura (Ntuli et al., 1997). Por outro lado, em sementes de *Ginkgo biloba*, nem a desidratação rápida e nem a lenta afetaram a atividade da ascorbato peroxidase ou o conteúdo de ácido ascórbico, embora outros sistemas antioxidantes não tenham sido investigados.

As evidências apresentadas acima para algumas espécies, as quais apresentam diferentes graus de comportamento recalcitrante, dão suporte ao ponto de vista de que os radicais livres são gerados durante a desidratação e que os sistemas antioxidantes tornam-se altamente inefetivos nessas condições. Assim, a incapacidade de os tecidos das sementes sensíveis à dessecação efetuarem adequada proteção contra a destruição dos eventos oxidativos, conseqüente do metabolismo desorganizado durante a desidratação, pode ser considerada como uma das principais causas da sensibilidade à dessecação (Leprince, Hendry e McKersie, 1993).

#### **b) proteção por açúcares**

Em relação a alguns dos sintomas de injúria induzida por dessecação, muitas pesquisas evidenciam que a tolerância à dessecação está também relacionada à proteção por açúcares que promovem a estabilização de lípidos e

proteínas e contribuem para a formação de vidros. Os estudos relativos à função dos açúcares na tolerância à dessecação, resultaram de pesquisas anteriores, em *Artemia*. Foi verificado que a sobrevivência de cistos de *Artemia* estava associada à síntese de trehalose durante a dessecação, e à degradação deste açúcar durante a reidratação (Madin e Crowe, 1975). Trehalose é um dissacarídeo não-reduzido de glicose, que constitui mais de 20% do peso seco de cistos de *Artemia*. Pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de conhecer os efeitos da dessecação sobre modelos de membranas e a função protetora de diferentes açúcares. Com este propósito, foram empregados diferentes tipos de modelos de membrana, incluindo vesículas de retículos sarcoplasmáticos transportadores de Ca, e lisosomos (Crowe et al., 1988). A trehalose pode prevenir danos à membrana-modelo, uma vez que, quando presente, a fase de transição verificada durante a desidratação ocorreu em menor temperatura de transição ( $T_m$ ) da fase lipídico.

Algumas pesquisas (Crowe et al., 1987, 1988; Hoekstra, Crowe e Crowe, 1990), têm confirmado que dissacarídeos interagem com lipídios por meio de ligações de hidrogênio do grupo  $-OH^-$  com os grupos polares da cabeça dos fosfolipídios.

Quando o DPPC (“dipalmitophosphatidilcolina”) é submetido ao espectro infra vermelho, a região de suas cabeças polares apresentam significativas alterações, em função do grau de hidratação do fosfolipídeo. A frequência vibracional, correspondente a área assimétrica do fosfato é cerca de  $1.260\text{ cm}^{-1}$  em DPPC seco. Adições de água decrescem a frequência vibracional desta banda para  $1.230\text{ cm}^{-1}$ , devido à ligação do hidrogênio do fosfato com moléculas de água. Quando o DPPC é seco na presença de trehalose, essa banda é estendida, porém mantém-se em torno de  $1.230 - 1.240\text{ cm}^{-1}$  (Crowe et al., 1988). Em razão das mudanças na vibração do fosfato na presença de DPPC, alterações nas bandas correspondentes aos grupos  $-OH$  de trehalose (entre

1.400 e 1.300  $\text{cm}^{-1}$ ) foram registradas em um ponto onde foi difícil detectá-las (Crowe, Crowe e Chapman, 1984). Ligações de Hidrogênio entre o grupo -OH da trehalose e a cabeça do grupo fosfato dos fosfolípidios, poderiam explicar essas observações.

O recente uso de carboidratos derivativos, que são ancorados parcialmente dentro da bicamada de lípidios e parcialmente fora, envolvendo a matriz, permite uma maior precisão na avaliação da associação de carboidratos com a bicamada. Usando derivativos que consistem de resíduos de maltosil ligados covalentemente para TEC (Trietoxcolesterol), Goodrich et al. (1991) estudaram alterações nas propriedades físicas de lípidios em DPPC seco, na presença de TEC e maltosil-TEC. A adição de maltosil-TEC estabilizou a bicamada de DPPC/TEC de forma similar à trehalose, reforçando o mecanismo proposto da interação entre trehalose e a bicamada de lípidio.

Stranss e Hauser (1986), mediram a estabilização de fosfatidil de lipossomos-congelados-secos por uma mistura de sacarose e  $\text{Eu}^{3+}$  (Európio, PA. 151,96), um cátion conhecido por formar uma ponte iônica específica com o fosfato dos fosfolípidios. Quando foram adicionados mais de 5mM de íons  $\text{Eu}^{3+}$  na preparação, a estabilização dos lipossomos por sacarose decresceu, sugerindo competição entre sacarose e  $\text{Eu}^{3+}$ . Estes autores concluíram que a sacarose provavelmente atuava ligada e inserida entre os sítios de fosfato.

Usando modelos de técnicas computadorizadas, Gaber, Chandrasekhar e Pattabiraman. (1986), tiveram sucesso mostrando modelos precisos de interação lípidio-açúcar, os quais levaram em conta os dados descritos acima e a dinâmica conformacional e molecular. O melhor modelo descreve uma ponte constituída de três ligações hidrogênio entre três grupos -OH de uma molécula de trehalose com dois oxigênios do fosfato não esterificado de uma molécula fosfolipídica e um oxigênio de uma segunda molécula de fosfolípido adjacente.



A trealose não é detectada em sementes (Kuo, Vanmiddlesworth e Wolf, 1988; Koster e Leopold, 1988, Leprince, Bronchart e Deltour, 1990). Todavia, outros açúcares solúveis, como sacarose, glicose e oligosacarídeos, estão presente em altas quantidades e podem assumir a mesma função protetora de membranas, como a descrita para trehalose (Crowe et al., 1988). Existem consideráveis variações entre açúcares, em suas capacidades para atuarem como agentes protetores. A trehalose é considerada o melhor agente protetor, seguida por um grupo de dissacarídeos que inclui maltose, sacarose, lactose, rafinose, além de monossacarídeos. Porém, inositol é considerado um agente pouco efetivo (Crowe et al., 1987). Diversas publicações, com conclusões semelhantes, enfatizam que o efeito da estabilização relativa dos açúcares provavelmente varia com a composição dos lipídeos das membranas (Crowe, Crowe e Chapman, 1985; Hoekstra, Crowe e Crowe, 1990).

Os efeitos protetores de açúcares, durante dessecação, também incluem estabilização de proteínas. Por exemplo, a atividade de três enzimas (glicoamilase, celulase e glicose oxidase), que contêm resíduos de carboidratos estabilizando suas estruturas terciárias, não foi afetada por desidratação (Darbyshire, 1974). Quando 70% dos carboidratos foram removidos por oxidação peroxidativa, a subsequente desidratação causou a perda de 80% da atividade das enzimas, o que não aconteceu quando as enzimas oxidadas foram desidratadas na presença de Dextran T500, sugerindo uma proteção por carboidratos, contra desidratação.

Mais recentemente, um amplo estudo foi desenvolvido para caracterizar a interação proteína-açúcar em tecidos desidratados (Carpenter, Crowe e Crowe, 1987 e Carpenter, Crowe e Arakawa, 1990). Usando fosfofrutoquinase (PFK), uma enzima extremamente lábil quando congelada seca, Carpenter, Crowe e Crowe (1987), conseguiram sua estabilização usando alguns açúcares e cátions bivalentes, até 500 mM. Os dissacarídios sacarose, maltose e trehalose, foram

agentes muito efetivos para estabilização, mesmo sem  $Zn^{2+}$ . Todavia, os monossacarídeos galactose e glicose, somente foram efetivos na presença de 100 - 200 mM de  $Zn^{2+}$ : Notou-se também que açúcares crioprotetores como glicerol inositol, prolina e glicina não ofereceram proteção durante o congelamento seco, sozinhos ou com  $Zn^{2+}$  (Carpenter, Crowe e Crowe, 1987). Usando espectrometria infra-vermelha, Carpenter, Crowe e Arakawa, (1990), observaram que a trehalose substitui moléculas de água por ligações de hidrogênio com grupos polares da proteína seca. Além disso, um processo caótico de formação de ligações de hidrogênio dentro da proteína seca foi removido, prevenindo assim, desestruturações e agregações durante a reidratação.

Diversos resultados de pesquisas correlacionam a aquisição ou perda de tolerância à dessecação com açúcares solúveis durante a maturação de sementes de mostarda (Fischer et al., 1988), milho (Chen, 1990) e soja (Blackman, Obendorf e Leopold, 1992) e durante a germinação de ervilha, soja e milho (Koster e Leopold, 1988), e *Brássica campestris* (Leprince, 1992; Leprince et al., 1992). De acordo com estes dados, os tecidos tolerantes são caracterizados por apresentarem alta quantidade de sacarose e oligossacarídeos (estaquiose ou rafinose (Kuo, Vanmiddlesworth e Wolf, 1998), e por ausência ou pelo menos muito baixas quantidades de monossacarídeos redutores, como a galactose, manose, glucose e frutose. Ao contrário, os tecidos intolerantes à dessecação são geralmente dotados de altas concentrações de monossacarídeos e baixas concentrações de dissacarídeos e sacarídeos maiores. As sementes de um mutante de *Arabidopsis* deficiente em ABA, têm pouca capacidade de ganhar tolerância à dessecação durante a maturação; um suprimento de 3% de sacarose e 10 - 100  $\mu$ M de ABA, em embriões jovens, colhidos 12 dias após a polinização, foram suficientes para desenvolver tolerância. Entretanto, a combinação de ABA e glicose foi menos eficiente (Meurs et al., 1992). Da

mesma forma, através destas correlações em embriões zigóticos, Anandarajah e McKersie (1990), demonstraram que os embriões somáticos de alfafa ganharam tolerância à dessecação, quando incubados na presença de altas concentrações de sacarose. Esses resultados confirmam os dados biofísicos dos modelos experimentais, sugerindo que açúcares conferem tolerância à dessecação, basicamente em função de que, quando em condições secas, substituem a água. Entretanto, diversas linhas de evidências sugerem que o papel dos açúcares pode não ser atribuído a um modelo unificado de proteção, aplicável a todo tipo de sementes.

Pela alta concentração e habilidade para induzir tolerância *in vitro*, a sacarose era tida como o maior agente protetor. Em sementes imaturas de soja, durante um tratamento de secagem lenta, *in vitro*, que induziu tolerância à dessecação, foi encontrado um aumento na concentração de estaquiose e rafinose, e um decréscimo na concentração de sacarose (Blackman, Obendorf e Leopold, 1992). Neste sistema, a sacarose não foi o fator limitante da tolerância à dessecação. Assim, parece que a presença de oligossacarídeos podem complementar a sacarose na sua função de conferir proteção contra danos induzidos por dessecação.

Em contraste, com as predições obtidas por meio de membranas-modelo, a glicose parece não ser um protetor de membranas eficiente. Três teorias sugerem esta discrepância:

1- De acordo com Koster e Leopold (1988), a glicose participaria, *in vivo*, na reação de Maillard, induzindo a inativação de proteínas e danos no DNA. A reação de Maillard, também conhecida como a reação caramelização em Ciência de Alimentos, é uma glicolização caótica e complexa entre grupos amino e carbonil.

2 - Monossacarídeos são agentes pouco eficientes para promover a formação de vidro. Koster (1991), demonstrou que a formação de vidro foi

dependente de específicas combinações de açúcares. Uma mistura de açúcares, semelhante à encontrada em eixos de soja tolerantes à dessecação (isto é: 85:15, rafinose:sacarose), entra num estado vitrificado, à temperatura ambiente, durante a dessecação, enquanto que uma mistura semelhante àquela encontrada em eixos intolerantes à dessecação (75:25 glicose:sacarose), somente forma vidro abaixo de 0°C. Em sementes recalcitrantes de castanha, os açúcares de reserva são caracterizados pela grande quantidade do monossacarídeo manose, que é ausente em sementes ortodoxas (Brunni e Leopold, 1992). Contudo, estes autores não puderam detectar nenhum sinal indicativo da transição para vidro, pela técnica da despolarização, simulada termicamente, em conteúdo de água abaixo de 20%, sugerindo a ausência de dominância de vidro em sementes recalcitrantes de castanha, à temperatura ambiente.

3 - Leprince et al. (1992) encontraram uma correlação significativa entre o aumento da taxa de respiração e o aumento da concentração de monossacarídeos, em radículas de milho germinando, sugerindo que a segunda poderia regular a primeira. Esta correlação deve ter alguma significância na perda de tolerância à dessecação, porque os prejuízos à tolerância, causados pela respiração, podem ser devidos à lixiviação de elétrons da cadeia respiratória, o que iniciaria um dano peroxidativo letal (Leprince, 1992).

Em sementes de café, entre os mono e oligossacarídeos, o açúcar encontrado em maior quantidade no grão verde de café é a sacarose e seu teor pode variar de 1,9 a 10% na matéria seca, sendo considerado como açúcar não redutor no cálculo final (Lockhart, 1957; Feldman, Ryder e Kung, 1969 e Navellier, 1970). Os monossacarídeos livres mais encontrados são a glicose e a frutose, sendo que, na maioria dos trabalhos publicados, são calculados como açúcares redutores e variam de 0 a 5%, segundo Lockhart (1957) e Leite (1991). Os açúcares totais do grão de café situam-se em torno de 8%, segundo Navellier (1970) e na faixa de 5 a 10% segundo Prete (1992). O teor de açúcar pode estar

diretamente relacionado com condições climáticas das regiões onde é produzido o café (Chagas, Carvalho e Costa, 1996).

Concluindo, uma quantidade substancial de evidências apoiam a visão de que açúcares solúveis agindo como “substitutos de água” podem desempenhar um papel-chave na tolerância à dessecação em sementes, por proteger as membranas na fase de transição de lipídeos, induzida pela dessecação, e também proteger as proteínas, e/ou por formar vidro a temperaturas fisiológicas. Todavia, diversos autores relatam uma alta concentração de sacarose e oligossacarídeos, durante o desenvolvimento de sementes recalcitrantes (Farrant, Pammenter e Berjak, 1993), sugerindo que a capacidade de tolerar desidratação não é somente por causa da presença daqueles sacarídeos. Entretanto, os efeitos protetores dos açúcares, in vivo, são, provavelmente, mais complexos que os observados nestes modelos de sistemas (Leprince, Hendry e McKersie, 1993).

### **2.3.7. Proteção do citoplasma em células de sementes**

Até agora, foi discutido o papel desempenhado pelos açúcares na proteção de membranas celulares e proteínas, bem como da presença de água não-congelável em relação à tolerância à dessecação. Entretanto, um mecanismo de proteção não pode ser centrado somente em membranas e proteínas. O citoplasma deve também ser protegido. De fato, como citado por Leopold (1990), a dessecação extrema do citoplasma poderia resultar na cristalização de proteínas e solutos, que indubitavelmente poderia induzir severas injúrias às células. A este respeito, Burke (1986), sugeriu uma hipótese atrativa e relevante para proteção do citoplasma: vitrificação ou formação de vidro dentro do citoplasma, isto é, a criação de uma solução líquida, com propriedades de viscosidade de um sólido, que não forma cristais mesmo em temperaturas muito baixas e com estabilidade em uma larga faixa de temperatura (Koster, 1991).

Os benefícios da vitrificação, para uma célula enfrentar a dessecação, são vários. Pela alta viscosidade, a difusão molecular é impedida, então, as reações químicas são fortemente diminuídas, ou impedidas. Consequentemente, os processos degradativos são prevenidos, e a quiescência e dormência são confirmadas. A fase vidro ocupa o espaço, previne o colapso celular após a dessecação (Burke, 1986), pode reter solutos caóticos, prevenindo então sua alta concentração, pode evitar alterações no poder iônico ou pH, e pode prevenir a cristalização dos solutos do citoplasma (Leopold, 1990). Como o vidro não tem transição térmica abaixo da TG, o citoplasma vitrificado tolera temperaturas extremas (- 200 a + 900°C) e previne o congelamento da água (Burke, 1986). O vidro pode permitir a ocorrência de banco de Hidrogênio na interface entre o vidro e os sítios de ligações fortes dos componentes da célula (Koster, 1991), e pode reversivelmente, fundir-se na fase líquida, após a adição de água, sem causar injúria celular (Brunni e Leopold, 1991).

Existem evidências de que no citoplasma de sementes ortodoxas secas existe o estado vitrificado. Usando DSC (differential scanning calorimetry) em embriões de milho, Williams e Leopold (1989), produziram termogramas DSC de material desengordurado, numa faixa de umidade sugestiva de que em temperaturas fisiológicas os embriões com umidade menor que 20% estavam no estado vítreo. Isto foi também confirmado por Bruni e Leopold (1991), usando técnicas EPR (electron paramagnetic resonance). Além disso, eles mostraram que o citoplasma de eixos intolerantes ou mortos por calor, não estavam vitrificados, mas compostos de água congelável, já que seu TG (Temperatura de mudança de fase para vidro) era quase 0°C, independente do teor de água. Essas informações também sustentam o envolvimento da água limitrofe não congelável na tolerância à dessecação.

Açúcares são acumulados acima de 20% em organismos anidrobióticos (sementes, pólen, nematóides, leveduras), e são suspeitos de serem solutos que

promovem a vitrificação do citoplasma, em temperatura ambiente. Williams e Leopold (1989), relataram que os resultados relativos à vitrificação em embriões de milho apresentava tendência idêntica aos dados térmicos para sacarose sozinha. Exames de termogramas de soluções de açúcares em proporções equivalentes àquelas de células tolerantes à dessecação indicaram que a formação de vidro foi possível em temperatura ambiente (Koster, 1991), suportando a hipótese de que a formação de citoplasma vítreo é específica em tipos tolerantes à dessecação e que açúcares desempenham um importante papel em sua formação.

Foi feita recentemente uma comparação sistemática da organização subcelular e da atividade metabólica, durante o desenvolvimento das sementes de três espécies que alcançam diferentes níveis de tolerância à dessecação: *Avicennia marina*, uma espécie tropical altamente recalcitrante, *Aesculus hippocastanum*, espécie temperada moderadamente recalcitrante e *Phaseolus vulgaris* de sementes ortodoxas (Farrant, et al., 1997).

A região distal do hipocótilo de *A. marina*, onde os primórdios meristemáticos da raiz estão situados, sofreram danos letais com conteúdos de água inferiores a  $0.5 \text{ g.g}^{-1}$  com base na massa seca (33% com base em massa fresca (wmb)). Durante o desenvolvimento destas sementes, o volume vacuolar aumentou uniformemente até ocupar quase 60% e 90% do volume celular do eixo e cotilédones, respectivamente (Farrant et al., 1997). Em adição, nenhuma reserva insolúvel foi acumulada nos vacúolos dos tecidos, sendo essas reservas apenas açúcares solúveis (Farrant, Pammenter e Berjak, 1992b). Eixos maduros de *A. hippocastanum* podem ser desidratados para conteúdos de água variando de  $0.42\text{-}0.25 \text{ g.g}^{-1}$  (30-20%, wmb). Durante o desenvolvimento, os vacúolos ocuparam uma pequena proporção do volume intracelular, constituindo uma fração muito pequena nas células do eixo, na maturidade. Em sementes ortodoxas de *P. vulgaris*, antes da secagem na maturação, os embriões

tolerariam conteúdos de água como  $0.08 \text{ g.g}^{-1}$  (9% wmb). O volume vacuolar foi reduzido para uma proporção insignificante nas células do eixo, quando as sementes atingiram a maturidade, e dentro das células cotiledonares, os vacúolos restantes tornaram-se cheios de um material amorfo, que é presumivelmente uma proteína insolúvel (Farrant et al., 1997). Para estas três espécies, o volume vacuolar nas sementes maduras foi diretamente correlacionado e, o acúmulo de reservas insolúveis, inversamente correlacionado com o grau de sensibilidade à dessecação, de acordo com as sugestões de Iljin (1957).

### 2.3.8. Expressão gênica em relação à tolerância à dessecação

Após os avanços em biologia molecular, tem havido, durante os últimos anos, uma explosão de estudos sobre a expressão gênica e a regulação em resposta à severa restrição hídrica, durante a maturação da semente. Alterações em proteínas e padrão de mRNA, durante os últimos estádios da maturação e o início da tolerância à dessecação, têm sido pesquisados em diversas espécies de sementes, por exemplo, embriões de cevada (Bartels, Singh e Salamine, 1988), embriões de milho (Bochicchio et al., 1988) e sementes de soja (Blackman et al., 1991). Diversos grupos de pequenos polipeptídeos têm sido correlacionados temporariamente, com a transição de intolerância para tolerância. Tratamentos exógenos com ABA, que regulam a aquisição de tolerância à dessecação, simularam o aparecimento destas proteínas em embriões cultivados “in vitro”.

A dessecação de sementes em desenvolvimento é caracterizada pela acumulação de um grupo particular de mRNA's e proteínas relacionadas (chamadas “Late Embryogenesis Abundant”). LEA mRNA's aparecem em tecidos embrionários, no começo da dessecação e tornam-se as mais prevalentes espécies de mRNA, no estado seco, declinando progressivamente várias horas após a embebição da semente (Baker, Steele e Durs, 1988; Goldberg, Barker e Perez-Grau, 1989; Shiver e Mundy, 1990; Galau, Hughes e Dure, 1991;



Robertson e Chandler, 1992). A regulação dos genes LEA parece ser principalmente transcricional, em que o ABA desempenha um importante papel (Baker, Steele e Durs, 1988; Williamson e Quatrano, 1988; Robertson e Chandler, 1992), embora em alguns casos, a regulação pós-transcricional seja relatada (Williamson e Quatrano, 1988). Algumas LEA proteínas podem ser induzidas por uma dessecação prematura ou por tratamentos que afetam o conteúdo de água da célula (Mundy e Chua, 1988; Bostock e Quatrano, 1992). Elas são largamente distribuídas em sementes de plantas superiores; diversos grupos de genes produtores de LEA têm sido detectados e caracterizados num grande número de espécies de sementes, incluindo cevada, cenoura, algodão, milho, ervilha, arroz, girassol, tomate e trigo (Dure et al., 1989; Skriver e Mundy, 1990; Lane, 1991; Almoguera e Jordano, 1992; Robertson e Chandler, 1992). Elas têm sido classificadas em três diferentes grupos, de acordo com a sequência protéica apresentada. O Grupo I inclui o gen Em (trigo), o grupo II, o RAB e genes desidratantes, e grupo III vários genes tais como: DC3 e DC8 (cenoura); gene pHVal (cevada) e MLG3 (milho) (Dure et al., 1989; Robertson e Chandler, 1992; Thomann et al., 1992). A presença de blocos de sequência altamente conservados sugerem que as LEA proteínas desempenham um papel fundamental durante o processo de desidratação/hidratação em sementes (Galau, Hughes e Dure, 1986; Baker, Steele e Durs, 1988).

Uma ligação similar entre estresse por dessecação e aparecimento de mRNA e proteínas específicas também foi relatada por Bartels et al., (1990) e Piatkowski et al., (1990), em plantas de ressurreição (*Craterostigma plantagineum*). Várias famílias de genes parecem ser rapidamente ativadas em folhas de calus indiferenciados de *Craterostigma plantagineum*, após dessecação, tratamento com ABA ou estresse osmótico. Algumas das proteínas vindas do cDNA isolado de folhas secas mostraram sequências homólogas a algumas das LEAs proteínas de sementes de algodão (Piatkowski et al., 1990).

Além do fato de que genes indutores de dessecação parecem ser ativados rapidamente por ABA exógeno, um aspecto notável é que o produto gênico tem propriedades estruturais e funcionais semelhantes. Suas caracterizações por análise de seqüência e predição estrutural (Baker, Steele e Durs, 1988; Dure et al., 1989; Piatkowski et al, 1990; Lane, 1991), indicam que eles são ricos em glicina e outros aminoácidos hidrofílicos e têm poucos resíduos hidrofóbicos. Essas proteínas são, dessa forma, facilmente solúveis em água, com alto nível de hidratação e provavelmente, localizadas exclusivamente na fração citosol. Elas geralmente são formadas por segmentos aleatórios, forma de espiral ocasionalmente com uma longa  $\alpha$ -hélice amplificada, que deve servir como uma base para ordenar a estrutura superior. Elas são solúveis na fervura e não têm estado determinado termodinamicamente. Com base nesses dados, diversos autores sugerem que tais proteínas desempenham um papel estrutural como protetoras à dessecação (McCubbin e Kay, 1985; Baker, Steele e Durs, 1988; Lane, 1991). Por exemplo, LEA-D11 e D113 de algodão são colocadas como desempenhadoras de um papel, em sinergismo com açúcares solúveis na inibição da cristalização do citoplasma e na preservação da superfície da membrana, enquanto D29 e GD29 prenderiam ions caóticos (Baker, Steele e Durs, 1988). Papel semelhante tem sido sugerido para a proteína Em, que poderia substituir uma matriz de água ligada em sítios estratégicos e estabilizar estruturas citoplasmáticas, durante a dessecação de embriões de trigo (McCubbin e Kay, 1985; Lane, 1991). Entretanto, a expressão padrão dos genes LEA parece ser complexa e o papel de seus produtos na tolerância à dessecação não estão claramente resolvidos ainda. Bradford e Chandler (1992), relatam que eixos embrionários de semente de *Zizania palustris* acumularam esse tipo de proteína durante a desidratação a 5°C, tratamento que é prejudicial à sobrevivência deles. Os autores sugerem que a presença de tais proteínas, sozinhas, não era suficiente para evitar as injúrias induzidas por dessecação.

Blackman et al. (1991), obtiveram uma conclusão semelhante, mostrando **que** proteínas estáveis ao calor foram induzidas e acumuladas durante a maturação “in vitro” de embriões de soja, sob condições de alta umidade relativa, tratamento este **que** preservou a intolerância à dessecação deles. Ademais, comparações de bases de cDNA, hibridização de mRNA “in situ” e análise “northern blot” têm demonstrado expressão gênica semelhante em tecidos vegetais **que** não são capazes de tolerar a dessecação após estresse hídrico ou osmótico, ou aplicação de ABA exógeno (Baker, Steele e Durs, 1988; Gomez et al., 1988; Mundy e Chuya, 1988; Skiver e Mundy, 1990). Por exemplo, clones de cDNA de plantas de ressurreição, secas, têm diversas seqüências homólogas **que** predizem propriedades estruturais semelhantes às proteínas isoladas de raízes de cevada, **que** sofreram estresse hídrico e de plântulas velhas de milho. Embora as proteínas desidrinas de RAB21 tenham sido encontradas em sementes de diversas espécies, elas também se acumularam em raízes, folhas, caules ou culturas em suspensão de plantas maduras, após tratamento com ABA e NaCl (Mundy e Chua, 1988; Bostock e Quatrano, 1992). Similarmente, a expressão do gene Em aumentou durante a maturação de embriões de milho e trigo, e também em tecidos vegetativos expostos a ABA ou estresse osmótico (Hetherington e Quatrano, 1991); adicionalmente, essa expressão foi detectada em suspensão de cultura de arroz, após tratamento com ABA, concentrações saturadas de NaCl e dessecação para 12% de conteúdo de água (Bostock e Quatrano, 1992). Em algumas espécies, a simples retirada do embrião resultou no acúmulo de LEA mRNA (Galau, Jakobsen e Hughes, 1991). Em sementes de girassol, Almonguera e Jordano (1992) relataram uma acumulação coordenada de LEA e mRNA's de proteínas resistentes ao calor, com baixo peso molecular, sugerindo um mecanismo comum de regulação destes genes. Isto tem sido usado para renomear todas essas proteínas com a sigla WSP (Water-stress proteins), cuja indução de síntese seria similar à das proteínas resistentes ao calor (Dure et

al., 1889). **Os** genes WSP parecem corresponder aos genes cujas expressões são comandadas por déficit hídrico ou algum tratamento que afete o potencial hídrico da célula, tais como **ABA**, estresse hídrico ou salino (Baker, Steele e Durs, 1988). Investigações concernentes aos papéis bioquímicos e fisiológicos que algumas proteínas **LEA** podem desempenhar em tecidos embrionários de sementes precisam, entretanto, ser ordenadas urgentemente, para o entendimento de seus papéis na tolerância à dessecação.

A identificação de **LEA's** proteínas é realizada mediante um protocolo no qual a purificação é conseguida por tratamento com altas temperaturas, considerando que as proteínas extremamente solúveis em água como as **LEA's**, geralmente **são** solúveis em altas temperaturas, facilitando a precipitação das proteínas hidrofóbicas. (Russouw et al., 1995; Baker, Steele e Durs, 1988; Blackman et al., 1991; Jepson e Close, 1995).

Russouw et al. (1997), utilizando embriões de ervilha (*Pisum sativum*) concluíram que a proteína extraída por tratamento com alta temperatura (80°C por 10 minutos), era uma **LEA** proteína do grupo I e que sua conformação não foi afetada pela exposição à alta temperatura.

#### 2.4. Condicionamento fisiológico de sementes

O estudo da curva de embebição é de suma importância, especialmente, para o desenvolvimento de técnicas de pré-germinação que buscam melhorar a qualidade fisiológica das sementes. Isso porque, o ponto em **que** ocorre a reversão do processo de embebição, sem acarretar prejuízos ao embrião, varia também conforme a espécie. Trata-se do princípio básico da técnica de condicionamento osmótico, **que** consiste em permitir que as atividades metabólicas pré-germinativas ocorram, mas sem **que** haja a emergência da radícula (Heydecker e Higgins, 1978; Bradford, 1986). Em sementes de cafeeiro Camargo (1998), concluiu que à embebição segue o padrão trifásico, que a fase I

foi completada 144 horas após o início da embebição e que a fase III iniciou-se 228 horas após a embebição. O padrão trifásico de absorção de água proposto por Bewley e Black (1994) tem satisfeito em grande parte os resultados dos estudos sobre curva de embebição com sementes de diferentes espécies. Trabalhando com sementes de algodão, Menezes (1996) concluiu que tanto nas sementes com linter como nas sem linter o padrão trifásico foi obtido, embora as fases I e II da curva tenham se completado mais rapidamente nas que foram deslinteradas. Apesar de esses resultados terem sido divergentes dos obtidos anteriormente por Ferreira e Rebouças (1992) com sementes de amendoim, o autor justifica que, além de se tratarem de espécies diferentes, a metodologia também pode ter influenciado os resultados. Em sementes de eucalipto, Cordoba et al. (1995) observaram que independente do potencial hídrico aplicado, houve uma tendência geral de ajuste da curva de embebição ao padrão trifásico proposto por Bewley e Black (1994). Na fase I da curva, a absorção de água pela semente é relativamente rápida, ocorrendo em decorrência do potencial matricial dos diversos tecidos que compõem a semente. Esta etapa não sofre influência se a semente estiver viva, morta ou dormente, exceto quando se tratar de dormência por impermeabilidade do tegumento a água. No plano bioquímico essa fase marca o início da degradação das substâncias de reserva, de modo a garantir energia e nutrientes necessários à retomada do crescimento do embrião.

Atingidos valores de umidade entre 25 e 30 % para sementes endospermáticas e de 35 a 40 % para cotiledonares, teria início então a Fase II. Esta é uma etapa em que, aparentemente, está ocorrendo um transporte ativo das substâncias desdobradas na fase anterior, do tecido de reserva para o tecido meristemático. A absorção de água é quase nula visto que os potenciais hídricos do substrato e da semente são muito semelhantes, no entanto a duração desta fase, em relação à fase I é, geralmente mais longa. O eixo embrionário, contudo, apesar de já estar recebendo algum nutriente, ainda não consegue crescer.

Ao final da fase II, além de uma maior atividade respiratória, pode ser notado também um súbito incremento no teor de água das sementes. Inicia-se então a fase III, que, em relação a aspectos bioquímicos, o que a caracteriza é o fato de as substâncias desdobradas na fase I e transportadas na fase II serem reorganizadas em substâncias complexas, para formar o citoplasma, o protoplasma e as paredes celulares, o que em última análise permite o crescimento do eixo embrionário (germinação visível). Evidentemente, o início de uma nova fase não inibe a ocorrência da anterior; assim, quando a fase III se inicia, a semente em germinação apresenta, simultaneamente, as três fases (Powell e Matthews, 1978; Carvalho e Nakagawa, 1988; Bewley e Black, 1994).

Segundo Bewley e Black (1994) é necessário que seja atingido um grau mínimo de umidade para haver germinação, como por exemplo: 30 % para as sementes de milho, 26,5 % (arroz), 33,4 % (algodão), 29 % (mamona) e 34 % (aveia). Em sementes de cafeeiro, a fase III é alcançada quando as sementes atingem um teor de água de 55% (Lima et al., 1997 e Camargo, 1998). Dessa forma, é de se esperar uma resposta diferente de cada espécie quando sob estresse hídrico, sendo menos evidente na etapa inicial do processo de embebição.

A interação de três potenciais representa o chamado potencial hídrico das células ( $\Psi_w$ ) nos tecidos das sementes. O potencial mátrico ( $\Psi_m$ ) é resultante da capacidade de algumas matrizes, como por exemplo parede celular, amido e proteínas sofrerem hidratação e se ligarem à água. O potencial osmótico ( $\Psi_o$ ) surge em função da concentração de solutos dissolvidos no interior das células. Por último há atuação também do potencial de pressão ( $\Psi_p$ ) o qual está relacionado à força contrária exercida pela parte externa da parede celular em decorrência da turgescência causada pela entrada de água na célula, (Bewley e Black, 1994).

Geralmente o potencial de água em sementes secas é menor que o do substrato de germinação, o que faz com que a água se movimente em direção ao menor potencial, penetrando na semente (Young et al., 1983), citado por Vazquez (1995). O baixo potencial hídrico de sementes secas se dá graças às forças mátricas ( $\Psi_m$ ) que resultam de interações interfaciais com os constituintes moleculares da semente., já que no estágio quiescente, as sementes possuem baixo conteúdo de umidade e estão praticamente inativas metabolicamente (Bewley e Black, 1994). Ainda segundo os mesmos autores, os valores dos potenciais mátrico e osmótico são negativos, enquanto o potencial de pressão é uma força oposta, ou seja, positiva. Dessa forma, a soma dos três componentes do potencial hídrico é um valor negativo, à exceção de células totalmente túrgidas, em que tende a zero.

A técnica do condicionamento osmótico desenvolvida por Heydecker, Higgins e Gulliver, (1973) e Heydecker, Higgins e Turner (1975) apesar de fisiologicamente complexa, é simples em conceito. O objetivo é reduzir o período de germinação, bem como sincronizar e melhorar a emergência das plântulas, submetendo as sementes a um controle da hidratação suficiente para permitir os processos reparatórios essenciais à germinação, porém insuficientes para a ocorrência da protusão da radícula. De acordo com Heydecker, Higging e Turner (1975) a técnica do condicionamento fisiológico consiste em fazer com que a semente passe pelas fases I e II, que são preparatórias para a germinação, sem no entanto avançar para a fase III caracterizada pelo alongamento celular e emergência da radícula. Entre outros objetivos, os autores destacam a possibilidade de uma germinação mais rápida em relação às não tratadas tanto em condições de baixas como em altas temperaturas, além de um maior sincronismo da germinação conduzindo a estandes mais uniformes.

Da mesma forma, Khan (1992) afirma que *os* processos bioquímicos e fisiológicos da germinação *são* estimulados até *o* ponto em que o baixo potencial osmótico do meio de embebição impede a germinação.

As metodologias empregadas nos condicionamentos fisiológicos podem diferir entre si. **As** variações residem nas formas de fornecimento de água (equilíbrio higroscópico com a atmosfera; embebição em substrato; imersão em água pura, em soluções salinas ou osmóticas), na opção pela realização de secagem subsequente à hidratação, no número de ciclos de hidratação e desidratação, na duração do período de hidratação, no nível de hidratação e no estágio da germinação atingido durante o condicionamento (Hanson, 1973; Heydecker, 1973/74; Hegarty, 1978; Mandal e Basu, 1987).

