

JOSETE PERTEL

EFEITO DO CONDICIONAMENTO FISIOLÓGICO NA GERMINAÇÃO, NO
VIGOR E NAS ALTERAÇÕES ENZIMÁTICAS EM SEMENTES DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
FEVEREIRO – 2001

A DEUS.

Aos meus pais José e Orlete.

Ao meu marido Roberto.

Ao meu filho Lucas.

Aos meus irmãos Paulo, Josiane e Vanuza.

AGRADECIMENTO

A Deus, pai de toda sabedoria, pela companhia constante.

Aos meus pais José e Orlete, por terem-me dado vida e preparado-me para o mundo.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realizar o programa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

À professora Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, pela amizade, pela atenção, pela orientação e pelo incentivo tão constantes no decorrer do programa e no desenvolvimento deste trabalho.

Ao pesquisador Luiz Antônio dos Santos Dias, pela valorosa orientação durante a realização das análises estatísticas.

Ao professor Tocio Sediya, pelo seu empenho, como coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, em sempre ajudar os alunos do programa e pelos conselhos constantes desde a graduação.

À professora Eveline Mantovani Alvarenga, pela amizade, pelo incentivo e pelas sugestões.

À pesquisadora Maria Carmem Bhéring, pela amizade, pelo apoio e pelo convívio agradável.

A Mara Rodrigues e Vicente Madaleno dos Santos, pela amizade e pelo apoio constantes.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, pela compreensão e pelos constantes estímulos.

Ao meu marido Roberto, pela compreensão, pelo carinho e pela tolerância sempre presentes.

Ao meu filho Lucas, pelo amor e carinho.

Ao meu amigo Júnior (Arte Livros), pela paciência, pela amizade e pelas incansáveis horas de trabalho nos finais de semana.

Aos meus grandes amigos Wanderlei e Ordália, pelos longos anos de amizade e pelo apoio jamais dispensado.

Às minhas amigas Marlei e Raquel, pelo apoio e pela ajuda durante todos esses anos.

Às minhas amigas Greice Kelly, Simone, Elizabete, Kátia, Marise, Maria Miranda e Meire, pelo agradável convívio por alguns anos.

A Carla e Neucimara, pelos cuidados com meu filho.

Aos meus amigos Mário Lúcio, Paulo, Ubirajara, Wagner, Hércules, Ludmila, Telma, Yonara, Mariana, Cláudia e Raunira, pela amizade e ajuda mútuas.

A Ribeiro, José Eduardo, Marcos e Marcelo, pela amizade e pela valiosa ajuda na condução dos trabalhos.

Aos funcionários da Agronomia, pela ajuda e disposição.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, auxiliaram na realização deste trabalho, o meu reconhecimento e a minha gratidão.

CONTEÚDO

	Página
EXTRATO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Hidratação de sementes.....	3
2.2. Condicionamento fisiológico de sementes.....	5
CAPÍTULO 1 - EFEITO DO CONDICIONAMENTO FISIOLÓGICO NA GERMINAÇÃO E NO VIGOR DE SEMENTES DE CAFÉ (<i>Coffea arabica</i> L.)	11
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. Condicionamento fisiológico de sementes.....	14
2.2. Avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre a qualidade fisiológica das sementes.....	15
2.2.1. Germinação.....	16
2.2.2. Primeira contagem de germinação.....	16
2.2.3. Porcentagem de plântulas com raízes secundárias.....	16
2.2.4. Envelhecimento acelerado.....	18
2.2.5. Comprimento do eixo hipocótilo-radícula, peso de matéria seca das plântulas e crescimento radicular.....	17
2.3. Análise estatística.....	18

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1. Germinação.....	21
3.2. Primeira contagem do teste de germinação.....	25
3.3. Envelhecimento acelerado.....	29
3.4. Porcentagem de plântulas com raízes secundárias aos 20 dias.....	33
3.5. Porcentagem de plântulas com raízes secundárias aos 30 dias.....	35
3.6. Crescimento radicular.....	37
3.7. Comprimento do eixo hipocótilo-radícula.....	40
3.8. Matéria seca das plântulas.....	43
4. RESUMO E CONCLUSÕES	46
CAPÍTULO 2 - ALTERAÇÕES ENZIMÁTICAS EM SEMENTES DE CAFÉ (<i>Coffea arabica</i> L.) SUBMETIDAS AO CONDICIONAMENTO FISIOLÓGICO	48
1. INTRODUÇÃO	48
2. REVISÃO DE LITERATURA	50
2.1. Alterações fisiológicas e bioquímicas promovidas pelo condicionamento fisiológico.....	50
2.2. Atividade de algumas enzimas na germinação.....	55
3. MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1. Condicionamento fisiológico das sementes.....	58
3.2. Obtenção dos dados isoenzimáticos.....	59
3.2.1. Testes preliminares.....	59
3.2.2. Metodologia geral para eletroforese em gel de amido.....	59
3.2.2.1. Preparo da amostra e extração das enzimas.....	59
3.2.2.2. Preparo do gel.....	60
3.2.2.3. Aplicação das amostras no gel.....	61
3.2.2.4. Eletroforese.....	61
3.2.2.5. Fatiamento do gel e revelação das bandas.....	62
3.2.2.6. Fixação e secagem dos géis.....	69
3.2.2.7. Leitura das bandas.....	63
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1. Ajuste de metodologia.....	64

4.2. Análise isoenzimática de bandas.....	66
4.2.1. Álcool desidrogenase (ADH – E.C. 1.1.1.1).....	66
4.2.2. Esterase (EST – E.C. 3.1.1.1)	69
4.2.3. Malato desidrogenase (MDH – E.C. 1.1.1.37).....	73
4.2.4. Glutamato desidrogenase (GDH – E.C. 1.4.1.2), peroxidase (PO – E.C. 1.11.1.7) e fosfatase ácida (ACP – E.C. 3.1.3.2).....	76
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
APÊNDICE.....	89

BIOGRAFIA

JOSETE PERTEL, filha de José Pertel e Orlete Maria Rossi Pertel, nasceu em Ibiráçu, Espírito Santo, em 14 de agosto de 1967.

Realizou os cursos primário e secundário no Espírito Santo.

Em 1997, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 1997, iniciou seus estudos no Programa de Mestrado em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2000.

EXTRATO

PERTEL, Josete, M. S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2001.
Efeito do condicionamento fisiológico na germinação, no vigor e nas alterações enzimáticas em sementes de café (*Coffea arabica* L.).
Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Conselheiros: Luiz Antônio dos Santos Dias e Fernando Luiz Finger.

O presente trabalho foi conduzido na Universidade Federal de Viçosa, com o objetivo de avaliar os efeitos do condicionamento fisiológico na germinação e no vigor, determinando-se, ainda, as principais alterações enzimáticas ocorridas nas sementes. Para tanto, seis lotes de sementes de café do cultivar Catuaí Vermelho 2144 foram submetidas a tratamentos de embebição a 25°C, em água e solução de polietileno glicol (PEG 6000) a -0,4 MPa, por dois, quatro e seis dias. Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições. A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada imediatamente após o condicionamento pelos testes de germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, porcentagem de plântulas com raízes secundárias aos 20 e 30 dias, crescimento radicular, comprimento do eixo hipocótilo-radícula e peso de matéria seca de plântulas. Para determinação das principais alterações enzimáticas ocorridas nas sementes, utilizou-se a técnica de eletroforese em gel de amido 12% nas isoenzimas álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), glutamato desidrogenase (GDH), fosfatase ácida (ACP), peroxidase (PO) e α e β esterases (EST). Os resultados permitiram concluir que os efeitos do condicionamento fisiológico variaram

conforme a qualidade fisiológica inicial dos lotes. Em lotes de menor vigor, o condicionamento fisiológico aumentou a velocidade de germinação e a porcentagem de raízes secundárias aos 20 dias. O condicionamento fisiológico mostrou-se eficaz em promover ganhos de vigor no lote de média qualidade fisiológica, mas não foi efetivo nos lotes de baixo e alto vigores. O condicionamento fisiológico em água por dois e quatro dias foram os tratamentos mais efetivos para promover a melhoria da qualidade das sementes de café de médio vigor. A melhor solução extratora foi a n.º 1, de ALFENAS et al. (1991), modificada. A enzima ADH apresentou bandas mais nítidas quando a pré-corrída eletroforética foi realizada com 20 minutos e, as demais enzimas, com 30 minutos. As avaliações eletroforéticas revelaram que podem ocorrer alterações enzimáticas em razão, principalmente, da qualidade fisiológica dos lotes. As avaliações das atividades das enzimas ADH e α e β EST não apresentaram associação com o vigor das sementes. Não foi possível ajustar uma metodologia para análise das enzimas PO, ACP e GDH. Houve maior atividade da enzima MDH nas sementes dos lotes de média e baixa qualidades fisiológicas em relação ao lote de alto vigor. Foi verificada menor atividade das enzimas ADH, MDH e EST nas sementes inviáveis. Houve redução na atividade da enzima α EST nas sementes dos lotes de médio vigor acondicionadas em água.

ABSTRACT

PERTEL, Josete, M. S., Universidade Federal de Viçosa, february, 2001. **Effect of pre-conditioning on germination, vigour, and enzymatic alterations in coffee (*Coffea arabica* L.) seeds.** Adviser: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Committee Members: Luiz Antônio dos Santos Dias and Fernando Luiz Finger.

The present work was conducted at the Universidade Federal de Viçosa to evaluate the effects of pre-conditioning on germination and vigour, as well as to determine the main enzymatic alterations taking place in the coffee seeds. A total of six lots of coffee seeds cv. Catuaí Vermelho 2144 were soaked in 25°C water and 0.4 MPa polyethylene glycol (PEG 6000) solutions, for two, four and six days. The treatments were arranged in a randomized blocks design, with four replications in 50-seed plot. The physiological quality of seeds was evaluated immediately after the conditioning by the tests of germination, first germination counting, accelerated ageing, percentage of seedlings with secondary roots at 20 and 30 days, radicle growth, length of the hypocotyl-radicle axis and seedling dry matter weight. To determine the main enzymatic alterations occurred in the seeds 12% starch gel electrophoresis was used with the isozymes alcohol dehydrogenase (ADH), malate dehydrogenase (MDH), glutamate dehydrogenase (GDH), acid phosphatase (ACP), peroxidase (PO) and α and β estereases (EST). The results obtained led to the conclusion that the effects of the pre-conditioning varied according to the initial physiological quality of the lots. In seed lots with low vigour, the pre-conditioning increased the speed of germination and the percentage of secondary roots at 20 days.

Pre-conditioning was effective in promoting gains of vigour in the seed lot of medium physiological quality, but not in the lots of low and high vigour. Physiological conditioning in water for two and four days were the most effective to increase quality of coffee seeds of medium vigour. The best extraction buffer was solution number 1, by ALFENAS *et al.* (1991), modified. The ADH enzyme gave more distinct bands when the electrophoresis pre-running was carried out for 20 minutes, and the other enzymes for 30 minutes. Zimogran evaluations showed that enzymatic alterations can occur mainly as a result of the physiological quality of the lots. The evaluations of the activities of ADH and α and β EST enzymes did not present association with seed vigour. It was not possible to adjust a methodology to analyse the PO, ACP and GDH enzymes. There was greater activity of the MDH enzyme in the seeds of lots with medium and low physiological quality than in the high vigour lot. It was verified less activity of the ADH, MDH and EST enzymes in unviable seeds. There was reduction in the activity of α EST in the seeds of lots with medium vigour conditioned in water.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil era conhecido internacionalmente no passado como o país do café. Mais de 70% do total das exportações brasileiras era proveniente da cafeicultura, numa época em que o país mantinha um quase monopólio deste grão, que era o principal produto primário no comércio internacional. Ainda hoje, o Brasil é o maior produtor e o maior exportador de café do mundo, sendo indiscutível a importância desta cultura para o país. Anualmente, a participação relativa média do café no valor total das exportações brasileiras, incluindo os produtos básicos e os produtos industrializados, é de aproximadamente 5% (ANUÁRIO, 1997). Em 1996, a produção brasileira atingiu 1,16 bilhão de toneladas, representando 20,36% da produção mundial (FAO, 1996).

As sementes de café são reconhecidamente problemáticas quanto à qualidade fisiológica, perdendo rapidamente a viabilidade durante o armazenamento. Esse fato tem sido uma das maiores preocupações dos produtores de sementes de café, uma vez que estas não conservam o seu poder germinativo em níveis satisfatórios por períodos superiores a seis meses após a colheita. Em virtude disso, a obtenção de mudas, muitas vezes, fica concentrada em épocas que nem sempre são as mais apropriadas para o plantio.

Além da difícil conservação durante o armazenamento, as sementes de café germinam de maneira lenta e desuniforme, trazendo transtornos aos produtores de mudas, já que, em muitas regiões, principalmente de Minas Gerais, a época em que ocorre a semeadura, muitas vezes, coincide com

períodos de temperaturas mais baixas, retardando o desenvolvimento das mudas.

Diante dessa situação, torna-se interessante o desenvolvimento de técnicas que permitam a germinação mais rápida e uniforme das sementes de café, o que poderia contribuir para diminuir o gasto de sementes, além de permitir ganhos significativos no estabelecimento das lavouras como menor índice de replanta e estabelecimento mais rápido das mudas no campo, além, ainda, de permitir maior uniformidade da lavoura, possivelmente com reflexos sobre as primeiras produções, implicando o retorno mais rápido dos investimentos.