O controle da hidratação das sementes pode ser realizado de diferentes formas. Pelo método de embebição simples, o controle da hidratação é feito mediante o equilíbrio com o vapor de água da atmosfera ou pela embebição em substrato úmido, ou ainda pode-se fazer a imersão direta em água. **Outra** forma de controle do ganho de umidade *são os* ciclos de hidratação/secagem (“hardening”) que consistem em expor as sementes a um ou mais ciclos de hidratação seguidos de secagem. Especificamente no condicionamento osmótico diferentes métodos tem sido utilizados, variando quanto ao modo de hidratação e incluem condicionamento em tambor, matricondicionamento e condicionamento osmótico. No condicionamento em tambor o controle da embebição é realizada pelo doseamento da água injetada dentro de um tambor giratório que contém as sementes, no matricondicionamento a embebição é limitada pela força matricial de uma matriz sólida que é misturada à semente e no condicionamento osmótico o controle da embebição é realizada com o auxílio de soluções osmoticamente ativas (Hilhorst e Leprince, 1998; Powel, 1998).

A imersão direta em água também pode ser um método adotado, porém exige um conhecimento detalhado da curva de embebição das sementes, pois o



teor de água e o limite máximo da curva a **ser** atingido **será** determinado pelo tempo de condicionamento. Existe ainda o risco da ocorrência de danos por embebição, apontado por Matthews e Powell (1986) como uma das principais causas fisiológicas do baixo vigor de sementes. Por outro lado, Powell e Matthews (1978) destacaram que nesse caso **os** resultados não **são** influenciados pela ação de produtos químicos. Em alguns trabalhos, verificou-se que o condicionamento em água só foi eficiente e superior a outros tipos de tratamentos quando as sementes foram postas para germinar sob condições de estresse hídrico, térmico ou salino (Guimarães, 1991) ou apenas térmico (Gomes et al, 1997).

O uso de substâncias químicas osmoticamente ativas como uma forma de controlar a entrada de água na semente tem sido amplamente difundido. Segundo Heydecker, Higgings e Turner (1975) o potencial hídrico da solução é ajustado de modo a possibilitar a ocorrência dos processos de preparação da germinação das sementes, **mas** que impeça o alongamento celular e a emergência da radícula, mesmo após semanas de contato entre as sementes e a solução.

**Os** solutos usados ou as **soluções** osmóticas com as quais as sementes vão permanecer em contato, devem apresentar algumas características. Não devem **ser** tóxicos ou causar alterações estruturais nas sementes; não devem penetrar pelo sistema de membranas das células dos tecidos das sementes; não devem **ser** metabolizados e nem estarem sujeitos às mudanças causadas por microorganismos durante o condicionamento das sementes (Bradford, 1986; Slavik, 1974; citado por Eira, 1988). Dentre **os** agentes osmóticos utilizados, incluem-se os sais ( $K_3PO_4$ ;  $KH_2PO_4$ ;  $MgSO_4$ ;  $NaCl$ ;  $KNO_3$ ), açúcares (manitol e sorbitol), polietileno glicol (PEG) e glicerol. Entretanto apenas o fato de um soluto **ser** absorvido pela semente não pode **ser** usado como único critério para sua não-utilização, outros fatores devem **ser** considerados, como sua ação

efetiva, toxidez à semente e impedimento da ocorrência da germinação (Heydecker e Coolbear, 1977). Por outro lado, para Bradford (1986) além de não penetrar no sistema de membranas das células de tecidos, o soluto não deve provocar toxidez ou alterações estruturais às sementes, além de não ser metabolizado e nem sofrer deterioração por microrganismos. No entanto, todas essas características não são encontradas simultaneamente em nenhum dos produtos atualmente utilizados em trabalhos de condicionamento osmótico de sementes (Heydecker e Coolbear 1977).

O polietileno glicol tem sido amplamente utilizado por ser um polímero de alto peso molecular, não-iônico, inerte, que não penetra pela parede celular e por não ser tóxico (Bewley e Black, 1994), embora efeitos adversos ocorram algumas vezes quando da imersão em solução de PEG, possivelmente por causa da baixa disponibilidade de oxigênio (Furutani, Zandstra e Price, 1986; Bujalski e Nienow, 1991; Mexal et al., 1975). Agitações vigorosas e adição de ar enriquecido (75% de O<sub>2</sub>) na solução de priming melhoraram a performance de sementes de cebola e cenoura (Bujalski e Nienow, 1991; Bujalski, Nienow, Petch e Gray, 1991).

O benefício do uso de sais, além do controle osmótico, é de suprir as sementes com nitrogênio e outros nutrientes essenciais durante a germinação, porém podem penetrar nas sementes e causar toxidez às plântulas. A absorção de íons da solução salina não somente influencia na quantidade de água absorvida pelas sementes (efeito osmótico), como também pode exercer um efeito negativo sobre enzimas e membranas (Frett, Pill e Morneau, 1991). Khan (1992), observou uma variação no conteúdo de umidade de sementes de beterraba, quando foram embebidas em água, ou em solução de -1,2 MPa de PEG, KNO<sub>3</sub>; NaCl; todas a 15°C atingindo respectivamente 94, 57, 84 e 87% de umidade.

Deve-se atentar também, quando soluções de polietileno glicol são usadas em papel de filtro, para a absorção de água pelo papel, concentrando a

solução de PEG, reduzindo assim o potencial hídrico da solução. **A** concentração de PEG na solução *e* a relação volume da solução/peso do papel, influenciam no processo (Hardegee e Emmerich, 1990).

Além dos solutos, outros fatores afetam o condicionamento osmótico de sementes, incluindo condições do ambiente durante o tratamento como: - temperatura; luz; disponibilidade de oxigênio; duração do tratamento; presença de microrganismos *e* secagem após condicionamento (Brocklehurst *e* Dearman, 1984; Smith *e* Cobb, 1991a; Copeland *e* McDonald, 1995).

**A** duração do tratamento é importante devendo inibir a germinação por **um** período que garanta o efeito máximo do "priming", entretanto, estendendo-se o período além do necessário pode haver a reversão dos efeitos benéficos do osmocondicionamento, efeito referido como "overpriming" (Ely *e* Heydecker, 1981).

**A** temperatura utilizada no condicionamento é geralmente aquela recomendada para a germinação da espécie tratada (Nascimento, 1998), embora alguns autores considerem que a temperatura pode influenciar-na eficiência, duração do tratamento *e* concentração ideal do soluto (Copeland *e* McDonald, 1995; Akers, Berkowitz *e* Rabin, 1987).

Luz pode ser necessário para espécies que **requerem** para ocorrência da germinação. Deve-se atentar também para um suprimento adequado de oxigênio durante o processo de embebição, proporcionando um ambiente aeróbico às sementes. Houve diferentes respostas nos tratamentos quando sementes de diversas espécies foram imersas **ou** não em solução osmótica, sendo que em condições aeróbicas, o  $T_{50}$  e a porcentagem de germinação tiveram os melhores resultados (Heydecker, Higgins *e* Turner, 1975 *e* Zheng *et al.*, 1994).

As sementes condicionadas, iniciam a embebição normalmente, cessando *esse* processo assim que entrarem em equilíbrio com o potencial osmótico da solução. Esse potencial deve **ser** pré-determinado para cada espécie

e, conseqüentemente, o conteúdo de água da semente pode ser ajustado a um nível que permita à semente a passagem por todas as fases preparatórias essenciais à germinação (fases I e II), evitando-se, contudo, alcançar a fase de alongamento celular e emergência da raiz primária (fase III), mesmo após semanas de contato entre as sementes e a solução osmótica (Heydecker, Higgins e Turner, 1975; Bewley e Black, 1994). A principal vantagem da técnica que é permitir a emissão da radícula em menor período de tempo e com maior uniformidade, tem sido comprovada por diversos estudos (Dell'aquila e Tritto, 1991; Lanteri et al., 1993). O aumento do tempo de permanência das sementes no solo contribui para o insucesso da germinação, já que fatores como: condições inadequadas de luminosidade, temperaturas sub ou supra-ótimas, presença de gases prejudiciais, condições osmóticas desfavoráveis, incidência de microrganismos, insetos, propriedades do solo, além de outras formas de estresse podem direta ou indiretamente contribuir para a deterioração das sementes (Khan et al., 1976)

No entanto, existem discordâncias entre alguns autores com relação à eficiência do tratamento em uma mesma espécie, conforme pode ser observado nos trabalhos de Vazquez (1995), Giúdice (1996) com sementes de soja. Para Heydecker e Coolbear (1977), isto se deve à grande quantidade de combinações experimentais que podem ser empregadas. É importante ressaltar que, a relação ideal entre potencial osmótico, temperatura e período de condicionamento pode ser variável segundo a espécie e cultivar (Heydecker, Higgins e Turner, 1975).

Dentro da técnica de condicionamento osmótico de sementes, um dos fatores que mais tem gerado discussão refere-se aos efeitos da secagem e do armazenamento das sementes após o tratamento. Inicialmente, a secagem foi considerada benéfica por Heydecker, Higgins e Turner, 1975 e Khan et al., (1978). Para Matthews e Powell (1986) os efeitos benéficos do condicionamento são fixados à semente pela secagem ("dry back"). Entretanto, diversos autores

detectaram **que** ela reverteu os benefícios do tratamento (Heydecker e Coolbear, 1977; Armstrong e McDonald, 1992). **A** possibilidade de envigoramento baseia-se na ação dos mecanismos de reparo celular, que atuam nas sementes durante **as** fases iniciais da germinação. **A** hipótese do reparo inclui a reorganização dos fosfolípídeos das membranas celulares, que ocorre durante a hidratação, e o reparo metabólico subsequente, como sugerem **os** trabalhos de Villiers (1973), Simon (1974) e Villiers e Edgcumbe (1975), Burgas e Powell (1984).

**O** re-arranjo estrutural das membranas, resultante da hidratação, é manifestado pela **redução** no vazamento de eletrólitos das sementes, que pode ser o fator responsável pelo aumento do vigor (Simon, 1974; Webster e Leopold, 1977).

Hanson (1973) mostrou que o efetivo envigoramento da semente ocorre no período de embebição sendo, subsequente, fixado pela secagem. Os resultados dessa técnica têm apresentado, mais expressivamente, aceleração na germinação em várias espécies (Bradford, 1986; Mandal e Basu, 1987; Dalianis, 1989; Nath, Coolbear e Hampton, 1991; Motta, 1997).

Duas hipóteses têm sido sugeridas para justificar o aumento do desempenho de sementes submetidas ao condicionamento osmótico: a restauração da integridade das membranas, perdida durante o processo de secagem **nas** sementes maduras, e o incremento na disponibilidade de metabólitos prontos para serem utilizados nos processos de germinação e de desenvolvimento inicial das plântulas. Esta seria devido ao aumento na síntese de proteína e de ácidos nucleicos, à elevação na atividade mitocondrial, com mudanças associadas à elasticidade e à viscosidade do protoplasma (Henckel, 1964; Hegarty, 1978).

**A** neutralização dos radicais livres e das reações de peroxidação dos lipídios pode, também, operar nos tratamentos de condicionamento osmóticos

(Priestley e Leopold, 1983; Dey (Pathak) e Basu, 1985; Mandal e Basu, 1987). Como os radicais livres são naturalmente produzidos durante o metabolismo da planta, particularmente em cloroplastos e mitocôndrias (Halliwell, 1987; Puntarulo et al., 1991), as plantas são bem dotadas com moléculas antioxidantes e sistemas removedores. O assunto foi revisto por Burton e Ingold (1984), Halliwell (1987), Alscher (1989), Winston (1990) e Hendry (1993). Moléculas removedoras incluem antioxidantes lipossolúveis (Tocoferol isómeros (Vitamina E),  $\beta$ -carotenos) e outros solúveis em água (ácido ascórbico (vitamina C), glutationa). Tocoferóis são antioxidantes bloqueadores da peroxidação de lípidios. As sementes contêm altas concentrações de ambos os componentes, variando em diferentes tecidos e espécies (Franzen e Haas, 1991). Os sistemas de processamento enzimático de radicais livres incluem SOD (Superóxido Desmutase), que catalisa a dismutação do superóxido ( $O_2^-$ ) em  $H_2O_2$  e  $O_2$  e aquelas enzimas que estão envolvidas na desintoxicação de  $H_2O_2$  (isto é, catalase, glutathione redutase, ascorbato peroxidase e outras peroxidases). Os sistemas enzimáticos estão provavelmente mais envolvidos em uma resposta antioxidativa inicial por neutralizar potencialmente oxigênio tóxico ativado, formado durante falta d'água.

Alguns estudos têm demonstrado a ligação entre tolerância ao estresse oxidativo, induzido por deficiência de água, e o aumento em concentrações de antioxidante em plantas fotossintéticas (Price e Hendry, 1991; Winston, 1990) mas a função protetora de antioxidantes em sementes durante a dessecação está muito menos resolvida. Estudos relativos a tal função, realizados durante a germinação de sementes, mostraram que o mecanismo protetor contra o oxigênio ativado é predominantemente enzimático. O sistema inclui SOD, catalase, peroxidase e glutathione redutase (Leprince et al., 1990, Puntarulo et al., 1991) e ascorbato peroxidase relacionada ao sistema de reciclagem do ascorbato (Cakmak, Strbak e Marschner, 1993); todas espécies mostram aumento na

atividade enzimática associada com emergência de radícula. Em milho, o metabolismo de glutatione e a atividade de SOD e peroxidase são severamente prejudicados por um tratamento de dessecação imposto em radículas germinadas, intolerantes (Leprince et al., 1990; Leprince, 1992). Um decréscimo da proteção enzimática contra o ataque oxidativo foi também associado à perda da viabilidade em sementes de castanha, durante a secagem (Hendry et al., 1992). Estes autores descreveram dois modelos distintos para a resposta antioxidativa, conforme o tecido. Na secagem de cotilédones, os mecanismos de proteção foram principalmente enzimáticos, com alta atividade da SOD e glutatona redutase; os eixos, entretanto, foram fartamente dotados de moléculas antioxidantes de membrana e moléculas antioxidantes solúveis (tocoferol e ácido ascórbico, respectivamente).

Concentrações de tocoferol em sementes de castanha decresceram durante a secagem e perda de viabilidade, sugerindo uma ligação causal entre esses dois eventos (Hendry et al., 1992). Em soja germinando, a perda da tolerância à dessecação foi associada à diminuição de antioxidantes lipossolúveis, da mesma forma que membranas microsonais foram mais susceptíveis a injúrias de dessecação induzidas pela oxidação, como observado em estudos prévios "in vitro" (Senaratna, McKersie e Stinson, 1985). Nessa consideração, Ramarathnam et al. (1986), observaram a correlação positiva entre concentrações de um antioxidante fenólico não caracterizado e a habilidade para germinação de sementes de duas cultivares de arroz, exibindo diferentes viabilidades durante o armazenamento, enquanto que tocoferóis não mostraram qualquer correlação positiva. Semelhantemente, o padrão do metabolismo de tocoferol em radículas de milho germinando não mostrou qualquer evidência convincente de que a exaustão no suprimento desse antioxidante lipossolúvel foi a causa da perda de tolerância à dessecação (Leprince et al., 1990). Os compostos fenólicos e plifenóis estão presentes em todo vegetal e compreendem

um grupo heterogêneo de substâncias com estruturas químicas relativamente simples ou complexas como os taninos (compostos fenólicos) e a lignina (Van Buren, 1970]

Ao determinar os teores de compostos fenólicos totais em grãos de café beneficiados, Carvalho, Chalfoun e Chagas (1989), encontraram teores de 8,73%, em média, em frutos cereja e 9,66% para os frutos de café de derriça.

Para Amorim e Silva (1968), os compostos fenólicos, principalmente os ácidos clorogênico e caféico, exercem uma ação protetora, antioxidante, dos aldeídos. Em virtude de qualquer condição adversa aos grãos, ou seja, uma colheita inadequada dos frutos, problemas no processamento e no armazenamento, as polifenóis oxidases agem sobre os polifenóis, diminuindo sua ação antioxidante sobre os aldeídos facilitando a oxidação destes.

Os ácidos clorogênicos constituem os principais compostos fenólicos do café e são ésteres do ácido químico com resíduos cinâmicos. De acordo com Sondheimer (1958), o primeiro relato sobre ácido clorogênico foi descrito por Robiquet e Boutron, em 1937, e, desde então, vários autores têm-pesquisado o assunto e publicado seus resultados dando origem a uma nomenclatura muito confusa. Os nomes aplicados aos seus vários isômeros incluem o ácido clorogênico, ácido criptoclorogênio, cinarina, substância de Hauschild, ácido isoclorogênico e ácido pseudoclorogênico (Clifford, 1985a). Atualmente, o ácido químico e seus ésteres são tratados como ciclitolis (IUPAC, 1976) e o nome “ácido clorogênico” é a forma geral usada para descrever o grupo de ésteres do ácido químico com um ou mais resíduos de ácido cinâmico.

Além dos ácidos clorogênicos identificados, a semente de cafeeiro contém alguns compostos desconhecidos que constituem 5% do teor do ácido clorogênico total em cafés arábica e 1% em cafés robusta (Van Der Stahan e Van Dujin, 1980 e Ohiokphai, Brumen e Clifford, 1982). Estes compostos



podem incluir glicosídeos fenólicos (Amorim et al., 1974) e ésteres de glicose em lugar do ácido químico.

De acordo com Dentan (1985), os ácidos clorogênicos ocorrem na superfície da semente associados com a graxa cuticular, e também no citoplasma, ao lado da parede celular do endosperma no parênquima. Ainda não se sabe se a composição varia de acordo com a posição do grão. Na parede celular, os ácidos clorogênicos podem se associar à cafeína num complexo molar da ordem de 1 : 1 ou 2 : 1 conforme estudos de Horman e Viani (1971). Os ácidos clorogênicos podem ocorrer em formas polimerizadas ou complexadas, possivelmente com proteína, tanto na polpa como na semente. Essas substâncias são consideradas inibidoras da enzima indol-acético oxidase e não têm sido bem caracterizadas.

O café robusta contém de 7 a 10% do ácido clorogênico e o café arábica de 5 a 7,5% (Illy e Viani, 1995). Sementes velhas e descoradas contêm menores quantidades de ácido clorogênico extraível, além de menor atividade em polifenol oxidase (Ohiokpehai, Brumen e Clifford, 1982). Northmore (1967) sugere que os pigmentos do endosperma podem ser produtos da oxidação do ácido clorogênico. Nas sementes novas de cafeeiro Amorim et al. (1974) relatam que os melhores cafés têm teores de ácido clorogênico significativamente inferiores, o que sugere que os teores mais elevados do ácido clorogênico em cafés de menor qualidade pode ser resultado do ataque de *Fusarium* sp., pois danos mecânicos e químicos causados por microrganismos podem induzir a produção de maiores quantidades de compostos fenólicos.

A relação entre oxidação dos compostos fenólicos por enzimas como a polifenol oxidase tem sido o objetivo de várias pesquisas. Para Amorim (1978), o mecanismo de oxidação dessa substância é um dos principais eventos bioquímicos indutores da depreciação da qualidade do café. Nos frutos do cafeeiro esses compostos são considerados como um complexo conhecido como

ácidos clorogênicos, geralmente subdivididos em grupos de isômeros o que é baseado no número e tipo de seus resíduos acilantes (Clifford, 1985b.). Aos fenólicos é atribuída a sensação de adstringência na bebida do café, possivelmente variável em função do tipo e concentração desses compostos.

A polifenol oxidase é uma enzima cúprica (Robinson e Eskin, 1991) que de acordo com vários autores se mostra diretamente relacionada com a qualidade da bebida do café (Amorim e Silva, 1968; Amorim, 1978; Leite, 1991; Carvalho et al., 1994; Chagas, Carvalho e Costa, 1996; Pimenta, 1995; Chalfoiun, 1996; Pereira, 1997 e Silva et al., 1999). Esta enzima “in vivo” se encontra ligada às membranas celulares e já foi detectada nas diferentes partes dos frutos do café. Quando elas sofrem danos liberam-se as enzimas ativando-as e tornando-as possíveis de reação com substratos fenólicos intra e extra-celulares (Amorim, 1978). Essa catálise consiste de dois tipos distintos de reações, ambas envolvendo os compostos fenólicos: hidroxilação de monofenóis gerando os o-difenóis e a remoção de hidrogênio destes últimos originando as o-quinonas (Zawistowski, Biliaderis e Eskin, 1991). As o-quinonas produzi-das exerceriam sobre a polifenoloxidase uma inibição competitiva por meio de ligação covalente no sítio ativo da enzima ou nas proximidades do mesmo, ocasionando a redução da atividade enzimática (Whitaker, 1972).

Carvalho et al. (1994), verificaram haver variação da atividade enzimática da polifenol oxidase, que permitem separar as classes de bebidas de café, constatando um aumento significativo na atividade da polifenol oxidase à medida que o café se apresenta de melhor qualidade.

Em face à grande variabilidade dos resultados obtidos pelo uso desse método de envigoramento, em função da metodologia aplicada ou espécie estudada, é de fundamental importância que os resultados da técnica sejam avaliados também como molecular e enzimático. A eletroforese é uma técnica bioquímica relativamente simples, rápida e de alto valor informativo, que

consiste na separação de moléculas ionizadas de acordo com suas cargas elétricas, formas e pesos moleculares, por meio da migração em um meio suporte e tampões adequados sob a influência de um campo elétrico (Alfenas et al., 1991; Westermeier et al., 1993).

Algumas das enzimas mais estudadas em sementes em deterioração são a malato desidrogenase (MDH), glutamato desidrogenase (GDH) e a álcool desidrogenase (ADH). A enzima MDH catalisa a reação de malato à oxaloacetato, tendo importante função no ciclo de Krebs, além de participar do movimento de malato através da membrana mitocondrial e fixação de CO<sub>2</sub> nas plantas (Conn e Stupf, 1980).

A álcool desidrogenase atua no metabolismo anaeróbico de plantas, reduzindo o acetaldeído a etanol (Vantoi, Fausey e McDonald, 1987). Segundo Zang et al. (1994) a produção de acetaldeído pelas sementes durante o armazenamento pode ser um importante fator que acelera a deterioração.

Perda de viabilidade é acompanhada por uma redução na capacidade de sintetizar proteínas, e dentre estas, as enzimas desempenham um papel importante na evolução da deterioração de sementes. Reduzindo a síntese protéica, ocorrerá uma redução das enzimas atuantes no processo germinativo, promovendo uma germinação mais lenta ou até mesmo perda da viabilidade. Mudanças qualitativas e quantitativas em carboidratos, lipídios e proteínas nos fornecem informações sobre mudanças metabólicas associadas com a deterioração durante o armazenamento (Anderson, 1973). Um bom indicativo de perda de qualidade seria a avaliação da atividade de enzimas específicas (Brandão Júnior, 1996).

Respiração envolve o ciclo da glicólise, rota oxidativa das pentoses fosfato, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, ocorrendo a contribuição de enzimas na regulação de cada rota (Bettey e Finch-Sarage, 1996). Com o envelhecimento, há um declínio na atividade de enzimas removedoras de

peróxido, como a catalase, peroxidase, superóxido desmutase, ascorbato peroxidase, contribuindo com o processo de envelhecimento (Nkang, 1988; Basavarajappa et al., 1991; Jeng e Sung, 1994, citados por Brandão Júnior, 1996).

Por intermédio do metabolismo anaeróbico, a produção de compostos voláteis pela semente acelera a deterioração. Com a diminuição da atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH), atuante no metabolismo anaeróbico, a semente fica mais susceptível à ação deletéria do acetaldeído (Zheng et al., 1994).

A Rota das Pentoses é uma via metabólica anaeróbica de oxidação de carbono, fornecedora de NADPH extracloroplastídeo, um agente redutor para síntese de moléculas como lipídeos, aminoácidos e componentes da parede celular. A atividade das enzimas dessa rota é também importante em determinar o fluxo através da glicólise, uma vez que esta é fornecedora do substrato para esta rota (Betty e Finch-Savage, 1996). O balanço entre a glicólise e a rota das pentoses assegura um suprimento adequado às sementes de poder redutor, ATP e esqueletos de carbono para a biossíntese. Nas sementes envelhecidas, este balanço é alterado (Priestley, 1986, citado por Betty e Finch-Savage, 1996), podendo afetar a capacidade biossintética das células, sendo que, nestas sementes, a atividade das enzimas pertencentes a essa rota é afetada antes mesmo do ciclo da glicólise e Krebs (Zalewski, 1992, citado por Betty e Finch-Savage, 1996).

A atividade da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6P) aumentou durante a germinação de sementes de maçã, segundo Bogatek et al. (1989), embora isto não ocorra para todas as espécies (Botha, Potgieter e Botha, 1992). Em sementes envelhecidas de brássica, a atividade desta enzima foi mais baixa comparada ao controle (não envelhecidas), e houve uma restauração parcial da sua atividade após "priming" (Betty e Finch-Savage, 1996).

Trabalhos vêm mostrando que sementes são metabolicamente ativas durante o "priming", por monitoramento das mudanças nos níveis de **rRNA**, conteúdo de proteínas solúveis, taxa respiratória das sementes, atividade de enzimas específicas e também por distintas alterações nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas, embora em alguns casos **não** tenham ocorrido mudanças quantitativas na atividade destas (Sundstrom e Edwards, 1989; Smith e Cobb, 1991b).

Sementes de alface osmocondicionadas reduziram o tempo de embebição necessário para iniciarem a síntese de **RNA** e proteínas. **O** aumento observado na síntese de **RNA**, de proteínas e de enzimas, em sementes condicionadas osmoticamente, pode ser devido à remoção de certos fatores de inibição e/ou à produção de fatores promotores (Khan et al., 1978).

Zheng et al. (1994) estudaram o efeito de um inibidor de germinação lixiviado durante o tratamento de condicionamento de sementes de canola sobre a posterior germinação, que foi conduzida nas temperaturas de 10 e 23°C. Na temperatura mais baixa, o inibidor foi mais efetivo em reduzir a germinação, acreditando-se que a possível razão desse fato é que este inibidor foi metabolizado ou degradado na temperatura mais elevada de germinação (Zheng et al., 1994).

Embebição de sementes de cevada sob condições aeróbicas diminuiu rapidamente o nível de ácido abscísico, e houve germinação. Porém, sob condições anaeróbicas, esse inibidor não foi degradado e as sementes não germinaram (Yamada, 1985).

A mobilização de materiais de reserva, tais como açúcares, lipídios e proteínas, pela ativação ou síntese de novo de enzimas chaves durante o tratamento, **parecem ser** componentes essenciais para a eficiência do condicionamento osmótico (Khan et al., 1978; Fu et al., 1988). Em sementes oleaginosas, houve um aumento na germinação das sementes submetidas ao

"priming" pela indução na síntese da enzima "scavenger", responsável pela neutralização da peroxidação de lipídeos e de radicais livres (Berjak, 1978; Saha, Mandal e Basu, 1990).

O condicionamento osmótico melhorou a performance germinativa das sementes de amendoim deterioradas e aumentou a atividade da isocitrato liase, enzima chave no metabolismo de lipídios (Fu et al., 1988), envolvida na mobilização de ácidos graxos de reserva, que são convertidos em carboidratos durante a germinação (ciclo glioxilato). Houve um incremento no crescimento de plântulas devido a um aumento da atividade dessa enzima nas sementes (Jeng e Sung, 1994). "Priming" em solução aerada de  $\text{KNO}_3$  a 3%, numa temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , não aumentou a porcentagem final de germinação, mas sim a velocidade de germinação e desenvolvimento do hipocótilo de plântulas de *Capsicum annum* L. O tratamento osmótico, realizado num período adequado, permitiu a mais alta atividade metabólica pré-germinativa e conseqüentemente, durante a subsequente germinação, o desenvolvimento da plântula foi também incrementado. Para *Capsicum frutescens* L, o "priming" não aumentou o desenvolvimento da plântula, e os autores sugeriram que algum processo no desenvolvimento da plântula foi afetado negativamente pelo tratamento. Na solução osmótica, lixiviação de fatores essenciais durante tratamento prolongado pode retardar a germinação e crescimento, e podem ser apenas parcialmente compensados pelo aumento da atividade metabólica ocasionado pelo tratamento. Quando as sementes foram colocadas para germinar, não houve diferença quanto ao conteúdo de umidade atingido pelas sementes osmocondicionadas e sementes embebidas em água, até o momento da emergência da radícula. Nas sementes condicionadas osmoticamente, foi necessário um teor de umidade de 46,4% para ocorrência da emergência da radícula, e nas sementes condicionadas em água, 44,7% de umidade. Mo foi o bastante para a protusão radicular (Halpin-Ingham e Sundstrom, 1992).

A indução da síntese protéica, atividade da isocitrato liase e aumento na respiração das sementes, estão normalmente associados com embebição ou com estádios iniciais da germinação (Sunstrom e Edwards, 1989). Isto também foi demonstrado por Smith e Cobb (1991b) quando as sementes foram condicionadas osmoticamente. Sementes de pimentão parcialmente submersas em solução de NaCl a -0,90 ou -1,35 MPa, no escuro, a 23°C, foram monitoradas durante o tratamento para o acompanhamento da taxa de germinação e mudanças fisiológicas que poderiam ocorrer. A secagem das sementes foi feita somente para avaliação da germinação. "Priming" na solução de -0,90 MPa durante 12 dias não inibiu a germinação, e na solução de -1,35 MPa não foi observada emergência durante 18 dias. Todos os tratamentos melhoraram a taxa germinativa, sem diminuir a porcentagem final de germinação. sendo mais efetivo o de -0,90 MPa durante 9 dias. A taxa respiratoria das sementes não osmocondicionadas e embebidas em água (controle) aumentou com a embebição e estabilizou (fase "lag") até emergência radicular. quando novamente aumentou, similarmente ao que acontece nas 3 fases da germinação, que são dependentes do nível de hidratação das sementes (Bewley e Black. 1994). O aumento inicial da respiração nas sementes osmocondicionadas segue conforme o controle, porém foi retardada por causa da extensão da fase lag, e posteriormente retomado nas sementes que germinaram (0,90 MPa/12 dias). O conteúdo de proteína solúvel nas sementes controle permaneceu constante e depois decresceu com a emergência radicular, o que não ocorreu com as sementes condicionadas, em que o conteúdo, além de ser maior, também aumentou com o decorrer do tratamento (12 dias). O fato de a velocidade de incorporação de aminoácidos marcados nas sementes controle ter sido maior indica que, nas sementes osmocondicionadas, a síntese protéica ocorre numa menor taxa ou de forma mais organizada, necessitando de um maior tempo de permanência das sementes na solução. A atividade da aldolase

(ciclo da glicólise), álcool desidrogenase (ADH), glucose-6-fosfato desidrogenase (G6P) e isocitrato liase (ICL) diminuiu nas sementes controle durante emergência radicular, mas permaneceu alta (G6P e ADH) ou aumentou (aldolase e ICL) nas sementes osmocondicionadas por 12 dias. A atividade da enzima 6-fosfogluconato desidrogenase (6PG), que coincide com a emergência da radícula, aumentou no momento da emergência e depois estabilizou, nas sementes controle (embebidas em água).

Condicionamento osmótico em solução de  $K_3PO_4$  a  $20^{\circ}C$  durante 7 dias proporcionou um maior aumento na taxa de germinação e redução do  $T_{50}$  quando sementes de pimentão foram germinadas numa temperatura de  $15^{\circ}C$ , comparado a sementes pré-condicionadas em água. Entretanto, na temperatura de  $20^{\circ}C$  de germinação, nenhuma diferença entre os dois tratamentos de pré-condicionamento foi verificada (Kang et al., 1997).

Outra pesquisa, conduzida pelos autores Smith e Cobb (1992), constatou que o incremento no nível protéico obtido durante o condicionamento osmótico foi mantido quando essas sementes foram colocadas para germinar. A atividade da aldolase e isocitrato liase (ICL) aumentou mais ainda durante a germinação; a da álcool desidrogenase (ADH) ficou abaixo do nível de detecção e a da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6P) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PG) permaneceu constante, todas comparadas ao controle (não tratadas germinadas em água). Acredita-se que a natureza transitória e instável da enzima álcool desidrogenase poderia ser responsável pelo desaparecimento desta enzima. O potencial de  $-1,35$  Mpa apresentou o mais alto conteúdo de proteína e atividades das enzimas aldolase e isocitrato liase. Smith e Cobb (1991b) explicaram que o aumento da taxa respiratória e atividade da 6-fosfogluconato desidrogenase (que coincide com a emergência da radícula) foram retardados durante o "priming" em consequência da extensão da fase lag. Esses eventos não foram iniciados antes da emergência da radícula, sugerindo que o "priming" pode influenciar nos



processos fisiológicos que precedem a emergência da radícula. Isto mostra que muitos dos eventos que ocorrem normalmente na germinação ocorrem também no "priming", embora certos aspectos fisiológicos da germinação sejam atrasados e intensificados. Essa possibilidade de iniciar a síntese protéica se dá graças a aumentos observados durante e após "priming" de rRNA e mRNA específicos. Porém, inibidores da síntese de proteínas e RNA eliminaram a indução da atividade da isocitrato liase durante "priming", bem como reduziram os efeitos benéficos promovidos pelo tratamento sobre a germinação (Fu et al., 1988).

Em sementes de soja, Knypl, Janas e Koswiak (1980) encontraram algumas variações no padrão eletroforético de proteínas extraídas de sementes osmocondicionadas. Os autores sugeriram que a absorção de uma quantidade limitada de água tenha induzido a uma ativação bioquímica e por conseguinte resultado em uma melhoria na qualidade fisiológica das sementes. Em outro trabalho, Fujikura e Karssen (1992) observaram que a germinação e a incorporação de metionina marcada no ápice da radícula de sementes de couve-flor envelhecidas artificialmente e osmocondicionadas foram atrasadas em função do envelhecimento acelerado das sementes, mas aceleradas pelo condicionamento osmótico. A conclusão final dos autores, foi de que o condicionamento osmótico proporcionou a reversão dos efeitos do envelhecimento das sementes.

### 3 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABDUL-BAKI, A.A.; BAKER, J.E. Are changes in cellular organelles or membranes related to vigor loss in seeds? **Seeds Science and Technology**, Zurich, v.1, n.1, p.89-125, 1973.

- ACKERSON, R.C. Abscisic acid and precocious germination in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, London, v.35, n.152, p.414-421, Mar.1984.
- ADAMS, C.A.; RINNE, R. M. Moisture content as a controlling factor in seed development and germination. **International Review of Cytology**, London, v. 68,p. 1-8. 1980.
- AKERS, S. W.; BERKOWITZ, G. A.; RABIN, J. Germination of parsley seed primid in aerated solutions of polyethylene glycol. **HortScience**, Alexandria, v.22, n.2, p.250-252, Apr.1987.
- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUCE, W.; PASSADOS, G. C. **Eletrofese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991.242 p.
- ALMONGUERA, C.; JORDANO, J. Developmental and environmental concurrea expression of sunflower dry-seed-stored low molecular weight heat-shock protein and Lea mRNAs. **Plant Molecular Biology** 19, Dordrecht, v.19, p.781-792, 1992.
- ALSCHER, R. G. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.77, n.3, p.457-464, Nov. 1989.
- AMORIM, H.V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com a determinação da qualidade**. Piracicaba: USP/ESALQ, 1978.85p. (Tese—"Livro Docente" em Bioquímica)
- AMORIM H.V.; CRUZ, A.R.; DIAS, R.M.; GUTIERREZ, S.E.; TEIXEIRA, A.A.; MELLO, M.; OLIVEIRA, G.D. de. Transformações químicas e estruturais durante a deterioração da qualidade de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1977p.15-18.
- AMORIM, H.V.; SILVA, D.M. Relationship between total polyphenol oxidase activity of coffee beans and quality of the beverage. **Nature**, New York, v.219, n.27, p.381-382, July 1968.
- AMORIM, H.V.; TEIXEIRA, A.A.; GUERCIDO, M.A.; CRUZ, V.F.; MALAVOLTA, E. Chemistry of Brazilian green coffee and the quality of the beverage. II. Phenolic compounds. **Turrialba**, San José, v.24, n.2, p.217-221, abr./jun. 1974.

- ANANDARAJAH, K.; MCKERSIE, B.D. Manipulating the desiccation tolerance and vigor of *dry* somatic embryos of *Medicago sativa* L. With sucrose, heat shock and abscisic acid. *Plant Cell. Reports, Berlin*, v.9, n.7, p.451-455, July 1990
- ANDERSON, J.D. Metabolic changes associated with senescence. *Seed Science and Technology, Zurich*, v.1, n.2, p.401-416, 1973.
- ÂNDREOLI, D. M. C. Qualidade fisiológica de sementes de café (*Coffea canephora* cv. *Guarani*). Armazenas com diferentes graus de umidade em dois tipos de embalagem após *secagem* Natural e artificial. Campinas: UNICAMP, 1992. 87p. (Dissertação - Mestrado em Pré-Processamento).
- ARAUJO, R.F. Influência do teor de umidade, da embalagem e do ambiente de armazenamento na conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.). Viçosa: UFV, 1988. 56p. (Dissertação-Mestrado).
- ARMSTRONG, H.; McDONALD, M.B. Effects of osmoconditioning on water uptake and electrical conductivity in soybean. *Seed Science and Technology, Zurich*, v.20, n.3, p.391-400, 1992.
- ARRIGONI, O.; DE GARA, L.; TOMMASI, E.; LISO, R. Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. *Plant Physiology, Rockville*, v.99, n.1, p.235-238, May 1992.
- AUNG, U.T.; McDONALD, M.B. Changes in esterase activity associated with peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed deterioration. *Seed Science and Technology, Zurich*, v.23, n.1, p.101-111, 1995.
- BACCHI, O. Estudo sobre a conservação de sementes de café. *Bragantia, Campinas*. v.17, n.20, p.261-270, Dez. 1958.
- BAKER, J.; STEELE, C.; DURS, L, III. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology, Drechit*, v.11. p.277-291, 1988.
- BARTELS, D.; SCHNEIDER, K.; ..ERSTAPPEN, G.; PIATKOWSKI, D.; SALAMINI, F. Molecular cloning of abscisic acid modulated gens where are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta, Berlin*, v.181, n.1, p.27-34, June 1990.

- BARTELS, D.; SINGH, M.; SALAMINE, F. Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. **Planta**, Berlin, v.175, n.3, p.485-492, Sept. 1988.
- BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.19, n.2, p.279-286, 1991.
- BENDANA, F. E. (1962). The physiology of coffee seeds. I. Problems related to storage. **Coffee**, San Jose, v.4, n.1, p.73-75, Jan./Mar. 1962.
- BERJAK, P.; BRADFORD, K.J.; KIVACH, D.A.; PAMMENTER, N.W. Differential effects of temperature on ultrastructural responses to dehydration in seeds of *Zizania palustris*. **Seed Science Research**, Wallingford, v.4, n.2, p.111-121, June 1994.
- BERJAK, P.; FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W. The basis of recalcitrant seed behaviour In TAYLORSON, R. B. (ed.) **Recent advances in the development and germination of seeds**. New York: Plenum Press, 1989. P.89-108.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Progress in the understanding and manipulation of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds. In ELLIS, R.M.; BLACK, M; MURDOCH, A.J.; HONG, T.D. (eds) **Basic and applied aspects of seed biology**. Dordrecht: Kluweeer Academic Publishers, 1997. p.689-703.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; VERTUCCI, C. Homoiohydrous (recalcitrant) seeds: developmental status desiccation sensitivity and the state of water in axes of *Landolphia Kirkii* Dyer. **Planta**, Berlin, v.186, n.2, p.249-261, Feb. 1992.
- BERJAK, P.; VERTUCCI, C.W.; PAMMENTER, N.W. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds to *Camellia sinensis*. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.2, p.155-166, June 1993.
- BERRY, T.; BEWLEY, J.D. Seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) which develop in a fully hydrated environment in the fruit switch from a developmental to a germinative mode without a requirement for desiccation. **Planta**, Berlin, v.186, n.1, p.27-34, Jan. 1991.

- BETTEY, M.; FINCH-SAVAGE, W.E. Respiratory enzyme activities during germination in Brassica seed lots of differing vigour. **Seed Science Research**, Wallingford, v.6, n.4, p.165-173, Dez. 1996.
- BEWLEY, J.D. Physiological aspects of desiccation tolerance. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto: v.30, p.195-238, 1979.
- BEWLEY, J.D.; BALCK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. New York: London Plenum Press, 1994. 367 p.
- BEWLEY, J.D.; KERMODE, A.R.; MISRA, S. Desiccation and minimal drying treatments of seeds of castor bean and *Phaseolus vulgaris* which terminate development and promote germination cause changes in protein and messenger RNA synthesis. **Annals of Botany**, New York, v.63, n.1, p.3-17. Jan. 1989.
- BIANCHI, G.; GAMBA, A.; MURELLI, C.; SALAMINI, E.; BARTELS, D. Low molecular weight solutes in desiccated and ABA-treated calli of *Craterostigma plantagineum*. **Phytochemistry**, Oxford, v.31, n.6, p.1917-1922, June 1992.
- BLACKMAN, S.A., OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, n.1, p.225-230, Sept. 1992.
- BLACKMAN, S.A.; WETTLAUFER, S.H.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, n.3, p.868-874, July 1991.
- BOCHICCHIO, A; VAZZANA, C.; RASCHI, A.; BARTELS, D.; SALAMINI, F. Effect of desiccation on isolated embryos of maize. Onset of desiccation tolerance during development. **Agronomie**, Paris, v.8, n.1, p.29-36, 1988.
- BOGATEK, R.; ZARSKA-MACIEJEWSKA, B.; SINSKA, B.; LEWAK, S. The embryonic axis controls lipid catabolism in cotyledons of apple seeds during germination. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.76, n.4, p.557-562, 1989.
- BOSTOCK, R.M.; QUATRANO, R.S. Regulation of Em gene expression in rice. Interaction between osmotic stress and abscisic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v.48, n.4, p.1356-1363, Apr. 1992.

- BOTHA, F.C.; POTGIETER, G.P.; BOTHA, A.M. Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.11, p.211-224, 1992.
- BOUHARMONT, P. La conservation des graines de caféier, destinées à la multiplication au Cameroun. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v.15. n.3, p.202-210, July/Sept. 1971.
- BRADFORD, K.J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **Hort Science**, Alexandria, v.21, n.5, p.1105-1112, Oct. 1986.
- BRADFORD, K.J.; CHANDLER, P.M. Expression of "dehydrin-like" proteins in embryos and seedlings of *Zizania palustris* and *Oryza sativa* during dehydration. **Plant physiology**, Rockville, v.99, n.2, p.448-494, June 1992.
- BRANDÃO JÚNIOR, D. da S. **Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho**. Lavras: UFLA, 1996. 110p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- BROCKLEHURST, P.A.; DEARMAN, J. A. Comparison of different chemicals for osmotic treatment of vegetable seed. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v.105, n.1, p.391-398, June 1984.
- BRUNI, F.; LEOPOLD, A.C. Glass transition in soybean seed. Relevance to anhydrous biology. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, n.2, p.660-663, June 1991.
- BRUNI, F.; LEOPOLD, A. C. Pools of water in anhydrobiotic organisms. A thermally stimulated depolarization current study. **Biophysical Journal**, Bethesda, v.63, p. 663-672, 1992.
- BUCHVAROV, P.; GANTCHEFF, TS. Influence of accelerated and natural aging on free radical levels in soybean seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.60, n.1, p.53-56, Jan. 1984.
- BUJALSKI, W.; NENOW, A. W. Large-scale osmotic priming of onion seeds: A comparison of different strategies for oxygenation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.46, n.1, p.13-24, 1991.

- BUJALSKI, W.; NIENOW, A. W.; PETCH, G. M.; GRAY, D. Scale-up studies for osmotic priming and drying of carrot seeds. **Journal of Agricultural Engineering Research**, New York, v.48, n.4, p.287-302, Apr. 1991.
- BURGASS, W.R.; POWELL, A.A. Evidence for Repair Process in the Invigoration of Seeds by Hydration. **Annals of Botany**, London, v.53, n.5, p.753-757, May 1984.
- BÜRKE, M.J. The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In: Leopold, A.C. (ed.) *Membrane, metabolism and dry organisms*. Ithaca: Cornell University Press, 1986. P.35
- BUF  
a
- CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, London, v.44, n.258, p.127-132, Jan. 1993.
- CAMARGO, D.M.; GROTH, D.; RAZERA, L.F. Armazenamento de Sementes de café (*Coffea canephora* L. cv. Guarini) condicionadas em dois tipos de embalagens após secagem natural e artificial. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.15, n.1/2, p.87-95, Jul/Dez. 1993.
- CAMARGO, R. **Condicionamento fisiológico de sementes de cafeeiro** (*Coffea arabica* L.). Lavras: UFLA, 1998. 108p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- CARPENTER, J.F.; CROWE, J.H.; ARAKAWA, T. Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, n.12, p.3627-3636, Dec. 1990.
- CARPENTER, J.F.; CROWE, L.M.; CROWE, J.H. Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze-drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 923, p.109-115, 1987.
- CARVALHO, N.M. de.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424p.

- CARVALHO, V.D.; CHAGAS, S.J. de R.; CHALFOUN, S.M.; BOTREL, N.; JUSTE JÚNIOR, E.S.G. Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e a qualidade de bebida do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.3, p.449-454, Mar. 1994.
- CARVALHO, V.D. de; CHALFOUN, S.M.; CHAGAS, S.J. DE R. Relação entre classificação do café pela bebida e composição físico-química, química e microflora do grão beneficiado. **In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS**, 15., 1989, Maringá, PR. **Anais...** Rio de Janeiro: MEC/IBC, 1989. p.25-26.
- CHAGAS, S.J. de R.; CARVALHO, V.D.; COSTA, L. Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns municípios de três regiões produtoras de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.8, p.555-561, Ago. 1996
- CHAGAS, S.J. de R.; CARVALHO, V.D.; COSTA, L.; ROMANIELLO, M.M. Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns municípios de três regiões de Minas Gerais. II – Valores de acidez titulável e teores de açúcares (redutores, não redutores e totais). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.20, n.2, p.224-231, Abr./Jun. 1996.
- CHAITANYA, K.S.K.; NAITHANI, S.C. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn. **New Phytologist**, London, v.126, n.4, p.623-627, Apr. 1994.
- CHALFOUN, S.M.S. **O café (*Coffea arabica* L.) na Região Sul de Minas Gerais-relação da qualidade com fatores ambientais, estruturais e tecnológicos**. Lavras: UFLA, 1996. 171p. (Tese-Doutorado em Fitotecnia).
- CHAUDHURY, R.; RADHAMANI, J.; CHANDEL, K.P.S. Preliminary observations on the cryopreservation of desiccated embryonic axes of tea (*Camelia sinensis* (L.) O.Kuntze) seeds for genetic conservation. **Cryo-Letters**, Cambridge, v.12, p.31-36, 1991.
- CHAURAN, K.P.S.; GOPINATHAN, M.C.; BABU, C.R. Eletrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.13, n.1, p.629-641, 1985.



- CHEN, Y.; BURRIS, J.S. Role of carbohydrates in desiccation tolerance and membrane behavior in maturing maize seed. *Crop Science*. Madison. v.30, n.4, p.971-975, July/Aug. 1990.
- CHIA, L.S.; MCRAE, D.G.; THOMPSON, J.E. Light-dependence of paraquat-initiated membrane deterioration in bean plants. Evidence for the involvement of super-oxide. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.56, n.3, p.492-499, Mar. 1982.
- CLIFFORD, M.N. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products, In: Clifford, M.N.; Willson, K.C. *Coffee, botany, biochemistry and production of beans and beverage*. London: croombelm, 1985a. p.305-359.
- CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids. In: CHARKE, R.J.; MACRAE, R. *Coffee*. London: Elsevier, 1985b. p.153-202.
- COELLO, P.; VAZQUEZ-RAMOS, J.M. Maize DNA polymerase 2 (an  $\alpha$ -type enzyme) suffers major damage after seed deterioration. *Seed Science Research*, Wallingford, v.6, n.1, p.1-7, Mar. 1996.
- CÔME, D.; CORBINEAU, E. Metabolic damage related to desiccation sensitivity. In: QUÉDRAOGO, A.S.; POULSEN, K.; STUBSGAARD, F. (eds) *Intermediate/recalcitrant tropical forest tree seeds*. Rome: IPGRI, 1996. P.83-87.
- CONN, E.C.; STUMPF, P. K. *Introdução à bioquímica*. São Paulo: Edgard Bliicher, 1980. 451p.
- COPELAND, L.O.; McDONALD JR., M.B. Principles of seed science and technology. New York: Mcmillan, 1985. 321p.
- COPELAND, L. O.; McDONALD, M. B. *Seed Science and Technology*. 3.ed. New York: Chapman e Hall, 1995.409 p.
- CÓRDOBA, G.A.T.; BORGES, E.E. de L e; BORGES, R. de. C. G.; NEVES, J.C.L. Osmocondicionamento, secagem e armazenamento de sementes de *Eucalyptus hook e Eucapyptus grandis* W. Hill (ex. Maiden). *Revista Brasileirade Sementes*, Brasilia, v.17, n.1/2, p.81-85, Jun./Dez. 1995.
- COSTÉ, R. *El Café*. Barcelona: Blume, 1969. 265p.

- COUTURON, E. Mantenimiento de la viabilidad de las semillas de cafetos por el control de su contenido en agua y de la temperatura de almacenamiento. **Cafe Cacao The**, Paris, v.24, n.1, p.27-32, Jan./Mar. 1980.
- CREVECOEUR, M., DELTOUR, R.; BRONCHART, R. Cytological study on water stress during germination of *Zea mays*. **Planta**, Berlin, v.132, n.1, p.31-41, Jan. 1976.
- ÊROCKER, N.; HARRINGTON, G.T. Catalase and oxidase content of seeds in relation to their dormency, age, vitality and respiration. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v.15, n.3, p.137-174, Oct. 1918.
- CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; AURELL WISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemical Journal**, London, v.242, n.1, p.1-10, Feb. 1987.
- CROWE, J.H.; CROWE, L. M.; CARPENTER, J.F.; RUDOLPH, A.S.; AURELL WISTROM, C.; SPARGO, B.J.; ANCHORDOGUY, T.J. Interactions of sugars with membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 947, p.367-384, 1988.
- CROWE, L.M.; CROWE, J.H.; CHAPMAN, D. Interaction of carbohydrates with dry dipalmitoylphosphatidylcholine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v.236, p.289-296, 1985.
- CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydriobiotic organisms: the role of trehalose. **Science**, New York, v.223, n.4637, p.701-703, Feb. 1984a.
- CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; HOEKSTRA, F.A.; AURELL WISTROM, C. Effects of water on the stability of phospholipid bilayers: the problem of imbibition damage in dry organisms. In STANWOOD, P.C.; MCDONALD, M.B. (eds) **Seed moisture**. Madison: Crop Science Society of America, 1989. P.1-22. (CSSA Special Publication, 14).
- CROWE, L.M.; WOMERLEY, C.; CROWE, J.H.; REID, D.; APPEL, L.; RUDOLPH, A.S. Prevention of fusion and leakage in freeze-dried liposomes by carbohydrates. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.861, p.131-140, 1986.
- DALIANIS, C.D. Improving the emergence rate of two grass species. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.17, n.3, p.463-470, 1989.

- DARBYSHIRE, B. The function of the carbohydrate units of three fungal enzymes in their resistance to dehydration. *Plant Physiology*, Rockville, v.54, n.5, p.717-721, Nov. 1974.
- DASGUPTA, J.; BEWLEY, J.D.; UEUNG, E.C. Desiccation-tolerant and desiccation-intolerant stages during the development and germination of *Phaseolus vulgaris* seeds. *Journal of Experimental Botany*, London, v.33, n.137, p.1045-1057, Dec. 1982.
- DELL'AQUILLA, A. Wheat seed ageing and embryo protein degradation. *Seed Science Research*, Wallingford, v.4, n.3, p.293-298, Sep. 1994.
- DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.1, n.2, p.427-452, 1973.
- DENTAN, E. The microscopic structure of the coffee bean. In: CLIFFORD, M.N.; WILLSON, K.C. *Coffee, botany, biochemistry and production of beans and beverage*. London, Croombelm, 1985. p.284-304.
- DEY (PATAHAK), G.; BASU, R.N. Physiochemical control of radiation and ageing damage in mustard seed. *Indian Journal of Experimental Botany*, Calcutta. v.23, n.2, p.167-171, 1985.
- DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) em diferentes embalagens. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília. v.15, n.1/2, p.197-202, Jun./Dez. 1993.
- DURE, L. H.; CROUCH, M.; HARADA, J.; MUNDY, H. J.; QUATRANO, R.; THOMAS, T.; SUNG, Z. R. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v.12, p.475-486, 1989.
- EIRA, M.T.S. Condicionamento **osmótico** de sementes de alface (*Lactuca sativa* L): Efeitos sobre a germinação e desempenho sob estresses hídrico, salino e térmico. Piracicaba: ESALQ/USP, 1988. 90 p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. The development of desiccation-tolerance and maximum seed quality during seed maturation in six grain legumes. *Annals of Botany*, New York, v.59, n.1, p.23-29, Jan. 1987.

- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, London, v.41, n.230, p.1167-1174, Sep. 1990.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity and imbibition on desiccation tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, London, v.42, n.238, p.653-657, May 1991.
- ELY, P. R.; HEYDECKER, W. Fast germination of parsley seeds. **Science Horticulturae**, Athens, v. 15, p.127-136, 1981.
- FARRANT, J.M.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. The effect of drying rate on viability retention of recalcitrant propagules of *Avicennia marina*. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 51, p.432-438, 1985.
- FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. The increasing desiccation sensitivity of recalcitrant *Avicennia marina* seeds with storage time. **Plant Physiology**, Rockville, v.67, n.2, p.291-298, Feb. 1986.
- FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Development of the recalcitrant (homoiohydrous) seeds of *Avicennia marina*: Anatomical, ultrastructural and biochemical events associated with development from histodifferentiation to maturation. **Annals of Botany**, New York, v.70, n.1, p.75-86, July 1992.
- FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation-tolerant types. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n.1, p.1-13, Mar. 1993.
- FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P.; WALTERS, C. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wallingford, v.7, n.2, p.135-144, June 1997.
- FELDMAN, J.R.; RYDER, W.S.; KUNG, J.T. Importance of non volatile compounds to the flavor of coffee. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.17, p.733-739, 1969.

- FERREIRA, L.G.R.; REBOUÇAS, M.A.A. Influência da hidratação/desidratação de sementes de algodão na superação dos efeitos da salinidade na germinação. Pesquisa Agropecuária Brasileira Brasília, v.27, n.4, p.609-615, abr. 1992
- FINCH-SAVAGE, W.E.; GRANGE, R.I.; HENDRY, G.A.F.; ATHERTON, N.M. Embryo water status and **loss of** viability during desiccation in the recalcitrant seed species. *Quercus robur* L. In CÔME, D.; CORBINEAU, F. (eds) **Fourth international workshop on seeds: Basic and applied aspects of seed biology.** Paris: ASFIS, 1993. p. 723-730.
- FINCH-SAVAGE, W.E.; HENDRY, G.A.F.; ATHERTON, N.M. Free radical activity and **loss** of viability during drying of desiccation-sensitive tree seeds. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh,** Edinburgh, v.102B, p.257-260, 1994.
- FINKELSTEIN, R.R.; D CROUCH, M.L. Rapeseed embryo development in culture on high osmoticum similar to that in seeds. *Plant Physiology,* Rockville, v.81, n.3, p.907-912, July 1986.
- FINKELSTEIN, R.R.; TENBARGE, K.M.; SHUMWAY, J.E.; CROUCH, M.L. Role of ABA in maturation of rapeseed embryos. *Plant Physiology,* Rockville, v.78, n.4, p.630-636, Aug. 1985.
- FISCHER, W.; BERGFELD, R.; PLACHY, C.; SCHAFER, R.; SCHPFER, P. Accumulation of storage materials, precocious germination and development of desiccation tolerance during seed maturation in mustard (*Sinapis alba* L.). *Botanica Acta,* Stuttgart, v.101, p.344-354, 1988.
- FRANZEN, J.; HAAS, M.M. Vitamin E content during development of some seedlings. *Phytochemistry,* Oxford, v. 30, n.9, p.2911-2913, Sep. 1991.
- FRETT, J. J.; PILL, W. G.; MORNEAU, D.C. A comparison of priming agents for tomato and asparagus seeds. *HortScience,* Alexandria, v. 26, p. 1158-1159, Sep. 1991.
- FU, J.R.; JIN, J.P.; PENG, Y.F.; XIA, Q.H. Desiccation tolerance in two species with recalcitrant seeds: *Clausena lansium* (Lour) and *Litchi chinensis* (Sonn.). *Seed Science Research,* Wallingford, v.4, n.3, p.257-261. Sept. 1994.

- FU, J. R.; LU, X. H.; CHEN, F. Z.; ZHANG, B. Z.; LIU, Z. S.; LI, Z. S.; CAI, D. Y. Osmoconditioning of peanut (*Arachis hypogea* L.) seeds with PEG to improve vigour and some biochemical activities. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.16, n.1, p.197-212, 1988.
- FU, J.R.; ZHANG, B.Z.; WANG, X.P.; QIAO, Y.Z.; HUANG, X.L. Physiological studies on desiccation, wet storage and cryopreservation of recalcitrant seeds of three fruit species dan their excised embryonic axes. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.18, n.3, p.743-754, 1990.
- FURUTANI, S. C.; ZANDSTRA, B. H.; PRICE, H. C. The effects of osmotic solute composition and duration and tempreature of priming on onion seed germination. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.14, n.3, p.545-551, 1986.
- GABER, B.P.; CHANDRASEKHAR, I.; PATTABIRAMAN, N. The interaction of trehalose with the phospholipid bilayer: a molecular study. In: LEOPOLD, A.C. (ed.) **Membranes, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Cornell University Press, 1986. p.231-249.
- GALAU, G.A.; HUGHES, D.W.; DURE, L., III. Abscisic acid induction of cloned late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. **Plant Molecular Biology**, Amsterdam, v.7, p.155-170, 1986.
- GALAU, G.A.; JAKOBSEN, K.S.; HUGHES, D.W. The controls of late dicot embryogenesis and early germination. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.81, n.2, p.280-288, Feb. 1991.
- GIÚDICE, M. P. DEL. **Condicionamento osmótico de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Viçosa: UFV, 1996. 117p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- GOLDBERG, R.B.; BARKER, S.J.; PEREZ-GRAU, L. Regulation of gene expression during plant embryogenesis. **Cell**, Cambridge, v.56, p.149-160, 1989.
- GOMES, M.S.; CAMARGO, R. de; VIEIRA, M.G.G.C.; CARVALHO, M.L.M. Condicionamento osmótico de milho doce. **Informativo Abrates**, Curitiba, v.7, n.1/2, p.186,1997.

- GOMEZ, J.; SANCHEZ-MARTINEZ, D.; STIEFEL, V.; RIGAU, J.; PUIGDOMENECH, P.; AND PAGES, M. A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. **Nature**, London, v.334, p.262-264, 1988.
- GOODRICH, R.P.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; BALDESCHWIETER, J.D. Alterations in membrane surfaces induced by attachment of carbohydrates. **Biochemistry**, Washington, v.30, p.5313-5318, 1991.
- GUIMARÃES, R.M. **Efeito do condicionamento osmótico sobre a germinação e desempenho de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) sob condições ideais e de estresse térmico, hídrico e salino.** Lavras: ESAL, 1991. 78p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- HAARER, A. E. The propagation of coffee from seed. In: HAARER, A. E. (ed) **Modern Coffee Production**. 2.ed. London: Leonard Hill, 1962. p.97-123.
- HALLIWELL, B. Oxidative damage, lipid preoxidation and antioxidant protection in chloroplasts. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v.44, p.327-340, 1987.
- HALLIWELL, B. Oxygen radicals: their formation in plant tissues and their role in herbicide damage In: BAKER, N.R.; PERCIVAL, M.P. (eds) **Herbicides**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1991.
- HALPIN-INGHAM, B.; SUNDSTROM, F.J. Pepper seed water content, germination response and respiration following priming treatments. **Seed Science and Tecnology**, Zurich, v.20, n.3, p.589-596, 1992.
- HANSON, A.D. The effects of imbibition drying treatments on wheat seeds. **New Phytologist**, London, v.72, n.4, p.1063-1073, Apr. 1973.
- BARADA, J.J. Seed Maturation and Control of Germination. In: LARKINS, B.A; VASIL, I.K. (eds) **Cellular and molecular biology of plant seed development**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p.545-592.
- HARDEGREE, S. P.; EMMERICH, W. E. Effect of polyethylene glycol exclusion on the water potential of solution-saturated filter paper. **Plant Physiology**, Rockville, v.92, n.2, p.462-466, Feb. 1990.

- HEGARTY, T.W. The physiology of seed hydration and dehydration, an the relation between water stress and the control of germination: a review. **Plant, Cell and Environment**, New York, v.1, n.1, p.101-119, Jan. 1978.
- HEGARTY, T.W. Seed activation and seed germination under moisture stress. **New Phytologist**, London, v.78, n.3, p.349-359, Mar. 1977.
- HENCKEL, P.A. Physiology of plants under drought. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.15, p.363-386. 1964.
- HENDRY, G.A.F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.2, p.141-153, June 1993.
- HENDRY, G.A.F.; FINCH-SAVAGE, W.E.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; BUCKLAND, S.H.; NILSSON, K.A.; SEEL, W.E. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New phytologist**, London, v.122, n.2, p.273-279, Oct. 1992.
- HEPBURN, H.A.; GOODMAN, B.A.; MCPHAIL, D.B.; MATTHEWS, S.; POWELL, A.A. An evaluation of EPR measurements of the organic free radical content of individual seeds in the non-destructive testing of seed viability. **Journal of Experimental Botany**, London, v.37, n.184, p.1675-1684, Nov. 1986.
- HETHERINGTON, A.M.; QUATRANO, R.S. Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. **New Phytologist**, London, v.119, n.1, p.9-32, Sept. 1991.
- HEYDECKER, W. Germination of an idea: priming of seeds. **University of Nottingham School of Agriculture Report**. England, 1973/74. p.50-67.
- HEYDECKER, W.; COOLBEAR, P. Treatments for improved performance survey and attempted prognosis. **Seed Science & Technology**, Zurich, v.5, n.2, 353-425, 1977.
- HEYDECKER, W.; HIGGINS, B.M. The priming of seeds. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 83, p.231-223, 1978.
- HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R. L. Accelerated germination by osmotic seed treatment. **Nature**, London, v.246, n.5427, p.42-44, Nov. 1973.



- HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, I.J. Invigoration of seeds? **Seed Science and Technology**, Zurich, v.3, n.3, p.881-888, 1975.
- HILHOST, H.; LEPRICE, O. Germination: Topics I to IV. Lavras: UFLA, 1998. p. ir. (Seed Physiology course simposium UFLA/WAV- Lavras-MG, Brasil, 19-24/10/1998).
- HOEKSTRA, F.A.; CROWE, I.H.; CROWE, L.M. Effect of sucrose on phase behavior of membranes in intact pollen of *Typha latifolia* L. as measured with Fourier transform infrared spectroscopy. **Plant Physiology**, Rockville, v.97, n.3, p.1073-1079, Nov. 1991.
- HOEKSTRA, F.A.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M. Membrane behavior in drought and its physiological significance. In: TAYLORSON, R.B. (ed.) Recent advances in the development and germination of seeds. New York: Plenum Press, 1990. P.71-126.
- HONG, T.D.; ELLIS, R.H. Development of desiccation tolerance in Norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds during maturation drying. **Seed Science Research**, Wallingford, v.2, n.2, p.169-172, June 1992.
- HONG, T.D.; ELLIS, R.H. Interspecific variation in seed storage behaviour within two genera – *Coffea* and *Citrus*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.23, n.1, p.165-181, 1995.
- HORMAN, L; VIANI, R. The caffeine-chlorogenate complex of coffee. Na NMR study. In: Internacional Scientific Colloquium on Coffee, 5., 1971, Lisboa. Paris: ASIC, 1971. P.102-111.
- ILJIN, W.S. Drought resistance in plants and physiological processes. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.3, p.341-363, 1957.
- ILLY, A; VIANI, R. **Espresso coffee: the chemistry of quality**. London Academic Press, 1995. 253p.
- INGRAM, I; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.47, p.377-443, 1996.
- ISHIDA, N.; KANO, H.; KOBAYASHI, T.; YOSHIDA, T. Analysis of physical states of water in soybean seeds by NMR. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 52, n.11, p.2777-2781, Nov. 1988.

- IUPAC. Nomenclature of cyclitols. *The Biochemical Journal*, London, v.153, n.1, p.23-31, Jan. 1976.
- JENG, T.L.; SUNG, J.M. Hydration effects on lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.22, n.2, p.531-39, 1994.
- JEPSON, S.G.; CLOSE, T.J. Purification of a maize dehydrin protein expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, San Diego, v.6, p.632-636, 1995.
- KANG, N. J.; JEOUNG, Y. O.; CHO, J.L.; KANG, S.M. Changes of seed proteins related to low temperature germinability of primed seeds of peppers (*Capsicum annuum* L.) . *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, Suwoniv, v.38, n.4, p.342-346, 1997.
- KERMODE A.R.; BEWLEY, J.D. Developing seeds of *Ricinus communis* L. When detached and maintained in an atmosphere of high relative humidity, switch to a germinative mode without the requirement for complete desiccation. *Plant Physiology*, Rockville, v.90, n.3, p.702-707, July 1989.
- KERMODE A.R.; OISHI, M.Y.; BEWLEY, J.D. Regulatory roles for desiccation and abscisic acid in seed development: a comparison of the evidence from whole seeds and isolated embryos. In: STANWOOD, P.C. AND MCDONALD, M.B. (eds) *Seed moisture*. Madison: Crop Science of America, 1989. p. 23-50. (CSSA Special Publication, 14).
- KHAN, A.A. Preplant physiological seed conditioning. *Horticultural Review*, Edinburgh, v.13, p.131-181, 1992.
- KHAN, A. A.; BRAUM, J.W.; TAO, K.L.; MILLIER, W.F.; BENSIN, R.F. New methods for maintaining seed vigor and improving performace. *Journal of Seed Technology*, Lansing, v.1, n.2, p.33-57, 1976.
- KHAN, A. A.; TAO, K. L.; KNYPL, J. S.; BORKOWSKA, B.; POWELL, L. E. Osmotic conditioning of seeds physiological and biochemical changes. *Acta Horticultural*, The Hague, v. 83, 267-278, 1978.
- KIOCO, J.; BERJAK, P.; P PAMMNTER, N.W.; WATT, P.M.; WESLEY-SMITH, J. Desiccation and cryopreservation of embryonic axes of *Trichilia dregeana* Sond. *Cryo-Letters*, Cambridge, v.19, p.15-26, 1998.

- RNYPL, J.S.; JANAS, K.M.; RADZIWONOWSKA-JOZWIAK, A. Is enhanced vigour in soybean (*Glicine max*) dependente on activation of protein turnover during controlled hydration of seeds? **Physiologie Végétale**, Paris, v.18, n.1, p.157-161, 1980.
- KOORNNEEF, M.; HANHART, C.J.; HILHORST, H.W.M.; KARSSSEN, C.M. In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v.90, n.3, p.463-469, July 1989.
- KOOSTRA, F. Changes in seed ultrastructure during senescence. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.2, p.417-25, 1973.
- KOSTER, K.L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, n.1, p.302-304, May 1991.
- KOSTER, K.L.; LEOPOLD, A.C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.88, n.4, p.829-832, Dec. 1988.
- KOVACH, D.A.; BRADFORD, K.J. Imbibitional damage and desiccation tolerance of wild rice (*Zizania palustris*) seeds. **Journal of Experimental Botany**, London, v.43, n.251, p.747-757, June 1992a.
- KOVACH, D. A ; BRADFORD, K.J. Temperature dependence of viability and dormancy of *Zizania palustris* var. interior seeds stored at high moisture contents. **Annals of Botany**, New York, v.69, n.3, p.297-301, Mar. 1992b.
- KUO, T.M., VANMIDDLESWORTH, J.F.; WOLF, W.J. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, n.1, p.32-36, Jan./Feb. 1988.
- LABOURIAU, L.G. A germinação das sementes. Washington: OEA, 1983.
- LANE, B.G. Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. **FASEB Journal**, Bethesda, v.5, p.2893-2901, 1991.
- LANTERI, S.; KRAAK, L.; DE VOS, C. H. R.; BINO, R. J. Effects of osmotic preconditioning on nuclear replication activity in seeds of pepper (*Capsicum annuum* L.). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 89, n.3, p.433-440, Nov. 1993.

- LEITE, I.P. **Influência do local de cultivo e do tipo de colheita nas características físicas, composição química do grão e qualidade do café (*Coffea arabica*, L.)**. Lavras: ESAL, 1991. 131p (Dissertação – Mestrado em Ciência de Alimentos).
- LEOPOLD, A.C. Coping with desiccation. In: ALSCHER, R.G. AND CUMMING, J.R. (eds) **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York: Wiley-Liss, 1990. p.57-86.
- LEOPOLD, A.C.; VERTUCCI, C.W. Physical attributes of desiccated seeds. In: LEOPOLD, A.C. (ed.) **Membranes, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Cornell University Press, 1986. P.22-34.
- LEOPOLD, A.C.; VERTUCCI, C.W. Moisture as a regulator of physiological reaction in seeds. In: STANWOOD, P.C. AND MCDONALD, M.B. (eds) **Seed moisture**. Madison: Crop Science Society of America, 1989. p.51-67. (CSSA Special Publication, 14).
- LEPRINCE, O. **Etude des mécanismes de la résistance à la déshydratation dans les embryos des plantes supérieures**. Liège: University of Liège, 1992. (PhD Thesis).
- LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; HENDRY, G.A.F. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, London, v.116, n.4, p.573-580, Dec. 1990.
- LEPRINCE, O. ; HENDRY, G.A F.; MCKERSIE, B.D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.3, p.231-246, Sept. 1993.
- LEPRINCE, O.; VAN DER WERF, A.; DELTOUR, R.; LAMBERS, H. Respiratory pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.84, n.4, p.581-588, Apr. 1992.
- LIMA, W.A.A.; ARAÚJO, R.F.; DIAS, D.C.F.S.; ALVARENGA, E.M.; ARAÚJO, E.F. Ajuste de metodologia para o condicionamento osmótico de sementes de café (*Coffea arabica* L.). **Informativo Abrates**, Curitiba, v.7, n.1/2, p.107, 1997.