Um dos procedimentos mais promissores é o tratamento das sementes antes da sementeira, através do controle da absorção de água pelas sementes. Esse processo envolvendo a iniciação do metabolismo de germinação, denominado pré-condicionamento fisiológico, ou “priming” ou condicionamento osmótico (KHAN et al., 1976), apresenta como principal vantagem a uniformização da germinação e tem apresentado resultados promissores em várias espécies, como essências florestais, flores e hortaliças.

O condicionamento fisiológico tem-se mostrado promissor também em lotes de sementes de café, resultando em germinação mais rápida e uniforme, reflexo da ocorrência de alterações enzimáticas nas sementes submetidas ao tratamento.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do condicionamento fisiológico na qualidade fisiológica das sementes de café, bem como verificar as principais alterações enzimáticas associadas ao condicionamento fisiológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Hidratação de sementes

A água é essencial para a germinação de sementes. O movimento da água para o interior da semente é determinado pelas diferenças de potencial hídrico entre o interior da semente e o substrato com o qual ela está em contato.

Segundo BEWLEY e BLACK (1985), quando diferentes espécies são colocadas para germinar em condições adequadas de temperatura e suprimento de água, elas apresentam padrão trifásico de embebição (fases I, II e III). A duração de cada fase depende de certas propriedades inerentes a cada semente (composição química, tamanho, condição fisiológica da semente), à temperatura e à suplementação de água.

Na fase I, a absorção de água pela semente é relativamente rápida, ocorrendo em decorrência do potencial matricial dos diversos tecidos que compõem a semente. Esta etapa ocorre independentemente de a semente estar viável ou não, ou morta, exceto quando se tratar de dormência por impermeabilidade do tegumento à água.

LIMA (1999) verificou que, nas sementes de café embebidas em água, a fase I se completou com aproximadamente dois e quatro dias, tanto nas sementes sem quanto nas sementes com endocarpo, respectivamente, atingindo um grau de umidade superior a 45%. Já CAMARGO (1998) considerou completada a fase I, com aproximadamente seis dias de

embebição, das sementes de café com e sem endocarpo. LIMA (1999) verificou que as sementes embebidas em solução de PEG 6000 a -0,4 MPa tiveram um processo de embebição mais lento, e a fase I foi completada com, aproximadamente, três dias de embebição, no caso de sementes sem endocarpo, que atingiram grau médio de umidade de 45%. Nas sementes com endocarpo, a fase I ocorreu, aproximadamente, aos cinco dias de embebição em PEG 6000 a -0,4 MPa, cujas sementes atingiram um grau de umidade próximo a 50%.

CARVALHO e NAKAGAWA (1988) verificaram que a fase II (“fase lag”) tem início quando se atinge grau de umidade entre 35 e 40% nas sementes cujo principal tecido de reserva é do tipo cotiledonar e 25 e 30% naquelas cujo tecido de reserva é endospermático. A fase II caracteriza-se por um período de repouso, em que é quase nula a absorção de água, visto que os potenciais hídricos do substrato e da semente são muito semelhantes; no entanto, a duração dessa fase em relação à fase I é de oito a 10 vezes mais longa (BEWLEY e BLACK, 1985).

De acordo com BEWLEY e BLACK (1985), na fase II, a semente praticamente não absorve água, mantendo os níveis de hidratação atingidos no final da fase I. LIMA (1999) verificou que as sementes com endocarpo demoraram mais para atingir a fase II, o que pode ser atribuído ao efeito do endocarpo no atraso da germinação de sementes de café, e isso pode estar relacionado, dentre outros fatores, a um impedimento à entrada de água durante as etapas iniciais da germinação.

Ao final da fase II, constataram-se maior atividade respiratória e súbito incremento no teor de umidade das sementes, variando de 35 a 40% nas endospermáticas e de 50 a 60% nas cotiledonares. Assim, tem início a fase III, a qual se caracteriza pelo início da emissão de raiz primária e retomada de absorção de água, alcançada só pelas sementes viáveis e não dormentes (BEWLEY e BLACK, 1985).

LIMA (1999) constatou que a fase III foi atingida somente pelas sementes de café sem endocarpo, quando o teor de umidade era em média de 55%, o que ocorreu aproximadamente no 10º e 18º dias, nas sementes embebidas em água e em PEG 6000 a -0,4 MPa, a 25°C, respectivamente. Tais resultados foram semelhantes aos obtidos por LIMA et al. (1997) e

CAMARGO (1998), que constataram que as sementes de café iniciaram a emissão da radícula com grau de umidade médio de 55%.

2.2. Condicionamento fisiológico de sementes

Existem algumas técnicas que melhoram a capacidade germinativa das sementes e aumentam a sua tolerância para germinar em ambiente adverso. Entre essas técnicas estão os tratamentos de pré-semeadura, que envolvem o início do metabolismo. Nesses tratamentos, há os que antecipam parte ou quase todo o processo de germinação antes da semeadura e os que modificam esse processo, “retendo” as sementes embebidas, de modo que a emergência da raiz primária seja inibida por algum tempo antes da semeadura (KHAN et al., 1978). A emergência da raiz primária é impedida pelo ajuste da concentração da solução de embebição, de tal modo que a entrada de água requerida para a expansão celular se torna impossível. O potencial hídrico da solução é ajustado de modo a possibilitar a ocorrência dos processos de preparo para a germinação das sementes, mas que impeça o alongamento e a divisão celular e a emergência da raiz primária, mesmo após semanas de contato entre as sementes e a solução (HEYDECKER et al., 1975).

A maneira pela qual o condicionamento fisiológico aumenta o vigor e a capacidade germinativa das sementes, especialmente em condições adversas, é, ainda, assunto de muita discussão, o que, aliás, já havia sido definido por HEYDECKER et al. (1975) como sendo uma técnica simples em conceito, mas, fisiologicamente, complexa. Duas linhas de evidências podem explicar os efeitos do condicionamento fisiológico, ou seja, a reestruturação da integridade das membranas e o aumento na disponibilidade de metabólitos prontos para serem utilizados na germinação.

Vários termos têm sido associados com tratamentos de sementes que envolvem hidratação, incluindo: “priming” (HEYDECKER et al., 1975), osmocondicionamento ou condicionamento osmótico (KHAN et al., 1976; KNYPL e KHAN, 1981), pré-embebição (“presoaking”) (KHAN, 1991) ou condicionamento fisiológico (CAMARGO, 1998).

A maioria dos trabalhos de condicionamento osmótico encontrados na literatura refere-se a sementes de espécies olerícolas. Uma possível explicação

para esse fato talvez seja o tamanho das sementes. As sementes olerícolas possuem, geralmente, tamanho muito reduzido, permitindo o tratamento de um grande número de sementes em pequeno volume da solução osmótica. Apesar disso, KNYPL e KHAN (1981) relataram que o condicionamento osmótico pode ser utilizado em sementes maiores, como soja, café, feijão e amendoim, embora, inicialmente, tenha sido indicado apenas para sementes pequenas.

Alguns trabalhos com a técnica de condicionamento osmótico têm demonstrado que esse método tem melhor efeito em lotes de sementes de médio e baixo vigores. Durante o processo de germinação, enquanto as de alto vigor atingem nível de metabolismo mais rápido e ordenado, as de baixo vigor tendem a obter maior uniformidade na germinação e emergência (HEYDECKER et al., 1975; HEYDECKER e GIBBINS, 1978).

A melhoria de lotes de baixo vigor, após o condicionamento osmótico e a secagem, indica que a manutenção dos efeitos de tratamentos de hidratação não seja resultado da retenção dos estádios iniciais da germinação. Se esse for o caso, sementes de alto vigor também seriam melhoradas. Acredita-se, portanto, que, com o condicionamento osmótico, ocorra o processo de “reparo” em sementes deterioradas (LOPES, 1996).

Entre as condições básicas que podem determinar a eficiência ou não do condicionamento osmótico de sementes, além do produto utilizado, são muito importantes a temperatura durante o tratamento, a concentração do agente osmótico e o período do tratamento. A melhor combinação de potencial osmótico, temperatura e duração do tratamento varia entre espécies e, possivelmente, entre lotes de sementes (HEYDECKER et al., 1975).

PANDEY (1988) observou que o condicionamento osmótico de sementes de feijão reduziu a incidência de injúrias por embebição em sementes envelhecidas. A redução do vazamento de solutos foi atribuída ao condicionamento osmótico, que amenizou os efeitos do envelhecimento em sementes deterioradas e, também, reduziu a injúria por embebição e melhorou o vigor das plântulas.

Essa técnica nem sempre é benéfica para as sementes. HEYDECKER e COOLBEAR (1977) não verificaram respostas satisfatórias utilizando o condicionamento osmótico em lotes de sementes de cebola envelhecidas e que apresentavam germinação abaixo de 60%. Esses resultados indicaram que,

dependendo da espécie e da qualidade fisiológica dos lotes de sementes, estes respondem diferentemente ao condicionamento fisiológico.

Importante limitação do condicionamento fisiológico das sementes é a forte redução na longevidade, observada em sementes de alface (TARQUIS e BRADFORD, 1992) e em sementes de pimentão (SARACCO et al., 1995). BRUGGINK et al. (1999) verificaram que o condicionamento por três dias a 20°C em solução de PEG aerada, cuja concentração era de 340g PEG 8000 l⁻¹, foi capaz de promover um aumento na longevidade das sementes de pimentão.

BRADFORD (1986) relatou que, durante o condicionamento osmótico, ocorre um ajuste osmótico. TAIZ e ZEIGER (1991) definiram ajuste osmótico como o acúmulo de solutos pelas células, em resposta ao potencial hídrico do meio. É um processo pelo qual o potencial osmótico das células pode ser reduzido, por meio do aumento na concentração de uma variedade de solutos, incluindo açúcares, ácidos orgânicos, íons (especialmente K⁺) e proteínas. AKERS et al. (1987), estudando os efeitos do condicionamento osmótico em sementes de *Petroselinum crispum*, encontraram resultados que suportam a hipótese de que o condicionamento osmótico induz a um ajuste osmótico nas sementes, melhorando a germinação das sementes tratadas em condições de estresse hídrico. Estes autores acreditavam que o condicionamento osmótico induziu o desenvolvimento de baixo potencial hídrico nas células, favorecendo sua posterior germinação em condições de *deficit* hídrico.

O uso de produtos químicos osmoticamente ativos como forma de controlar a entrada de água na semente tem sido amplamente difundido. Polietileno glicol (PEG), manitol e sais inorgânicos têm sido usados como agentes osmóticos, visando obter o condicionamento de sementes, com destaque para MgSO₄ e KNO₃ (SUZUKI et al., 1989; BRADFORD et al., 1990), NaCl, K₃PO₄, MgCl₂, NaNO₃ (SUZUKI et al., 1989), glicerol (BROCKLEHURST e DEARMAN, 1984) e manitol (BEWLEY e BLACK, 1994; PASSAM et al., 1989), sendo o polietileno glicol o mais utilizado (BEWLEY e BLACK, 1994; GRAY et al., 1990; DEL GIÚDICE, 1996; BRACCINI, 1996).

TILDEN e WEST (1985) obtiveram o envigoração de sementes de soja, realizando o controle da taxa de absorção de água pelas sementes por meio do aumento do número de folhas de papel-filtro, para uma quantidade

constante de água, removendo, dessa maneira, os efeitos indesejáveis causados por agentes osmóticos. Entretanto, não foi possível quantificar o potencial hídrico em que as sementes foram embebidas. O tratamento mais efetivo foi obtido quando as sementes foram embebidas em cinco folhas de papel, com 20 ml de água, em placa de Petri, a 25°C, seguido de secagem, também a 25°C.

Dentre as principais vantagens do condicionamento fisiológico, destaca-se a possibilidade de germinação mais rápida, além de maior sincronismo da germinação, conduzindo a estandes mais uniformes (EIRA e MARCOS FILHO, 1990; DELLAQUILA e TRITO, 1988).

O polietileno glicol (PEG) está disponível em pesos moleculares que variam de 200 até 20.000, mas, para evitar a possibilidade de absorção do produto pelas sementes, são utilizados os que possuem maior peso molecular (SHARMA, 1973). Em pesos moleculares acima de 4.000, o PEG não é absorvido pelas sementes, não é quebrado facilmente por microrganismos e, geralmente, não provoca toxidez (MEXAL et al., 1975; HASEGAWA et al., 1984). PETCH et al. (1991) verificaram que a solução de PEG, utilizada no condicionamento osmótico de sementes, pode, inclusive, ser reaproveitada.

O potencial hídrico normalmente utilizado no condicionamento osmótico com PEG 6000 está na faixa de -0,5 a -2,0 MPa, e a duração do tratamento varia de quatro a 35 dias (KHAN et al., 1980/81).