- LOCKHART, E.E. **Chemistry of coffee**. New York: The Coffee Brewing Institute, 1957. 20p. (Publication, 25).
- LONG, S.R.; DALE, R.M.K.; SUSSEX, L.M. Maturation and germination of *Phaseolus vulgaris* embryonic axes in culture. **Planta**, Berlin, v.153, n.3, p.405-415, May 1981.
- LYNCH, R.M.; CLEGG, J.S. A study of metabolism in dry seeds of *Avena fatua* L. Evaluated by incubation with ethanol-1-14C. In: LEOPOLD, A.C. (ed.) **Membranes, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Cornell University Press, 1986. p. 50-58.
- MADIN, K.A.C.; CROWE, J.H. Anhydrobiosis in nematodes: carbohydrate and lipid metabolism during dehydration. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v.193, p.335-342, 1975.
- MANDAL, A.K.; BASU, R.N. Midterm and Presowing hidaration-dehidration treatments for improve field performance of wheat. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.15, p.259-65, 1987.
- MATTHEWS, S.; POWELL, A.A. Environmental and physiological constraints on field performance of seeds. **HortScience**, Alexandria, v.21, n.10, p.1125-1128, Oct. 1986.
- MCCUBBIN, W.D.; KAY, C.M. Hydrodynamic and optical properties of the wheat Em protein. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v.63, p.803-810, 1985.
- McGEE, D.C. Deterioration mechanisms in seeds. **Phytopathology**, St. Paul, v.73, n.2, p.314-315, Feb. 1983.
- MCKERSIE, B.D. The role of oxygen free radicals in mediating freezing and desiccation stress in plants. In: PELL, E.; STAFFEN, K. (eds) **Active oxygen and oxidative stress in plant metabolism: Current Topics in Plant Physiology**. 1991. P.107-118. (American Society of Plant Physiologist Series, 8).
- MCKERSIE, B.D.; THOMPSON, J.E. Phase properties of senescing plant membranes. Role of the neutral lipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.550, p.48-58, 1979.

- MCKERSIE, B.D.; HOEKSTRA, F.A.; KRIEG, L.C. Differences in the susceptibility of plant membrane lipids to peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v.1030, p.119-126, 1990.
- MCKERSIE, B.D.; SENARATNA, T.; BOWLEY, S.R.; BROWN, D.C.W.; KROCHKO, J.E.; BEWLEY, J.D. Application of artificial seed technology in the production of hybrid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *In Vitro Cell and Development Biology*, Columbia, v.25, p.1183-1188, 1989.
- MCKERSIE, B.D.; SENARATNA, T.; WALKER, M.A.; KENDALL, E.J.; HETHERINGTON, P.R. Deterioration of membranes during aging in plants: evidence for free radical mediation. In: NOODÉN, L.D.; LEOPOLD, A.C. (eds) *Senescence and aging in plants*. San Diego: Academic Press, 1988. P.441-464.
- MENEZES, D. Determinação da curva da embebição e avaliação da qualidade fisiológica de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). Lavras: UFLA, 1996. 57p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- MEURS, C.; BASRA, A.S.; KARSEN, C.M.; VAN LOON, L.C. Role of abscisic acid in the induction of desiccation tolerance in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, Rockville, v.98, p.1484-1493, 1992.
- MEXAL, J.; FISHER, J. T.; OSTERYOUNG, J.; PATRICK-REID, C. P. Oxygen availability in polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiology*, Rockville, v.72, n.1, p.66-70, Jan. 1975.
- MIGLIORANZA, E. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L. cv. **Catuai**), com diferentes teores de umidade, armazenadas em embalagens hermeticamente fechadas. Piracicaba: ESALQ, 1982. 60p. (Dissertação-mestrado).
- MIRANDA, J.M.; CARVALHO, M.M. DE; CARVALHO, M.L. DE; VIEIRA, M. DAS GRAÇAS. Estudos de alguns fatores que influenciam a duração da viabilidade de sementes de café. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.15, n.1/2, p.215-220, Jun./Dez. 1993.
- MIRANDA, J.M.; VALIAS, E. P. Estudo sobre conservação da viabilidade de sementes de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 11. 1984, Londrina. Resumos.. Rio de Janeiro: Ministério da Indústria e do Comércio IBC, 1984. p. 160-161

- MOTTA, C.A.P. **Efeitos de períodos crescentes de hidratação seguidos de secagem no desempenho fisiológico e na sanidade de sementes de trigo.** Piracicaba: ESALQ/USP, 1994. 146p. (Tese-Doutorado).
- MUNDY, J.; CHUA, N.H. Abscisic acid and water-stress induce a novel rice gene. **EMBO Journal**, Oxford, v.7, p.2279-2286, 1988.
- NATH,S.; COOLBEAR,P.; HAMPTON,J.G. Hydratation-dehydratation treatments to protect or repair stored 'Karamu' wheat seeds. **Crop Science**, Madison, v.31, n.3, p.822-826, May/June 1991.
- NAUTIYAL, A.R.; THAPLIYAL, A.P.; PUROHIT, A.N. Seed viability in sal. IV. Protein changes accompanying loss of viability in **Shorea robusta**. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.13, n.1, p.83-86, 1985.
- NAVELLIER, P. Coffe. In: **ENCYCLOPÉDIA of Industrial Chemical Analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1970. v.19, p.373-447.
- NORMAH, M.N.; CHIN, H.E.; HOR, Y.L. Desiccation and cryopreservation of embryonic axes of *Hevea brasiliensis* Muell – Arg. **Pertanika**, Malaysia, v.9, p.299-303, 1986.
- NORTHMORE, J.M. Raw bean colours and the quality of Kenya arabica coffee. In: **Internacional Scientific Colloquium on Coffee**, 3., 1967, Trieste. Paris: ASIC, 1967, p.405-414.
- NTULI, T.M.; BERJAC, P.; PAMMENTER, N.W.; SMITH, M.T. Effects of temperature on the desiccation responses of seeds of *Zizania palustris*. **Seed Science Research**, Wallingford, v.7, n.2, p.145-156, June 1997.
- OHIKPEHAI, O, BRUMEN, G.; CLIFFORD, M.N. The chlorogenic acid content of some peculiar green coffee beans and the implications for be quality. In: **INTERNACIONAL. SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE**, 10., 1982, Salvador. Paris: ASIC, 1982. p.177-186.
- OISHI, M.Y.; BEWLEY, J.D. Distinction between the responses of developing maize kernels to fluridone and desiccation in relation to germinability,  $\alpha$ -amylase activity, and abscisic acid content. **Plant Physiology**, Rockville, v.94, n.2, p.592-598, Oct. 1990.
- OLIVER, M.J.; BEWLEY, J.D. Desiccation-tolerance of plant tissues: A mechanistic overview. **Horticultural Reviews**, v.18, p.171-213, 1997.

- PAMMENTER, N.M.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation tolerance mechanisms, **Seed Science Research**, Wallingford, v.9, n.1, p.13-37, Mar. 1999.
- PAMMENTER, N.W.; GREGGAINS, V.; KIOKO, J.I.; WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P.; FINCH-SAVAGE, W.E. Effects of differential drying rates on viability retention of recalcitrant seeds of *Ekebergia capensis*. **Seed Science Research**, Wallingford, v.8, n.4, p.463-471, Dec. 1998.
- PAMMENTER, N.W.; VERTUCCI, C.W.; BERJAK, P. Homeohydrous (recalcitrant) seeds: dehydration, the state of water and viability characteristics in *Landolphia Kirkii*. **Plant Physiology**, Rockville: v.96, 1093-1098, 1991.
- PAMMENTER, N.W.; VERTUCCI, C.W.; BERJAK, P. Responses of dehydration in relation to non-freezable water in desiccation-sensitive and tolerant seeds. pp. 867-872 in CÔME, D.; CORBINEAU, F. (Eds) *Fourth International Workshop on Seeds: Basic and applied aspects of seed biology*. Paris, ASFIS. 1993.
- PAULS, K.P.; THOMPSON, J.E. Effects of in vitro treatment with ozone on the physical and chemical properties of membranes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.53, n.3, p.255-262, Mar. 1981.
- PEREIRA, R.G.F.A **Efeito da inclusão de grãos defeituosos na composição química e qualidade do café (*Coffea arabica* L.) "estritamente mole"**. Lavras:UFLA, 1997. 96p. (Tese-Doutorado em Ciências dos Alimentos)
- PIATKOWSKI, D.; SCHNEIDER, K.; SALAMINI, F.; BARTELS, D. Characterization of five abscisic acid-responsive cDNA clones isolated from the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water-stress genes. **Plant Physiology**, Rockville, v.94, n.4, p.1682-1688, Dec. 1990.
- PIMENTA, C.J. **Qualidade do café (*Coffea arabica* L.) originado de diferentes frutos colhidos em quatro estádios de maturação**. Lavras: UFLA, 1995. 94p. (Dissertação – Mestrado em Ciências dos Alimentos)
- POWELL, A.A.; MATTHEWS, S. The damaging effect of water on dry pea embryos during imbibition. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.29, n.112, p.1215-1229, Oct. 1978.



- PRASAD, T.; PATHAK, S.S. Impact of various storage systems on biodeterioration of cereal. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v.40, n.1, p.39-46, Mar. 1987.
- PRETE, C.E.C. **Condutividade elétrica do exsudato de grãos de café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a qualidade da bebida**. Piracicaba: ESALQ 1992. 125p. (Tese.Doutorado em Fitotecnia).
- PREVOST, I.; LE PAGE-DEGIVRY, M.T. Inverse correlation between ABA content and germinability throughout the maturation and the *in vitro* culture of the embryo of *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Experimental Botany**, London, v.36, n.170, p.1457-1464, Sept. 1985.
- PRICE, A.H.; ATHERTON, N.M.; HENDRY, G.A.F. Plants under drought-stress generate activated oxygen. **Free Radical Research Communications**, Berkshire, v. 8, p.61-66, 1989.
- PRICE, A.H.; HENDRY, G.A.F. Iron-catalyzed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. **Plant, Cell and Environment**, New York, v.14, p.477-484, 1991.
- PRIESTLEY, D. A. Seed Aging. Implications of seed storage and persistence in the soil. Ithaca: Cornell University Press, 1986.
- PRIESTLEY, D.A.; LEOPOLD, A.C. Lipid changes during natural ageing of soybeans seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.59, n.3, p.467-70, Mar. 1983.
- PRIESTLEY, D.A.; WERNER, B.G.; LEOPOLD, A.C.; MCBRIDE, M.B. Organic free radical levels in seeds and pollen: the effects of hydration and aging. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.64, n.1, p.88-94, May 1985.
- PRITCHARD, H.W. Water potential and embryonic axis viability in rehydrated seeds of *Quercus rubra*. **Annals of Botany**, New York, v.67, n.1, p.43-49, Jan. 1991.
- PRITCHARD, H.W.; MANGER, K.R. A calorimetric perspective on desiccation stress during preservation procedures with rehydrated seeds of *Quercus robur* L. **CryoLetters**, Cambridge, v.19, p.23-30, 1998. Supplement 1.

- PROBERT, R.J.; LONGLEY, P.L. Recalcitrant seed storage physiology in three aquatic grasses (*Zizania palustris*, *Spartina anglica* and *Porteresia coarctata*). **Annals of Botany**, New York, v.63, n.1, p.53-63, Jan. 1989.
- PUNTARULO, S.; GALLEANO, M.; SANCHEZ, R.A.; BOVERIS, A. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1074, p.277-283, 1991.
- QUATRANO, R.S. Regulation of gene expression of abscisic acid during angiosperm embryo development. **Oxford Survey of Plant Molecular and Cell Biology**, Oxford, v.3, 467-477, 1986.
- RAGHAVAN, V. **Embryogenesis in Angiosperms: a developmental and experimental study**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986.
- RAMARATHNAM, N.; OSAWA, T.; NAMIKI, M.; TASHIRO, T. Studies on the relationship between antioxidative activity of rice hull and germination ability of rice seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 37, n.8, p.719-726, Aug. 1986.
- REDDY, L. S. Effect of different stages of maturity and posthrvest treatments on the seed viability of *Coffea arabica* L. **Journal of Coffee Research**, Karnataka, v.17, p.14-25, 1987.
- ROBERTON, M.; CHANDLER, P.M. Pea dehydrins: identification, characterisation and expression. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.19, p.1031-1044, 1992.
- ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.2, p.499-514, 1973.
- ROBERTS, E.H.; ELLIS, R.H. Water and seed survival. **Annals of Botany**, New York, v.63, n.1, p.39-52, Jan. 1989.
- ROBINSON, D.S.; ESKIN, N.A M. **Oxidative enzymes in foods**. New York, Elsevier Applied Science, 1991. 314p.
- ROGERSON, N.E.; MATTHEWS, S. Respiratory and carbohydrate changes in developing pea (*Pisum sativum* L.) seeds in relation to their ability to withstand desiccation. **Journal of Experimental Botany**, London, v.28, n.103, p.304-313, Apr. 1977.

- RUSSOUW, P.S.; FARRANT, J.M.; BRANDT, W.; LINDSEY, G.G. The most prevalent protein in a heat-treated extract of pea (*Pisum sativum*) is a LEA group I protein; its conformation is not affected by exposure to high temperature. **Seed Science Research**, Wallingford, v.7, n.2, p.117-123, June 1997.
- RUSSOUW, P.S.; FARRANT, J.M.; BRANDT, W.; MAEDER, D.; LINDSEY, G.G. Isolation and characterization of a heat-soluble protein from pea (*Pisum sativum*) embryos. **Seed Science Research**, Wallingford, v.5, n.2, p.137-144, June 1995.
- SARGENT, J.A.; MANDI, S.S.; OSBORNE, D. The loss of desiccation tolerance during germination: an ultrastructural and biochemical approach. **Protoplasma**, Vienna, v.105, p.225-229, 1981.
- SEEL, W.; HENDRY, G.A.F.; ATHERTON, N.M.; LEE, J. Radical formation and accumulation *in vivo*, in desiccation tolerant and intolerant mosses. **Free Radical Research Communications**, Berkshire, v.15, p.133-141, 1991.
- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D. Characterization of solute efflux from dehydration injured soybean (*Glycine max* L. Merr) seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.72, n.4, p.911-914, Aug. 1983.
- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D. Loss of desiccation tolerance during seed germination: a free radical mechanism of injury. In: LEOPOLD, A.C. (ed.) **Membranes, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Cornell University Press, 1986. p. 85-101.
- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D.; BOROCHOV, A. Desiccation and free radical mediated changes in plant membranes. **Journal of Experimental Botany**, London, v.38, n.197, p.2005-2014, Dec. 1987.
- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D.; BOWLEY, S.R. Desiccation tolerance of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. Influence of abscisic acid, stress pretreatments and drying rates. **Plant Science**, Amsterdam, v.65, n.2, p.253-259, 1989.
- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D.; STINSON, R.H. Antioxidant levels in germinating soybean seed axes in relation to free radical and dehydration tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v.78, n.1, p.168-171, May 1985.

- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D.; STINSON, R.H. Association between membrane phase properties and dehydration injury in soybean axes. **Plant Physiology**, Rockville, v.76,n.3,p.759-762, Nov. 1984.
- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D.; STINSON, R.H. Simulation of dehydration injury to membranes from soybean axes by free radicals. **Plant Physiology**, Rockville, v.77,n.3,p.472-174, Mar. 1985.
- SHERWIN, H.W.; FARRANT, J.M. Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.24, p.203-210, 1998
- SILVA, E.B.; NOGUEIRA, F.D.; GUIMARÃES, P.T.G.; CHAGAS, SLJ. De R.; Costa, L. Fontes e doses de óptássio na produção e qualidade do grão de café beneficiado. **Pequisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.3, p.335-345, mar. 1999.
- SIMON, E.W. & RAJA-HARUM, R.M. Leakege during imbibition. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.23,n.77,p.1076-85, 1972.
- SIMON, E.W. Phospholipids and plant membrane permeability. **New Phytologist**, London, v.73,p.377-420, 1974.
- SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S. (1992) Oxygen radical generatin by isolated mecosomes from soybean seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v.100,n.3,p.1263-1268, Nov. 1985b.
- SKRIVER, K.; MUNDY, J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. **Plant Cell**, Rockville, v.2,n.6,p.503-512, June 1990.
- SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. Tansley Review No. 52. **New Phytologist**, London, v.125,n.1,p.27-58, Sept. 1993.
- SMITH, P.T.; COBB, B.G. Accelerated germination of peppers seed by priming with salt solutions and water. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 4, p. 417-419, Apr. 1991a.
- SMITH, P.T.; COBB, B.G. Physiological and enzymatic activity of peppers seeds (*Capisicum annuum* L.) during priming. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 82,n.3,p. 443-449, Mar. 1991b.

- SONDHEIMER, E. On the distribution of caffeic acid and the chlorogenic acid isomers in plants. **Archives of Biochemistry & Biophysics**, Orlando, v.74, p.1311-138, 1958.
- STRAUSS, G.; HAUSER, H. Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.83, p.2422-2426, 1986.
- SUNDSTROM, F. J.; EDWARDS, R.L. Pepper seed respiration, germination, and seedling development following seed priming. **HortScience**, Alexandria, v.24, n.2, p.343-345, Apr. 1989.
- THOMANN, E.B.; SOLLINGER, J.; WHITE, C.; RIVIN, C.J. Accumulation of group 3 embryogenesis abundant proteins in *Zea mays* embryos. Roles of abscisic acid and the viviparous-1 gene product. **Plant Physiology**, Rockville, v.99, n.2, p.607-614, June 1992.
- TOMPSETT, P.B.; PRITCHARD, H.W. The effect of chilling and moisture status on the germination, desiccation tolerance and longevity of *Aesculus hippocastanum* L. seed. **Annals of Botany**, New York, v.82, n.2, p.249-261, Aug. 1998.
- VALIO, I. F. M. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L. Cv. Mundo Novo). **Journal of Experimental Botany**, London, v.27, n.100, p.983-991, Sept. 1976.
- VAN BÜREN, J. Fruit phenolics. In: HULME, AC. **The biochemistry of fruits and their products**. New York, Academic Press, 1970. v.1, p.268-304
- VAN DER STEGAN, G.H.D.; VAN DUJIN, J. Analysis of chlorogenic acids in coffee. In: INTERNACIONAL. SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 9., 1980, London. Paris: ASIC, 1980. p.107-112.
- VANTOAI, T.T.; FAUSEY, N.R.; MCDONALD JR, M.B. Anaerobic metabolism enzymes as markers of flooding stress in maize seeds. **Plant and Soil**, New York, v.102, n.1, p.33-39, 1987.
- VASCONCELOS, L.M.; GROTH, D.; RAZERA, L.F. Efeito de processos de secagem, diferentes graus de umidade e tipos de embalagens na conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.14, n.2, p.181-188, 1992.

- VAZQUEZ, G.H. Condicionamento fisiológico de sementes de soja: efeitos sobre a germinação, vigor e potencial de armazenamento. Piracicaba: ESALQ, 1995. 138p.
- VERTUCCI, C.W. Calorimetric studies of the state of water in seed tissues. *Biophysical Journal*, Bethesda, v.58, p.1463-1471 1990.
- VERTUCCI, C.W.; CRANE, J.; PORTER, R.A.; OELKE, E.A. Physical properties of water in *Zizania* embryos in relation to maturity status, water content and temperature. *Seed Science Research*, Wallingford, v.4, n.3, p.211-224, Sept. 1994.
- VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In KIGEL, J.; GALILI, G. (eds) *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, 1995. p.237-271.
- VERTUCCI, C.W.; LEOPOLD, A.C. The relationship between water binding and desiccation tolerance in tissues. *Plant Physiology*, Rockville, v.85, n.1, p.232-238, Sept. 1987a.
- VERTUCCI, C.W.; LEOPOLD, A.C. Water binding in legume seeds. *Plant Physiology*, Rockville, v.85, n.1, p.224-231, Sept. 1987b.
- VIEIRA, M.G.C.G. Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). Lavras:UFLA, 1996. 127p. (Tese-Doutorado em Fitotecnia).
- VILLIERS, T.A. Ageing and longevity of seeds in field conditions. in: HEYDECKER, W., (ed.), *Seed ecology*, London, 1973. 578p.
- VILLIERS, T.A.; EDGCUMBE, D.J. On the cause of seed deterioration in dry storage. *Seed Science and Technology*, Wageningen. v.3. n.3. p.761-774, 1975.
- VOSSSEN, H.A.M. Methods of preserving the viability of coffee seed in storage. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.7, n.1, p. 65-74, 1979.
- WALTER, J. Chemical reactivity of a macromolecule as function of its age. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v.69, p.410-411, 1963.

- WEBSTER, B.D.; LEOPOLD, A.C. The ultrastructure of dry and imbibed cotyledons of soybean. **American Journal of Botany**, Columbus, v.64,n.10,p.1286-1293, Nov./Dec. 1977.
- WELLMAN, F.L.; TOOLE, V. K. Coffea seed germination as affected by species, diseases and temperature. Proceedings of the caribbean section, **American Society of Horticultural Sciences**, New York, v.4, p.1-6, 1960.
- WESTERMEIER, (ed) **Electrophoresis in practice: a guide to theory and practice**: New York: VCH, 1993. 227p.
- WHITAKER, H.R. **Principles of enzymology for the food sciences**. New York: Marcel Dekker, 1972. p.571-582.
- WILLIAMS, R.J.; LEOPOLD, A.C. The glassy state in com embryos. **Plant Physiology**, Rockville, v.89, p.977-981, 1989.
- WILLIAMSON, J.D.; QUATRANO, R.S. ABA-regulation of two classes of embryo-specific sequences in mature wheat embryos. **Plant Physiology**, Rockville, v.86,n.1, p.208-215, Jan. 1988
- WILSON JR., D.O.; McDONALD JR., M.B. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.14,n.3,p.269-300, 1986.
- WINSTON, G.W. Physiochemical basis for free radical formation *in* cells: production and defenses. In: ALSCHER, R.G. AND CUMMING, J.R. (eds) **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York: Wiley-Liss, 1990. p 57-86
- XU, N.; BEWLEY, J.D. Sensitivity to abscisic acid and osmoticum changes during embryogenesis of alfalfa (*Medicago sativa*). **Journal of Experimental Botany**, London, v.42,n.240,p.821-826, July 1991.
- YAMADA, K. Endogenous abscisic acid in barley and use of abscisic acid in malting. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.49,n.2, p.429-434, Feb. 1985.
- ZAWISTOWSKI, J.; BILIADERIS, C.G.; ESKIN, N.A N. Polyphenoloxidases. In: ROBINSON, D.S.; ESKIN, N.A M. **Oxidative enzymes in foods**. New York: Elsevier Applied Science, 1991. p.217-274.

ZHANG, M.; MAEDA, Y.; FURIHATA, Y.; NAKAMAR, Y. ESASHI, Y.A.  
**Mechanism of seed deterioration in relation to the volatile compounds  
evolved by dry seeds themselves. *Seed Science Research*, Wallingford, v.4,  
n.1, p.49-56, Mar.1994.**

ZHENG, G.H.; WILEN, R.W.; SLINKARD, A.E.; GUSTA, L.V. Enhancement  
of canola seed germination and seedling emergence at low temperature by  
priming. ***Crop Science***, Madison, v.34,n.6, p.1589-1593, Nov./Dec. 1994.



## CAPÍTULO 2

### TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)

#### RESUMO

GUIMARÃES, Renato Mendes. Tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro. Lavras: UFLA, 2000. 180p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia)

A capacidade de sobreviver apresentada pelas sementes da maioria das espécies, mesmo quando são submetidas à desidratação, é um atributo fundamental para sua resistência à armazenagem. Com o objetivo de avaliar o desenvolvimento de mecanismos de tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro em diferentes estádios de maturação, foram conduzidos ensaios nos Laboratórios de Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras e de Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Sementes de cafeeiro da cultivar Rubi foram colhidas nos campos de produção da UFLA, quando se encontravam nos estádios de desenvolvimento caracterizados como verde, verde-cana e cereja. Os tratamentos constaram de métodos de secagem: convencional, em câmara com umidade do ar controlada (Higrostat) e sem secagem. As avaliações foram feitas pelos testes de germinação, índice de velocidade de germinação, taxa de emergência em bandejas, índice de velocidade de emergência,  $T_{50}$ , dosagens de açúcares em HPLC e eletroforese de proteínas LEA's. De acordo com os resultados, concluiu-se que as sementes de cafeeiro apresentaram redução de vigor e viabilidade quando submetidas à secagem. O vigor aumentou sensivelmente na fase de desenvolvimento entre os estágios verde e verde-cana. As proteínas estáveis ao calor (LEA proteínas) se correlacionaram com a tolerância à dessecação existente nas sementes de cafeeiro. A sacarose não foi fator limitante para aquisição de tolerância à dessecação e que glicose, rafinose e estaquiase, não foram detectadas em embriões de sementes de cafeeiro.

## ABSTRACT

GUIMARÃES, Renato Mendes. **Desiccation tolerance in coffee seeds (*Coffea arabica* L.)**. Lavras: UFLA, 2000. 180p (Thesis – Doctorate in crop science).

The capacity presented by the seeds of most species to survive even when submitted to dehydration is a fundamental trait to resistance to storage with the objective of evaluating the development of mechanisms of desiccation tolerance in coffee seeds at different maturation stages, trials were conducted in the Universidade Federal de Lavras Seed Analysis Laboratories and chromatography at the chemistry department of the Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Coffee seeds of the cultivar Rubi were harvested in the UFLA cropland when they were at the developmental stages characterised as green, yellow and red. The treatments consisted of drying methods: conventional, in controlled air humidity chambers (Higrostat) and without drying. The evaluations were done by germination tests, germination velocity index,  $T_{50}$ , tray emergence, rate sugar dosage in HPLC and LEA'S protein electrophoresis. According to the results, it follows that coffee seeds presented reduced vigor and viability when submitted to drying vigor increased markedly at the developmental phase between the green and yellow stages. The heat-stable proteins (LEA protein) correlated to the desiccation tolerance existing in the coffee seeds. Sucrose was not a limiting factor for obtaining desiccation tolerance and glucose, raffinose and stachiose were not detected in coffee seed embryos.

# 1 INTRODUÇÃO

As sementes representam para a maioria das espécies, não apenas a estrutura básica de reprodução, fundamental para o sucesso da atividade agrícola, como também um reservatório genético que pode ser preservado de maneira segura, econômica e por períodos longos de tempo. Entretanto, algumas espécies de plantas, onde estão incluídas as do gênero *Coffea*, apresentam sementes com potencial de longevidade de poucos meses, variando em função das diferentes espécies, modo de preparo das sementes, com as condições de armazenamento e com outros fatores ainda desconhecidos e que precisam ser investigados. É notório que o armazenamento das sementes ditas ortodoxas, é mais fácil, barato e seguro, mas as sementes de cafeeiro demonstram um comportamento intermediário em relação a essa característica, e, provavelmente por isso, sua preservação seja mais difícil, e os resultados das pesquisas nestes aspectos sejam inconsistentes e não conclusivos. Por outro lado, esse tipo de comportamento apresentado pelas sementes de cafeeiro, permite que sejam lançadas hipóteses para a investigação de mecanismos de tolerância à dessecação que, se convenientemente manejados, podem acentuar ou induzir, o comportamento ortodoxo e, conseqüentemente, facilitar e prolongar o tempo de armazenamento.

Dessa forma, mediante essa pesquisa, teve-se como objetivo avaliar o efeito da secagem na aquisição de tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro, obtidas em frutos em diversos estágios de maturação, desenvolvimento e submetidas a diferentes métodos de secagem.

## 2 MATERIAL E METODOS

### 2.1 Localização do experimento.

Os ensaios foram realizados nos Laboratórios de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras e de Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, no período de Janeiro de 1998 a Janeiro de 1999.

### 2.2 Colheita e preparo das sementes

Sementes de cafeeiro da cultivar Rubi foram colhidas dos campos de produção de sementes da Universidade Federal de Lavras, em três diferentes estádios de desenvolvimento: verde, verde-cana e cereja. Cada estágio foi obtido em época distinta, quando as plantas apresentavam a maior parte dos frutos no estágio objeto da colheita, em plantas tomadas aleatoriamente. Os frutos foram colhidos dos ramos médios das plantas e das partes medianas dos ramos. Após a colheita dos frutos em cada estágio, estes eram selecionados para uniformização do estágio de maturação, em que se considerou: - verdes – frutos com o exocarpo de coloração verde escura, sem nenhuma mancha ou sinal de amadurecimento; - verde-cana- frutos com a coloração do exocarpo amarelada, com manchas de amarelo a vermelho, mostrando sinais do início da maturação dos frutos; - cereja – frutos com exocarpo de coloração vermelho intenso, característico de maduro na cultivar Rubi. Logo após a colheita e seleção, os frutos de cada estágio foram submetidos à determinação do teor de água pelo método da estufa ( $105 \pm 3^\circ\text{C}$  por 24 horas)(Brasil, 1992).

### 2.3 Obtenção dos tratamentos

As sementes foram avaliadas em cada estágio de desenvolvimento, nas seguintes condições relativas à secagem:

### -Sem secagem

Imediatamente após a colheita, antes que os frutos perdessem água.

### -Secagem Convencional

Os frutos foram colocados em camada única dentro de bandejas plásticas e deixados em ambiente de laboratório, por 24 dias, até o equilíbrio higroscópico, que aconteceu em torno de 12% de umidade.

### Secagem em ambiente controlado

A secagem em ambiente controlado foi realizada pelo controle artificial da umidade relativa no interior de câmaras (Higrostat). (Fig. 1). O aparelho consiste de uma caixa de acrílico com tampa para fechamento hermético, à qual foi adaptado um fundo telado, suspenso cerca de 20cm em relação ao fundo verdadeiro, um sistema de circulação de ar interno, com a finalidade de promover uma constante homogeneização da umidade relativa do ar dentro da caixa.

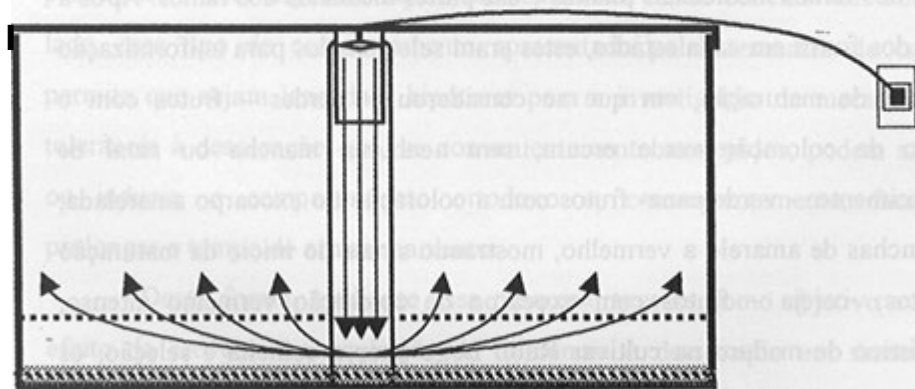


Figura 1 – Esquema de um higrostat. UFLA, Lavras, MG, 2000.

No fundo da caixa, numa bandeja, foi colocada uma solução salina higroscópica que, em função do tipo de sal utilizado, propicia uma dada umidade relativa do ar dentro da caixa. A solução salina utilizada no higrostat foi

preparada dissolvendo-se o sal específico em água fervendo, em quantidade suficiente para alcançar a saturação. A saturação foi confirmada pela formação de cristais no fundo dos recipientes que continham as soluções, após o resfriamento para a temperatura na qual foi realizada o tratamento (20°C). Para o preparo das soluções foi adotada metodologia descrita por Medeiros (1996) e consultado o MERCK & CO. INC. (1989) para obtenção da solubilidade do sal.

O sal utilizado foi o carbonato de potássio ( $K_2CO_3$ ), do qual foram gastos 5Kg para o preparo de 3 litros de solução, que propiciou uma umidade relativa dentro do higrostat de 48,4%. Os frutos foram colocados sobre o fundo telado em camada única dentro do higrostat (20°C e 48.4-%UR), onde permaneceram por oito dias, até atingirem o equilíbrio higroestático. Em seguida foram retiradas amostras para determinação do teor de água (sementes no fruto) e a secagem foi completada em 16 dias, à sombra até o equilíbrio higrostatico no mesmo ambiente onde estavam as sementes do tratamento secagem convencional (12% de umidade).

Após cada tratamento, parte dos frutos foram descascados manualmente e as sementes avaliadas pelo teste de germinação, índice de velocidade de germinação, tempo médio para germinação de 50% das sementes ( $T_{50}$ ), Condutividade elétrica, e outra parte submetida ao congelamento e mantida em deep freezer à -82°C, para futuras determinações bioquímicas ( Determinação de Açúcares e Análise eletroforética de LEA's Proteínas).

## 2.4 Determinação do grau umidade das sementes

Foram realizadas determinações do grau de umidade das sementes logo após a colheita de cada estágio, após a retirada das sementes do higrostat e após estabelecimento do equilíbrio higroscópico com o ambiente (método secagem em ambiente controlado) e ao final do processo da secagem convencional. Foram utilizadas duas amostras (frutos inteiros) de 20g cada uma e adotaram-se

os procedimentos prescritos pelas Regras para Análise de Sementes para o método da estufa a  $105\pm 3^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. (Brasil, 1992)

## 2.5 Teste de germinação e índice de velocidade de germinação

Como substrato foi utilizado o rolo de papel toalha umedecido com água na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel. Os rolos em número de quatro, contendo 50 sementes cada, foram mantidos em germinador regulado à temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ . Foram realizadas contagens a cada 3 dias, considerando germinadas as plântulas que apresentaram radícula com comprimento maior ou igual a 1mm. Após a estabilização do número de sementes germinadas, foi calculado o índice de velocidade de germinação pelo somatório do número de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo número de dias decorridos entre a semeadura e a contagem (Maguirre, 1962). A porcentagem de germinação foi avaliada após 30 dias, segundo as prescrições das RAS (Brasil, 1992).

## 2.6 Teste de condutividade elétrica

Esse teste foi efetuado com quatro repetições de 50 sementes submetidas aos diversos tratamentos de secagem e de cada estágio de desenvolvimento, aparentemente isentas de danos mecânicos. Sementes de cada parcela foram pesadas com precisão de 0,01g e a seguir colocadas em copos plásticos contendo 75ml de água deionizada, permanecendo em embebição à temperatura constante de  $30^{\circ}\text{C}$ . No mesmo ambiente foi deixado um copo com 75ml de água pura. Decorridas 24 horas, foi efetuada a leitura de condutividade elétrica das soluções em  $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ , utilizando-se de um condutivímetro marca Digimed modelo CD 21A. Os resultados foram obtidos calculando-se: -condutividade lida para cada

parcela, subtraída da condutividade lida para a água pura, dividido pelo peso das sementes, sendo expressos em  $\mu\text{S}/\text{cm}^2/\text{g}$ .