Alguns autores têm alertado para a alta viscosidade das soluções de PEG, que, somada à baixa taxa de difusão do oxigênio em tais soluções, pode comprometer, seriamente, a disponibilidade de oxigênio para as sementes (MEXAL et al., 1975; FURUTANI et al., 1986). Esse fato pode ter contribuído para o insucesso em algumas tentativas de condicionamento osmótico em certas espécies (FURUTANI et al., 1986). Preocupados com isso, alguns autores desenvolveram técnicas para oxigenação das soluções de PEG (AKERS e HOLLEY, 1986).

Para BODSWORTH e BEWLEY (1981), que utilizaram o condicionamento osmótico em sementes de sorgo, milho, cevada, trigo e soja, as soluções de PEG 6000 podem ser usadas para promover germinação precoce e sincronizadas em baixas temperaturas. Esses autores relataram, para sementes de soja, o condicionamento osmótico a -0,5 MPa por seis dias,

à temperatura de 10°C. KHAN et al. (1978) obtiveram os melhores resultados de condicionamento osmótico com as sementes de soja, em solução de PEG 6000 (25, 30 ou 35%) a 15°C, por quatro a 10 dias.

DE e KAR (1995), trabalhando com sementes de feijão mungo em diferentes potenciais hídricos de PEG 6000, -0,5 MPa, -1,0 MPa e -1,5 MPa, a 25°C, por um, dois, três, quatro e cinco dias, verificaram que a germinação das sementes decresceu com o aumento das concentrações de PEG 6000, afetando também o crescimento das raízes e o crescimento do eixo hipocótilo-radícula das plântulas. Houve também atraso na germinação das sementes de feijão mungo com o aumento dos potenciais osmóticos, fato que já havia sido verificado em arroz (SING e SING, 1983), café (CAMARGO, 1998; LIMA, 1999) e soja (BRACCINI, 1996). A redução na porcentagem de germinação pode ser atribuída à mais baixa difusibilidade da água pela cobertura externa das sementes nos mais negativos potenciais hídricos.

BRADFORD (1986), estudando o efeito do condicionamento osmótico em sementes de diversas espécies cultivadas, verificou que o maior efeito do “priming” foi promover o acúmulo de solutos durante o tratamento, resultando em maior turgor na reidratação. YAN (1987), trabalhando com sementes de soja imersas em solução de polietileno glicol 6000 a 10°C por 72 horas e, posteriormente, reidratadas a 23°C, verificou que as sementes apresentaram maior tolerância à condição de baixa temperatura, sem redução na viabilidade. Esse autor concluiu que a maior resistência das sementes de soja condicionadas osmoticamente com PEG à baixa temperatura deve-se ao aumento na atividade metabólica promovido pelo tratamento.

DEL GIÚDICE (1996) verificou o efeito do condicionamento osmótico em sementes de soja, realizado em polietileno glicol 6000, a -0,8 MPa, por quatro dias, utilizando as temperaturas de condicionamento 15, 20, 25, 30 e 35°C. Os melhores níveis de qualidade fisiológica das sementes foram obtidos com o condicionamento osmótico entre 20 e 25°C. Houve melhoria na germinação das sementes de soja realizada em temperatura sub e supra-ótima e sob estresse hídrico. O condicionamento reduziu a perda de eletrólitos das sementes e promoveu melhor crescimento da plântula e acúmulo de matéria seca, e o índice de velocidade de emergência de plântulas foi

significativamente maior em sementes submetidas ao condicionamento osmótico.

O efeito da secagem e do armazenamento das sementes, após o tratamento, inicialmente foi considerado benéfico por HEYDECKER et al. (1975) e KHAN et al. (1978). Entretanto, diversos autores consideraram que a secagem reverteu os efeitos benéficos do tratamento (HEYDECKER e COOLBEAR, 1977; ARMSTRONG e McDONALD, 1992).

BRACCINI (1996) verificou que a secagem das sementes de soja após o condicionamento osmótico em PEG 6000 foi eficiente em aumentar o desempenho germinativo dessa cultura. Isso foi verificado também em sementes de café por LIMA (1999).

Existem alguns trabalhos em que se adotou a imersão direta das sementes em água, sendo esse o método mais simples de condicionamento, porém exige conhecimento detalhado da curva de embebição das sementes, pois o teor de água e o limite máximo da curva a ser atingido serão determinados pelo tempo de embebição. CAMARGO (1998), trabalhando com sementes de café, verificou que os mais altos índices de germinação foram obtidos com a imersão direta das sementes em água destilada por nove dias, sendo melhor em relação ao tempo de seis dias, que, por sua vez, também foi superior quando comparada com a média observada no tempo de três dias, muito embora, pelo teste de Duncan, as médias sejam iguais entre si, revelando apenas a tendência de superioridade com o aumento do tempo de imersão. LIMA (1999) também verificou que a embebição das sementes de café em água por 34 horas mostrou-se eficaz em aumentar a germinação e o vigor das sementes de café; verificou ainda que, quando foram armazenadas por 90 dias, tiveram acréscimo de cerca de 40% na sua germinação.

CAPÍTULO 1

EFEITO DO CONDICIONAMENTO FISIOLÓGICO NA GERMINAÇÃO E NO VIGOR DE SEMENTES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

1. INTRODUÇÃO

A propagação do cafeeiro é feita por meio de mudas oriundas de sementes, que apresentam problemas para conservação prolongada e germinam lenta e irregularmente. Durante o período de emergência, as sementes podem ser expostas a condições edafoclimáticas adversas, o que pode contribuir para a maior lentidão do processo de germinação e, conseqüentemente, baixa emergência de plântulas.

Dessa forma, a redução do período compreendido entre a semeadura e a emergência das plântulas, bem como a diminuição do tempo entre a emergência da primeira e da última plântula, tem sido aspecto de grande relevância para a cafeicultura, pois permite a semeadura, para obtenção das mudas, em ocasião mais adequada, possibilitando o plantio mais cedo, no início da estação chuvosa.

Algumas técnicas têm sido propostas, objetivando acelerar o processo de germinação das sementes, sendo o condicionamento fisiológico, ou osmótico, também chamado de “priming”, a técnica mais promissora. Nesta técnica, as sementes são submetidas a determinado período de embebição,

que permite a iniciação do metabolismo de germinação sem, contudo, ocorrer a emissão da raiz primária (HEYDECKER et al., 1975).

Os efeitos do condicionamento fisiológico são controvertidos, podendo ou não ser benéficos, dependendo da espécie. Além disso, existem controvérsias também relativas ao fato de os efeitos dos tratamentos serem apenas imediatos ou se podem ser mantidos após o armazenamento das sementes. Efeitos satisfatórios do condicionamento fisiológico já foram constatados não só em sementes de espécies olerícolas, essências florestais e flores, como também em algumas grandes culturas.

Para as sementes de café, as pesquisas referentes ao uso do condicionamento fisiológico são relativamente recentes, apresentando resultados promissores. Contudo, o uso dessa técnica em escala comercial depende não só do estabelecimento de metodologias específicas para a espécie, como também da realização de estudos envolvendo lotes com níveis distintos de qualidade fisiológica, já que a resposta ao tratamento depende, dentre outros fatores, do nível de vigor das sementes.

Desse modo, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do condicionamento fisiológico na germinação e no vigor de diferentes lotes de sementes de café.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Foram obtidos 20 kg de sementes de café do cultivar Catuaí Vermelho 2144, colhidas, entre março e abril de 1999, da área experimental denominada Vale da Agronomia, pertencente à Universidade Federal de Viçosa. Dividiram-se essas sementes em cinco lotes, sendo montados os testes em épocas diferentes, com a finalidade de ter lotes com qualidades fisiológicas distintas. Um sexto lote foi obtido da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais (EPAMIG), em Viçosa, MG, colhido em Araponga, Minas Gerais, em abril de 1998. Assim, quanto à qualidade fisiológica, os lotes receberam a seguinte classificação: lotes 1 e 2 - alta qualidade, lotes 3 e 4 - média qualidade, lote 5 - baixa qualidade fisiológica e lote 6 germinação nula.

A colheita dos frutos de café foi realizada manualmente, quando estes se apresentavam próximos ao estágio denominado “cereja”. Após a colheita, foi feita a eliminação de frutos verdes, brocados e secos. Apenas os frutos “cereja” foram despulpados mecanicamente, no mesmo dia, e degomados por fermentação natural durante 24 horas. Após a lavagem, as sementes foram espalhadas à sombra para eliminação da água superficial. Retirou-se uma amostra das sementes, e determinou-se a sua qualidade inicial pelo teste de germinação, realizado com quatro repetições de 50 sementes sem o endocarpo, em rolos de papel-toalha umedecidos com quantidade de água

equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. Os rolos foram mantidos em germinador a 30°C, sendo a contagem efetuada aos 30 dias após a semeadura (BRASIL, 1992).

As sementes foram secadas à sombra até atingir grau de umidade em torno de 11 a 13% em base úmida.

Antes do início do experimento, as sementes foram tratadas com o fungicida Captan 0,2%.

2.1. Condicionamento fisiológico das sementes

Para o condicionamento fisiológico das sementes, utilizou-se solução de polietileno glicol (PEG 6000), a -0,4 MPa e na temperatura de 25°C, definida por LIMA (1999) como o melhor potencial osmótico e a melhor temperatura para condicionamento osmótico das sementes de café.

Na determinação da quantidade de PEG 6000 a ser adicionada, utilizou-se a equação proposta por MICHEL e KAUFMANN (1973), ou seja:

$$\Psi_{os} = -(1,18 \times 10^{-2}) C - (1,18 \times 10^{-4}) C^2 + (2,67 \times 10^{-4}) CT + (8,39 \times 10^{-7}) C^2 T$$

em que

Ψ_{os} = potencial osmótico da solução (bar);

C = gramas de PEG 6000/litro de água (a ser calculado); e

T = temperatura em °C (25°C).

A concentração de PEG 6000 utilizada para obter o potencial osmótico desejado de -0,4 MPa à temperatura de 25°C foi de 178,34 g/l de água destilada, de acordo com a equação anterior. Para a dissolução do PEG em água destilada utilizou-se agitador magnético.

Sementes com o endocarpo foram condicionadas em PEG 6000 a -0,4 MPa e em água por dois, quatro e seis dias, a 25°C. Foram colocadas 50 sementes em cada caixa gerbox, contendo no fundo três folhas de papel germitest e 30 ml da solução de PEG 6000 a -0,4 MPa, sendo este volume suficiente para cobrir a terça parte das sementes. Os tratamentos que

envolveram a embebição das sementes em água foram conduzidos da mesma forma descrita anteriormente, empregando-se 30 ml de água destilada em vez de PEG. As caixas gerbox foram tampadas e colocadas dentro de sacos plásticos e levadas à incubadora (BOD) previamente regulada para fornecer temperatura constante de 25°C, onde permaneceram por dois, quatro e seis dias.

Foram definidos os seguintes tratamentos:

T₁ = sementes embebidas em PEG 6000 por dois dias;

T₂ = sementes embebidas em PEG 6000 por quatro dias;

T₃ = sementes embebidas em PEG 6000 por seis dias; e

T₄ = sementes embebidas em água por dois dias;

T₅ = sementes embebidas em água por quatro dias;

T₆ = sementes embebidas em água por seis dias

Após o período de condicionamento de cada tratamento, as sementes foram retiradas da BOD e lavadas superficialmente em água corrente. Em seguida, tomou-se uma amostra para determinação do grau de umidade, pelo método da estufa a 105°C ± 3°C, por 24 horas, segundo as prescrições das “regras para análise de sementes” (BRASIL, 1992).

Logo após, as sementes foram submetidas às avaliações de sua qualidade fisiológica, por meio dos testes descritos nos tópicos subseqüentes.

2.2. Avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre a qualidade fisiológica das sementes

As avaliações dos efeitos dos tratamentos tiveram início imediatamente após a secagem natural em ambiente de laboratório para a retirada do excesso de água, realizando-se os testes subseqüentes.

2.2.1. Germinação

Realizada em rolo de papel-toalha, sendo cada rolo constituído de três folhas, duas embaixo das sementes e uma cobrindo estas. A quantidade de água utilizada para umedecer o substrato foi de 2,5 vezes o peso do papel seco. Foram utilizadas quatro subamostras de 50 sementes sem endocarpo, retiradas manualmente, a fim de evitar quaisquer danos ao embrião. Os rolos foram mantidos em germinador regulado a 30°C. Foram feitas duas avaliações, ou seja, aos 20 e 30 dias após a instalação do teste. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais, segundo os critérios estabelecidos pelas regras para análise de sementes (BRASIL, 1992).

2.2.2. Primeira contagem de germinação

Aproveitou-se o próprio teste de germinação conduzido de acordo com as regras para análise de sementes (BRASIL, 1992), conforme citado anteriormente. Registrou-se a porcentagem de plântulas normais encontradas por ocasião da primeira contagem do teste de germinação (20 dias).

2.2.3. Porcentagem de plântulas com raízes secundárias

O teste foi realizado, seguindo-se a mesma metodologia do teste de germinação, recomendado pelas regras para análise de sementes (BRASIL, 1992), sendo as avaliações feitas aos 20 e 30 dias após a instalação do teste e computando-se a porcentagem de plântulas com emissão de raízes secundárias.

2.2.4. Envelhecimento acelerado

Foi adotada a metodologia descrita por MARCOS FILHO (1999), utilizando-se o método do gerbox adaptado. Foram distribuídas 240 sementes sem pergaminho sobre a bandeja de tela de alumínio acoplada ao gerbox contendo, ao fundo, 40 ml de água destilada. A seguir, os gerbox foram tampados e mantidos em incubadora BOD a 42°C, por 72 horas, conforme VASCONCELOS et al. (1992). Após esse período, quatro subamostras de 50 sementes foram colocadas para germinar conforme descrito no teste de germinação. Com as 40 sementes restantes, efetuou-se a determinação de umidade após o envelhecimento, pelo método da estufa a 105°C ± 3°C por 24 horas, segundo as recomendações das regras para análise de sementes (BRASIL, 1992). A avaliação foi realizada aos 30 dias após a montagem do teste, computando-se a porcentagem média de plântulas normais.

2.2.5. Comprimento do eixo hipocótilo-radícula, peso da matéria seca das plântulas e crescimento radicular

Este fato foi realizado com quatro subamostras de 20 sementes em rolo de papel-toalha, umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. As sementes foram distribuídas em linha, manualmente, no sentido longitudinal da folha (NAKAGAWA, 1999). Em seguida, os rolos foram colocados em germinador mantido a 30°C, durante 30 dias. No final desse período, as plântulas foram avaliadas, descartando-se as anormais e as sementes mortas.

A determinação do comprimento do eixo hipocótilo-radícula foi efetuada aos 30 dias, utilizando-se uma régua milimetrada, para a medição a partir da inserção do endosperma. Os resultados foram expressos em mm/plântula.

O peso de matéria seca foi tomado com as mesmas plântulas normais de cada subamostra, seguindo-se a metodologia proposta por (KRZYZANOWSKI et al., 1991). As plântulas foram mantidas em estufa termoelétrica regulada para 80°C ± 2°C, durante 24 horas. Após esse período, as amostras foram resfriadas em dessecadores e pesadas em balança com

precisão de um miligrama, sendo os resultados de matéria seca expressos em mg/plântula.

O crescimento radicular foi determinado no mesmo teste, utilizando-se uma régua milimetrada. Mediu-se o comprimento da raiz primária das plântulas, computando apenas a porcentagem média de sementes que emitiram raiz primária com comprimento igual ou superior a 2 cm, aos 20 dias após a semeadura.

2.3. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com sete tratamentos e quatro repetições. Os dados obtidos dos testes de avaliação da qualidade fisiológica das sementes foram submetidos a análises de variância (ANAVA), envolvendo-se cada lote (ANAVAs individuais) e o conjunto dos lotes (ANAVA conjunta). A ANAVA conjunta foi processada, considerando-se que a razão entre o maior e o menor quadrado médio do erro, para cada teste, não ultrapassou o valor 7. Considerando-se ainda o interesse em conclusões gerais (efeito aleatório), os efeitos de tratamentos foram testados com a interação tratamentos x lotes. As médias obtidas nos testes foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância foi conduzida com os dados obtidos em cinco dos seis lotes empregados, pois as sementes do lote 6 apresentaram germinação nula, mesmo após terem sido submetidas ao condicionamento fisiológico.

Através da análise conjunta de variância (Quadro 1), verificou-se que os efeitos devido aos tratamentos foram significativos apenas no teste de germinação, plântulas com raízes secundárias aos 30 dias e crescimento radicular. Porém, os efeitos dos lotes, bem como da interação entre lotes e tratamentos, foram significativos em todas as variáveis. Ao analisar o desdobramento dos tratamentos dentro de cada lote, verificou-se que eles apresentaram respostas diferenciadas em cada lote.

Apesar dos efeitos significativos da interação tratamentos x lotes, foram mais enfatizados neste trabalho os resultados referentes aos efeitos dos tratamentos aplicados às sementes dos diferentes lotes.

Quadro 1 - Resumo da ANAVA conjunta para avaliação do efeito do condicionamento fisiológico na germinação e no vigor das sementes de café embebidas em PEG 6000 e em água, por dois, quatro e seis dias, e testemunha, em cinco lotes

F.V.	G.L.	Quadrados Médios							
		TG ¹	PC ²	EA ³	PR 20 ⁴	PR 30 ⁵	CR ⁶	CEH ⁷	MS ⁸
Trat. (T)	6	280,0*	493,3	515,2	541,8	194,8**	2138,8*	372,7	5,6
Lotes (L)	4	4.697,8**	4.923,0**	3.512,6**	4.511,1**	2.433,7**	9.836,5**	1.836,5**	62,3**
T X L	(24)	110,4**	412,5**	231,2**	240,4**	52,5**	808,9**	212,4**	5,3*
T/L ₁	6	54,6**	582,1**	198,9**	215,6*	54,3**	596,7	391,3**	9,0**
T/L ₂	6	24,5	284,5*	425,9**	180,6*	53,5	1.959,2**	198,0**	3,7
T/L ₃	6	62,9**	276,7**	49,6	113,6**	14,0	324,4*	84,1**	8,0
T/L ₄	6	377,6**	845,9**	151,1**	520,1**	165,9**	2.017,8**	278,1**	3,6
T/L ₅	6	202,0**	154,0**	614,2**	473,3**	117,3*	476,4*	270,7**	2,8
Erro Médio	105	25,9	56,3	33,9	61,4	18,0	201,4	42,9	3,1
Média Geral		80,3	35,0	79,0	67,1	85,3	57,6	73,6	23,8
C.V.(%)		6,3	21,5	7,4	11,7	5,0	24,6	9,0	7,4

** e * significativos a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

¹ Teste de germinação.

² Primeira contagem.

³ Envelhecimento acelerado.

⁴ Plantas com raízes secundárias aos 20 dias.

⁵ Plantas com raízes secundárias aos 30 dias.

⁶ Crescimento radicular.

⁷ Comprimento do eixo hipocótilo-radícula.

⁸ Peso de matéria seca.

3.1. Germinação

Ao comparar a porcentagem de germinação das sementes da testemunha de cada um dos lotes (Quadro 2), verificou-se que os lotes 1 e 2 (alta qualidade) se mostraram significativamente semelhantes, sendo superiores aos demais. Os lotes 3 e 4 apresentaram qualidade intermediária, enquanto o lote 5 (baixa qualidade) excluiu a menor germinação.

Quanto aos tratamentos, observou-se que houve maior destaque nas sementes condicionadas em PEG 6000 por quatro dias, que apresentaram a maior média de germinação (85,6%). Em todos os lotes, esse tratamento se encontrava entre os melhores, apesar de diferir da testemunha apenas no lote 3.

Notou-se que as sementes do lote 3 embebidas em PEG 6000 por quatro e seis dias e em água por quatro dias foram superiores à testemunha. Já nas sementes dos demais lotes não houve efeitos benéficos dos tratamentos em relação à testemunha. Portanto, na maioria dos lotes estudados, os tratamentos de condicionamento em PEG e em água não favoreceram a germinação.

Existem, na literatura, controvérsias com respeito aos efeitos dos tratamentos e à qualidade inicial das sementes. PARERA e CANTLIFFE (1994) sugeriram o uso de sementes de alto vigor como pré-requisito para se obter bom resultado. Entretanto, pode ser observado no Quadro 2 que apenas nas sementes do lote 3 houve efeito benéfico do condicionamento sobre a germinação, o que não ocorreu nas sementes dos lotes 1 e 2, cuja germinação média foi de 91,4% e 88,4%, respectivamente. Assim, os tratamentos utilizados não foram benéficos à germinação das sementes dos lotes 1, 2, 4 e 5.

Dentro da técnica do condicionamento fisiológico de sementes, um dos pontos que mais têm gerado discussão refere-se aos efeitos da secagem e do armazenamento das sementes após o tratamento. LIMA (1999), trabalhando com sementes de café e utilizando a técnica de condicionamento fisiológico, verificou que ela promoveu a melhoria da qualidade das sementes, principalmente daquelas de baixa qualidade fisiológica.

WOODSTOCK e TAO (1981) observaram que a embebição das sementes de soja em solução com 30% de polietileno glicol não só evitou as

injúrias provocadas pela rápida absorção de água, como também aumentou a germinação de sementes de baixo vigor.

Quadro 2 - Valores médios, em porcentagens de plântulas normais, obtidos no teste de germinação das sementes de café condicionadas, segundo os tratamentos^{1/}

Tratamentos	Lotes					Médias
	1	2	3	4	5	
PEG 6000 2 dias	93,5 Aa	88,5 ABab	86,0 BCb	57,0 Cc	50,5 Dc	75,1
PEG 6000 4 dias	93,5 Aa	92,0 Aa	91,0 Aa	82,5 Ab	69,0 Ac	85,6
PEG 6000 6 dias	87,0 Aab	86,5 ABab	90,0 ABa	83,0 Ab	67,0 Ac	82,7
Água 2 dias	92,0 Aa	92,0 Aa	87,0 ABCab	81,0 Ab	56,0 BCDc	81,6
Água 4 dias	89,5 Aab	83,5 Bb	91,5 Aa	68,0 Bc	54,0 CDd	77,3
Água 6 dias	91,0 Aa	83,5 Ba	82,5 Ca	68,5 Bb	61,5 ABCb	77,4
Testemunha	93,5 Aa	92,5 Aa	83,0 Cb	77,0 Ab	65,5 ABc	82,3
Médias	91,4	88,4	87,3	73,9	60,5	80,3

^{1/}As médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

De acordo com HEYDECKER e COOLBEAR (1977), um dos fatores que mais interferem no condicionamento de sementes são a manutenção do nível adequado de oxigênio e a aeração da solução. FURUTANI et al. (1986) observaram diminuição na porcentagem de germinação em sementes de cebola e associaram essa redução à baixa disponibilidade de oxigênio na solução de PEG, que é 69% menos disponível a -1,1 MPa a 10°C em relação à água, podendo levar a condições de anaerobiose, diminuindo o metabolismo ou aumentando a produção de níveis tóxicos de etanol. Esse fenômeno parece explicar os resultados do Quadro 2 dos lotes 1, 2, 3 e 5, no tratamento em PEG 6000 por seis dias. Velasco e Gutierrez (1974), citados por RENA e MAESTRI (1986), descreveram que a presença do endocarpo causa impedimento da difusão de gases, contribuindo para a germinação lenta das sementes de café.

LIMA (1999) verificou que o condicionamento em PEG 6000 por 168 horas acarretou problemas na oxigenação das sementes de café. No presente trabalho, o tratamento em PEG 6000 por quatro e seis dias foi benéfico para as sementes do lote 3, cuja germinação inicial foi de 83,0%.

Os efeitos do condicionamento fisiológico podem ser explicados pela restauração na integridade das membranas e pelo aumento da disponibilidade de metabólitos prontos para serem utilizados durante a germinação e emergência. As membranas desempenham papel importante na compartimentalização dos componentes celulares, podendo a ruptura dessas membranas promover diversas alterações metabólicas nas sementes. Com o condicionamento fisiológico, perturbações na estrutura das membranas podem ser suavizadas em graus variados. O componente osmótico reduz a taxa e a quantidade de água absorvida, e a semente se hidrata lentamente, o que permite tempo maior para reorganização das membranas, possibilitando que os tecidos se desenvolvem de forma mais ordenada, o que reduz a incidência de injúrias ao embrião provocadas pela rápida embebição (KHAN, 1991).

CAMARGO (1998), estudando os efeitos de cinco potenciais hídricos (0 (água), -3, -6, -9 e -12 atm) nos períodos de três, seis, nove e 12 dias de condicionamento em sementes de café, utilizando PEG 6000 a 25°C, verificou que, no tempo de nove dias de condicionamento, a porcentagem de germinação foi sensivelmente prejudicada em todos os potenciais hídricos,

sendo seus efeitos tanto mais drásticos quanto maior a concentração da solução.

3.2. Primeira contagem do teste de germinação

A primeira contagem se baseou no princípio de que as amostras que apresentam maior porcentagem de plântulas normais, na data da primeira contagem estabelecida pelas “regras de análise das sementes” (BRASIL, 1992), são as mais vigorosas, indicando maior velocidade de germinação.

De acordo com o Quadro 3, observa-se que as porcentagens médias de germinação na primeira contagem variaram com os tratamentos dentro de cada lote e também entre lotes em razão, provavelmente, da qualidade fisiológica inicial destes.

Os lotes 1 e 2 se mostraram como os mais vigorosos com germinação média geral de 47,4% e 45,5% na data da primeira contagem, respectivamente. Nas sementes do lote 2, tanto os tratamentos em PEG 6000 como em água tiveram efeitos benéficos sobre a germinação, sendo os melhores tratamentos água e PEG 6000, por quatro e seis dias. Já nas sementes do lote 1, os tratamentos empregados não contribuíram para aumentar o vigor das sementes.

As sementes do lote 3 apresentaram germinação média geral de 36,4% na primeira contagem, mostrando-se mais inferiores que as dos lotes 1 e 2. Os tratamentos de embebição em água por dois, quatro e seis dias mostraram-se benéficos em relação à testemunha, enquanto aqueles que envolveram PEG 6000 não diferiram da testemunha. Assim, a velocidade de germinação foi menor nas sementes submetidas aos tratamentos em PEG 6000 em relação à água, indicando menor vigor das sementes de café tratadas com PEG 6000.