## 2.7 Teste de emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência e

$T_{50}$

Foram semeadas quatro repetições de cinquenta sementes para cada tratamento, em bandejas contendo mistura de terra e areia, previamente desinfestada, na proporção de 1:1. A profundidade da semeadura foi de 3 cm e as bandejas mantidas em câmara de crescimento vegetal, previamente regulada à temperatura de 30°C em regime alternado de luz e escuro (12 horas). As bandejas foram irrigadas quando necessário. A partir da emergência, foram realizadas avaliações diárias, computando-se o número de plântulas emergidas, até a estabilização. O índice de velocidade de emergência foi calculado segundo fórmula proposta por Maguirre(1962). A porcentagem de emergência das plântulas foi computada após a estabilização da emergência nas parcelas, avaliando-se o número de plântulas normais emergidas, e o  $T_{50}$  calculado pela fórmula abaixo:

$$T_{50} = [(G - G_1)/G_2 - G_1] + T$$

Onde:

$T_{50}$  = Tempo para a ocorrência de 50% da germinação

G = Metade do valor máximo de germinação

$G_1$  = Valor de germinação igual ou imediatamente inferior a G

$G_2$  = Valor de germinação imediatamente superior a G

I = Intervalo entre as contagens

T = Tempo para a ocorrência de  $G_1$



## 2.8 Determinação do conteúdo de açúcares

Amostras de sementes de cada estágio, e de cada método de secagem, foram retiradas do deep-freezer e deixadas por 24 horas para degelar em temperatura ambiente e, em seguida, embebidas em água destilada por mais 24 horas para facilitar a extração dos embriões. À medida que eram extraídos, os embriões foram colocados em microtubos contendo antioxidante (PVP- 40). Quando obtida a quantidade suficiente para as análises (200mg), os microtubos contendo os embriões foram imediatamente congelados pela submersão em nitrogênio líquido por 15 segundos e mantidos a  $-86^{\circ}\text{C}$  em deep-freezer. No momento da extração, 200 mg de embriões foram moídos em mortar com areia lavada, na presença de 1 ml de metanol ultrapuro 80% . O mortar foi lavado com 0.5 ml de metanol 80% e o conteúdo transferido para microtubos de 2mL que, foram incubados em banho Maria por 15 minutos a  $75^{\circ}\text{C}$  e congelados a  $-21^{\circ}\text{C}$  até a análise em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).(Bernal-Lugo e Leopold, 1992)

Para a análise em CLAE, as amostras foram diluídas em-agua ultrapura para 5mL em balão volumétrico, e filtradas em membranas de  $0.45\ \mu\text{m}$ . Utilizando água ultra pura como fase móvel, um volume de injeção de  $10\ \mu\text{L}$  e um fluxo de  $1.0\ \text{mL}/\text{minuto}$  (bomba LC - 10 AD - Shimadzu), os açúcares foram separados em coluna Dextrapak -cartucho waters-  $8\text{mm} \times 10\ \text{cm}$ - Radial - Pak e analisados em detetor de Índice de Refração (Waters 410), sensibilidade  $32 \times 20$ , polaridade +. Como padrão utilizaram-se os seguintes açúcares e as respectivas diluições: - glicose ( $8,70\text{mg}/\text{mL}$ ); sacarose( $9,40\text{mg}/\text{mL}$ ); rafinose( $8,85\text{mg}/\text{mL}$ ); estaquiouse( $8,75$ ).

## 2.9 Análise eletroforética de LEA's proteínas

Embriões das sementes, de cada um dos tratamentos, extraídos e conservados como descrito no item 2.8, foram utilizados para análise

eletroforética de LEA's proteínas. Os embriões foram pesados (100 mg), moídos por 1 minuto em mortar na presença de nitrogênio líquido, colocados em microtubos de 1500  $\mu\text{L}$  com 270  $\mu\text{L}$  de tampão (50mM tris-HCl-7,5; 500mM NaCl; 5mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1mM PMSF; 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Leupeptim; e 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Antipain) e agitados em Vortex. O homegeneizado cru foi centrifugado a 14000g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante incubado em banho Maria a 80°C por 10 minutos e novamente centrifugado como acima referido. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o pellet descartado. Antes da aplicação no gel, os tubos de amostras contendo 60 $\mu\text{L}$  de extrato + 20 $\mu\text{L}$  de **solução** tampão da amostra (5mL de glicerol; 2,5mL de solução tampão do gel concentrador; 2,5mg de azul Bromofenol e completado o volume para 25mL de água deionizada) foram colocados em banho-maria com água em ebulição por 5 minutos (Blakeman et al. 1991). Foram aplicados 60 $\mu\text{L}$  do extrato com LEA proteína + 20 $\mu\text{L}$  do tampão da amostra por canaleta, em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 150 V por cerca de 4 horas. Após a migração eletroforética os géis foram corados em Coomassie Blue a 0,05% conforme Alfenas et al., (1991), durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10%.

## 2.10 Análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial (3x3), com quatro repetições, sendo três estádios de maturação das sementes (verde, verde-cana e cereja) e três métodos de secagem (sem secagem, secagem em ambiente controlado e secagem convencional). Os dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Umidade dos frutos

De acordo com a Tabela 1, observa-se que o teor de água dos frutos, antes de serem submetidas a secagem (SS), no estágio verde-cana, apresentou valores mais baixos que os demais estádios. Essa variação pode ser atribuída às condições climáticas dos dias que antecederam as colheitas, uma vez que após a queda de umidade do estágio verde para o verde-cana, esta volta a crescer nos frutos do estágio mais avançado de maturação, descaracterizando, dessa forma, um declínio da umidade, típico do final da maturação.

**TABELA 1** - Teores médios de umidade dos frutos antes de serem submetidas aos tratamentos sem secagem(SS), após incubação no higrostat(AH) e a umidade final alcançada pelas sementes(UF). UFLA, Lavras - MG, 2000.

ESTÁDIO DE MATURAÇÃO	TRATAMENTOS		
	SS	AH	UF
VERDE	56,95	46.12	9.97
VERDE-CANA	52,79	45.98	13.09
CEREJA	57,84	47.09	10.99

Pode ser notado que após a permanência dos frutos higrostat(AH) por 8 dias, houve uma uniformização entre os teores de água dos frutos colhidos nos diferentes estádios de maturação. Observa-se que houve uma queda, em relação aos valores observados antes da secagem, até a estabilização em um patamar determinado pela umidade relativa do ar conferida pela solução de  $K_2CO_3$  dentro do higrostat. Já nos frutos com secagem convencional, foi possível constatar

certa desuniformidade entre os teores de água dos **frutos** colhidos nos diferentes estádios de maturação, **que** também pode ser atribuída às condições ambientais.

### 3.2 Análise de variância dos dados

O resumo da análise de variância aos dados obtidos **nos testes para** avaliar a influência dos estádios de maturação e dos métodos de secagem, sobre a **qualidade** das sementes de cafeeiro encontra-se na Tabela 1A. Os fatores, métodos de secagem e estádios de maturação, apresentaram diferenças altamente significativas (1% de probabilidade) em todos os testes utilizados para avaliação. A interação entre os dois fatores também foi significativa para todos os testes, sendo que, para o teste de germinação e para o índice de velocidade de emergência o nível de significância foi de 5% de probabilidade e para os demais de 1% de probabilidade.

### 3.3 Teste de germinação

Verifica-se (Tabela 2), que as sementes antes de serem submetidas à secagem apresentaram maior porcentagem de germinação, independentemente do estágio de maturação, quando comparadas com aquelas submetidas aos outros métodos de secagem. Nos métodos de secagem em ambiente controlado e convencional houve diferença apenas no estágio cereja, no qual a secagem controlada promoveu maior germinação. As comparações entre os estádios de maturação indicam que as sementes nos estádios cereja e verde-cana, apresentaram maior germinação, para qualquer dos três métodos de secagem, se comparadas com aquelas do estágio verde. Comparadas entre si, foram iguais nos métodos sem secagem e secagem convencional e o método de secagem controlada promoveu maior germinação nas sementes no estágio cereja. O maior potencial de germinação foi observado nas sementes colhidas em estádios de maturação mais adiantados, o que demonstra que, nas sementes de

cafeeiro, a germinação tende a aumentar com o seu desenvolvimento. Por outro lado, não foi constatada durante a secagem controlada, a evolução do desenvolvimento (por causa do período de tempo em que os frutos permaneceram com teores de água altos durante a secagem), que se esperava ocorrer; fato este comprovado em função da estabilidade dos níveis de germinação, ou seja, as sementes nos estádios verde ou verde-cana, mesmo sob secagem controlada não atingiram taxa de germinação semelhantes àquelas alcançadas no estágio cereja.

**TABELA 2** - Porcentagem média de germinação de sementes de cafeeiro obtidas de frutos colhidos nos estádios de desenvolvimento verde, verde-cana e cereja, submetidas a métodos de secagem: secagem controlada(SL), secagem convencional(SC) e sem secagem(SS). UFLA, Lavras - MG, 2000

ESTÁDIO DE MATURAÇÃO	TRATAMENTOS			MÉDIAS
	SS	SL	SC	
VERDE	75,75 a B	60,75 b C	65,50 b B	67,33
VERDE-CANA	89,75 a A	76,25 b B	78,50 b A	81,50
CEREJA	93,00 a A	87,50 b A	78,75 c A	86,42
MÉDIAS	86,16	74,83	74,25	78,42

As médias seguidas de uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

A capacidade de germinação é um atributo adquirido progressivamente, (Kermonde e Bewley, 1989), fato constatado pelos resultados que indicam uma evolução acentuada da germinação entre os estádios verde e verde-cana, e uma subsequente tendência de estabilização entre os estádios verde-cana e cereja, em todos os métodos de secagem.

As sementes tiveram as maiores taxas de germinação, antes da secagem em qualquer dos estádios estudados, evidenciando que sementes de cafeeiro podem ser incluídas num grupo descrito por Kermode e Bewley, 1989, para o qual a dessecação não representa um sinal que desvia o programa de desenvolvimento, para um programa de germinação, visto que a secagem foi prejudicial à germinação, mesmo no estádio verde no qual fatores como altos teores de ABA (Long, Dale e Sussex, 1981; Ackerson, 1984; Finkelstein et al., 1985; Prevost e Le Page-Degivry, 1985; Quatrano, 1986; Koomneef et al., 1989; Xu e Bewley, 1991), e resistencia de tecidos que circundam o embrião (Bewley, Kermode e Misra, 1989; Berry e Bewley, 1991) podem inibir a germinação e por isso confundir os efeitos degenerativos da secagem. A observação que, qualquer tipo de secagem influenciou negativamente na germinação, demonstra o caráter de intolerância à dessecação das sementes de cafeeiro, embora a intensidade dessa influencia não tenha se apresentado de maneira drástica e com limites de umidade altos como aqueles apresentados pelas sementes tipicamente recalcitrantes. As sementes de café foram inicialmente classificadas por Roberts (1973) como recalcitrantes. Ellis, Hong e Roberts (1990) observaram que essas sementes apresentavam características tanto do comportamento ortodoxo, como do recalcitrante, e sugeriram a sua inclusão numa nova categoria chamada de intermediária. As sementes classificadas como apresentando comportamento intermediário, na fase pós-colheita, são relativamente tolerantes à dessecação, mas provavelmente não resistirão à remoção de água para níveis tão baixos quanto as sementes ortodoxas. São sementes, particularmente de origem tropical, (Ellis, Hong e Roberts, 1990; Hong e Ellis, 1995). Esses resultados podem explicar porque vários autores (Couturon 1980, Reddy, 1987, Andreoli, 1992; Camargo, Groth e Razera, 1993; Dias e Barros, 1993 e Miranda et al., 1993), preconizaram o armazenamento de sementes de cafeeiro com altos níveis de umidade confirmando essa tendência ao seu comportamento recalcitrante.

### 3.4 Índice velocidade de germinação

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados do índice de velocidade de germinação de sementes de cafeeiro quando submetidas a diferentes métodos de secagem, em diferentes estádios de maturação. O vigor das sementes não variou com o método de secagem, quando as sementes estavam no estágio verde. No estágio verde-cana, o maior vigor foi apresentado pelas sementes sem secagem e

**TABELA 3** – Índice de velocidade de germinação de sementes de cafeeiro obtidas de frutos colhidos nos estádios de desenvolvimento verde, verde-cana e cereja, submetidas a métodos de secagem: secagem controlada(SL), secagem convencional(SC) e sem secagem(SS). UFLA, Lavras - MG, 2000

ESTÁDIO DE MATURAÇÃO	TRATAMENTOS			MÉDIAS
	SS	SL	SC	
VERDE	3,94 a C	3,97 a C	4,29 a B	4,06
VERDE-CANA	5,65 a B	4,98 b B	5,25 a b A	5,29
CEREJA	6,14 a A	5,85 a A	5,25 b A	5,74
MÉDIAS	5,24	4,93	4,92	5,03

As médias seguidas de uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

o mais baixo pelas sementes com secagem controlada; e o das sementes com secagem convencional não diferiu do daquelas submetidas aos dois outros métodos. No estágio cereja, as sementes submetidas aos métodos sem secagem e secagem controlada apresentaram resultados iguais entre si e superiores ao método secagem convencional. Pode-se verificar que sementes não submetidas à secagem ou após secagem controlada apresentaram valores de vigor diferentes para estágio de maturação, sendo quanto mais altos tanto mais adiantado era esse estágio. A secagem convencional promoveu valores de vigor significativamente

iguais para estádios cereja e verde-cana e superiores quando comparados àqueles apresentados no estádio verde. A exemplo dos resultados obtidos no teste de germinação, as sementes não submetidas à secagem apresentaram melhor desempenho, evidenciando as perdas de qualidade devidas à dessecação. Entretanto, vale ressaltar que as diferenças, principalmente entre métodos de secagem, não foram tão evidentes como o foram para a germinação, especialmente no estádio verde. Este fato parece indicar que a secagem removeu fatores tais como: altas concentrações de ABA ou resistência de tecidos que circundam o embrião, que reduzem a velocidade de germinação, sem no entanto, reduzir sua taxa final. Durante o desenvolvimento das sementes, diversos fatores inibem a germinação, permitindo ao embrião completar a maturação. Dentre eles, podem-se citar: os tecidos que circundam o embrião (Bewley, Kermode e Misra, 1989; Berry e Bewley, 1991), baixos potenciais hídricos (Long, Dale e Sussex, 1988; Finkelstein e Crouch, 1985; Fischer *et al.*, 1988; Xu e Bewley, 1991) e altas concentrações de ABA (Long, Dale e Sussex, 1981; Ackerson, 1984; Finkelstein *et al.*, 1985; Prevost e Le Page-Degivry, 1985; Quatrano, 1986; Koornneef *et al.*, 1989; Xu e Bewley, 1991). Provavelmente os tecidos que circundam o embrião e as altas concentrações de ABA tenham sido os fatores que mais sofreram alterações, favorecendo as sementes submetidas à secagem.

A germinação, o vigor avaliado pelo índice de velocidade de germinação aumentou com o avanço do desenvolvimento das sementes, apresentando melhores resultados nos estádios mais avançados.

### 3.5 Condutividade elétrica

Pelos dados contidos na Tabela 4, verifica-se que, no estágio de maturação verde, as sementes não submetidas à secagem apresentaram os valores de condutividade elétrica do lixiviado menores que os das sementes



**TABELA 4**—Valores médios da condutividade elétrica do lixiviado de sementes de cafeeiro nos estádios de desenvolvimento verde, verde-cana e cereja, submetidas a métodos de secagem: secagem controlada(SL), secagem convencional(SC) e sem secagem(SS). UFLA, Lavras - MG, 2000

ESTÁDIO DE MATURAÇÃO	TRATAMENTOS			MÉDIAS
	SS	SL	SC	
VERDE	34,34 a A	106,04 b B	143,95 c B	94,78
VERDE-CANA	27,28 a A	67,81 b A	69,57 b A	54,89
CEREJA	22,83 a A	58,24 b A	56,92 b A	46,00
MEDIAS	28,15	77,36	90,15	65,22

As médias seguidas de uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

avaliadas após secagem controlada, que por sua vez apresentaram valores menores que daquelas submetidas à secagem convencional. As sementes nos estádios verde-cana e cereja também apresentaram menores valores quando sem secagem se comparadas com aquelas com secagem controlada ou convencional, que foram iguais entre si. Nas sementes sem secagem não houve diferenças entre os valores de condutividade para os diferentes estádios de desenvolvimento. Nos métodos secagem controlada e secagem convencional, as sementes nos estágios verde-cana e cereja apresentaram os valores de condutividade iguais entre si e superiores àqueles encontrados para sementes no estágio verde. Esses resultados são coerentes com aqueles encontrados para o teste de germinação e demonstram claramente que a secagem, lenta ou convencional, provocaram danos ao sistema de membranas celulares das sementes os quais são diferenciados em relação aos estádios de desenvolvimento das mesmas, sendo que, no estágio verde, as sementes são mais susceptíveis que nos estádios cereja e

verde-cana, indicando que os mecanismos de proteção às membranas são desenvolvidos entre os estádios verde e verde-cana. Muitas sementes sofrem uma rápida transição de uma fase de intolerância à tolerância à dessecação, aproximadamente na metade do seu período de desenvolvimento, precedendo ou coincidindo com a deposição de reservas (Kermode e Bewley, 1989; Kermode, Oishi e Bewley, 1989; Hong e Ellis, 1992). Nas sementes verdes o menor índice de danos apresentados por aquelas submetidas à secagem controlada em relação àquelas submetidas à secagem convencional, pode ser atribuído ao desenvolvimento de mecanismos de proteção durante a secagem.

Um indicador precoce de dano induzido por dessecação em membranas é a lixiviação de várias soluções citoplasmáticas (ions, açúcares e proteínas) que ocorrem na reidratação de tecidos dessecados (Seneratna e McKersie, 1983, 1986; Crowe et al., 1989). A taxa e extensão de lixiviado plasmático está possivelmente relacionada com o grau de sensibilidade à dessecação (Seneratna e McKersie, 1983, 1986).

### **3.6 Teste de emergência de plântulas**

Pode ser observado pelos dados contidos na Tabela 5, que sementes no estágio de desenvolvimento verde não sofreram influência do método de secagem quando avaliadas pelo teste de emergência de plântulas. Nos estágios verde-cana e cereja, as maiores porcentagens de emergência foram apresentadas pelas sementes sem secagem. As sementes após secagem controlada ou secagem convencional, apresentaram porcentagem de emergência iguais entre si e inferiores àquelas sem secagem. Nas sementes sem secagem as maiores porcentagens de emergência foram alcançadas pelas sementes no estágio cereja, seguidas por aquelas no estágio verde cana que apresentaram porcentagens superiores àquelas avaliadas no estágio verde.

**TABELA 5** – Porcentagem média de emergência de plântulas originadas de sementes de cafeeiro obtidas de frutos colhidos nos estádios de desenvolvimento verde, verde-cana e cereja, submetidas a métodos de secagem: secagem controlada(SL), secagem convencional(SC) e sem secagem(SS). UFLA, Lavras - MG, 2000

ESTÁDIO DE MATURAÇÃO	MÉTODOS DE SECAGEM			MEDIAS
	SS	SL	SC	
VERDE	52,00 a C	44,50 a B	40,00 a B	45,50
VERDE-CANA	83,50 a B	64,00 b A	49,50 b A B	65,67
CEREJA	95,50 a A	66,00 b A	67,00 b A	76,17
MÉDIAS	77,00	58,17	52,17	62,45

As médias seguidas de uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

As sementes submetidas ao método de secagem controlada, quando nos estágios cereja e verde-cana, apresentaram porcentagem de emergência de plântulas estatisticamente iguais entre si e superiores às daquelas no estágio verde. As sementes submetidas à secagem convencional no estágio cereja apresentaram a maior taxa de emergência e no estágio verde a menor, enquanto valores intermediários foram apresentados pelas sementes submetidas à secagem no estágio verde-cana, que não se diferenciou estatisticamente dos outros dois. Os resultados obtidos por essa avaliação são similares àqueles encontrados para o índice de velocidade de germinação, de tal maneira que as considerações feitas naquele item (3.4.) são válidas também para análise dos resultados de emergência das plântulas.

### 3.7 Índice de velocidade de emergência

Pode-se verificar pela Tabela 6, que as sementes no estádio verde, não foram influenciadas pelos métodos de secagem, quando avaliadas pelo índice de velocidade de emergência. No estádio verde-cana, os maiores valores do índice foram alcançados nas sementes sem secagem e os menores, nas sementes com secagem convencional. Os valores intermediários alcançados pelas sementes submetidas à secagem controlada, não diferiram estatisticamente dos outros dois métodos. No estádio cereja as sementes mais vigorosas também foram aquelas não submetidas à secagem, enquanto aquelas com secagem controlada e convencional apresentaram valores mais baixos e iguais entre si. Sementes sem

**TABELA 6** – Valores médios do índice de velocidade de emergência de sementes de cafeeiro nos estádios de desenvolvimento verde, verde-çana e cereja, submetidas a métodos de secagem: secagem controlada (SL), secagem convencional(SC) e sem secagem(SS). UFLA, Lavras - MG, 2000

ESTÁDIO DE MATURAÇÃO	MÉTODOS DE SECAGEM			MÉDIAS
	SS	SL	SC	
VERDE	0,64 a C	0,60 a B	0,57 a B	0,6
VERDE-CANA	1,03 a B	0,92 a b A	0,72 b A B	0,89
CEREJA	1,28 a A	0,91 b A	0,91 b A	1,03
MÉDIAS	0,98	0,81	0,73	0,84

As médias seguidas de uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

secagem se apresentaram mais vigorosas, pelo índice de velocidade de emergência no estádio cereja enquanto sementes submetidas à secagem no estádio verde-cana apresentaram IVE de valor intermediário e as no estádio verde, o menor índice. Nas sementes submetidas à secagem controlada, os

maiores valores para o IVE foram obtidos, quando nos estádios cereja e verde-cana, embora os valores obtidos pela sementes verde-cana tenham sido estatisticamente iguais aos valores alcançados pelas sementes no estádio verde, que foram os mais baixos. Sementes no estádio cereja secadas pelo método convencional apresentaram os maiores índices de velocidade de emergência e quando no estádio verde, os menores. As sementes secadas no estádio verde-cana apresentaram IVE intermediário, com tendência de igualdade aos outros dois estádios.

É importante ressaltar a consistência dos resultados entre os testes utilizados nesta pesquisa para avaliar o vigor das sementes. Essa similaridade reforça as discussões apresentadas no item (3.4). As diferenças detectadas pelo teste de condutividade elétrica foram discutidas no item pertinente e demonstram a especificidade deste teste na avaliação do grau de estruturação de membranas celulares em sementes como já mencionado por Seneratna e McKersie, 1986.

### 3.8 Tempo médio para a ocorrência de 50% da germinação ( $T_{50}$ )

Pela Tabela 7 nota-se que as sementes no estádio verde, após secagem convencional, apresentaram maior velocidade inicial de germinação, demonstrada pelo  $T_{50}$ , quando comparadas com as sementes que foram submetidas a secagem controlada e àquelas não secadas. As sementes secadas de forma controlada apresentaram valores intermediários e aquelas sem secagem os mais altos valores de  $T_{50}$ . No estádio verde-cana, os maiores valores também foram verificados nas sementes não submetidas à secagem e as sementes submetidas a secagem controlada e convencional foram estatisticamente iguais entre si. Os diferentes métodos de secagem não influenciaram no  $T_{50}$  das sementes de cafeeiro colhidas no estádio cereja.

**TABELA 7**– Valores médios do  $T_{50}$  de sementes de cafeeiro obtidas de frutos colhidos nos estádios de desenvolvimento verde, verde-cana e cereja, submetidas a métodos de secagem: secagem controlada (SL), secagem convencional(SC) e sem secagem(SS). UFLA, Lavras - MG, 2000

ESTÁDIO DE MATURAÇÃO	TRATAMENTOS			MÉDIAS
	SS	SL	SC	
VERDE	45,40 c C	37,06 b B	33,37 a A	38,61
VERDE-CANA	42,97 b B	33,33 a A	32,33 a A	36,21
CEREJA	36,10 a A	37,53 a B	36,47 a B	36,7
MÉDIAS	41,49	35,97	34,05	37,17

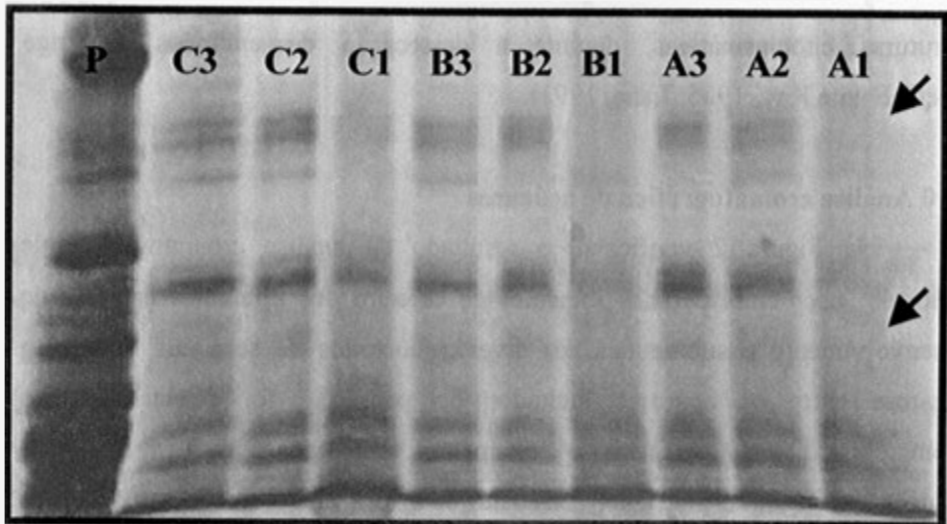
As médias seguidas de uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Em relação aos métodos de secagem, as sementes sem secagem, no estádio cereja apresentaram melhor desempenho que as demais e aquelas no estádio verde, o desempenho mais baixo. As sementes submetidas à secagem controlada apresentaram resultados estatisticamente iguais quando no estádio cereja e verde e inferiores àqueles alcançados pelas sementes no estádio verde-cana. As sementes secadas de forma convencional nos estádios verde e verde-cana tiveram um desempenho em relação ao  $T_{50}$ , estatisticamente iguais entre si e superiores àqueles alcançados pelas sementes no estádio cereja. Os ganhos de vigor detectados pelo tempo médio para ocorrência de 50% de germinação, em função da forma de secagem das sementes em diferentes estádios do desenvolvimento, reafirmam que as diferenças observadas entre os resultados de germinação e vigor, são ligadas a fatores inerentes à espécie, como já discutido no item 3.4, que reduzem a velocidade de germinação. Indicam ainda que estes fatores têm maior influência em sementes nos estádios precoces de

desenvolvimento, já que os efeitos são apresentados principalmente nos estádios verde e verde-cana e que interferem principalmente na primeira metade do processo de germinação, como verificado pelo teste do  $T_{50}$ .

### 3.9 Análise eletroforética de LEA's proteínas

O perfil eletroforético de proteínas apresentado na Figura 1, revela a presença de proteínas extraídas pelo calor em todos os estádios de desenvolvimento avaliados, independente do método de secagem. Entretanto, é evidente a ausência de algumas bandas nas sementes sem secagem (1) no terço superior do zimograma, e alteração na intensidade de outras, também nas sementes sem secagem(1), principalmente na parte mediana do perfil eletroforético, e que se tornam presentes de forma mais evidente, à medida que avança o estágio de desenvolvimento das sementes (A-B-C). Esses resultados são coerentes com a tendência observada nas demais avaliações, nos quais se verificou, nas sementes de cafeeiro um comportamento de intolerância à dessecação, pela queda de qualidade demonstrada na maioria das avaliações das sementes submetidas à secagem. A ausência de determinadas bandas nas sementes sem secagem, demonstram diferenças nas proteínas tipo LEA, que são coincidentes com as variações fisiológicas, indicando que as modificações nas proteínas estão atreladas à redução na tolerância à dessecação das sementes. Observações semelhantes foram verificadas em relação ao teste de condutividade elétrica, o que parece indicar que as proteínas LEA podem agir, também em sementes de café, como um agente protetor de membranas. Essas constatações e indicações podem ser explicadas ou sustentadas por relatos encontrados na literatura relativos às caracterizações de LEA's por análise de seqüência e predição estrutural (Baker, Steele e Durs, 1988; Dure et al., 1989 Piatkowski et al, 1990, Lane, 1991), que indicam que elas são ricas em glicina e outros aminoácidos hidrofílicos e têm poucos resíduos hidrofóbicos. **Estas**



**FIGURA I**– Perfil eletroforético de proteínas extraídas pelo calor em sementes de cafeeiro nos estádios de desenvolvimento verde (A), verde-cana (B) e cereja (C), sem secagem (1) ou submetidas a secagem controlada (2) e secagem convencional (3). Padrão referencial extraído de sementes de soja (P).UFLA, Lavras - MG, 2000

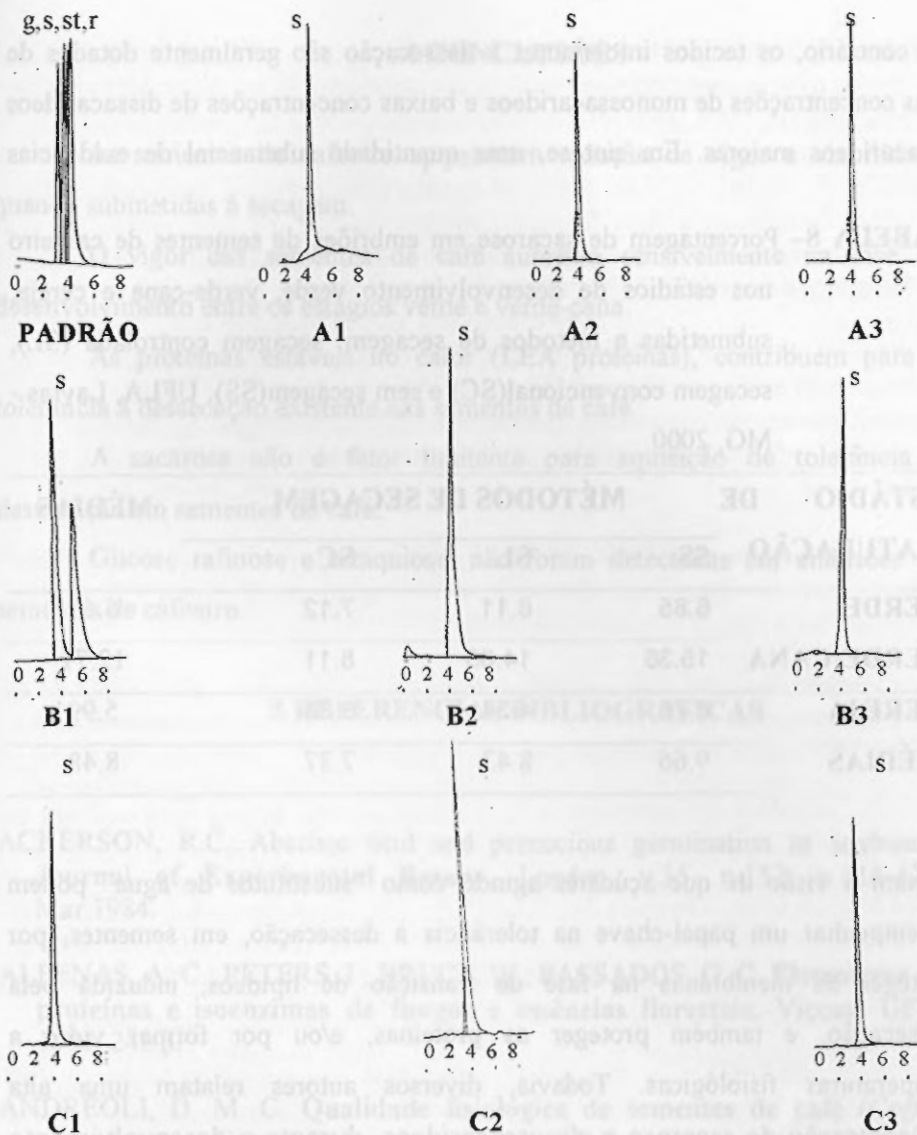
proteínas são, desta forma, facilmente solúveis em água, com alto nível de hidratação e provavelmente, localizadas exclusivamente na fração citosol. Elas geralmente são formadas por segmentos aleatórios, na forma de espiral ocasionalmente com uma longa  $\alpha$ -hélice amplificada, que deve servir como uma base para ordenar a estrutura superior. Elas são solúveis na fervura e não têm estado determinado termodinamicamente. Com base nesses dados, diversos autores sugerem que tais proteínas desempenham um papel estrutural como protetoras à dessecação (McCubbin e Kay, 1985; Baker, Steele e Durs, 1988; ... , 1991). Por exemplo, LEA-D11 e D113 de algodão são colocadas como desempenhadoras de um papel, em sinergismo com açúcares solúveis na inibição da cristalização do citoplasma e na preservação da superfície da membrana, enquanto D29 e GD29 prenderiam ions caóticos (Baker, Steele e Durs, 1988). Papel semelhante tem sido sugerido para a proteína (Em), que poderia substituir uma matriz de água ligada em sítios estratégicos e estabilizar



estruturas citoplasmáticas, durante a dessecação de embriões de trigo (McCubbin e Kay, 1985; Lane, 1991).

### 3.10 Análise cromatográfica de açúcares

Na Figura 2 verifica-se o resultado da análise cromatográfica de açúcares nos embriões das sementes de cafeeiro dos diferentes estádios do desenvolvimento e submetidas aos diversos métodos de secagem. Apenas a sacarose entre os açúcares incluídos no padrão, foi detectada. No cromatograma que representa o tratamento verde-cana/sem secagem (B1), aparece um segundo pico que, entretanto está fora do tempo de retenção dos açúcares pesquisados no padrão. As variações quantitativas podem ser verificadas na Tabela 8, onde são apresentados os resultados do conteúdo de sacarose em porcentagem. Percentuais mais elevados e discrepantes em relação aos demais foram apresentados pelos embriões das sementes no estádio verde-cana. Como esse fato não provocou efeito diferencial aparente que influenciasse nos testes fisiológicos, sugere-se que a quantidade de sacarose necessária para contribuir como mecanismo de tolerância a dessecação, seja menor que aquela encontrada no tratamento que apresentou menor percentual. Diversos resultados de pesquisas correlacionam a aquisição ou perda de tolerância à dessecação com açúcares solúveis durante a maturação de sementes de mostarda (Fischer *et al.*, 1988), milho (Chen, 1990a) e soja (Blackman, Obendorf e Leopold, 1992) e durante a germinação de ervilha, soja e milho (Koster e Leopold, 1988), e *Brássica campestris* (Leprince, 1992; Leprince *et al.*, 1992). De acordo com estes dados, os tecidos tolerantes são caracterizados por apresentarem alta quantidade de sacarose e oligossacarídeos (estaquiase ou rafinose (Kuo, Vanmiddlesworth e Wolf., 1998)), e por apresentarem ausência ou pelo menos muito baixa quantidade de monossacarídeos redutores, como a galactose, manose, glucose e frutose.



**FIGURA 2**– Cromatograma da análise de açúcares (g - glicose; s - sacarose; st - estaquiose; r - rafinose), em embriões de sementes de cafeeiro, nos estádios de desenvolvimento verde (A), verde cana (B) e cereja (C), sem secagem (1) ou submetidas a secagem controlada (2) e secagem convencional (3) e padrão referencial. UFLA. Lavras - MG. 2000

Ao contrário, os tecidos intolerantes à dessecação são geralmente dotados de altas concentrações de monossacarídeos e baixas concentrações de dissacarídeos e sacarídeos maiores. Em síntese, uma quantidade substancial de evidências

**TABELA 8**– Porcentagem de sacarose em embriões de sementes de cafeeiro nos estádios de desenvolvimento verde, verde-cana e cereja, submetidas a métodos de secagem: secagem controlada (SL), secagem convencional(SC) e sem secagem(SS). UFLA, Lavras - MG, 2000

ESTÁDIO DE MATURAÇÃO	MÉTODOS DE SECAGEM			MÉDIAS
	SS	SL	SC	
<b>VERDE</b>	<b>6.85</b>	<b>6.11</b>	<b>7.12</b>	<b>6.69</b>
<b>VERDE-CANA</b>	<b>15.36</b>	<b>14.85</b>	<b>8.11</b>	<b>12.77</b>
<b>CEREJA</b>	<b>6.76</b>	<b>4.34</b>	<b>6.88</b>	<b>5.99</b>
<b>MÉDIAS</b>	<b>9.66</b>	<b>8.43</b>	<b>7.37</b>	<b>8.48</b>

apoiam a visão de que açúcares agindo como “substitutos de água” podem desempenhar um papel-chave na tolerância à dessecação, em sementes, por proteger as membranas na fase de transição de lipídeos, induzida pela dessecação e também proteger as proteínas, e/ou por formar vidro a temperaturas fisiológicas. Todavia, diversos autores relatam uma alta concentração de sacarose e oligossacarídeos, durante o desenvolvimento de sementes recalcitrantes, sensíveis à dessecação (Farrant, Pammenter e Berjak, 1993), sugerindo que a capacidade de tolerar desidratação não é somente por causa da presença daqueles sacarídeos.

#### 4 CONCLUSÕES

As sementes de cafeeiro apresentam redução de vigor e viabilidade quando submetidas à secagem.

O vigor das sementes de café aumenta sensivelmente na fase de desenvolvimento entre os estágios verde e verde-cana.

As proteínas estáveis no calor (LEA proteínas), contribuem para a tolerância à dessecação existente nas sementes de café.

A sacarose não é fator limitante para aquisição de tolerância à dessecação em sementes de café.

Glicose rafinose e estaquiose, não foram detectadas em embriões de sementes de cafeeiro.

#### 5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ACKERSON, R.C. Abscisic acid and precocious germination in soybeans *Journal of Experimental Botany*, London, v.35, n.152, p.414-421, Mar.1984.
- ALFENAS, A. C., PETERS, I., BRUCE, W.; PASSADOS, G. C. Eletrofese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florísticas. Viçosa: UFGV, 1991. 242 p.
- ANDREOLI, D. M. C. Qualidade fisiológica de sementes de café (*Coffea canephora* cv. *Guarani*). Armazenas com diferentes graus de umidade em dois tipos de embalagem após secagem Natural e artificial. Campinas: UNICAMP, 1992. 87p. (Dissertação - Mestrado em Pré-Processamento).
- BAKER, J.; STEELE, C.; DURS, L, III. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology*, Drechit, v.11, p.277-291, 1988

- BERNAL-LUGO, I.; LEOPOLD, A.C. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. *Plant Physiology*, Rockville, v.98, n.3, p.1207-1210, Mar. 1992.
- BERRY, T.; BEWLEY, J.D. Seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) which develop in a fully hydrated environment in the fruit switch from a developmental to a germinative mode without a requirement for desiccation. *Planta*, Berlin, v.186, n.1, p.27-34, Jan. 1991.
- BEWLEY, J.D.; KERMODE, A.R.; MISRA, S. Desiccation and minimal drying treatments of seeds of castor bean and *Phaseolus vulgaris* which terminate development and promote germination cause changes in protein and messenger RNA synthesis. *Annals of Botany*, New York, v.63, n.1, p.3-17. Jan. 1989.
- BLACKMAN, S.A.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing seeds. *Plant Physiology*, Rockville, v.100, n.1, p.225-230, Sept. 1992.
- BLACKMAN, S.A.; WETTLAUFER, S.H.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. *Plant Physiology*, Rockville, v.96, n.3, p.868-874, July 1991.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Regras para análises de sementes. Brasília: SNTA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- CAMARGO, D.M.; GROTH, D.; RAZERA, L.F. Armazenamento de Sementes de café (*Coffea canephora* L. cv. Guarani) condicionadas em dois tipos de embalagens após secagem natural e artificial. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.15, n.1/2, p.87-95, Jul./Dez. 1993.
- CHEN, Y.; BURRIS, J.S. Role of carbohydrates in desiccation tolerance and membrane behavior in maturing maize seed. *Crop Science*, Madison, v.30, n.4, p.971-975, July/Aug. 1990.
- COUTURON, E. Mantenimiento de la viabilidad de las semillas de cafetos por el control de su contenido en agua y de la temperatura de almacenamiento. *Cafe Cacao The*, Paris, v.24, n.1, p.27-32, Jan./Mar. 1980.

- CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; HOEKSTRA, F.A.; AURELL WISTROM, C. Effects of water on the stability of phospholipid bilayers: the problem of imbibition damage in dry organisms. In STANWOOD, P.C.; MCDONALD, M.B. (eds) **Seed moisture**. Madison: Crop Science Society of America, 1989. P.1-22. (CSSA Special Publication, 14).
- DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) em diferentes embalagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.15, n.1/2, p.197- 202, Jun./Dez. 1993.
- DURE, L. H.; CROUCH, M.; HARADA, J.; MUNDY, H. J.; QUATRANO, R.; THOMAS, T.; SUNG, Z. R. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.12, p.475-486, 1989.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, London, v.41, n.230, p.1167-1174, Sep. 1990.
- FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. *Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation-sensitive (reclalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation-tolerant types.* **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n.1, p.1-13, Mar. 1993.
- FINKELSTEIN, R.R.; TENBARGE, K.M.; SHUMWAY, J.E.; CROUCH, M.L. Role of ABA in maturation of rapeseed embryos. **Plant Physiology**, Rockville, v.78, n.4, p.630-636, Aug. 1985.
- FISCHER, W.; BERGFELD, R.; PLACHY, C.; SCHAFFER, R.; SCHPFER, P. Accumulation of storage materials, precocious germination and development of desiccation tolerance during seed maturation in mustard (*Sinapis alba* L.). **Botanica Acta**, Stuttgart, v.101, p.344-354, 1988.
- HONG, T.D.; ELLIS, R.H. Development of desiccation tolerance in Norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds during maturation drying. **Seed Science Research**, Wallingford, v.2, n.2, p.169-172, June 1992.
- HONG, T.D.; ELLIS, R.H. Interspecific variation in seed storage behaviour within two genera – *Coffea* and *Citrus*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.23, n.1, p.165-181, 1995.

- KERMODE, A.R.; BEWLEY, J.D. Developing seeds of *Ricinus communis* L. When detached and maintained in an atmosphere of high relative humidity, switch to a germinative mode without the requirement for complete desiccation. *Plant Physiology*, Rockville, v.90, n.3, p.702-707, July 1989.
- KERMODE, A.R.; OISHI, M.Y.; BEWLEY, J.D. Regulatory roles for desiccation and abscisic acid in seed development: a comparison of the evidence from whole seeds and isolated embryos. In: STANWOOD, P.C. AND MCDONALD, M.B. (eds) **Seed moisture**. Madison: Crop Science of America, 1989. p. 23-50. (CSSA Special Publication, 14).
- KOORNNEEF J.; HILHORST, H.W.M.; KARSSSEN, C.M. In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, Rockville, v.90, n.3, p.463-469, July 1989.
- KOSTER, K.L.; LEOPOLD, A.C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology*, Rockville, v.88, n.4, p.829-832, Dec. 1988.
- KUO, T.M.; VANMIDDLESWORTH, J.F.; WOLF, W.J. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 36, n.1, p.32-36, Jan./Feb. 1988.
- LANE, B.G. Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. *FASEB Journal*. Bethesda, v.5, p.2893-2901, 1991.
- LEPRINCE, O. Etude des mécanismes de la résistance à la déshydratation dans les embryons des plantes supérieures. Liège: University of Liège, 1992. (PhD Thesis)
- LEPRINCE, O.; VAN DER WERF, A.; DELTOUR, R.; LAMBERS, H. Respiratory pathways in germinating maize radicles, correlated with desiccation tolerance and soluble sugars. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.84, n.4, p.581-588, Apr. 1992.
- LONG, S.R.; DALE, R.M.K.; SUSSEX, L.M. Maturation and germination of *Phaseolus vulgaris* embryonic axes in culture. *Planta*, Berlin, v.153, n.3, p.405-415, May 1981.

- MAGUIRRE, J.D. Speed of germination - aid seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2,n.2, p.176-177, Mar./Apr. 1962.
- MCCUBBIN, W.D.; KAY, C.M. Hydrodynamic and optical properties of the wheat Em protein. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v.63, p.803-810, 1985.
- MEDEIROS, A.C. dos S. Comportamento fisiológico, conservação de germoplasma a longo prazo e previsão de longevidade de sementes de aroeira{*Austromum urundeuva*(Fr. All.) Eng.}. Jaboticabal, FCAVJ/UNESP,, 1996. 130P. (Tese-Doutorado em Agronomia)
- Merck & CO., inc. The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, N.J., U.S.A.: Eleventh edition. Budavari, (ed), Rahway, 1989. 1605p.
- MIRANDA, J.M.; CARVALHO, M.M. DE; CARVALHO, M.L. DE; VIEIRA, M. DAS GRAÇAS. Estudos de alguns fatores que influenciam a duração da viabilidade de sementes de café. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.15, n.1/2, p.215-220, Jun./Dez. 1993.
- PIATKOWSKI, D.; SCHNEIDER, K.; SALAMINI, F.; BARTELS, D. Characterization of five abscisic acid-responsive eDNA clones isolated from the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water-stress genes. **Plant Physiology**, Rockville, v.94, n.4, p.1682-1688, Dec. 1990.
- PREVOST, I.; LE PAGE-DEGIVRY, M.T. Inverse correlation between ABA content and germinability throughout the maturation and the *in vitro* culture of the embryo of *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Experimental Botany**, London, v.36, n.170, p.1457-1464, Sept. 1985.
- QUATRANO, R.S. Regulation of gene expression of abscisic acid during angiosperm embryo development. **Oxford Survey of Plant Molecular and Cell Biology**, Oxford, v.3, 467-477, 1986.
- REDDY, L. S. Effect of different stages of maturity and posthrvest treatments on the seed viability of *Coffea arabica* L. **Journal of Coffee Research**, Kamataka, v.17, p.14-25, 1987.
- ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.2, p.499-514, 1973.



- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D. Characterization of solute efflux from dehydration injured soybean (*Glycine max* L. Merr) seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.72, n.4, p.911-914, Aug. 1983.
- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D. Loss of desiccation tolerance during seed germination: a free radical mechanism of injury. In: LEOPOLD, A.C. (ed.) **Membranes, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Cornell University Press, 1986. p. 85-101.
- XU, N.; BEWLEY, J.D. Sensitivity to abscisic acid and osmoticum changes during embryogenesis of alfalfa (*Medicago sativa*). **Journal of Experimental Botany**, London, v.42,n.240,p.821-826, July 1991.
- MIRANDA, J.M. CARVALHO M.M. DE CARVALHO M.L. DE VIEIRA. - In: DAS GRACAS - Estudos de sítios biotecnológicos de importância da viabilidade de sementes de cereais de sequeiro. Brasília, v.12, n.12, p.215-220, Jan. Dez. 1993.
- PREVOST, I. LE PAGE-DEGIVRY, M.T. Inverse correlation between ABA levels and germination in wheat: the maturation and the in vivo culture of the embryo of wheat. **Journal of Experimental Botany**, London, v.30, n.170, p.1457-1464, Sept. 1982.
- REDDY, J. S. Effect of different stages of maturity and post-ovary treatment on the seed viability of cotton. **Journal of Cotton Research**, Gandhinagar, v.1, p.149-154, 1981.
- ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.2, p.499-514, 1973.

## CAPITULO 3

### CONDICIONAMENTO FISIOLÓGICO EM SEMENTES DE CAFEIEIRO (*Coffea arabica*, L.)

#### RESUMO

GUIMARÃES, Renato Mendes. Condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*, L.). Lavras: UFLA, 2000. 180p. (Tese de Doutorado em Fitotecnia).

Com o objetivo de avaliar metodologias para recuperar a qualidade fisiológica de sementes de cafeeiro, pela técnica de condicionamento fisiológico, e detectar marcadores para grau de estruturação de membranas e qualidade fisiológica de sementes, foi conduzida a presente pesquisa nos Laboratórios de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras e Laboratório de Análises Bioquímicas da EPAMIG. Sementes da cultivar Rubi colhidas nos campos de produção da UFLA e armazenadas de maio a outubro de 1999, foram condicionadas sobre papel umedecido ou submersas em solução de Polietileno Glicol 6000 ou solução de Nitrato de Potássio, ambas com potencial hídrico de  $-1,1\text{Mpa}$ . O condicionamento foi realizado em câmaras tipo BOD a  $30^{\circ}\text{C}$ , na presença de luz, por períodos de 8,12,16,20 e 24 dias. Nas mesmas condições foram instalados 3 tratamentos adicionais: condicionamento de sementes em água, sobre papel, ou por submersão durante 8 dias e sementes não condicionadas. Após os tratamentos as sementes foram lavadas e enxugadas com papel toalha. Em seguida, foram submetidas a determinação do teor de água, avaliadas pelos testes de germinação, velocidade de germinação,  $T_{50}$ , peso da matéria seca do eixo hipocótilo/radicula e condutividade elétrica. Parte das sementes foi congelada a  $-86^{\circ}\text{C}$  e posteriormente submetida a análises para determinação dos teores de ácido clorogênico, atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase. Pelos resultados pode-se concluir que o condicionamento de sementes de cafeeiro em água por submersão ou sobre papel durante 8 dias, aumenta a taxa e a velocidade de germinação; o condicionamento sobre papel propicia os maiores incrementos na qualidade fisiológica das sementes; os solutos PEG 6000 e Nitrato de Potássio não são promissores para o condicionamento de sementes de cafeeiro; os parâmetros, testes condutividade elétrica, porcentagem de ácido clorogênico e atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase são marcadores promissores para determinação do grau de estruturação de membranas e da qualidade fisiológica de sementes de cafeeiro.

## ABSTRACT

GUIMARÃES, Renato Mendes **Physiological conditioning in coffee seeds (*Coffea arabica* L.)**. Lavras: UFLA, 2000. 180p. (Thesis – Doctorate in Plant Science)

With the goal of studying methodologies to restore coffee seeds physiological quality, by physiological conditionings, essays were carried out in the Laboratories of Seed Analysis of the Agriculture Department of the UFLA and Biochemical Analyses of EPAMIG. Seeds from the cultivar Rubi, harvested in the UFLA's fields, were conditioned on moist paper or soaked in PEG 6000 or potassium nitrate ( $KNO_3$ ) solutions, both with  $-1.1$  Mpa of water potential. The conditioning was made in BOD chambers at  $30^\circ C$  and in the presence of light during 8, 12, 16, 20 and 24 days. In the same conditions were installed 3 additional treatments consisting of seed conditioning in water, on paper or soaked, during 8 days and seeds without conditioning. After the treatments, the seeds were washed, dried with paper towel, submitted to the water content determination and were evaluated by the germination test, germination velocity index, T50, hypocotil/radicle dry weight and electric conductivity. Some seeds were freezeed at  $86^\circ C$  and afterward submitted to the anlysis for chlorogenic acid content determination and polyphenoloxidase/oxidase enzyme activities. The results made at possible to conclude that the conditionings of coffee seeds in water, soaked or on paper, during 8 days, increase the germination rate and velocity, that the conditioning on paper gives the largest increases in the physiological quality of seeds, that the PEG 6000 and  $KNO_3$  solution are not promissing for coffee seed conditioning and that the parameters (electric conductivity test clorogenic acid percentage and polyphenoloxidase/oxidase enzyme activity) are promissing markers to determine the integrity level of membrans and physiological quality of coffee seeds.

## 1 INTRODUÇÃO

A época de plantio da lavoura cafeeira tem sido extremamente dependente da época de colheita, tendo em vista as dificuldades de utilização de sementes armazenadas, em função de geralmente não apresentarem qualidade fisiológica satisfatória no momento ideal para início da formação das mudas. A possibilidade de obtenção de sementes de alta qualidade, em qualquer época do ano, oferece ao produtor a oportunidade de programar a instalação de sua lavoura na melhor época para sua região e, conseqüentemente a formação de lavouras mais produtivas e precoces. Nesse sentido, a recuperação da qualidade fisiológica das sementes, por meio de tratamentos pré-germinativos, tem sido uma alternativa investigada para a **solução** do problema. Dentre estes tratamentos, o condicionamento fisiológico tem se destacado como uma técnica de alto potencial. A hipótese de que as sementes podem ter a velocidade de germinação aumentada e mesmo sua viabilidade recuperada pelo controle da embebição e de fatores externos que afetam o processo germinativo, deve ser avaliada sob diversos aspectos, para que soluções consistentes e definitivas possam ser oferecidas ao cafeicultor.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar métodos de condicionamento fisiológico de sementes de cafeeiro, sob aspectos fisiológicos e bioquímicos, visando à recuperação da qualidade das sementes de cafeeiro armazenadas.

## 2 MATERIALE MÉTODOS

### 2.1 Localização do experimento

O trabalho foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras e Laboratório de Análises Bioquímicas da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, em Lavras, Minas Gerais, em dezembro de 1999.

### 2.2. Condições iniciais das sementes

Foram utilizadas sementes de cafeeiro *Coffea arabica*, da cultivar Rubi, safra de 1999, colhidas nos campos de produção de sementes da UFLA. Foram acondicionadas em embalagens de papel multifoliado e armazenadas em câmara fria (aproximadamente 10°C e 50%UR) de maio até outubro de 1999. Quando foram iniciados os experimentos, as sementes continham teor de água, determinado pelo método da estufa 105±3°C, igual a 11,32% (Brasil, 1992) e apresentavam viabilidade avaliada pelo teste de tetrazólio igual a 66% segundo metodologia descrita por Vieira et al., 1998. As sementes sem condicionamento foram embebidas em papel mata-borrão, até umidade (48.89%) próxima à média das sementes condicionadas antes das avaliações. Para o teste de condutividade elétrica, após cada tratamento, as sementes eram deixadas em ambiente de laboratório, onde permaneciam até o equilíbrio higroscópico, com a finalidade de serem avaliadas com graus de umidade semelhantes.

### 2.3. Tratamentos

As sementes foram retiradas da câmara fria, tiveram o endocarpo retirado pelo processo manual, foram tratadas com o fungicida Captan 75 na dosagem de 0,25% do produto comercial e submetidas ao condicionamento fisiológico pelos seguintes métodos:

Condicionamento fisiológico em papel - **As** sementes foram uniformemente distribuídas, no interior de caixas tipo gerbox, sobre duas folhas de papel mata-borrão umedecidas com água, ou solução de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) com potencial hídrico de  $-1,1$  MPa ou solução de polietileno glicol de peso molecular 6000 (PEG 6000) com potencial hídrico de  $-1,1$ MPa, na proporção de 3 mL de água ou das soluções por grama de papel. **As** caixas foram colocadas em câmaras de germinação tipo BOD, previamente regulada à temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , na presença de **luz**, por períodos de 8, 12, 16, 20, 24 dias. Para cada uma das soluções ( $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KNO}_3$  ou PEG 6000) e para cada um dos tempos de tratamento programados (8, 12, 16, 20, 24 dias) foram condicionadas 250 sementes distribuídas em 5 caixas gerbox. Cada tratamento constou de 4 repetições.

Condicionamento fisiológico **por** submersão - **As** sementes foram submersas em água ou soluções de  $\text{KNO}_3$  ou PEG600 ambas com potencial hídrico de  $-1,1$  MPa, **no** interior de recipientes com capacidade de 3 litros, de modo que o nível da **solução** sobrepuja em no mínimo 10cm o nível das sementes. Os três recipientes. foram colocados no interior de câmaras tipo BOD, na presença de luz e reguladas a  $30^\circ\text{C}$ . Durante todo o processo de condicionamento foi realizada aeração dos tratamento através de injeção de ar com compressor para aquário e com uma bomba especial para filtro de aquário (Whisper - Power filter) **que** promovia a circulação do líquido que caía em cascata de uma altura aproximada de 15 cm. Decorridos cada um dos tempos de 8, 12, 16, 20 e 24 dias, 4 repetições de 250 sementes cada, foram submetidas às avaliações.

Preparo das soluções - Os cálculos para determinação das concentrações das soluções de PEG6000 e  $\text{KNO}_3$  para a obtenção potencial hídrico de  $-1,1$ MPa em  $30^\circ\text{C}$ , foram baseados na equação de Michel e Kaufmann (1973) para o PEG6000 e na equação de Van't Hoff citada por Hillel (1971), para o  $\text{KNO}_3$ . **As** soluções foram preparadas em balões volumétricos, pela simples adição do

soluto em água (PEG6000 323,66g/litro e  $\text{KNO}_3$  25,50g/litro) e agitação até que não restasse nenhum precipitado no fundo do balão.

Preparo das sementes para as avaliações - Tanto as sementes condicionadas em papel como aquelas em submersão, foram retiradas dos tratamentos, lavadas em água corrente por 3 minutos e enxugadas com auxílio de papel toalha. Parte das sementes foi destinada aos testes de avaliação da qualidade fisiológica e determinação da umidade pós-tratamento. Das sementes restantes, foram retirados duzentos embriões, sendo que, no momento da extração eram colocados em microtubos mantidos em gelo e contendo ácido ascórbico. Em seguida os embriões foram congelados pela submersão dos microtubos em nitrogênio por 15 segundos e depois armazenados em deep-freezer a  $-86^\circ\text{C}$  para serem utilizadas em análises futuras. As sementes restantes foram armazenadas em caixas tipo gerbox e mantidas em deep-freezer a  $-86^\circ\text{C}$ .

#### **2.4. Determinação do grau de umidade**

Após cada tratamento, duas repetições de aproximadamente 10g de sementes foram colocadas em recipientes de alumínio com diâmetro de 4cm, e submetidas à determinação do grau de umidade, pelo método de estufa a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  por 24 horas, conforme as prescrições das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em porcentagem.

#### **2.5 Teste de germinação e índice de velocidade de germinação**

O teste foi conduzido com 4 repetições de 50 sementes, dispostas em 2 rolos de 25 sementes cada um, para cada tratamento. Como substrato foi utilizado o rolo de papel toalha umedecido com água na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel e mantidos em germinador regulado à temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , na presença de luz. As avaliações foram diárias, computando-se o número de

sementes que apresentavam protusão de radícula. Após a estabilização do número de sementes germinadas, calculou-se o índice de velocidade de germinação pelo somatório do número de sementes germinadas a cada dia dividido pelo número de dias decorridos entre a sementeira e a contagem (Maguirre, 1962). Após 30 dias, foram realizadas as avaliações segundo os critérios das RAS (Brasil, 1992) para obtenção dos resultados da porcentagem de germinação.

## 2.6 Determinação do tempo para ocorrência de 50% de germinação ( $T_{50}$ )

Utilizando os mesmos dados obtidos no índice de velocidade de germinação, o  $T_{50}$  foi calculado pela seguinte fórmula:

$$T_{50} = [(G - G_1) / (G_2 - G_1)] \cdot T$$

Onde.

$T_{50}$  = Tempo para a ocorrência de 50% da germinação

G = Metade do valor máximo de germinação

$G_1$  = Valor de germinação igual ou imediatamente inferior a G

$G_2$  = Valor de germinação imediatamente superior a G

l = Intervalo entre as contagens

T = Tempo para a ocorrência de  $G_1$

## 2.7 Determinação do peso da matéria seca do eixo hipocótilo/radicula.

Após a última contagem do teste de germinação foram eliminadas das plântulas o endosperma e cotilédones (com o objetivo de eliminar influência do peso seco de restos de endospermas presos em algumas plântulas), e o eixo hipocótilo /radícula de cada parcela foram colocados em sacos de papel e deixados em estufa com circulação de ar à 65°C, até peso constante. Para pesagem utilizou-se balança com precisão de 1 miligrama. Os resultados foram expressos em gramas/parcela



## 2.8 Teste de condutividade elétrica

Após os tratamentos, 50 sementes lavadas de cada parcela foram colocadas em camada única dentro de caixas tipo gerbox com uma folha de papel mata-borrão seca, em ambiente de laboratório, e aí permanecendo até atingirem o equilíbrio higroscópico. A verificação da paridade graus de umidade entre parcelas foi determinada pelo peso de 100 sementes. A seguir as sementes foram colocadas em copos plásticos contendo 75mL de água deionizada, permanecendo em embebição à temperatura constante de 30°C. No mesmo ambiente foi deixado um copo com 75mL de água pura. Decorridas 24 horas, foi efetuada a leitura da condutividade elétrica das soluções em  $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ , utilizando condutivímetro marca Digimed modelo CD 21A. Os resultados foram obtidos calculando-se: condutividade lida para cada parcela, subtraída da condutividade lida para a água pura, dividido pelo peso das sementes e foram expressos em  $\mu\text{S}/\text{cm}^2/\text{g}$ .

## 2.9 Determinação da atividade da enzima peroxidase

A determinação da atividade da enzima peroxidase foi realizada em 2 repetições de cada tratamento. Em 5g sementes de café moídas, adicionou-se 40mL de tampão fosfato pH 6,0, e agitou-se em gelo por 5 minutos. A mistura foi filtrada em papel Whatman número 1. A seguir, 1mL do filtrado foi colocado em tubo de ensaio onde foram adicionados 2mL de tampão ácido cítrico pH 5,0 e incubado por 5 minutos à 30°C. Adicionou-se 0,4 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 0,08%; 0,4 mL de guaiacol a 0,5% e incubou-se novamente por 15 minutos à 30°C. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Schmaz, a 470 nm. A amostra referencia (branco) constou de 1 mL do filtrado (amostra); 2 mL de tampão ácido cítrico pH 5,0) e 0,8 mL de água destilada. Os resultados foram expressos em Unidades/minuto/gramas de amostra. (U/min/g)

## 2.10 Determinação da atividade da enzima polifenoloxidase

A determinação da atividade da enzima polifenoloxidase foi realizada em 2 repetições de cada tratamento. Em 5g sementes de café moídas adicionou-se 40mL de tampão (fosfato de potássio 0,1 mol/L) pH 6,0, e agitou-se sobre gelo por 5 minutos. A mistura foi filtrada em papel Whatman número 1 (Draetta e Lima, 1976). Colocou-se 1mL do filtrado em tubo de ensaio onde foram adicionados 3 mL de 3,4 dihidroxifenil-alania (OPA) 0,005 M; e 1 mL de glicina 0,2 M. A amostra referência (branco) foi constituída de 1mL de amostra e 4 mL de água (Ponting e Joslyng, 1948). Os tubos foram colocados em banho-maria à 60°C por 60 minutos e a leitura realizada em espectrofotômetro Schumaz a 420 nm. Os resultados foram expressos em U/min/g.

## 2.11 Determinação de ácido clorogênico

A determinação da porcentagem de ácido clorogênico contido nas sementes foi realizada em 2 repetições por tratamento. Em 0,5 gramas de sementes de café moídas foram adicionados 100 mL de isopropanol 70% e a mistura colocada em refluxo por 4 horas à 50°C. Em seguida a mistura foi filtrada e o volume completado para 100 mL com isopropanol 70%. Após a incubação de 1 mL do extrato misturado ao reagente metaperiodato a 0,25%, por 10 minutos à 27°C, a leitura foi realizada em espectrofotômetro Shumaz a 406 nm. A amostra referência (branco), foi constituída de 1,0 mL de isopropanol 70% e 10 mL do reagente metaperiodato a 0,25% (Menezes, 1990)

## 2.12. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, num esquema fatorial (2 x 2 x 5) + 3, sendo dois métodos de condicionamento (em papel e por submersão), dois diferentes solutos (PEG 6000 e KNO<sub>3</sub>), cinco

periodos de condicionamento e três tratamentos adicionais (sementes não condicionadas, sementes condicionadas sobre papel com água **por 8 dias** e sementes submersas em água **por 8 dias**). Para a determinação do grau de umidade, dos fenólicos totais, ácido clorogênico e atividades das enzimas foram utilizadas 2 repetições, para as demais avaliações foram utilizadas **4**. O fator períodos de condicionamento foi avaliado por meio de análise de regressão. Os adicionais tiveram suas médias contrastadas com todos os tratamentos do fatorial.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Observações preliminares**

Pelos resumos das análises de variância dos dados referentes às avaliações realizadas após os diversos tratamentos de condicionamento, podem-se observar diferenças significativas entre os tratamentos, entre os níveis dos fatores e entre as interações (Tabelas 2A; 3A; e 4A). Os contrastes considerando os tratamentos adicionais e os tratamentos em fatorial foram analisados e serão discutidos sempre que a comparação for relevante.

#### **3.2 Grau de umidade das sementes**

A Figura 1, apresenta o comportamento do grau de umidade das sementes após os tratamentos analisados em esquema fatorial. Verifica-se que as sementes condicionadas com  $\text{KNO}_3$ , não apresentaram variação no teor de água ao longo do tempo de condicionamento tanto em papel quanto em submersas, embora aquelas em submersão tenham atingido um patamar de umidade mais elevado. As sementes condicionadas em PEG, mostraram uma tendência de redução no grau de umidade ao longo do tempo de condicionamento, tanto em papel quanto em submersão, com valores mais elevados nas sementes submersas. Pode-se

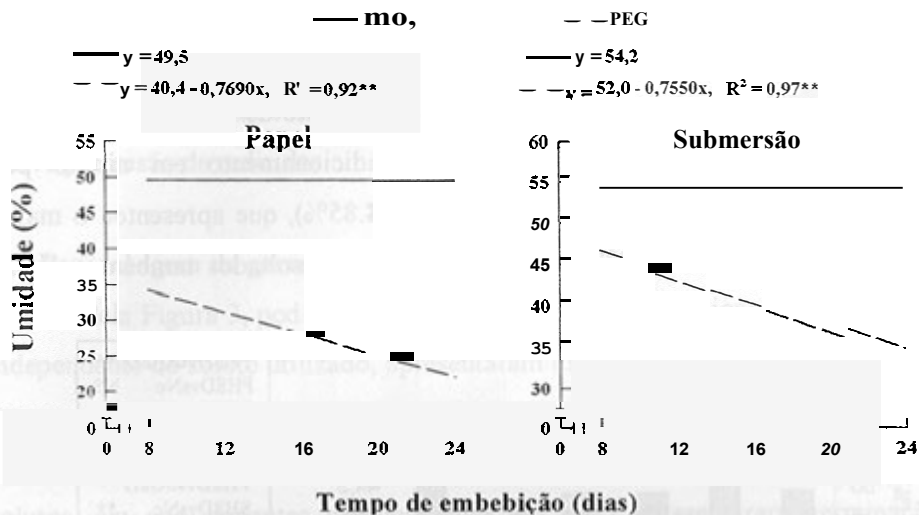
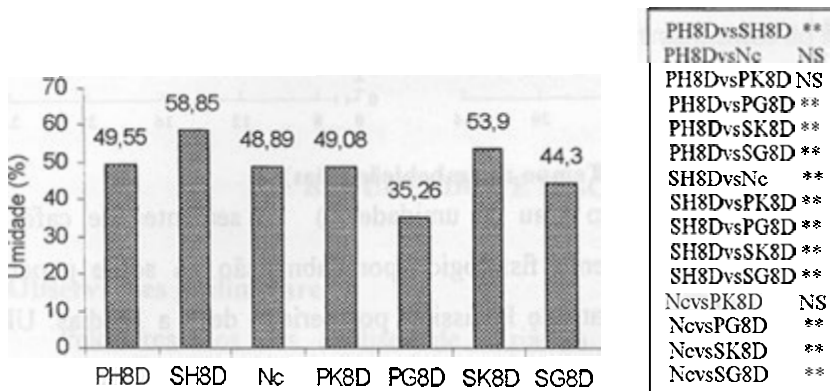


FIGURA 1– Estimativa do grau de umidade(%) de sementes de café após condicionamento fisiológico por submersão ou sobre papel, em PEG ou Nitrato de Potássio, por período de 8 a 24 dias. UFVLA, Lavras – MG, 2000

ainda observar que as sementes condicionadas em  $KNO_3$ , casos apresentaram graus de umidade superiores aqueles apresentados pelas sementes em PEG.

A quantidade de água absorvida pelas sementes e ou perdida por evaporação durante a embebição, provavelmente provocou maior redução no potencial hídrico da solução de PEG do que na de  $KNO_3$  e que no 8º dia de condicionamento em  $KNO_3$ , o equilíbrio entre os potenciais hídricos das sementes e dos substratos, já havia se estabelecido. Para sementes condicionadas em PEG, houve tendência linear de redução da umidade ao longo do período de condicionamento, tanto em papel quanto em submersão. Os mais baixos graus de umidade das sementes condicionadas em papel em relação às submersas, indicam que a força matricial gerada nos componentes do papel reduz o potencial hídrico em relação à submersão. Esse fato foi também ressaltado por Hardegree e Emmerich, 1990, que relatam a influência da relação volume de solução: peso do papel no processo de condicionamento. O teor de água das

sementes após o tratamento em papel/água/8dias (49.55%) foi semelhante àqueles encontrados após condicionamento com nitrato de potássio sobre papel (49.08%), e ambos foram inferiores ao condicionamento em nitrato por submersão (53,9%), e submersão/água/8dias (58.85%), que apresentou o maior valor entre todos os tratamentos (Figura 2). Esses resultados também indicam



**FIGURA 2** – Contrastes entre resultados das determinações de umidade relativas aos tratamentos adicionais e alguns métodos de condicionamento destacados do esquema fatorial. (P) substrato papel; (S) submersão; (H) água; (K) nitrato de potássio; (G) polietileno glicol PEG; (D) dias; (Nc) não condicionadas; (\*\*) significativo ao nível de 1% de probabilidade e (NS) não significativo. UFLA, Lavras –MG, 2000.

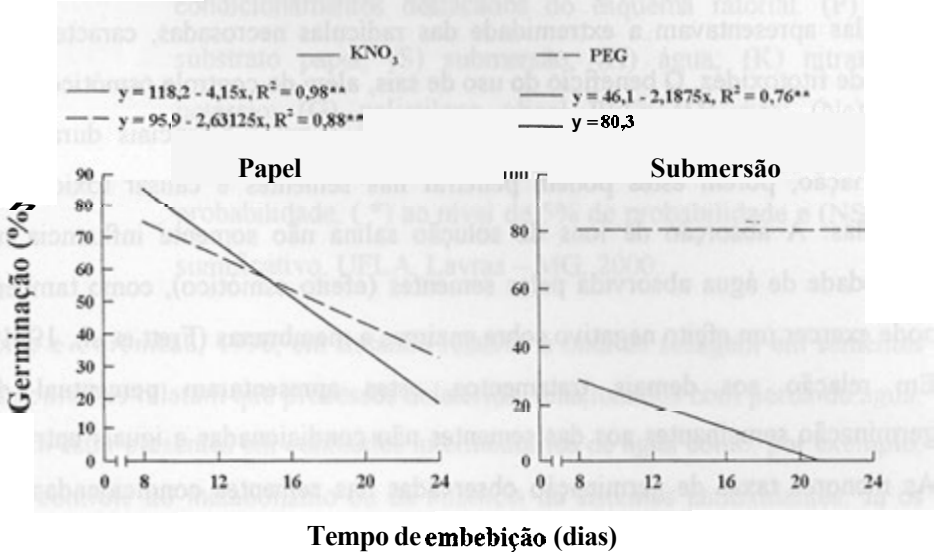
que o condicionamento sobre papel reduz o potencial hídrico, da solução.

Em sementes de cafeeiro, a germinação visível é alcançada quando as sementes atingem um grau de umidade em torno de 55% (Lima et al., 1997 e Camargo, 1998). Sementes submersas em água por 8 dias (SH8D) que alcançam teores de água superiores a esse limite, não germinaram, provavelmente porque o tempo foi insuficiente para o desenvolvimento de todo

o processo que antecede a protrusão radicular. Em condicionamentos sobre papel ou em submersão com água por tempos maiores (dados não apresentados), houve protrusão de radículas.