Nas sementes do lote 4, o melhor desempenho foi obtido com as sementes embebidas em PEG 6000 por seis dias (54,0%), enquanto a testemunha apresentou 14,5% de germinação na primeira contagem. Nos resultados apresentados pelo teste de germinação, esse tratamento ficou entre os melhores nas sementes do lote 4, apesar de não ter diferido da testemunha.

Os tratamentos de condicionamento em PEG 6000 por quatro dias e em água por quatro e seis dias foram superiores à testemunha nas sementes

do lote 5. No entanto, conforme resultados do teste de germinação, os tratamentos em PEG 6000 por quatro e seis dias e em água por seis dias não diferiram da testemunha.

De modo geral, os tratamentos de embebição em água por quatro e seis dias promoveram aumento na velocidade de germinação das sementes dos lotes 2 e 5. Nas sementes do lote 3, os tratamentos em água por dois e quatro dias foram efetivos em aumentar o vigor

Em algumas espécies, tem sido observado que poucas horas após o início da germinação de sementes osmocondicionadas têm havido rápido retorno à replicação de DNA e à divisão celular (BRAY et al., 1989), o que explica a maior velocidade de germinação dessas sementes.

Pelos resultados de primeira contagem (Quadro 3), observou-se que apenas o lote 1 não foi beneficiado pelos tratamentos de condicionamento. O mesmo foi verificado no teste de germinação desse lote.

O tratamento em água por dois dias apresentou maior média 40,3% na primeira contagem de germinação, indicando, provavelmente, como o mais eficiente em promover aumento de vigor das sementes. Este tratamento esteve entre os melhores no teste de germinação das sementes dos lotes 1, 2 e 4, apesar de não ter diferido da testemunha.

Quadro 3 - Valores médios, em porcentagens de plântulas normais, obtidos na primeira contagem de germinação das sementes de café condicionadas segundo os tratamentos^{1/}

Tratamentos	Lotes					Médias
	1	2	3	4	5	
PEG 6000 2 dias	49,5 ABCa	42,0 ABCa	29,0 CDb	15,3 Dc	11,0 BCc	29,4
PEG 6000 4 dias	50,5 ABCa	54,5 Aa	32,5 CDb	25,0 Cb	24,5 Ab	37,4
PEG 6000 6 dias	37,5 Cb	52,5 ABa	30,5 CDb	54,0 Aa	11,5 BCc	37,2
Água 2 dias	56,0 ABa	41,0 BCb	56,5 Aa	40,0 Bb	8,0 Cc	40,3
Água 4 dias	38,0 Ca	45,5 ABa	46,5 ABa	40,5 Ba	18,0 ABb	37,7
Água 6 dias	42,0 BCab	52,0 ABa	39,5 BCab	27,5 Cbc	19,5 Ac	36,1
Testemunha	58,5 Aa	31,0 Cb	20,5 Dbc	14,5 Dc	9,0 Cc	26,7
Médias	47,4	45,5	36,4	31,0	14,5	35,0

^{1/}As médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

BRACCINI (1996), em trabalho com sementes de soja, verificou efeito prejudicial da rápida hidratação ao embeber as sementes em água pura, observando também melhor desempenho das sementes osmocondicionadas em solução de polietileno glicol. Alguns pesquisadores concluíram que a embebição das sementes em soluções de polietileno glicol, além de prevenir as injúrias provocadas pela rápida entrada de água, pode reduzir a taxa respiratória e evitar possíveis concentrações tóxicas de etanol, resultantes da respiração anaeróbica, que pode ocorrer nas primeiras horas de embebição (POWELL e MATTHEWS, 1978; ISHIDA et al., 1988).

PAIXÃO (1998), trabalhando com sementes de quiabo embebidas em água nos períodos de oito e 16 horas, não verificou efeito prejudicial durante o processo de embebição. Porém, NADA et al. (1994) verificaram redução na germinação de sementes de *Trifolium resupinatum* e *Trifolium balansae*, com o aumento do tempo de embebição afetando a sua qualidade.

Observando o desempenho dos lotes de sementes, verificou-se que o lote 1 apresentou redução na porcentagem de germinação em todos os tratamentos. No entanto, os tratamentos em PEG 6000 por dois e quatro dias e água aos dois dias não diferiram da testemunha. Comportamento diferente foi observado nos demais lotes, cuja qualidade fisiológica em praticamente todos os tratamentos ficou acima daquela testemunha.

Em algumas espécies, têm sido observado poucas horas após o início da germinação de sementes osmocondicionadas, rápido retorno à replicação de DNA e à divisão celular (BRAY et al., 1989), o que explica a maior velocidade de germinação dessas sementes.

BRADFORD (1986) observou que o aumento na taxa de germinação e no vigor de sementes após o condicionamento seria explicado pela retenção de preparados fisiológicos durante o tratamento, isto é, o condicionamento levaria a um acúmulo de solutos (açúcares, ácidos orgânicos e íons) provenientes do início do metabolismo da semente, resultando em maior turgor na reidratação e promovendo a emergência da radícula em menor espaço de tempo.

Observando os valores de germinação, na primeira contagem, das sementes da testemunha de todos os lotes, notou-se que o lote 1 foi superior aos demais, seguido pelos lotes 2 e 3. Os lotes de pior desempenho foram o 4 e o 5, que não diferiram estatisticamente do 1.

Portanto, os tratamentos empregados não foram benéficos para as sementes do lote 1, cuja qualidade inicial foi superior à dos demais. No teste de germinação, também não houve efeitos benéficos dos tratamentos no lote 1. Assim, apenas os lotes de média e baixa qualidades apresentaram respostas aos tratamentos.

3.3. Envelhecimento acelerado

Este teste teve como base o fato de que a taxa de deterioração das sementes foi aumentada consideravelmente pela sua exposição a níveis elevados de temperatura e umidade relativa altas.

BASAVARAJAPPA e SHETTY (1991), referindo-se a sementes de trigo, arroz, milho, feijão e outras leguminosas, verificaram que a exposição das sementes a temperatura e umidade relativa elevadas provoca sérias alterações degenerativas no metabolismo das sementes (desnaturação de proteínas, queda nos teores de carboidratos totais, de carboidratos solúveis, de proteínas solúveis e de fosfatos, aumento dos teores de açúcares redutores e de ácidos graxos livres, desestabilização da atividade de enzimas e da síntese de RNA e de proteínas), desencadeadas pela desestruturação e perda de integridade do sistema de membranas celulares, causadas principalmente pela peroxidação de lipídios (constituintes essenciais das membranas).

DEARMAN et al. (1986) condicionaram osmoticamente sementes de cebola em soluções de PEG 6000 antes de submetê-las ao processo de envelhecimento precoce. O condicionamento fisiológico retardou a perda de viabilidade das sementes envelhecidas. Também, TILDEN e WEST (1985) verificaram a reversão dos efeitos do envelhecimento precoce (41°C e 100% UR) de sementes de soja pelo uso do condicionamento fisiológico. Diversos benefícios do condicionamento fisiológico têm sido relatados, sendo um deles a maior probabilidade de se obter melhor emergência, particularmente em condições de estresse, como *deficit* hídrico ou temperaturas inadequadas (EIRA, 1988).

Observa-se, no Quadro 4, que nas sementes do lote 1 os tratamentos de embebição em água aos dois dias e PEG 6000 por dois e quatro dias não diferiram, estatisticamente, da testemunha, enquanto os demais tratamentos

foram inferiores. Os tratamentos em PEG 6000 e em água por seis dias se destacaram como os piores tratamentos.

Quanto às sementes do lote 2, verificou-se que o condicionamento das sementes em água por seis dias e PEG 6000 por dois e seis dias apresentou-se como o melhor em relação à testemunha.

Nas sementes do lote 3, apenas os tratamentos em PEG 6000 e água por seis dias não diferiram estatisticamente da testemunha. Os demais tratamentos foram superiores, com destaque para PEG 6000 por quatro dias.

Todos os tratamentos aumentaram o vigor das sementes do lote 4, com destaque para o condicionamento em água por quatro dias, e diferiram estatisticamente da testemunha.

O condicionamento em água por seis dias reduziu o vigor das sementes do lote 5 em relação à testemunha, e não houve, portanto, benefícios significativos do condicionamento fisiológico para as sementes desse lote, cuja qualidade inicial era baixa. Já pelo teste de primeira contagem, o condicionamento em água por seis dias aumentou o vigor das sementes do lote 5 em relação à testemunha.

De modo geral, nas sementes dos lotes 2, 3 e 4, o condicionamento fisiológico promoveu aumento no vigor, havendo variação quanto ao tratamento mais eficiente segundo o lote. Esses lotes também apresentaram maior germinação na primeira contagem quando submetidos ao condicionamento fisiológico. As sementes dos lotes 1 e 5 não apresentaram melhoria no vigor, avaliado pelo envelhecimento acelerado, quando submetidas ao condicionamento fisiológico.

SZAFIROWSKA et al. (1981) verificaram que o condicionamento osmótico tem “revigorado” certos lotes de sementes de baixa qualidade fisiológica, o que não foi observado no presente trabalho.

A maneira pela qual o condicionamento fisiológico aumenta o vigor e a capacidade germinativa, especialmente em condições adversas, é assunto que merece ser discutido de forma mais detalhada. Duas linhas de evidência podem explicar os efeitos do condicionamento, ou seja, a reestruturação da integridade das membranas e o aumento na disponibilidade de metabólitos prontos para serem utilizados na germinação. Os efeitos do “priming” podem,

também, ser indiretos, pela diminuição do vazamento de solutos das sementes durante o processo de embebição.

LIMA (1999) verificou, pelo teste de envelhecimento acelerado, que houve envigoração mais efetivo em sementes não-armazenadas de café embebidas em água por 34 horas, e as sementes que foram armazenadas por 90 dias após o condicionamento fisiológico apresentaram baixo vigor, embora se possa considerar que foi obtido pequeno envigoração quando se fez a embebição em água por 66 horas, seguida de condicionamento em PEG 6000 por 168 horas, tratamentos esses que foram estatisticamente semelhantes. O pior desempenho foi obtido nas sementes embebidas em PEG 6000 por 72 horas, que foi semelhante ao da testemunha, que, por sua vez, não apresentou germinação após o envelhecimento acelerado. Verificou-se, nesse caso, que as sementes exibiam grande sensibilidade às condições de estresse deste teste.

Quadro 4 - Valores médios, em porcentagens de plântulas normais, obtidos no teste de envelhecimento acelerado das sementes de café, condicionadas segundo os tratamentos¹

Tratamentos	Lotes					Médias
	1	2	3	4	5	
PEG 6000 2 dias	93,0 ABa	93,0 Aa	88,0 ABa	74,5 Bb	73,5 Ab	84,4
PEG 6000 4 dias	88,5 ABa	89,0 ABa	92,0 Aa	77,5 ABb	71,5 Ab	83,7
PEG 6000 6 dias	69,0 Ccd	93,0 Aa	75,0 Cbc	78,5 ABb	63,5 ABd	75,8
Água 2 dias	94,5 Aa	89,0 ABb	85,5 ABbc	82,0 ABc	67,5 Ad	83,7
Água 4 dias	87,0 Ba	88,0 ABa	84,0 Ba	84,0 Aa	51,0 BCb	78,8
Água 6 dias	71,5 Cb	94,5 Aa	77,0 Cb	77,0 ABb	38,5 Cc	71,7
Testemunha	90,5 ABa	84,5 Ba	73,5 Cb	65,0 Cbc	60,5 ABc	74,8
Médias	84,9	90,1	82,1	76,9	60,9	79,0

^{1/}As médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

3.4. Porcentagem de plântulas com raízes secundárias aos 20 dias

Observando o Quadro 5, verifica-se que houve efeito benéfico do condicionamento tanto em água como em PEG 6000, em aumentar a porcentagem de plântulas com raízes secundárias, com exceção apenas das sementes do lote 1. Verificou-se que os tratamentos em PEG 6000 por dois dias e em água por seis dias foram os únicos que não promoveram acréscimos significativos. O condicionamento das sementes em água por dois dias promoveu melhor desenvolvimento de raízes secundárias aos 20 dias nas sementes do lote 3, conforme observado nos resultados do teste de primeira contagem de germinação. O tratamento em PEG 6000 por quatro e seis dias foi benéfico para as sementes dos lotes 2, 4 e 5, conforme verificado nos testes de germinação.

Notou-se que menores porcentagens de plântulas com raízes secundárias foram constatadas nas sementes dos lote 5, seguido pelos lotes 4, 3, 2 e 1.

Apenas nas sementes do lote 1 (alta qualidade), o condicionamento fisiológico não foi eficiente, conforme observado nos resultados de germinação na primeira contagem e no envelhecimento acelerado, apesar de este último teste ter indicado que os tratamentos também não beneficiaram as sementes do lote 5 (baixa qualidade)

JACKSON (1962) citou a ocorrência de inibição do crescimento de pêlos absorventes decorrentes do uso de polietileno glicol, embora se tenha referido ao uso de PEG com maior peso molecular.