### 3.3 Porcentagem de germinação

Pela Figura 3, pode-se observar que sementes condicionadas em papel e independente do soluto utilizado, apresentaram uma tendência linear decrescente do percentual de germinação à medida que o período de tratamento se prolongava. Vale ressaltar no entanto, o comportamento diferencial entre os dois solutos, em que sementes com  $\text{KNO}_3$  tiveram germinação menor em relação às condicionadas em  $\text{KNO}_3$  nos menores tempos, tendo

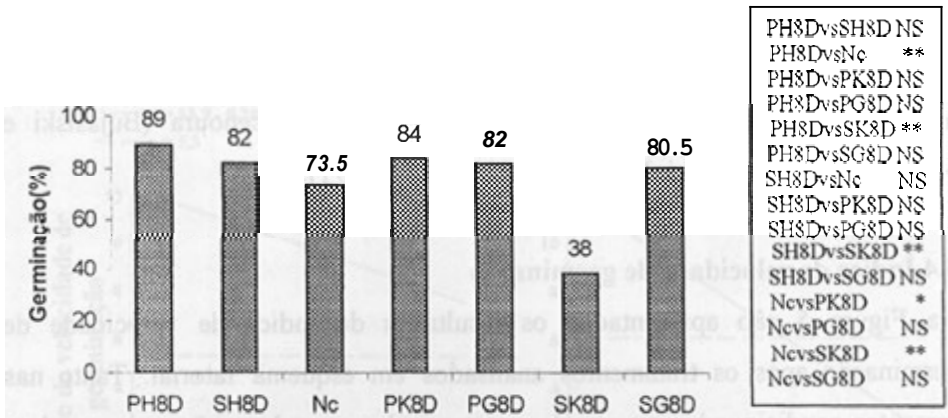


**FIGURA 3**– Estimativa da porcentagem de germinação de sementes de café após condicionamento fisiológico por submersão ou sobre papel, em PEG ou Nitrato de Potássio, por período de 8 a 24 dias.

UFLA, Lavras – MG, 2000

posteriormente essa situação invertida nos tempos mais prolongados. Quando em submersão, as sementes condicionadas em PEG não apresentaram variações

nas taxas de germinação em função do tempo, permanecendo o percentual na faixa de 80%, enquanto as sementes condicionadas em nitrato, apresentaram taxas de germinação a partir de 30%, que decresceu com o aumento do tempo de condicionamento. A comparação das testemunhas (sem condicionamento ou condicionadas em água) com os tratamentos que apresentaram as maiores taxas de germinação após condicionamento (sobre papel em água por 8 dias e sobre papel em nitrato por 8 dias; Figura 4) evidencia a superioridade desses tratamentos em relação às sementes não condicionadas e que eles foram iguais entre si. As sementes condicionadas por submersão em solução de nitrato de potássio apresentaram o nível mais baixo de germinação em relação às de todos os outros tratamentos. É necessário informar, que nesse tipo de tratamento, as plântulas apresentavam a extremidade das radículas necrosadas, característica típica de fitotoxidez. O benefício do uso de sais, além do controle osmótico, é de suprir as sementes com nitrogênio e outros nutrientes essenciais durante a germinação, porém estes podem penetrar nas sementes e causar toxidez às plântulas. A absorção de íons da solução salina não somente influencia na quantidade de água absorvida pelas sementes (efeito osmótico), como também pode exercer um efeito negativo sobre enzimas e membranas (Frett et al., 1991). Em relação aos demais tratamentos, estes apresentaram percentual de germinação semelhantes aos das sementes não condicionadas e iguais entre si. As menores taxas de germinação observadas nas sementes condicionadas em PEG, quando comparadas às dos tratamentos com água e nitrato por 8 dias, podem ser devidas às dificuldades encontradas durante o experimento, 'para manter um nível de aeração adequado nos tratamentos de condicionamento com PEG em submersão, e pelo potencial hídrico mais negativo e decrescente verificado nos condicionamentos com PEG em papel. Neste caso, o teor de umidade intermediário no qual as sementes permaneceram durante o condicionamento pode ter contribuído para a redução da taxa de germinação.



**FIGURA 4** – Contrastes entre resultados do teste de germinação relativos aos tratamentos adicionais e alguns métodos de condicionamentos destacados do esquema fatorial. (P) para substrato papel; (S) submersão; (H) água; (K) nitrato de potássio; (G) polietileno glicol PEG; (D) dias; (Nc) não condicionadas; (\*\*) significativo ao nível de 1% de probabilidade, (\*) ao nível de 5% de probabilidade e (NS) não significativo. UFLA, Lavras –MG, 2000.

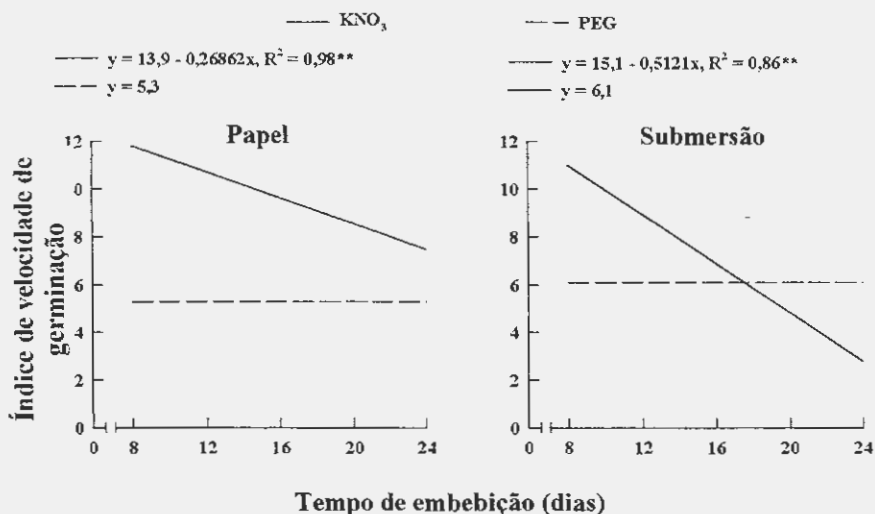
Côme e Corbineau, 1996, em trabalho relativo à taxa de secagem em sementes recalcitrantes relatam que processos deletérios, relacionados com perda de água, podem estar presentes em conteúdos intermediários de água como, por exemplo, o descontrole do metabolismo ou da ausência de sistemas antioxidantes. Já os prejuízos atribuídos à deficiência de aeração nas **soluções** de PEG, coincidem com relatos que afirmam que apesar de o Polietileno Glicol ser amplamente utilizado em condicionamentos fisiológicos por ser um polímero de alto peso molecular, não-iônico, inerte, que não penetra pela parede celular e não é tóxico (Bewley e Black, 1994), efeitos adversos ocorrem algumas vezes pela imersão em solução de PEG, possivelmente por causa da baixa disponibilidade de Oxigênio (Furutani, Zandstra e Price, 1986; Bujalski e Nienow, 1991; Mexal,



Fisher, Osteryoung e Reid, 1975). Tanto assim é que agitações vigorosas e adição de ar enriquecido (75% de O<sub>2</sub>) na solução do condicionamento melhoraram a performance de sementes de cebola e cenoura (Bujaslski e Nienow, 1991; Bujaslski, Nienow, Petch e Gray, 1991).

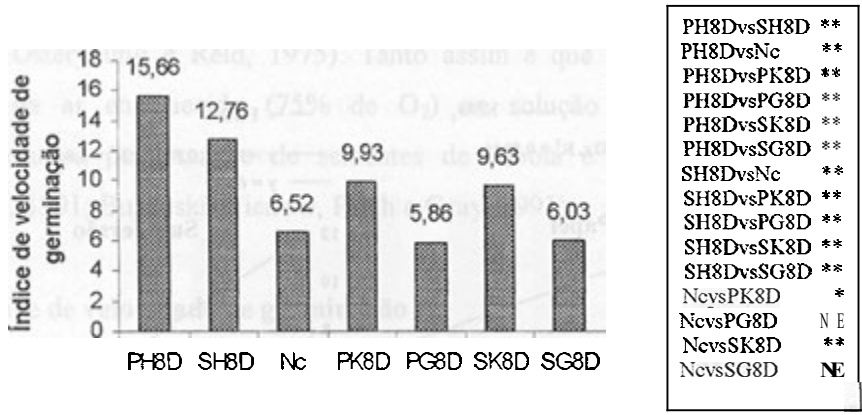
### 3. Velocidade de germinação

Na Figura 5 são apresentados os resultados do índice de velocidade de germinação após os tratamentos analisados em esquema fatorial. Tanto nas sementes condicionadas em papel como naquelas em submersão, com o soluto nitrato de potássio ou PEG, as tendências do IVG foram lineares. Quando se utilizou o soluto nitrato de potássio o IVG decresceu à medida que se aumentou o período de condicionamento, ao passo que, quando se utilizou PEG, este permaneceu estável. Vale ressaltar, no entanto, que as sementes condicionadas em papel umedecido com nitrato de potássio, apresentaram maiores IVG do que aquelas com PEG, independente do período de condicionamento. No entanto, sementes condicionadas por submersão em nitrato, apresentaram maiores valores de IVG que as condicionadas com PEG, apenas nos períodos iniciais de condicionamento, após 16 dias apresentaram um pior desempenho detectado por esse teste. Na Figura 6 os resultados dos métodos de condicionamento analisados em esquema fatorial que indicaram maiores velocidades de germinação, são comparados com os resultados dos métodos de condicionamento em água (papel e submersão 8 dias) e de sementes não condicionadas. Os condicionamentos com PEG em papel ou submersão apresentaram velocidade de germinação semelhante àquela apresentada pelas sementes não condicionadas. Os demais métodos propiciaram um maior IVG em relação às sementes não condicionadas, embora os condicionamentos com água tenham sempre apresentado maiores valores em comparação ao nitrato de potássio. As tendências de redução na velocidade de germinação nos



**FIGURA 5**– Índice de velocidade de germinação de sementes de café após condicionamento fisiológico por submersão ou sobre papel, em PEG ou Nitrato de Potássio, diferentes períodos de tempo. UFLA, Lavras – MG, 2000

condicionamentos com nitrato de potássio ocorreram provavelmente em razão do efeito fitotóxico do sal. Os menores níveis em termos de velocidade de germinação e a constância dos resultados nas sementes condicionadas com PEG podem estar relacionados com o menor grau de umidade que essas sementes apresentavam após o condicionamento e/ou com danos devidos à permanência das sementes em nível intermediário de umidade durante o condicionamento (conforme demonstrado no item 2.1). Uma das condições básicas para o sucesso da técnica é o controle da hidratação das sementes num patamar próximo daquele no qual ocorre a germinação das sementes. As sementes condicionadas, iniciam a embebição normalmente, cessando este processo assim que entrou em equilíbrio com o potencial hídrico da solução. Este potencial deve ser pré-determinado para cada espécie e, conseqüentemente,



**FIGURA 6**– Contrastes entre resultados do índice de velocidade de germinação relativos aos tratamentos adicionais e alguns métodos de condicionamentos destacados do esquema fatorial. (P) para substrato papel; (S) submersão; (H) água; (K) nitrato de potássio; (G) polietileno glicol **PEG**; (D) dias; (Nc) não condicionadas; (\*\*) significativo ao nível de 1% de probabilidade, (\*) ao nível de 5% de probabilidade e (NS) não significativo. UFLA, Lavras –MG, 2000.

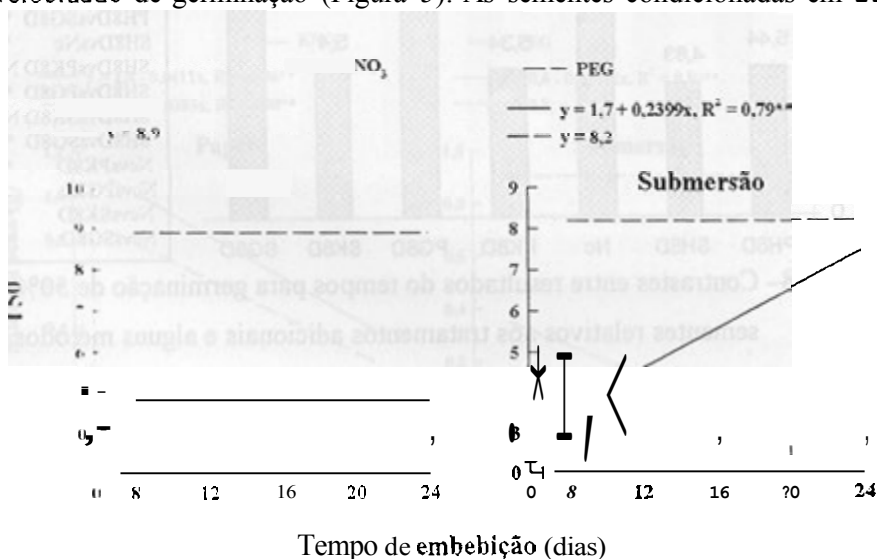
o conteúdo de água da semente pode ser ajustado a um nível que permita à semente a passagem por todas as fases preparatórias essenciais à germinação (fases I e II), evitando-se, contudo, alcançar a fase de alongamento celular e emergência da raiz primária (fase III), mesmo após um período de contato entre as sementes e a solução osmótica. (Heydecker et al, 1975; Bewley & Black, 1994).

Deve-se ressaltar que as sementes não condicionadas, apesar de avaliadas com grau de umidade semelhante às das demais tratamentos, tiveram um período de embebição menor que o das sementes condicionadas. Entretanto, na utilização prática destes resultados, a redução do tempo de exposição das sementes às adversidades do ambiente de viveiro durante a

germinação pode representar ganhos significativos. O aumento do tempo de permanência das sementes no solo contribui para o insucesso da germinação, já que fatores como: condições inadequadas de luminosidade, temperaturas sub ou supra-ótimas, presença de gases prejudiciais, condições osmóticas desfavoráveis, incidência de microrganismos, insetos, além de outros podem direta ou indiretamente contribuir para a deterioração das sementes (Khan et al., 1976 e Khan et al. 1980/81).

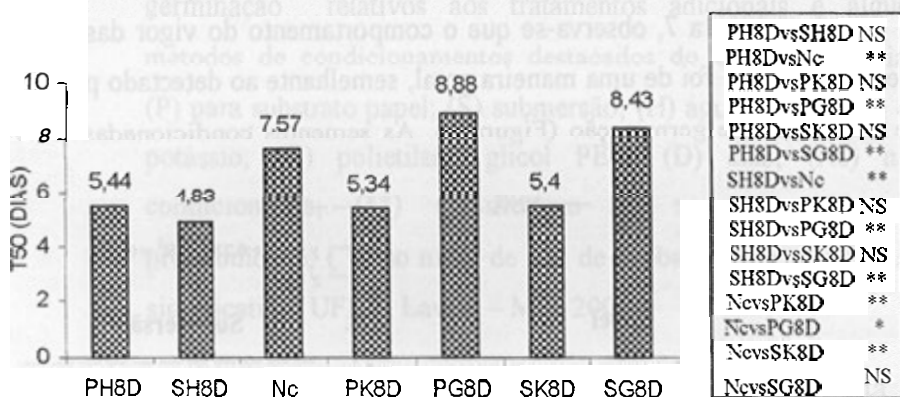
### 3.5 Tempo para germinação de 50% das sementes ( $T_{50}$ )

Pela Figura 7, observa-se **que** o comportamento do vigor das sementes medido pelo  $T_{50}$ , foi de uma maneira geral, semelhante ao detectado pelo índice de velocidade de germinação (Figura 5). As sementes condicionadas em **PEG**



**FIGURA 7**– Tempo para emergência de 50% das sementes de café após condicionamento fisiológico por submersão ou sobre papel, em **PEG** ou Nitrato de Potássio, por período de 8 a 24 dias. UFLA, Lavras – MG, 2000

germinaram mais lentamente que aquelas condicionadas em nitrato de potássio, tanto em papel como em submersão. A tendência de estabilidade do  $T_{50\%}$  nos diversos períodos de condicionamento em papel umedecido com nitrato, indicam que o efeito fitotóxico do sal, só foi detectado após a protrusão da radícula. Ao que tudo indica, em submersão, este sal se apresentou mais fitotóxico, prejudicando as sementes de maneira crescente à medida que o período de condicionamento era prolongado. As comparações entre as sementes condicionadas em água, não condicionadas e os tratamentos com melhores resultados analisados em fatorial (Figura 8), indicam que os tratamentos com



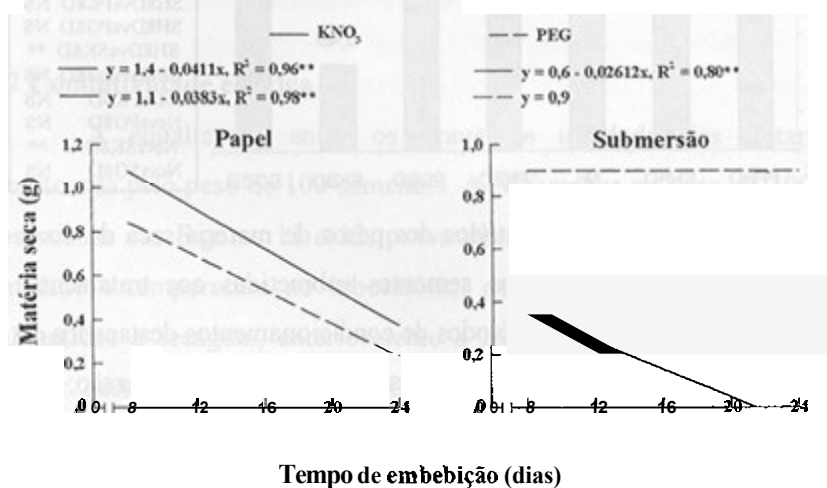
**FIGURA 8**– Contrastes entre resultados do tempos para germinação de 50% das sementes relativos aos tratamentos adicionais e alguns métodos condicionamentos destacados do esquema fatorial. (P) para substrato papel; (S) submersão; (H) água; (K) nitrato de potássio; (G) polietileno glicol PEG; (D) dias; (Nc) não condicionadas; (\*\*) significativo ao nível de 1% de probabilidade, (\*) ao nível de 5% de probabilidade e (NS) não significativo. UFLA, Lavras –MG, 2000

água e nitrato de potássio por 8 dias apresentaram resultados estatisticamente iguais entre si e superiores àqueles apresentados pelas sementes não condicionadas. Sementes condicionadas em PEG por 8 dias, tanto em papel como em submersão, necessitaram de maior tempo para que 50% das

sementes germinassem, em relação às submetidas aos demais tratamentos. Esses resultados confirmam que os condicionamentos com PEG, contribuíram para a redução do vigor das sementes e que os efeitos fitotóxicos do nitrato de potássio são mais acentuados quando as sementes são condicionadas por períodos mais longos.

### 3.6 Peso da matéria seca do eixo hipocótilo radícula

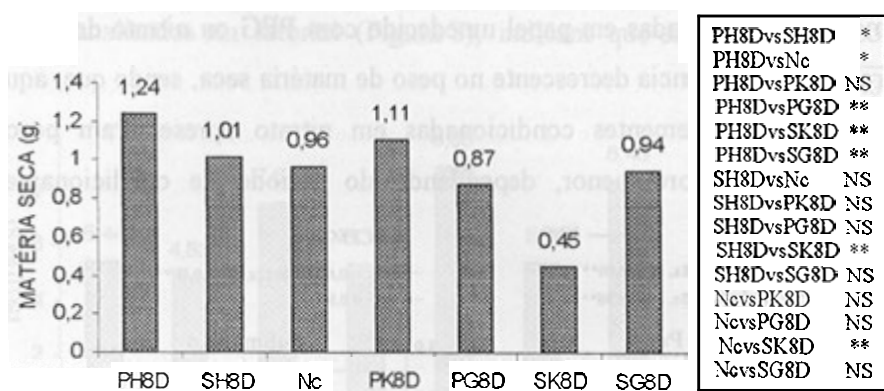
Pela Figura 9, pode-se observar que os eixos hipocótilo/radícula das sementes condicionadas em papel umedecido com PEG ou nitrato de potássio, apresentaram tendência decrescente no peso de matéria seca, sendo que, aqueles provenientes de sementes condicionadas em nitrato apresentaram peso de matéria seca sempre menor, dependendo do período de condicionamento.



**FIGURA 9** – Peso da matéria seca de eixos hipocótilo/radícula das sementes de café após condicionamento fisiológico por submersão ou sobre **papel**, em PEG ou Nitrato de Potássio, por **período** de 8 a 24 dias. UFLA, Lawas –MG, 2000

Sementes condicionadas em PEG, por submersão, apresentaram eixos com peso da matéria seca estável nos diversos tempos de condicionamento. Em nitrato de

potássio por submersão as sementes apresentaram valores para o peso de matéria seca dos eixos, marcadamente inferior já aos 8 dias de condicionamento, com tendência decrescente, ao longo do período de condicionamento. Esses resultados também confirmam o efeito fitotóxico do nitrato, principalmente nos condicionamentos em submersão. Os resultados obtidos pelas sementes condicionadas em água por oito dias e sementes não condicionadas foram comparados com os resultados obtidos pelos melhores tratamentos analisados fatorial (Figura 10). Pode-se observar que o condicionamento sobre papel em



**FIGURA 10**– Contrastes entre resultados dos pesos de matéria seca de eixos hipocótilo/radicula das sementes submetidas aos tratamentos adicionais e alguns métodos de condicionamentos destacados do esquema fatorial. (P) para substrato papel; (S) submersão; (H) água; (K) nitrato de potássio; (G) polietileno glicol PEG, (D) dias; (Nc) não condicionadas; (\*\*) significativo ao nível de 1% de probabilidade, ( \*) ao nível de 5% de probabilidade e (NS) não significativo. UFLA, Lams –MG, 2000.

água e em nitrato de potássio, por 8 dias propiciaram os maiores ganhos em peso de matéria seca dos eixos hipocótilo/radicula, e foram estatisticamente iguais entre si. Por outro lado, o condicionado em nitrato de potássio por submersão, propiciou os menores valores para peso de matéria seca dos eixos,

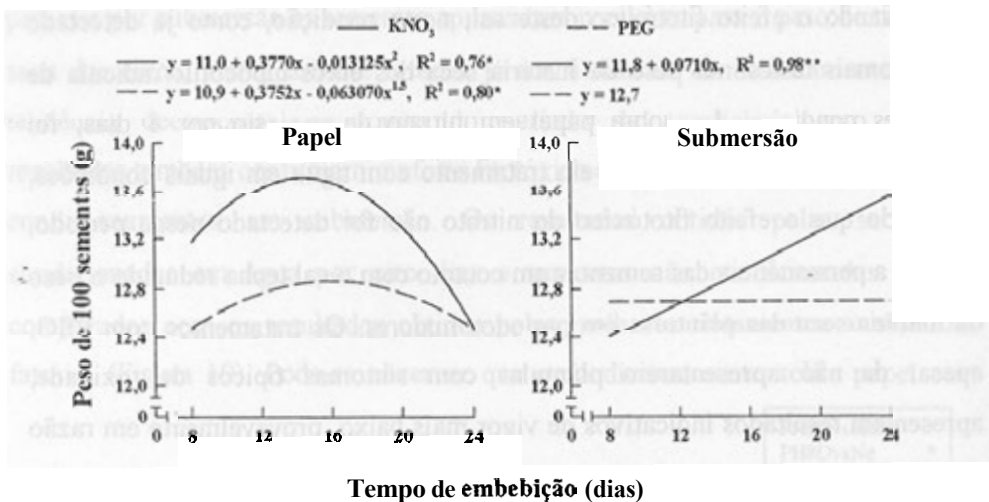
evidenciando o efeito fitotóxico deste sal, nesta condição, como já detectado pelos demais testes. O peso de matéria seca dos eixos hipocótilo/radicula de sementes condicionadas sobre papel em nitrato de potássio por 8 dias, foi semelhante àquele conseguido pelo tratamento com água em iguais condições, indicando que o efeito fitotóxico do nitrato não foi detectado nesse período, embora a permanência das sementes em contato com o sal tenha reduzido o peso da matéria seca das plântulas em períodos maiores. Os tratamentos com PEG, apesar de não apresentarem plântulas com sintomas típicos de toxicidade, apresentam resultados indicativos de vigor mais baixo, provavelmente em razão da deficiência de aeração nos tratamentos por submersão e à redução do potencial hídrico do substrato provocada pelo papel, impedindo assim que as sementes alcançassem a umidade ideal para o condicionamento fisiológico.

### 3.7 Condutividade elétrica

A equalização entre os graus de umidade dos tratamentos foi monitorada pelo peso de 100 sementes. As diferenças no peso de 100 sementes, observadas nas Figuras 11 e 12, provavelmente foram devidas às variações de umidade e temperatura no laboratório, durante o período que estas foram submetidas a secagem, anteriormente a realização do teste de condutividade. Apesar destas variações, ao se analisarem esses valores juntamente com os resultados da condutividade elétrica, pode-se inferir que elas não interferiram nos resultados de condutividade. Assim é que a maior diferença de umidade monitorada pelo peso de 100 sementes foi entre aquelas condicionadas sobre papel umedecido com água, por 8 dias e aquelas não condicionadas; entretanto não foi detectada diferença significativa entre a condutividade dos lixiviados destes dois tratamentos (Figura 14).

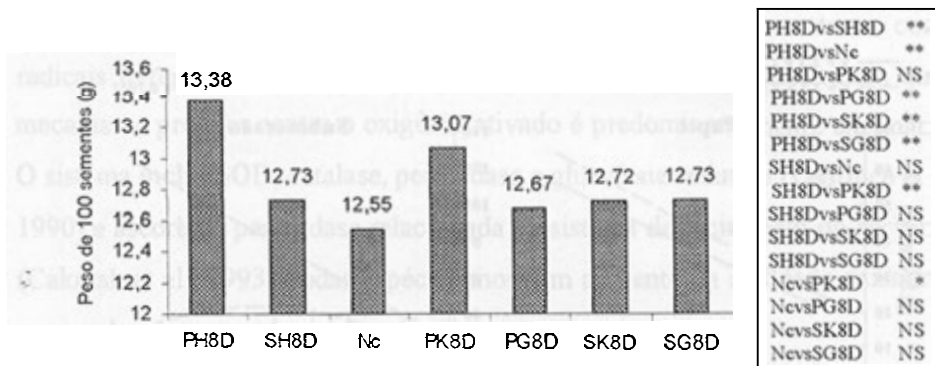
Os resultados dos testes de condutividade elétrica do lixiviado das sementes submetidas ao condicionamento com nitrato de potássio ou PEG estão





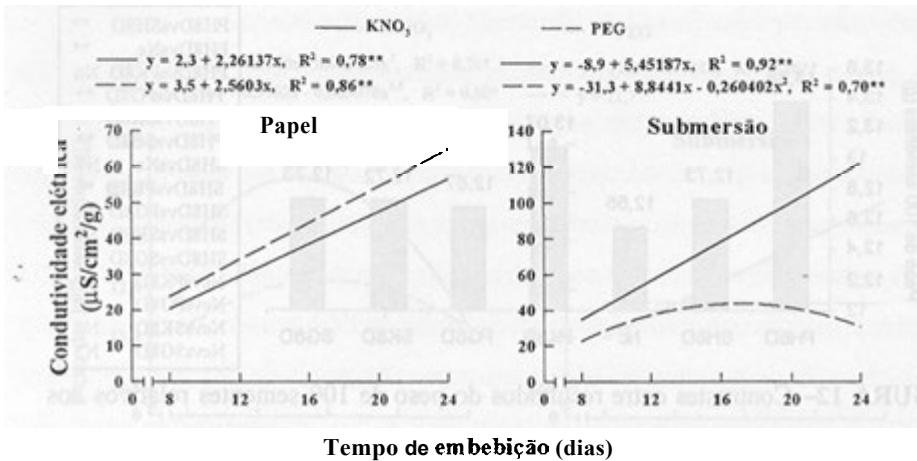
**FIGURA 11**—Peso de 100 sementes de sementes de café após condicionamento osmótico por submersão ou sobre papel, em PEG ou Nitrato de Potássio, no período de 8 a 24 dias. UFLA, Lavras –MG, 2000

representados na Figura 13. Observa-se a tendência linear crescente, ao longo dos períodos de condicionamento, quando este foi efetuado sobre papel, sendo que o soluto nitrato de potássio propiciou menores valores de condutividade que o PEG. Essa tendência crescente dos valores de condutividade sugere uma desestruturação dos sistemas de membranas, fato este reforçado pela tendência de redução na porcentagem do ácido clorogênico à medida que o tempo de condicionamento das sementes era aumentado até aproximadamente 20 dias (Figura 15). Os ácidos clorogênicos constituem os principais compostos fenólicos do café e são ésteres do ácido químico com resíduos cinâmicos (Sondheimer, 1958). Para Amorim e Silva (1968), os compostos fenólicos, principalmente os ácidos clorogênico e cafêico, exercem uma ação protetora, antioxidante, dos aldeídos. Em virtude de qualquer condição adversa aos grãos, ou seja, uma colheita inadequada dos frutos, problemas no processamento e no armazenamento, as polifenóis oxidases agem sobre os

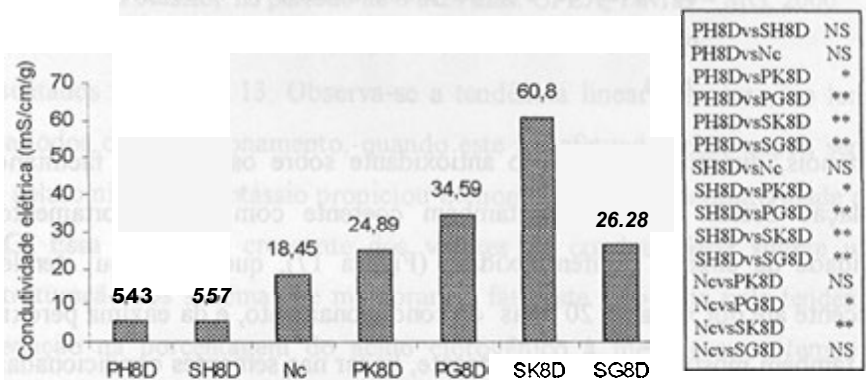


**FIGURA 12**– Contrastes entre resultados do peso de 100 sementes relativos aos tratamentos adicionais e alguns métodos de condicionamentos destacados do esquema fatorial. (P) para substrato papel; (S) submersão; (H) água; (K) nitrato de potássio; (G) polietileno glicol PEG; (D) dias; (Nc) não condicionadas; (\*\*) significativo ao nível de 1% de probabilidade, ( \*) ao nível de 5% de probabilidade e (NS) não significativo. UFLA, Lavras – MG, 2000.

polifenóis, diminuindo sua ação antioxidante sobre os aldeídos facilitando a oxidação destes. Este fato é também coerente com o comportamento da atividade da enzima polifenoloxidase (Figura 17), que mostrou tendência crescente até por volta de 20 dias de condicionamento, e da enzima peroxidase que também mostrou tendência crescente, linear nas sementes condicionadas em **PEG** até aproximadamente 20 dias naquelas em nitrato. A ação das peroxidases está ligada aos sistemas de processamento enzimático de radicais livres que incluem SOD (Superóxido Desmutase), que catalisa a dismutação do superóxido (**O<sub>2</sub><sup>-</sup>**) em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> e aquelas enzimas que estão envolvidas na desintoxicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, isto é, catalase, glutathione, redutase, ascorbato peroxidase e outras peroxidases. Os sistemas enzimáticos estão provavelmente mais envolvidos em uma resposta antioxidativa inicial por neutralizar potencialmente oxigênio tóxico



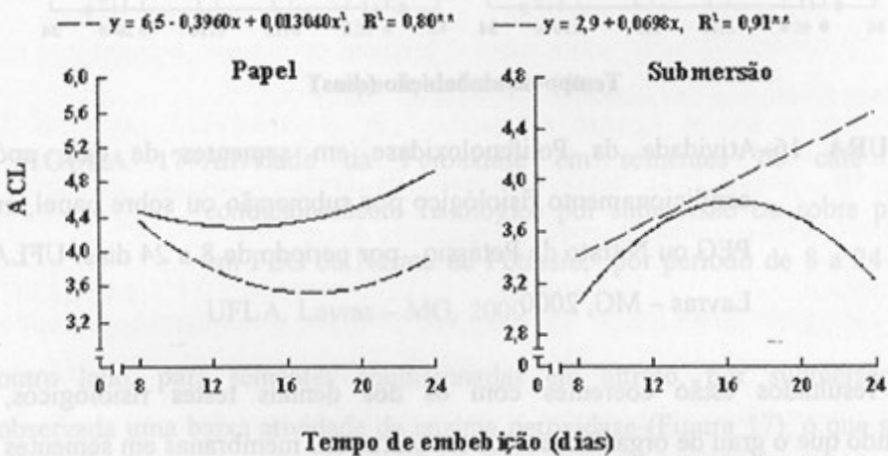
**FIGURA 13**—Condutividade elétrica do lixiviado de sementes de café após condicionamento fisiológico por submersão ou sobre papel, em PEG ou Nitrato de Potássio, por período de 8 a 24 dias. UFLA, Lavras – MG, 2000



**FIGURA 14**— Contrastes entre resultados do teste de condutividade elétrica das sementes relativos aos tratamentos adicionais e alguns métodos de condicionamentos destacados do esquema fatorial. (P) para substrato papel; (S) submersão; (H) água; (K) nitrato de potássio; (G) polietileno glicol **PEG**; (D) dias; (Nc) não condicionadas; (\*\*) significativo ao nível de 1% de probabilidade, (\*) ao nível de 5% de probabilidade e (NS) Não significativo. UFLA, Lavras – MG, 2000.

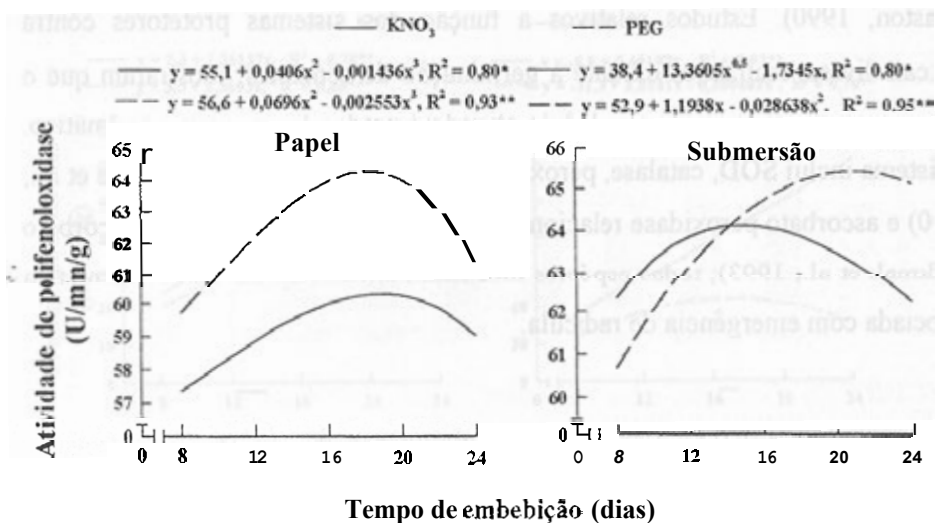
ativado, formado durante processos de estresses (Price e Hendry, 1991;

Winston, 1990). Estudos relativos à função dos sistemas protetores contra radicais livres, realizados durante a germinação de sementes, mostraram que o mecanismo protetor contra o oxigênio ativado é predominantemente enzimático. O sistema inclui **SOD**, catalase, peroxidase e glutatione redutase (Leprince et al., 1990) e ascorbato peroxidase relacionada ao sistema de reciclagem do ascorbato (Cakmak et al., 1993); todas espécies mostram aumento na atividade enzimática associada com emergência de radícula.