Quadro 5 - Valores médios, em porcentagens de plântulas com raízes secundárias aos 20 dias, das sementes de café condicionadas, segundo os tratamentos¹

Tratamentos	Lotes					Médias
	1	2	3	4	5	
PEG 6000 2 dias	85,0 Aa	70,5 Bb	66,5 ABCb	43,0 Dc	36,0 Cc	60,2
PEG 6000 4 dias	79,5 Abab	84,0 Aa	61,2 BCb	65,0 BCb	63,0 Ab	70,6
PEG 6000 6 dias	80,5 Aba	83,5 Aa	70,5 ABCb	78,5 Aa	57,0 ABc	74,0
Água 2 dias	86,0 Aa	77,5 ABb	76,0 Ab	71,5 ABb	39,5 Cc	70,1
Água 4 dias	73,5 Babc	74,5 Bab	75,5 ABa	59,0 BCbc	58,0 ABc	68,1
Água 6 dias	71,5 Ba	76,5 ABa	60,5 Cb	56,0 Cb	38,5 Cc	60,6
Testemunha	90,0 Aa	71,5 Bb	58,0 Ccd	64,0 BCbc	49,0 BCd	66,5
Médias	80,9	76,9	66,8	62,4	48,7	67,1

^{1/}As médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

3.5. Porcentagem de plântulas com raízes secundárias aos 30 dias

Observando os resultados do Quadro 6, verifica-se que apenas nas sementes do lote 3 houve efeito benéfico significativo do condicionamento sobre a porcentagem de plântulas com raízes secundárias aos 30 dias, em relação à testemunha. O condicionamento fisiológico em PEG 6000 por quatro dias apresentou a mais alta média, apesar de não diferir dos tratamentos em PEG 6000 por seis dias e de água por dois e quatro dias.

CAMARGO (1998), trabalhando com sementes de café, verificou que as mais altas porcentagens de plântulas com raízes secundárias foram constatadas nos tratamentos de imersão em água por três e seis dias e em PEG 6000 a $-0,3$ MPa por três dias. Nos tratamentos sob potenciais hídricos mais altos ($-0,8$ e $-0,12$ MPa), os efeitos foram prejudiciais, atribuindo-se esse fato à menor disponibilidade de oxigênio imposta pelo PEG em soluções mais concentradas.

Ainda no Quadro 6, verifica-se que as sementes do lote 3 foram semelhantes às do lote 4, as quais foram inferiores às dos lotes 1 e 2, quanto à porcentagem de plântulas apresentando raízes secundárias aos 30 dias.

Confrontando esses resultados (Quadro 6) com os do Quadro 5, verificou-se que as avaliações de porcentagem de plântulas com raízes secundárias aos 20 dias apresentaram efeitos significativos em todos os lotes, com exceção do lote 1, enquanto a mesma avaliação aos 30 dias só detectou efeitos significativos nos tratamentos das sementes do lote 3, mostrando-se, portanto, menos sensível para detectar diferenças de vigor entre os tratamentos.

Quadro 6 - Valores médios, em porcentagens de plântulas com raízes secundárias aos 30 dias, das sementes de café condicionadas segundo os tratamentos¹

Tratamentos	Lotes					Médias
	1	2	3	4	5	
PEG 6000 2 dias	95,5 Aa	93,0 Aab	89,0 Bb	78,0 Bc	66,5 BCd	84,4
PEG 6000 4 dias	94,0 Aa	95,5 Aa	93,5 Aa	87,5 Ab	77,0 Ac	89,5
PEG 6000 6 dias	85,5 Ba	92,0 Aa	91,5 ABa	87,0 Aa	74,0 ABb	86,0
Água 2 dias	93,0 ABa	93,5 Aa	91,5 ABab	85,0 Ab	72,0 ABCc	87,0
Água 4 dias	90,5 ABa	90,0 Aa	93,0 ABa	73,5 Bb	64,5 Cc	82,3
Água 6 dias	89,5 ABa	90,5 Aa	84,5 Ca	73,5 Bb	64,0 Cc	80,4
Testemunha	95,5 Aa	93,0 Aab	85,0 Cc	87,0 Abc	75,5 Ad	87,2
Médias	91,9	92,5	89,7	81,6	70,5	85,2

^{1/}As médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

3.6. Crescimento radicular

Os resultados referentes ao crescimento radicular encontram-se no Quadro 7. Verifica-se, neste quadro, que sementes do lote 1 o condicionamento em PEG 6000 por seis dias prejudicou o crescimento radicular, seguido pelo tratamento em PEG 6000 por quatro dias, os quais diferiram estatisticamente da testemunha.

O condicionamento fisiológico não beneficiou o crescimento radicular das sementes dos lotes 1, 2, 4 e 5, sendo esse mesmo fato verificado no teste de germinação e na porcentagem de plântulas com raízes aos 30 dias.

Quanto às sementes dos lotes 2 e 4, a embebição em PEG 6000 por quatro dias foi prejudicial ao crescimento radicular.

Nas sementes do lote 3, todos os tratamentos melhoraram o crescimento radicular, embora a testemunha não tenha diferido dos tratamentos de imersão em PEG 6000 por quatro e seis dias e em água por seis dias. Assim, os tratamentos mais efetivos foram condicionamento em PEG 6000 por dois dias e em água por dois e quatro dias.

A imersão em água por seis dias prejudicou o crescimento radicular das sementes do lote 5. Esse tratamento não diferiu dos tratamentos em PEG 6000 por quatro e seis dias. Apesar de não ter havido diferença estatística entre as médias dos tratamentos em PEG 6000 por quatro e seis dias e água por seis dias no lote 5, houve diferença numérica um tanto expressiva.

LIMA (1999) verificou que o comprimento da radícula das sementes de café condicionadas (sem armazenamento) em PEG 6000 por 168 horas e em água por 34 horas e por 66 horas se destacou significativamente, promovendo melhoria no crescimento radicular, apesar de a testemunha não diferir estatisticamente desses tratamentos e do tratamento em que as sementes foram embebidas em PEG 6000 por 72 horas. Pelos resultados obtidos por LIMA (1999), notou-se que as sementes embebidas em água exibiram melhores médias de comprimento de radícula em relação às condicionadas em PEG 6000 por 72 horas. Esse mesmo autor, trabalhando com as sementes condicionadas e armazenadas por 90 dias, observou que o crescimento radicular daquelas embebidas em PEG 6000 por 168 horas foi significativamente superior, porém não diferindo, estatisticamente, das

sementes embebidas em PEG 6000 por 72 horas. Esse tratamento, por sua vez, não diferiu, estatisticamente, dos tratamentos em que as sementes foram embebidas em água por 66 e 34 horas. Também, CAMARGO (1998), trabalhando com sementes de café, constatou que o índice de velocidade de germinação subiu de 1,34 (testemunha) para 2,72 (imersão em água por nove dias), indicando alta resposta das sementes ao condicionamento fisiológico.

Liptay e Tan (1985), citado por DEL GIÚDICE (1996), também observaram, em sementes de tomate, que o condicionamento osmótico em condições adequadas melhorou o crescimento radicular. ARMSTRONG e McDONALD (1992) acreditavam que o aumento observado no crescimento do hipocótilo e da radícula, em sementes de soja condicionadas osmoticamente, foi devido a processos fisiológicos de reparo, ocorridos durante o tratamento osmótico. Esse reparo incluiu, além da reorganização da membrana plasmática, outros processos metabólicos (TILDEN e WEST, 1985).

Quadro 7 - Valores médios, em porcentagens de plântulas, obtidos no teste de crescimento radicular (raízes com comprimento \geq a 2 cm) das sementes de café condicionadas segundo os tratamentos¹

Tratamentos	Lotes					Médias
	1	2	3	4	5	
PEG 6000 2 dias	63,7 ABa	77,5 Aa	66,2 Aa	47,5 Bb	36,7 Ab	58,4
PEG 6000 4 dias	45,0 BCab	56,2 Ba	46,2 ABab	28,7 Cab	18,7 ABb	39,0
PEG 6000 6 dias	21,2 Cc	80,0 Aa	45,0 ABb	87,0 Aa	23,7 ABc	51,4
Água 2 dias	81,2 Aa	82,5 Aa	65,0 Aab	85,0 Aa	40,0 Ab	70,7
Água 4 dias	73,7 Aa	75,0 Aa	66,2 Aa	73,5 Aa	32,5 Ab	64,2
Água 6 dias	58,7 ABb	78,7 Aa	58,7 ABb	73,5 Aab	8,7 Bc	55,7
Testemunha	83,7 Aa	81,2 Aa	36,2 Bb	87,0 Aa	30,0 Ab	63,7
Médias	61,1	75,9	54,8	68,9	27,2	57,6

^{1/}As médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Para KHAN et al. (1978), durante o condicionamento osmótico, ocorre mobilização de materiais de reservas, como açúcares, lipídios e proteínas, através da *síntese-de-novo* de enzimas-chaves do metabolismo. No caso de sementes de café, observou-se que o período de tempo em que permaneceram embebidas em água ou PEG provavelmente estimularam o início da degradação de reservas e da síntese de enzimas importantes no processo de germinação.

3.7. Comprimento do eixo hipocótilo-radícula

Por meio do Quadro 8, verifica-se, que, nas sementes do lote 1, pode-se destacar que, de modo geral, os tratamentos que envolveram o uso de PEG 6000 foram inferiores àqueles realizados com água por dois e quatro dias, mas tanto o condicionamento em PEG 6000 como em água não contribuíram para o crescimento do eixo hipocótilo-radícula em relação à testemunha.

Verificou-se nas sementes do lote 2 que os maiores comprimentos de plântulas foram obtidos nas sementes embebidas em água e em PEG 6000 por seis dias, o que também foi verificado pelo teste de envelhecimento acelerado e primeira contagem.

Já nas sementes do lote 3, apenas o tratamento em PEG 6000 por dois dias não diferiu da testemunha e foi inferior aos demais tratamentos, prejudicando o crescimento das plântulas. O tratamento mais benéfico ao crescimento da plântula foi a imersão em água por seis dias, a qual não diferiu significativamente da imersão em água por dois e quatro dias.

Nas sementes do lote 4, tanto a embebição em PEG 6000 por seis dias quando em água por quatro dias mostrou-se superior à testemunha, enquanto nas sementes do lote 5 não houve benefícios dos tratamentos.

Notou-se, de modo geral, que não houve diferença significativa quanto ao comprimento de plântulas das sementes da testemunha dos lotes 1, 2 e 4, que se mostraram superiores às dos lotes 3 e 5.

KHAN et al. (1978) relataram que a melhoria no crescimento de plântulas de sementes submetidas ao condicionamento osmótico é explicada pela mobilização de materiais de reserva e pela ativação ou síntese de

enzimas durante o período do tratamento osmótico. KNYPL et al. (1980) mencionaram que ocorre ativação bioquímica durante o condicionamento osmótico, incluindo síntese de RNA e proteínas, o que seria responsável pelo maior vigor observado em sementes condicionadas.

Quadro 8 - Valores médios, em mm/plântula, do comprimento do eixo hipocótilo-radícula de plântulas obtidas das sementes de café condicionadas segundo os tratamentos¹

Tratamentos	Lotes					Médias
	1	2	3	4	5	
PEG 6000 2 dias	70,1 CDb	79,4 BCa	66,6 CDb	81,8 ABa	68,2 Ab	73,2
PEG 6000 4 dias	67,7 CDa	72,7 Da	75,1 BCa	65,4 Ca	53,5 Bb	66,9
PEG 6000 6 dias	64,0 Dc	86,3 Aa	76,3 BCb	90,4 Aa	59,5 ABc	75,3
Água 2 dias	81,5 ABa	78,8 BCa	81,0 ABa	79,0 ABa	71,9 Aa	78,5
Água 4 dias	83,0 Aa	76,5 CDa	81,4 ABa	86,3 Aa	59,8 ABb	77,4
Água 6 dias	73,4 BCb	84,0 ABa	87,2 Aa	83,0 ABab	47,6 Bc	75,1
Testemunha	76,2 ABCa	77,5 CDa	58,0 Db	73,3 BCa	58,7 ABb	68,8
Médias	73,7	79,3	75,1	79,9	59,9	73,6

^{1/}As médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

3.8. Matéria seca das plântulas

Analisando o Quadro 9, verifica-se que nas sementes dos lotes 1, 2, 4 e 5 não foram observadas diferenças significativas dos tratamentos em relação à testemunha. Nas sementes do lote 3, apenas o tratamento em PEG 6000 por dois dias não diferiu da testemunha. Assim, tanto o condicionamento fisiológico em PEG 6000 por quatro e seis dias quanto em água por dois, quatro e seis dias melhoraram o vigor da matéria seca das plântulas, com destaque para água aos dois e seis dias.

KNYPL e KHAN (1981) também observaram que o condicionamento de sementes de soja propiciou maior crescimento das plântulas e, portanto, maiores valores de matéria seca.

DEL GIÚDICE (1996) concluiu que o condicionamento promoveu o crescimento das plântulas de soja, o que também foi verificado por KHAN et al. (1978).

Os resultados do peso de matéria seca de plântulas obtidos nas testemunhas indicaram melhor desempenho nas sementes dos lotes 1 e 2, que não diferiram estatisticamente do lote 4.

Confrontando esses resultados com aqueles obtidos nos demais testes realizados, observou-se que os lotes 1 e 2 mostraram-se superiores aos demais pelos testes de germinação e envelhecimento acelerado (Quadros 2 e 4), com a ressalva de que apenas as sementes do lote 1 se destacaram nos testes de primeira contagem de germinação (Quadro 3) e porcentagem de plântulas com raízes secundárias aos 20 dias (Quadro 5). De modo geral, na maioria dos testes, as sementes do lote 1 apresentaram maior qualidade fisiológica, seguidas pelas do lote 2. As sementes do lote 3 tiveram, de modo geral, qualidade intermediária, sendo o menor vigor apresentado pelas sementes do lote 5. Nessas sementes do lote 5, os tratamentos de condicionamento fisiológico empregados não se mostraram benéficos à sua qualidade fisiológica.

Quadro 9 - Valores médios, em mg/plântula do peso de matéria seca de plântula, obtidos das sementes de café condicionadas segundo os tratamentos¹

Tratamentos	Lotes					Médias
	1	2	3	4	5	
PEG 6000 2 dias	24,0 Ab	26,0 Aa	22,7 BCbc	24,5 Aab	21,5 Ac	23,8
PEG 6000 4 dias	23,0 Ab	28,7 Aa	24,0 ABab	22,2 Bb	22,2 Ab	24,0
PEG 6000 6 dias	23,0 Ab	25,2 Aa	23,7 ABab	24,5 Aab	23,0 Ab	23,9
Água 2 dias	25,2 Aa	26,5 Aa	25,5 Aa	23,2 ABb	22,7 Ab	24,7
Água 4 dias	25,2 Aa	24,7 Aa	24,2 ABa	24,0 ABa	22,0 Ab	24,0
Água 6 dias	23,5 Abc	26,7 Aa	25,0 Aab	22,5 ABcd	20,5 Ad	23,7
Testemunha	24,2 Aa	24,7 Aa	21,0 Cb	22,7 ABab	21,7 Ab	22,9
Médias	24,0	26,1	23,7	23,4	22,0	23,8

^{1/}As médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

NASCIMENTO (1998) verificou que a qualidade inicial das sementes tem efeito decisivo no sucesso do condicionamento fisiológico. Isso foi claramente verificado no presente trabalho.

Em síntese, as sementes do lote 3, que nos testes de vigor apresentaram qualidade fisiológica intermediária, foram aquelas que mostraram respostas positivas aos tratamentos, especialmente quando se utilizou o condicionamento em água por dois e quatro dias, o que foi detectado em todos os testes de avaliação da qualidade fisiológica.

Esses resultados concordaram com aqueles obtidos por CAMARGO (1998) e LIMA (1999), em que a imersão das sementes de café em água se destacou como o método mais promissor. Para LIMA (1999), a embebição em água por 34 horas elevou a germinação e a emergência de plântulas em leito de areia, proporcionando, ainda, crescimento radicular superior ao da testemunha.

As sementes do lote 1, identificado na maioria dos testes de vigor como de melhor qualidade fisiológica, não diferiram da testemunha em todos os tratamentos estudados, não respondendo, portanto, ao condicionamento fisiológico. Notou-se que as sementes desse lote apresentaram, por ocasião do início do experimento, 93,5% de germinação, 90,5% de germinação após o envelhecimento acelerado e 90% de plântulas com raízes secundárias após a semeadura.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi conduzido no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), com o objetivo de avaliar os efeitos do condicionamento fisiológico na germinação e no vigor de sementes de café Catuaí Vermelho 2144. Sementes com o endocarpo (pergaminho) foram submetidas a tratamentos de embebição em água e em solução de polietileno glicol (PEG 6000) a $-0,4$ MPa por dois, quatro e seis dias a 25°C . Os efeitos dos tratamentos foram avaliados imediatamente após o condicionamento das sementes pelos testes de germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, porcentagem de plântulas com raízes secundárias aos 20 e aos 30 dias, crescimento radicular, comprimento do eixo hipocótilo-radícula e peso de matéria seca de plântulas. Para comparação, foram utilizadas sementes sem tratamento de embebição.

Nas condições em que foi desenvolvido este trabalho e com base nas interpretações dos resultados, concluiu-se que:

- O efeito do condicionamento fisiológico variou segundo a qualidade inicial dos lotes.
- Em lotes de menor vigor, o condicionamento fisiológico aumentou a velocidade de germinação e a porcentagem de raízes secundárias aos 20 dias.
- O condicionamento fisiológico mostrou-se eficaz em promover ganhos de vigor dos lotes de média qualidade fisiológica, mas não foi efetivo nos lotes de alto e baixo vigores.

- O condicionamento fisiológico em água por dois e quatro dias foi o tratamento mais efetivo para promover a melhoria da qualidade das sementes de café de médio vigor.

CAPÍTULO 2

ALTERAÇÕES ENZIMÁTICAS EM SEMENTES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) SUBMETIDAS AO CONDICIONAMENTO FISIOLÓGICO

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas enfrentados pelos cafeicultores refere-se à conservação das sementes, pois estas mantêm a viabilidade por, no máximo, seis meses quando armazenadas em condições adequadas. Além disso, a germinação das sementes de café se processa de modo lento e desuniforme, o que, muitas vezes, é agravado pelo baixo vigor dos lotes utilizados na semeadura.

A qualidade fisiológica das sementes pode ser melhorada com a aplicação de medidas estratégicas, visando a um controle de qualidade eficiente e que minimize a deterioração das sementes nas etapas de pós-colheita. Um dos procedimentos promissores para a melhoria da qualidade das sementes é o condicionamento fisiológico, ou osmocondicionamento ou “priming”, que envolve a iniciação do metabolismo de germinação, através do controle da absorção de água pela semente sem, no entanto, permitir a emissão da raiz primária (HEYDECKER et al., 1975). Esta técnica tem como principal vantagem a uniformização da germinação, podendo ser útil, ainda,

para acelerar o processo de germinação e melhorar o desempenho de lotes de menor vigor (BRADFORD, 1986; KHAN, 1991).

O condicionamento fisiológico tem-se mostrado interessante para sementes de espécies olerícolas e ornamentais; em café, os poucos trabalhos existentes têm mostrado resultados promissores, sendo necessárias, ainda, maiores informações para a referida espécie, uma vez que, segundo NASCIMENTO (1998), a resposta ao tratamento tem variado entre espécies, variedades e, mesmo, entre lotes de uma mesma variedade.

Vários trabalhos de pesquisa têm mostrado os benefícios do condicionamento fisiológico, como promover germinação mais rápida e sincronizada, melhorar a germinação em condições adversas do meio e aumentar o sistema radicular, dentre outros. Assim, a maioria dos estudos tem-se concentrado em avaliar os efeitos do condicionamento sobre a qualidade fisiológica das sementes, principalmente germinação e vigor.

Além de mudanças fisiológicas, alterações bioquímicas/moleculares ocorrem nas sementes, decorrentes do condicionamento, e muitas delas não estão totalmente elucidadas. De acordo com KHAN (1991), quando as condições do tratamento são favoráveis, os processos de mobilização de reservas, ativação e *síntese-de-novo* de algumas enzimas, síntese de DNA e RNA são iniciados durante o condicionamento fisiológico, refletindo em benefícios à germinação.

Dessa forma, é de fundamental importância para a evolução dos conhecimentos sobre o assunto elucidar as mudanças fisiológicas e enzimáticas induzidas pelo condicionamento fisiológico das sementes. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar as principais alterações enzimáticas ocorridas nas sementes de café submetidas ao condicionamento fisiológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Alterações fisiológicas e bioquímicas promovidas pelo condicionamento fisiológico

O condicionamento fisiológico promove alterações no metabolismo das sementes, levando a uma melhoria de sua qualidade fisiológica. Estudos bioquímicos têm indicado que o metabolismo de RNA e a síntese de proteínas e enzimas também são aumentados pelo condicionamento fisiológico, indicando que este tratamento deixa disponível às sementes precursores utilizados para a síntese de macromoléculas (BRACCINI, 1996).

O aumento observado na síntese de RNA, de proteínas e de enzimas pode ser devido à remoção de certos inibidores, como ácido abscísico (ABA) e, ou, produção de promotores. O estresse hídrico leva a um aumento de ABA e induz à dormência, enquanto o condicionamento fisiológico leva ao completo desaparecimento do ABA (KHAN, 1991). A mobilização de materiais de reserva, como açúcares, lipídios e proteínas, pela ativação ou *síntese-de-novo* de enzimas-chave durante o tratamento pode explicar o mecanismo de condicionamento osmótico (KHAN et al., 1978).

Estudos recentes têm demonstrado que o condicionamento osmótico das sementes de pimentão e tomate está associado com a síntese de DNA (LANTERI et al., 1994).

Alguns trabalhos de pesquisa têm verificado que, durante ou imediatamente após o condicionamento osmótico de sementes de amendoim e

alho, grandes quantidades de RNA foram sintetizadas (FU et al., 1988; BRAY et al., 1989).

FU et al. (1988) verificaram que o condicionamento osmótico de sementes de amendoim aumentou a germinação e o vigor em sementes deterioradas. Durante o condicionamento osmótico, houve aumento na produção de ATP, indicando melhora no índice de vigor das sementes, uma vez que o seu conteúdo está relacionado à emissão de raiz primária mais cedo. Verificou-se que a atividade da isocitrato liase, enzima-chave no metabolismo de lipídios, apresentou maior atividade em sementes condicionadas osmoticamente, favorecendo o rápido metabolismo de ácidos graxos durante a germinação. A atividade das enzimas ATP-ase e fosfatase ácida também foi aumentada em sementes osmocondicionadas.

As galactomananas são encontradas no endosperma de inúmeras sementes, como nas leguminosas e no café, dentre outras, servindo de reserva de polissacarídeos (MALLETT e MATHESON, 1987). A enzima endo- β -mananase é uma das enzimas que hidrolisam a galactomanana. GROOT et al. (1988) verificaram que o PEG induziu aumento de atividade da enzima endo- β -mananase, permitindo, assim, a emissão mais rápida da raiz primária.

GUSMAN e PRADE (1986 e 1987), estudando os efeitos da embebição em água em sementes de barbatimão (*Stryphnodendron obovatum* Benth), verificaram que, após o período de 24 horas, houve declínio no conteúdo de açúcares livres e de nitrogênio total; aumento nos níveis de atividade da fosfatase ácida foi também detectado nos cotilédones desde o início da embebição. No 14^o dia teve início a diminuição do peso do endosperma seco, que foi acompanhado pelo aumento simultâneo na síntese de amido nos cotilédones. Isso indicou que os produtos da hidrólise da galactomanana, principalmente galactose e manose, foram rapidamente fosforilados à galactose-1-P e à manose-6-P, e a fração não usada no metabolismo energético nos cotilédones foi transformada em amido via sacarose.

A fosfatase ácida, também presente em sementes secas, constantemente aumentou sua atividade durante a embebição e o crescimento de plântulas, alcançando o máximo aos cinco dias, seguido por pequeno decréscimo (GUSMAN e PRADE, 1986, 1987). No entanto, a atividade dessa enzima declinou rapidamente durante a germinação em muitas espécies.

Provavelmente, a transformação de carboidrato (possível açúcar livre) e a transformação de componentes contendo fósforo foram mediados pela fosfatase ácida em períodos críticos dos processos morfogênicos e bioquímicos, que, de algum modo, estão envolvidos com a emissão da raiz primária e a diferenciação celular.

Incremento nas atividades enzimáticas e metabólicas é comum durante o condicionamento osmótico e parece estar relacionado com o revigoramento das sementes durante a germinação subsequente. As alterações na atividade de certas enzimas, como esterase, fosfatase ácida e 3-fosfogliceraldeído desidrogenase, indicaram que a mobilização do material de reserva armazenado nas sementes, como carboidratos, lipídios e proteínas, podem justificar o aumento da germinação e o vigor induzido pelo condicionamento osmótico (KHAN, 1991).

SMITH e COBB (1992) demonstraram que o conteúdo de proteínas solúveis e a atividade das enzimas aldolases, isocitrato liase e glucose-6-fosfato desidrogenase aumentavam significativamente em sementes de pimentão que foram osmocondicionadas.

SUNG e CHANG (1993) verificaram que, em milho-doce, ambos os tratamentos de hidratação e de condicionamento osmótico aumentam significativamente o conteúdo de açúcar livre nas sementes, em comparação com o controle. As sementes hidratadas em água tinham maior acumulação de açúcar do que as osmocondicionadas. Esses açúcares seriam prontamente quebrados para fornecer energia e operar o metabolismo do carbono na embebição. Assim, SUNG e CHANG (1993) concluíram que a emergência do milho-doce, especialmente em temperaturas subótimas, pode ser melhorada pela hidratação e pelo condicionamento osmótico.

Muitas pesquisas têm relatado que o condicionamento osmótico melhora a integridade de membrana, como também promove aumento em proteína e na síntese de ácido nucléico (KHAN et al., 1978; DELL'AQUILA e TARANTO, 1986; SMITH e COBB, 1992).

FU et al. (1988) observaram que o condicionamento osmótico repara as membranas, levando à reativação e à síntese de certas enzimas, com reflexos sobre a germinação, que se mostra mais uniforme.