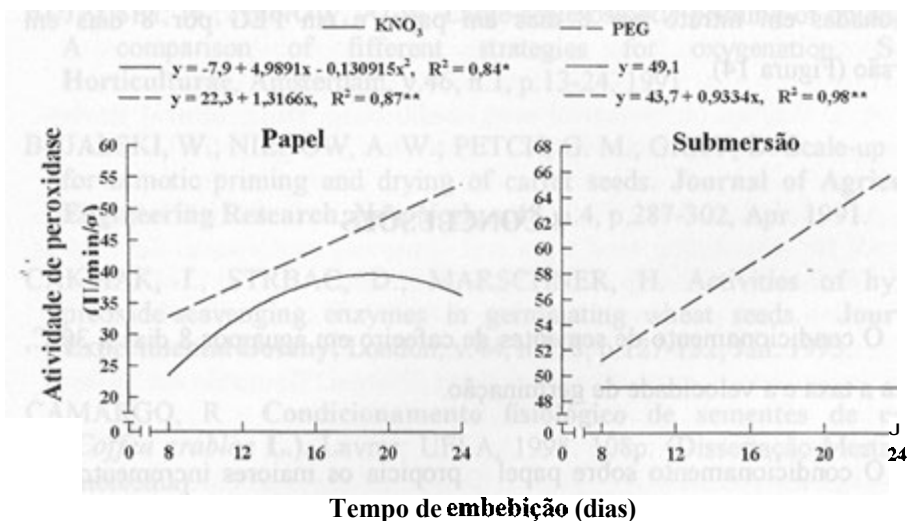
**FIGURA 15**—Porcentagem de Acido Clorogênico em sementes de café após condicionamento osmótico por submersão ou sobre papel, em PEG ou Nitrato de Potássio, por período de 8 a 24 dias. UFLA, Lavras – MG, 2000

Sementes condicionadas em sistema de submersão apresentaram tendência linear e crescente da condutividade de seus lixiviados, com o aumento do período de condicionamento, quando da utilização do soluto nitrato. Já o condicionamento em PEG, propiciou resultados de condutividade que se ajustaram numa curva em parábola. Vale ressaltar, no entanto, que, em termos absolutos, tais variações **não são** consideráveis, uma vez que encontram-se num intervalo de 20 a 40  $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$ .



**FIGURA 16**—Atividade da Polifenoloxidase em sementes de café após condicionamento fisiológico por submersão ou sobre papel, em PEG ou Nitrato de Potássio, por período de 8 a 24 dias. UFLA, Lavras –MG, 2000

Esses resultados estão coerentes com os dos demais testes fisiológicos, indicando que o grau de organização das estruturas das membranas em sementes de cafeeiro estão relacionados com sua performance na germinação. Por outro lado, os resultados da porcentagem de ácido clorogênico e da atividade da enzima polifenoloxidase, de sementes submetidas ao condicionamento por submersão, não apresentaram resultados similares aos daqueles apresentados em sementes condicionadas sobre papel, provavelmente em função de deficiência na aeração, por ocasião do condicionamento por este método. Desta forma, apenas a enzima peroxidase, apresentou resultados consistentes e possíveis de reforçar aqueles detectados pelos demais testes fisiológicos (Figura 17). Pode ser observada uma relação positiva entre a atividade da peroxidase (Figura 17), e a estabilização do dano ocasionado ao sistema de membranas (Figura 13). Por



**FIGURA 17**–Atividade da Peroxidase em sementes de café após condicionamento fisiológico por submersão ou sobre papel, em PEG ou Nitrato de Potássio, por período de 8 a 24 dias. UFLA, Lavras –MG, 2000

outro lado, para sementes condicionadas em nitrato, por submersão, foi observada uma baixa atividade da enzima peroxidase (Figura 17), o que sugere uma não-proteção ao sistema de membranas, coincidindo com valores crescentes de condutividade (Figura 13).

A comparação dos valores de condutividade elétrica do lixiviado das sementes não condicionadas ou condicionadas em água por S dias em papel ou em submersão, com o daquelas condicionadas em nitrato ou PEG, **sugere** que as sementes condicionadas na presença de qualquer dos dois solutos, apresentaram deficiência na reestruturação dos sistemas de membranas em relação ao daquelas condicionadas em água. Em relação às sementes não condicionadas, estas apresentaram valores de condutividade estatisticamente semelhantes aos daquelas condicionadas em água, como também aos das sementes

condicionadas em nitrato por 8 dias em papel e em PEG por 8 dias em submersão (Figura 14).

#### 4 CONCLUSÕES

O condicionamento de sementes de cafeeiro em água por 8 dias à 30°C, aumenta a taxa e a velocidade de germinação.

O condicionamento sobre papel propicia os maiores incrementos na qualidade fisiológica das sementes de cafeeiro.

Os solutos PEG 6000 e Nitrato de Potássio não se mostraram apropriados para o condicionamento de sementes de cafeeiro.

Os parâmetros testes condutividade elétrica, porcentagem de ácido clorogênico e atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase apresentam-se como marcadores relacionados à determinação do grau de estruturação de membranas e qualidade fisiológica de sementes de cafeeiro.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H.V.; SILVA, D.M. Relationship between the polyphenol oxidase activity of coffee beans and quality of the beverage. *Nature*, New York, v.219, n.27, p.381-382, July 1968.
- BEWLEY, J.D.; BALCK, M. **Seeds: *Physiology*** of development and germination. New york: London Plenum Press, 1994. 367 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Regras para análises de sementes. Brasília: SMDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.

- BUJALSKI, W.; NENOW, A. W. Large-scale osmotic priming of onion seeds: A comparison of different strategies for oxygenation. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.46, n.1, p.13-24, 1991.
- BUJALSKI, W.; NIENOW, A. W.; PETCH, G. M.; GRAY, D. Scale-up studies for osmotic priming and drying of carrot seeds. *Journal of Agricultural Engineering Research*, New York, v.48, n.4, p.287-302, Apr. 1991.
- ČAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal of Experimental Botany*, London, v.44, n.258, p.127-132, Jan. 1993.
- CAMARGO, R. Condicionamento fisiológico de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Lavras: UFLA, 1998. 108p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- \_\_\_\_\_ ted to desiccation sensitivity. In: QUÉDKRAUGO, A.S.; POULSEN, K.; STUBSGAARD, F. (eds) **Intermediate/recalcitrant** tropical forest tree seeds. Rome: IPGRI, 1996. P.83-87.
- DRAETTA, I.S.; LIMA, D.C. Isolamentos e caracterização das polifenoloxidasas do café. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v7, p.3-28, Jan./Jun. 1976.
- FRETT, J. J.; PILL, W. G.; MORNEAU, D.C. A comparison of priming agents for tomato and asparagus seeds. *HortScience*, Alexandria, v. 26, p. 1158-1159, Sep. 1991.
- FURUTANI, S. C.; ZANDSTRA, B. H.; PRICE, H. C. The effects of osmotic solute composition and duration and temperature of priming on onion seed germination. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.14, n.3, p.545-551, 1986.
- HARDEGREE, S. P.; EMMERICH, W. E. Effect of polyethylene glycol exclusion on the water potential of solution-saturated filter paper. *Plant Physiology*, Rockville, v.92, n.2, p.462-466, Feb. 1990.
- HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, I.J. Invigoration of seeds? *Seed Science and Technology*, Zurich, v.3, n.3, p.881-888, 1975.



- HILLEL, D. Soil and water: Physical principles and processes. New York: Academic Press, 1971. 288 p.
- KHAN, A.A. Preplant physiological seed conditioning. Horticultural Review, Edinburgh, v.13, p.131-181, 1992.
- KHAN, A.A.; BRAUM, J.W.; TAO, K.L.; MILLIER, W.F.; BENSIN, R.F. New methods for maintaining seed vigor and improving performance. Journal of Seed Technology, Lansing, v.1, n.2, p.33-57, 1976.
- KHAN, A.A.; PECK, N.H.; SAMIMY, C. Seed osmoconditioning, physiological and biochemical changes. Israel Journal of Botany, Jerusalem, v.29, n.1/4, p.133-44, 1980/81.
- LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; HENDRY, G.A.F. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). *New Phytologist*, London, v.116, n.4, p.573-580, Dec. 1990.
- LIMA, W.A.A.; ARAÚJO, R.F.; DIAS, D.C.F.S.; ALVARENGA, E.M.; ARAÚJO, E.F. Ajuste de metodologia para o condicionamento osmótico de sementes de café (*Coffea arabica* L.). *Informativo Abrates*, Curitiba, v.7, n.1/2, p.107, 1997.
- MAGUIRRE, J.D. Speed of germination - aid seedling emergence and vigor. *Crop Science*, Madison, v.2, n.2, p.176-177, Mar./Apr. 1962
- MENEZES, H.C. Variação dos monoisômeros e diisômeros do ácido cafeoilquímico com maturação de café. Campinas: UNICAMP, 1990. 171p. (Tese-Doutorado em Ciência dos Alimentos).
- MEXAL, J.; FISHER, G.B.; REID, C.P. Oxygen availability in polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiology*, Rockville, v.72, n.1, p.66-70, Jan., 1975.
- MICHEL, B.E.; KAUFMANN, M.R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*, Rockville, v.51, p. 914-916, 1973.
- PONTING, J.D.; JOSLYNG, M.A. Ascorbic acid oxidation and browning in apple-tissue extract. *Archives of Biochemistry*, New York, v.19, p.47-63, 1948.

- PRICE, A.H.; HENDRY, G.A.F. Iron-catalyzed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native **grasses** and three cereals. *Plant, Cell and Environment*, New York, v.14, p.477-484, 1991.
- SONDHEIMER, E. On the distribution of caffeic acid and the chlorogenic acid isomers in plants. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, Orlando, v.74, p.1311-138, 1958.
- VIEIRA, M.G.G.C.; GUIMARÃES, R.M.; VON PINHO, E.V. de R.; GUIMARÃES, R. J.; OLIVEIRA, J. A. Testes rápidos para determinação da viabilidade e da incidência de danos mecânicos em sementes de cafeeiro. Lavras :UFLA, 1998, 34p. (UFLA. Boletim Agropecuário, 26)
- WINSTON, G.W. Physiochemical basis for free radical formation *in* cells: production and defenses. In: ALSCHER, R.G. AND CUMMING, J.R. (eds) *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*. New York:Wiley-Liss, 1990.p 57-86.

<p>T. ....</p> <p>avaliações de sementes de cafeeiro em diferentes estádios de maturação, submetidas a diferentes métodos de secagem, pelos testes de germinação(TG); índice de velocidade de germinação (IVG); condutividade elétrica (CE); emergência em bandejas(EB); índice de velocidade de emergência(IVE); tempo para emergência de 50% de plântulas(<math>T_{50}</math>). UFLA, Lavras –MG, 2000.....</p>	174
<p><b>TABELA 2A</b> – Resumo da análise de variância (em fatorial e contrastes com 3 tratamentos adicionais) dos dados obtidos das avaliações de sementes de cafeeiro submetidas a diferentes métodos de condicionamento fisiológico, pelos testes de condutividade elétrica do lixiviado (CEL); germinação (GER); índice de velocidade de germinação (IVG); Tempo para germinação de 50% das sementes (<math>T_{50}</math>); Peso da matéria seca dos eixos hipocótilo/radicula(MS). UFLA, Lavras – MG, 2000.....</p>	175

**TABELA 3A – Resumo** da análise de variância (em fatorial e contrastes com 3 tratamentos adicionais) dos dados obtidos das avaliações de sementes de cafeeiro submetidas a diferentes métodos de condicionamento fisiológico, pelos parâmetros atividade da enzima peroxidase (APR); atividade da enzima polifenoloxidase (APF); teor de ácido clorogênico(ACL); peso de 100sementes (P100); grau de umidade das sementes (GUS). UFLA, Lavras –MG, 2000..... 177

**TABELA 4 A – Valores médios** obtidos por sementes de cafeeiro, submetidas a diferentes métodos de condicionamento, nas avaliações: grau de umidade das sementes (GUS) em ( $h$ ), peso de 100sementes (P100) em (g); condutividade elétrica do lixiviado (CEL) em ( $\mu S/cm^l/g$ ); germinação (GER)em (%); índice de velocidade de germinação (IVG); Tempo para germinação de 50% das sementes (T<sub>50</sub>) em (Dias); Peso da matéria seca dos eixos hipocótilo/radícula(MS) em (g); atividade da enzima peroxidase (APR) em (U/min/g); atividade da enzima polifenoloxidase (APF) em (U/min/g); teor de ácido clorogênico (ACL) em(%). UFLA, Lavras – MG, 2000. .... 179

**TABELA 1A** – Resumo da análise de variância dos dados obtidos das avaliações de sementes de cafeeiro em diferentes estádios de maturação, submetidas a diferentes métodos de secagem, pelos testes de germinação(TG); índice de velocidade de germinação (IVG); condutividade elétrica (CE); emergência em bandejas(EB) índice de velocidade de emergência(IVE); tempo para emergência de 50% de plântulas(T<sub>50</sub>). UFLA. Lavras –MG, 2000.

FONTES DE VARIAÇÕES	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS					
		TG	IVG	ICE	EB	IVE	T <sub>50</sub>
MÉTODOS DE SECAGENS(MS)	2	316,302**	0,399**	12857,042**	1120,289**	0,198**	178,737**
ESTÁDIO DE MATURAÇÃO(EM)	2	592,271**	9,007**	8099,184**	1202,933**	0,574**	19,296**
MS X EM	4	28,521*	0,536**	1719,292**	198,004**	0,045*	56,751**
ERRO	27	8,504	0,061	53,901	22,219	0,015	1,512
CV%	-	4,62	4,92	11,26	8,61	14,69	3,31
MÉDIA GERAL	-	63,06	5,03	65,22	54,72	0,84	37,17

\* e \*\* Teste F significativo a 5 e 1% de probabilidade respectivamente

**TABELA 2A** – Resumo da análise de variância (em fatorial e contrastes com 3 tratamentos adicionais) dos dados obtidos das avaliações de sementes de cafeeiro submetidas a diferentes métodos de condicionamento fisiológico, pelos testes de condutividade elétrica do lixiviado (CEL); germinação (GER); índice de velocidade de germinação (IVG); Tempo para germinação de 50% das sementes ( $T_{50}$ ); Peso da matéria seca dos eixos hipocótilo/radicula(MS). UFLA, Lavras –MG, 2000.

C.V.	G. L	QM				
		CEL	GER	IVG	T50	MS
Tratamento	22	3.252,020743 **	3.666,930830 **	38,886386 **	14,336201**	0,539711 **
Fatorial	19	2.893,457890 **	3.648,907237 **	23,988862 **	15,204778 **	0,479999 **
Ms	1	4.677,364050 **	987,012500 **	22,717580 **	0,004500NS	0,236530 **
St	1	6.949,924030 **	25.382,812500 **	128,001000 **	224,78512 **	1,604610 **
PC	4	4.385,945493 **	3.113,543750 **	27,995063 **	3,176420 **	0,488998 **
Ms*St	1	12.065,59126 **	22.612,812500 **	56,594650 **	7,601450 **	4,460400 **
Ms*Pc	4	1.583,360863 **	674,918750 **	3,086200 **	3,645225 **	0,089365 **
St*Pc	4	880,558683 **	846,843750 **	24,091620 **	4,129238 **	0,084770 **
Pc*St*Ms	4	970,840105 **	451,343750 **	6,945905 **	3,174045 **	0,041480NS
PH8D vs SH8D	1	0,036450NS	98,000000NS	16,733113 **	0,750313NS	0,108113 *
PH8D vs Ne	1	339,171013NS	480,500000 **	166,987813 **	9,052513 **	0,154013 *
SH8D vs Ne	1	332,175313NS	144,500000NS	78,000050 **	15,015200 **	0,004050 **
PH8D vs PK8D	1	757,188613 *	50,000000NS	65,608513 **	0,021013NS	0,035113NS
PH8D vs PK12D	1	1.234,299613 **	800,000000 **	27,975200 **	2,010013NS	0,238050NS
PH8D vs PK16D	1	804,005000 *	3.120,500000 **	54,340313 **	2,599200NS	0,738113 **
PH8D vs PK20D	1	4.596,007813 **	4.512,500000 **	129,122450 **	0,340313NS	0,812813 **
PH8D vs PK24D	1	5.647,187813 **	11.026,125000 **	108,486450 **	0,825613NS	1,505113 **
PH8D vs PG8D	1	1.700,028050 **	98,000000NS	191,786113 **	23,667200 **	0,266450 **
PH8D vs PG12D	1	1.611,132613 **	2.016,125000 **	194,833800 **	22,044800 **	0,708050 **
PH8D vs PG16D	1	953,534450 **	4.802,000000 **	207,468450 **	22,044800 **	1,377800 **
PH8D vs PG20D	1	6.916,644113 **	5.202,000000 **	249,873013 **	33,252013 **	2,050313 **
PH8D vs PG24D	1	6.463,276513 **	2.812,500000 **	204,727613 **	20,640313 **	1,073113 **
PH8D vs SK8D	1	6.131,673800 **	5.202,000000 **	72,661513 **	0,002450NS	1,248200 **
PH8D vs SK12D	1	730,384200 *	11.704,500000 **	42,366013 **	6,160050 **	2,300513 **
PH8D vs SK16D	1	17.726,562050 **	14.450,000000 **	158,776200 **	0,132613NS	2,749513 **
PH8D vs SK20D	1	23.657,475200 **	15.488,000000 **	260,947013 **	0,204800NS	2,989013 **
PH8D vs SK24D	1	15.246,945313 **	15.842,000000 **	330,759200 **	16,820000 **	3,062813 **
PH8D vs SG8D	1	869,653513 **	144,500000NS	185,281250 **	17,880200 **	0,180000 **
PH8D vs SG12D	1	1.237,531250 **	200,000000 *	202,809800 **	21,648200 **	0,255613 **
PH8D vs SG16D	1	2.855,412450 **	66,125000NS	172,329613 **	12,600200 **	0,192200 **
PH8D vs SG20D	1	3.751,512200 **	242,000000 *	189,637813 **	14,526050 **	0,328050 **
PH8D vs SG24D	1	955,719200 **	128,000000NS	174,751513 **	14,878513 **	0,238050 **
SH8D vs PK8D	1	746,718013 *	8,000000NS	16,074450 **	0,520200NS	0,020000NS
SH8D vs PK12D	1	1.220,921113 **	338,000000 **	1,436513NS	0,304200NS	0,025313NS
SH8D vs PK16D	1	793,214450 *	2.112,500000 **	10,764800 **	0,556513NS	0,281250 **
SH8D vs PK20D	1	4.570,158013 **	3.280,500000 **	52,890613 **	2,101250NS	0,328050 **

Continuação.....							
SH8D vs PK24D	1	5.618,53001 **	9.045,125000 **	30.000	513 **	0,001800NS	0,806450 **
SH8D vs PG8D	1	1.684,32080	-NS	99,22	000 **	32,845513 **	0,035113NS
SH8D vs PG12D	1	1.595,842513 **	1.225,125000 **	97,371013 **		30,929113 **	0,262813 **
SH8D vs PG16D	1	941,780000 **	3.528,000000 **	106,361113 **		30,929113 **	0,714013 **
SH8D vs PG20D	1	6.884,924513 **	3.872,000000 **	137,282450 **		43,992200 **	1,216800 **
SH8D vs PG24D	1	6.432,615313 **	1.860,500000 **	104,401250 **		29,261250 **	0,500000 **
SH8D vs SK8D	1	6.101,810450 **	3.872,000000 **	19,656450 **		0,667013NS	0,621613 **
SH8D vs SK12D	1	720,101250 *	9.660,500000 **	5,848200 **		2,610613NS	1,411200 **
SH8D vs SK16D	1	17.675,760200 **	12.168,000000 **	72,420613 **		0,252050NS	1,767200 **
SH8D vs SK20D	1	23.598,781250 **	13.122,000000 **	145,521800 **		0,171113NS	1,960200 **
SH8D vs SK24D	1	15.199,833013 **	13.448,000000 **	198,702113 **		24,675313 **	2,020050 **
SH8D vs SG8D	1	858,429613 **	4,500000NS	90,653113 **		25,956013 **	0,009113NS
SH8D vs SG12D	1	1.224,135200 **	18,000000NS	103,033013 **		30,459013 **	0,031250NS
SH8D vs SG16D	1	2.835,045000 **	3,125000NS	81,664200 **		19,500013 **	0,012013NS
SH8D vs SG20D	1	3.728,161250 **	32,000000NS	93,708050 **		21,879113 **	0,059513NS
SH8D vs SG24D	1	943,951250 **	2,000000NS	83,334050 **		22,311200 **	0,025313NS
Nc vs PK8D	1	82,818450NS	220,50000 *	23,256200 **		9,945800 **	0,042050NS
Nc vs PK12D	1	279,424800NS	40,500000NS	58,266013 **		19,593800 **	0,009113NS
Nc vs PK16D	1	98,771513 NS	1.152,000000 **	30,811250 **		21,353113 **	0,217800 **
Nc vs PK20D	1	2.438,114450 **	2.048,000000 **	2,431013NS		5,882450 **	0,259200 **
Nc vs PK24D	1	3.218,426450 **	6.903,125000 **	6,283513 **		15,345800 **	0,696200 **
Nc vs PG8D	1	520,515113 *	144,500000NS	0,858050NS		3,445313 *	0,015313NS
Nc vs PG12D	1	471,859200NS	528,125000 **	1,073113NS		2,844113 *	0,201613 **
Nc vs PG16D	1	155,320313NS	2.244,500000 **	2,194513NS		2,844113 *	0,610513 **
Nc vs PG20D	1	4.192,532450 **	2.520,500000 **	8,323200 **		7,605000 **	1,080450 **
Nc vs PG24D	1	3.841,261250 **	968,000000 **	1,920800NS		2,354450NS	0,414050 **
Nc vs SK8D	1	3.586,621513 **	2.520,500000 **	19,344200 **		9,352813 **	0,525313 **
Nc vs SK12D	1	74,115313NS	7.442,000000 **	41,132450 **		30,147613 **	1,264050 **
Nc vs SK16D	1	13.161,720013 **	9.660,500000 **	0,103513NS		11,376450 **	1,602050 **
Nc vs SK20D	1	18.331,337813 **	10.512,500000 **	10,442450 **		11,980513 **	1,786050 **
Nc vs SK24D	1	11.038,008200 **	10.804,500000 **	27,714013 **		1,193513NS	1,843200 **
Nc vs SG8D	1	122,617800NS	98,000000NS	0,475313NS		1,487813NS	0,001013NS
Nc vs SG12D	1	280,963513NS	60,500000NS	1,739113NS		2,702813NS	0,012800NS
Nc vs SG16D	1	1.226,362813 **	190,125000 *	0,042050NS		0,292613NS	0,002113NS
Nc vs SG20D	1	1.834,665313 **	40,500000NS	0,720000NS		0,644113NS	0,032513NS
Nc vs SG24D	1	156,202813NS	112,500000NS	0,088200NS		0,720000NS	0,009113NS
Erro	69	118,790911	38,235507	0,667124		0,687016	0,016933
Média geral	-	52,64	44,00	7,61		6,80	0,64
CV %	-	4,01	24,77	10,73		12,19	20,32

**TABELA 3A –** Resumo da análise de variância (em fatorial e contrastes com 3 tratamentos adicionais) dos dados obtidos das avaliações de sementes de cafeeiro submetidas a diferentes métodos de condicionamento fisiológico, pelos parâmetros atividade da enzima peroxidase (APR); atividade da enzima polifenoloxidase (APF); teor de ácido clorogênico(ACL); peso de 100sementes (P100); grau de umidade das sementes (GUS). UFLA, Lavras – MG, 2000.

CV	GL	QM				
		APR	APF	ACL	P100	GUS
Tratamento	22	250,993382 **	11,657364**	1,201777 **	0,377031 **	227,896597 **
Fatorial	19	248,784350 **	12,629997 **	0,576387 **	0,396196 **	232,609713 **
Ms	1	2.280,25100 **	92,507220 **	2,065250 **	0,351560 *	690,644100 **
St	1	889,909220 **	43,743720 **	0,073530 **	1,556300 **	3.178,55412 **
PC	4	210,854670 **	9,499428 **	0,237493 **	0,666515 **	29,482865 **
Ms*St	1	0,280560NS	22,695420 **	3,324100 **	0,081900NS	126,131520 **
Ms*Pc	4	74,975448 *	5,550610 **	0,225673 **	0,487030 **	22,471515 **
St*Pc	4	43,222568NS	3,007098 **	0,446063 **	0,121335NS	44,321798 **
Pc*ST*Ms	4	60,062783NS	2,198760 *	0,462893 **	0,109610NS	9,787523 **
PH8D vs SH8D	1	860,542225 **	12,250000 **	0,522006 **	0,422500 **	86,397025 **
PH8D vs Nc	1	576,000000 **	12,250000 **	3,347070 **	0,688900 **	0,435600NS
SH8D vs Nc	1	28,462225NS	-NS	6,512704 **	0,032400NS	99,102025 **
PH8D vs PK8D	1	1,768900NS	1,345600NS	0,148996 **	0,093025NS	0,225625NS
PH8D vs PK12D	1	7,102225NS	1,345600NS	0,391876 **	0,144400NS	0,555025NS
PH8D vs PK16D	1	144,000000 *	0,336400NS	0,191844 **	0,270400 *	0,008100NS
PH8D vs PK20D	1	256,000000 **	1,368900NS	0,173056 **	0,511225 **	8,732025 *
PH8D vs PK24D	1	64,000000NS	5,428900 **	0,009216NS	0,270400 *	4,818025NS
PH8D vs PG8D	1	25,000000NS	2,788900 *	0,098282 **	0,504100 **	204,347025 **
PH8D vs PG12D	1	87,142225NS	5,452225 **	2,229049 **	0,462400 **	327,429025 **
PH8D vs PG16D	1	454,968900 **	16,687225 **	1,690000 **	0,005625NS	558,849600 **
PH8D vs PG20D	1	576,000000 **	27,615025 **	0,751689 **	0,748225 **	629,759025 **
PH8D vs PG24D	1	576,000000 **	0,342225NS	1,227664 **	0,783225 **	685,130625 **
PH8D vs SK8D	1	455,182225 **	12,250000 **	2,968729 **	0,435600 **	18,922500 **
PH8D vs SK12D	1	576,000000 **	16,687225 **	2,452356 **	0,240100 *	22,992025 **
PH8D vs SK16D	1	576,000000 **	27,615025 **	0,389376 **	0,019600NS	18,879025 **
PH8D vs SK20D	1	348,382225 **	8,526400 **	1,985281 **	0,902500 **	21,068100 **
PH8D vs SK24D	1	576,000000 **	8,526400 **	2,569609 **	0,044100NS	28,249225 **
PH8D vs SG8D	1	576,000000 **	1,368900NS	0,609961 **	0,422500 **	27,562500 **
PH8D vs SG12D	1	860,542225 **	12,250000 **	0,822649 **	0,504100 **	94,187025 **
PH8D vs SG16D	1	1.024,000000 **	34,105600 **	1,813062 **	0,608400 **	260,015625 **
PH8D vs SG20D	1	1.202,008900 **	27,615025 **	1,567504 **	0,883600 **	20,884900 **
PH8D vs SG24D	1	1.600,000000 **	34,105600 **	0,034040NS	0,220900 *	152,275600 **
SH8D vs PK8D	1	940,342225 **	21,715600 **	0,113232 **	0,119025NS	95,452900 **
SH8D vs PK12D	1	711,288900 **	21,715600 **	0,009312NS	1,060900 **	73,102500 **
SH8D vs PK16D	1	300,502225 **	16,646400 **	0,080940 *	1,368900 **	84,732025 **
SH8D vs PK20D	1	177,822225 *	5,428900 **	0,093942 **	0,004225NS	150,062500 **



Continuação.....						
SH8D vs PK24D	1	455,182225 **	33,988900 **	0,669942 **	0,016900NS	50,410000 **
SH8D vs PG8D	1	592,192225 **	3,348900 *	0,167281 **	0,003600NS	556,488100 **
SH8D vs PG12D	1	400,000000 **	1,357225NS	0,593670 **	0,000900NS	750,212100 **
SH8D vs PG16D	1	64,080025NS	0,342225NS	0,333506 **	0,525625 **	1,084,714225 **
SH8D vs PG20D	1	28,462225NS	3,080025 *	0,020880NS	0,046225NS	1,182,672100 **
SH8D vs PG24D	1	28,462225NS	8,497225 **	0,148610 **	0,055225NS	1,258,120900 **
SH8D vs SK8D	1	64,000000NS	-NS	1,001000 **	0,000100NS	24,453025 **
SH8D vs SK12D	1	28,462225NS	0,342225NS	0,711492 **	0,025600NS	20,250000 **
SH8D vs SK16D	1	28,462225NS	3,080025 *	0,009702NS	0,260100 *	24,502500 **
SH8D vs SK20D	1	113,848900 *	0,336400NS	0,471282 **	0,090000NS	22,137025 **
SH8D vs SK24D	1	28,462225NS	0,336400NS	0,775280 **	0,739600 **	15,840400 **
SH8D vs SG8D	1	28,462225NS	5,428900 **	0,003422NS	-NS	211,557025 **
SH8D vs SG12D	1	-NS	-NS	0,034040NS	0,003600NS	361,000000 **
SH8D vs SG16D	1	7,102225NS	5,475600 **	0,389376 **	0,016900NS	646,176400 **
SH8D vs SG20D	1	28,462225NS	3,080025 *	0,280370 **	0,084100NS	192,238225 **
SH8D vs SG24D	1	113,742225 *	5,475600 **	0,289444 **	0,032400NS	468,073225 **
Nc vs PK8D	1	641,608900 **	21,715600 **	4,908440 **	0,275625 *	0,034225NS
Nc vs PK12D	1	455,182225 **	21,715600 **	6,029480 **	1,464100 **	1,974025NS
Nc vs PK16D	1	144,000000 *	16,646400 **	5,141556 **	1,822500 **	0,562500NS
Nc vs PK20D	1	64,000000NS	5,428900 **	5,042270 **	0,013225NS	5,267025NS
Nc vs PK24D	1	256,000000 **	33,988900 **	3,005022 **	0,096100NS	8,151025 *
Nc vs PG8D	1	361,000000 **	3,348900 *	4,592449 **	0,014400NS	185,913225 **
Nc vs PG12D	1	215,062225 **	1,357225NS	11,039006 **	0,022500NS	303,979225 **
Nc vs PG16D	1	7,128900 NS	0,342225NS	9,793770 **	0,819025 **	528,080400 **
Nc vs PG20D	1	-NS	3,080025 *	7,271112 **	0,001225NS	597,069225 **
Nc vs PG24D	1	-NS	8,497225 *	8,628906 **	0,003025NS	651,015225 **
Nc vs SK8D	1	7,102225NS	-NS	12,620256 **	0,028900NS	25,100100 **
Nc vs SK12D	1	-NS	0,342225NS	11,529420 **	0,115600NS	29,757025 **
Nc vs SK16D	1	-NS	3,080025 *	6,019662 **	0,476100 **	25,050025 **
Nc vs SK20D	1	28,462225NS	0,336400NS	10,487882 **	0,014400NS	27,562500 **
Nc vs SK24D	1	-NS	0,336400NS	11,782056 **	1,081600 **	35,700625 **
Nc vs SG8D	1	-NS	5,428900 *	6,814710 **	0,032400NS	21,068100 **
Nc vs SG12D	1	28,462225NS	-NS	7,488432 **	0,014400NS	81,812025 **
Nc vs SG16D	1	64,000000NS	5,475600 **	10,086976 **	0,002500NS	239,166225 **
Nc vs SG20D	1	113,848900 *	3,080025 *	9,495642 **	0,012100NS	15,288100 **
Nc vs SG24D	1	256,000000 **	5,475600 **	4,056196 **	0,129600NS	136,422400 **
Erro	23	23,967935	0,525102	0,011005	0,047846	1,832350
Média geral		46,07	61,98	4,12	12,91	44,18
CV %	-	10,67	1,17	2,55	1,69	3,06

TABELA 4 A – Valores médios obtidos por sementes de cafeeiro, submetidas a diferentes métodos de condicionamento, nas avaliações: grau de umidade das sementes (GUS) em (%*h*); peso de 100sementes (P100) em (g); condutividade elétrica do líquido (CEL) em ( $\mu\text{S}/\text{cm}^2/\text{g}$ ); germinação (GER)em (%); índice de velocidade de germinação (IVG); -Tempo para germinação de 50% das sementes (T<sub>50</sub>) em (Dias); Peso da matéria seca dos eixos hipocótilo/radicula(MS) em (g); atividade da enzima peroxidase (APR) em (U/min/g); atividade da enzima polifenoloxidase (APF) em (U/min/g); teor de ácido clorogênico(ACL) em(%). UFPA, Lavras – MG, 2000.

MÉTODOS DE CONDICIONAMEN TOS	AVALIAÇÕES									
	GUS	P100	CEL	GER	IVG	T50	MS	APR	APF	ACL
PHD8D	49,555	13,38	5,435	89	15,66303	5,4425	1,2425	26,66	59,49	4,863
SHD8D	58,85	12,73	5,57	82	12,7681325	4,83	1,01	55,995	62,99	4,1405
Nc	48,895	12,550	18,4575	73,5	6,5238025	7,57	0,965	50,66	62,99	6,6925
PK8D	49,08	13,075	24,8925	84	9,9339575	5,34	1,11	25,33	58,33	4,477
PK12D	50,3	13,76	30,2775	69	11,9199	4,44	0,8975	29,325	58,33	4,237
PK16D	49,645	13,9	25,485	49,5	10,44855	4,3025	0,635	38,66	58,91	4,425
PK20D	46,6	12,665	53,3725	41,5	7,62412275	5,855	0,605	42,66	60,66	4,447
PK24D	51,75	12,86	58,5725	24,5	8,29496875	4,8	0,375	34,66	57,16	4,959
PG8D	35,26	12,67	34,59	82	5,86789	8,8825	0,8775	31,66	61,16	4,5495
PG12D	31,46	12,7	33,8175	62	5,79328025	8,7625	0,6475	35,995	61,825	3,37
PG16D	25,915	13,455	27,27	40	5,475605	8,7625	0,4125	47,99	63,575	3,563
PG20D	24,46	12,515	64,2425	24,5	4,4801865	9,52	0,23	50,66	64,745	3,996
PG24D	23,38	12,495	62,2825	40,5	5,54347975	8,655	0,51	50,66	60,075	3,755
SK8D	53,905	12,720	60,805	38	9,6340775	5,4075	0,4525	47,995	62,99	3,14
SK12D	54,350	12,890	24,545	12,5	11,0579375	3,6875	0,17	50,66	63,575	3,297
SK16D	53,900	13,240	99,58	6	6,748512	5,185	0,07	50,66	64,745	4,239
SK20D	54,145	12,430	114,195	1	4,2384615	5,1225	0,02	45,325	62,41	3,454
SK24D	54,870	13,590	92,7475	0	2,8017315	8,3425	0,005	50,66	62,41	3,26
SG8D	44,305	12,730	26,2875	80,5	6,03528675	8,4325	0,9425	50,66	60,66	4,082
SG12D	39,850	12,670	30,31	79	5,5925205	8,7325	0,885	55,995	62,99	3,956

CONTINUAÇÃO....										
SG16D	33,430	12,600	43,22	79	6,37775475	7,9525	0,9325	58,66	65,33	3,5165
SG20D	44,985	12,440	48,745	75	5,92442125	8,1375	0,8375	61,33	64,745	3,611
SG24D	37,215	12,910	27,295	81	6,31248125	8,17	0,8975	66,66	65,33	4,6785
Média Geral	44,178	12,912	44,000	52,7	7,611	6,797	0,640	46,066	61,975	4,118

-Nos métodos de condicionamentos:(P) sobre papel; (S) em submersão; (K) nitrato de potássio; (G) polietileno glicol 6000; (D) dias.



CONDICIONAMENTO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SG16D	33,430	12,600	43,22	79	6,37775475	7,9525	0,9325	58,66	65,33	3,5165
SG20D	44,985	12,440	48,745	75	5,92442125	8,1375	0,8375	61,33	64,745	3,611
SG24D	37,215	12,910	27,295	81	6,31248125	8,17	0,8975	66,66	65,33	4,6785
Média Geral	44,178	12,912	44,000	52,7	7,611	6,797	0,640	46,066	61,975	4,118