ZHENG et al. (1991) verificaram que o maior vigor obtido em sementes de soja condicionadas com PEG a baixos potenciais hídricos ocorre conforme a eficiência da solução osmótica em reparar a permeabilidade da membrana plasmática durante a embebição das sementes. Outros autores (ISHIDA et al., 1988; ARMSTRONG e McDONALD, 1992), constatando aumento no vigor de sementes de soja com a embebição controlada, observaram, também, que a velocidade com que as membranas e organelas celulares são estruturalmente modificadas durante o processo de embebição tem sido relacionada à perda de solutos das células. SUNG e CHANG (1993) verificaram que as sementes de milho-doce osmocondicionadas apresentavam menos vazamento de eletrólitos do que as sementes hidratadas.

Aumentos nas atividades respiratórias e na formação de adenosina trifosfato (ATP) necessários para a síntese de macromoléculas, membranas e materiais da parede celular têm sido observados durante ou após o condicionamento osmótico. FU et al. (1988) verificaram que as atividades de isocitrato liase, ATPase e fosfatase ácida foram maiores em sementes de ervilha condicionadas do que em sementes não-tratadas dessa espécie. SMITH e COBB (1992) demonstraram que o conteúdo de proteínas solúveis e a atividade das enzimas aldolase e isocitrato liase aumentam significativamente em sementes de pimentão durante o condicionamento osmótico, devido a uma indução de síntese de RNA.

KHAN (1991) observou em sementes osmocondicionadas de pimentão, que, aproximadamente, duas vezes mais aminoácidos são incorporados em proteínas durante as primeiras 24 horas de embebição em PEG, em comparação com as sementes embebidas em água. Em outro estudo com sementes dessa mesma espécie, SMITH e COBB (1992) observaram que a síntese de proteínas aumenta durante todo o tratamento de condicionamento osmótico. O mesmo foi verificado por CAMARGO (1998) em sementes de café.

Vários autores afirmaram que o condicionamento osmótico repara as membranas e contribui para a reativação e síntese de certas enzimas, com conseqüente aumento na germinação (FU et al., 1988; SMITH e COBB, 1992).

JENG e SUNG (1994) observaram que o crescimento de plântulas de aumendoim foi maior devido ao envigoroamento, em razão de este ter

promovido aumento na atividade das enzimas isocitrato liase e malato sintase, responsáveis pela conversão de lipídios em sacarose.

Por sua vez, TILDEN e WEST (1985) verificaram que a maioria dos benefícios do envigoramento é devida ao fato de a hidratação ser lenta, o que dificulta a ocorrência de injúrias por embebição.

Mais recentemente, CHOJNOWSKI et al. (1997) verificaram que sementes de girassol osmocondicionadas em PEG 6000 por três e cinco dias apresentaram maior taxa respiratória e produção de etileno.

O tratamento de hidratação-secagem tem apresentado resultados satisfatórios em sementes de grandes culturas, especialmente em lotes de baixo vigor. BASU e PAL (1980), após submeterem essas sementes de arroz de alto e baixo vigor ao envelhecimento acelerado, também as submeteram ao tratamento de hidratação-secagem. Observou-se, durante o período de armazenamento, diminuição no avanço da deterioração das sementes de baixo vigor.

NATH et al. (1991) verificaram, em sementes de trigo, que o tratamento de hidratação em água por duas horas a 25°C, seguido de secagem, permitiu a manutenção da sua viabilidade durante o armazenamento. Tratamentos de hidratação por 20 e 24 horas, seguidos de secagem, foram efetivos em restaurar a taxa de germinação e o vigor quando aplicados após o armazenamento. Entretanto, se aplicados antes, aceleraram o processo de deterioração das sementes.

SINGH e SINGH (1992), condicionando sementes de ervilha em PEG 6000 nos potenciais de -0,1, -0,2, -0,3, -0,4 e -0,5 MPa, a 20°C, por 72, 96 e 120 horas de embebição, verificaram que a atividade da nitrato redutase e da nitrito redutase diminuíram progressivamente nos cotilédones com o aumento dos níveis de estresse. A atividade da enzima amilase nos cotilédones aumentou com o tempo de embebição e diminuiu significativamente com o aumento dos níveis de potencial osmótico. Quanto à atividade máxima da enzima protease, isso foi observado em condicionamento osmótico em PEG 6000 a -0,1 MPa por 72 e 120 horas, no eixo embrionário das sementes de ervilha.

2.2. Atividade de algumas enzimas na germinação

A atividade de certas enzimas, dentre elas as oxidases, catalases, peroxidases e fonolases, está associada à mobilização de reservas e à biossíntese de tecidos novos.

A enzima peroxidase, embora amplamente distribuída no reino vegetal e ocorrendo na maioria dos tecidos vivos, ainda não teve o seu papel fisiológico totalmente elucidado; sabe-se que está presente em muitas sementes. Pode estar envolvida na oxidação da auxina (OCKERSE et al., 1966), nos mecanismos de resistência a doenças (SEEVERS et al., 1971; TOMIYAMA e STAHAMAN, 1964), na formação de parede celular e na regulação da permeabilidade de membranas (DE JONG, 1967) e na dormência de sementes, por meio do controle da entrada de oxigênio através do tegumento da semente (MAJOR e ROBERTS, 1967). Enfim, está envolvida na regulação do crescimento e no desenvolvimento das plantas, mais especificamente em atividades metabólicas, juntamente com a germinação.

As sementes de café contêm muito pouco amido e alto conteúdo de polissacarídeos associados à parede celular (WOLFRON e PATIN, 1964). O maior componente é uma β -manana, cristalina e insolúvel em água, contendo aproximadamente 2% de galactose, a qual pode servir como importante reserva para o desenvolvimento das plântulas (REID, 1985). A presença de mananase em sementes de café, a qual é uma enzima requerida para a hidrólise biodegradativa de galactomanana, foi descrita primeiramente por TAKAKI e DIETRICH (1980). Estes autores observaram que, em sementes normais de café, a atividade da mananase aumentou apenas após 10 dias de embebição.

A enzima fosfatase ácida é uma hidrolase envolvida em reações de hidrólise de ésteres, que pode atuar sobre fosfolipídios de membrana, tendo como consequência a peroxidação de lipídios. BASAVARAJAPPA et al. (1991) encontraram incremento significativo no total de ácidos graxos livres para as sementes deterioradas, e isso pode ter sido devido à atividade catalítica de enzimas eletrolíticas. ROBERTS (1973) citou a preponderância de enzimas hidrolíticas, dentre elas as fosfatases, em terem sua atividade incrementada com a perda de viabilidade, o que levantou a possibilidade, sugerida em

estudos realizados por BERJAK e VILLIERS (1978), de que a ruptura de lisossomo pode estar envolvida com a perda de viabilidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Sementes e de Melhoramento de Hortaliças do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Foram obtidos 20 kg de sementes de café do cultivar Catuaí Vermelho 2144, colhidas, entre março e abril de 1999, na área experimental denominada Vale da Agronomia, pertencente à Universidade Federal de Viçosa. Dividiram-se essas sementes em cinco lotes, e foram montados os testes em épocas diferentes, com a finalidade de ter lotes com qualidades fisiológicas distintas. Um sexto lote foi obtido da empresa EPAMIG (Viçosa, MG), colhido em Araponga, Minas Gerais, em abril de 1998. Assim, quanto à qualidade fisiológica, os lotes receberam a seguinte classificação: lotes 1 e 2 - alta qualidade, lotes 3 e 4 - média qualidade, lote 5 - baixa qualidade fisiológica e lote 6, de germinação nula.

A colheita dos frutos de café foi realizada manualmente, quando estes se apresentaram no estágio denominado “cereja”. Após a colheita, foi feita a eliminação de frutos verdes, brocados e secos. Apenas os frutos “cereja” foram despulpados mecanicamente, no mesmo dia, e degomados por fermentação natural durante 24 horas. Após a lavagem, as sementes foram espalhadas à sombra, para eliminação da água superficial. As sementes foram secadas à sombra até atingirem grau de umidade em torno de 11 a 13% em base úmida.

Antes do início do experimento, as sementes foram tratadas com o fungicida Captan 0,2%.

3.1. Condicionamento fisiológico das sementes

Para condicionamento fisiológico das sementes, utilizou-se a solução de polietileno glicol (PEG 6000), na temperatura de 25°C, e potencial de -0,4 MPa, definida por LIMA (1999) como sendo a temperatura e a concentração adequadas para o condicionamento osmótico das sementes de café.

Para determinação da quantidade de PEG 6000 a ser adicionada, utilizou-se a equação proposta por MICHEL e KAUFMANN (1973), ou seja:

$$\Psi_{os} = -(1,18 \times 10^{-2})C - (1,18 \times 10^{-4})C^2 + (2,67 \times 10^{-4})CT + (8,39 \times 10^{-7})C^2T$$

em que

Ψ_{os} = potencial osmótico da solução (bar);

C = gramas de PEG 6000/litro de água (a ser calculado); e

T = temperatura em °C (25°C).

A concentração de PEG 6000 utilizada para obter o potencial osmótico desejado de -0,4 MPa à temperatura de 25°C foi de 178,34 g/l de água destilada, de acordo com a equação citada anteriormente. Para dissolução do PEG em água destilada, utilizou-se um agitador magnético.

Sementes com o endocarpo foram condicionadas em PEG 6000 e em água por dois, quatro e seis dias a 25°C e comparadas com a testemunha (sem condicionamento). Foram colocadas 50 sementes em cada caixa gerbox, contendo no fundo três folhas de papel-toalha e 30 ml da solução de PEG 6000 a -0,4 MPa, sendo este volume suficiente para cobrir a terça parte das sementes. Os tratamentos que envolveram a embebição das sementes em água foram conduzidos da mesma forma descrita anteriormente, empregando-se 30 ml de água destilada em vez de PEG. As caixas gerbox foram colocadas em incubadora (BOD) previamente regulada para fornecer temperatura constante de 25°C, onde permaneceram por dois, quatro e seis dias.

Foram definidos os seguintes tratamentos:

T₁ = sementes embebidas em PEG 6000 por dois dias;

T₂ = sementes embebidas em PEG 6000 por quatro dias;

T₃ = sementes embebidas em PEG 6000 por seis dias;

T₄ = sementes embebidas em água por dois dias;

T₅ = sementes embebidas em água por quatro dias; e

T₆ = sementes embebidas em água por seis dias.

Após o período de condicionamento de cada tratamento, as sementes foram retiradas da BOD e lavadas superficialmente em água corrente. Logo após, as sementes foram maceradas em nitrogênio líquido, e realizou-se a análise de isoenzimas.

3.2. Obtenção dos dados isozimáticos

3.2.1. Testes preliminares

Com o objetivo de ajustar a metodologia dos sistemas enzimáticos fosfatase ácida (ACP), α e β esterase (EST), peroxidase (PO), malato desidrogenase (MDH), álcool desidrogenase (ADH) e glutamato desidrogenase (GDH), foram conduzidos vários testes preliminares.

Para cada sistema estudado, testaram-se as soluções extratoras n^{os} 1, 3, 8 e 9, recomendadas por ALFENAS et al. (1991) e BALLVE et al. (1995). Verificaram-se também, para cada sistema isomático, as melhores combinações de pH dos tampões do gel e dos eletrodos e os melhores protocolos de coloração.

3.2.2. Metodologia geral para a eletroforese em gel de amido

3.2.2.1. Preparo da amostra e extração das enzimas

Imediatamente após a retirada das sementes do condicionamento fisiológico, removeu-se o pergaminho das sementes manualmente e, em seguida, tomaram-se três subamostras de 10 sementes de cada tratamento. As sementes de cada repetição foram pesadas em uma balança com precisão de

0,001 g. Cada repetição foi macerada separadamente em nitrogênio líquido, com o auxílio de um almofariz e um pistilo de porcelana, ambos previamente resfriados e mantidos à baixa temperatura (aproximadamente 8°C), para evitar desnaturação das enzimas. Em seguida, adicionou-se ao macerado a solução de extração (modificada de ALFENAS et al., 1991), para a extração de enzimas. A relação volume de solução de extração para peso de amostra foi de 2:1; utilizou-se uma pipeta automática. Adicionaram-se ainda 30 mg de PVPP (polivinilpolipirrolidona), para remover compostos fenólicos e aumentar a estabilidade das enzimas (ALFENAS et al., 1991); esperava-se descongelar, sendo bem homogeneizado o extrato. Sobre esse extrato, colocava-se um pedaço de gaze para filtrar, e sobre esta eram colocados pequenos retângulos de papel cromatográfico Whatman 3 M (1,2 x 0,5 cm), os quais absorveram o macerado e serviram para a transferência da amostra para o gel.

Como a corrida eletroforética não foi efetuada no mesmo dia da extração, os retângulos de papel foram colocados em tubos Eppendorf, previamente numerados e armazenados em um “freezer” a -80°C.

3.2.2.2. Preparo do gel

Os géis de amido foram preparados a 12% de concentração, com 60 g de amido de milho (maisena), em 500 ml de solução-tampão do gel adequada a cada sistema enzimático. Eram cozidos no microondas por aproximadamente 15 minutos. Ainda quentes, eram colocados dentro da forma de acrílico, e sobre esses géis se colocava uma placa de vidro (preaquecida a -60°C).

No dia anterior à corrida, os géis foram preparados, mantidos em temperatura ambiente e, posteriormente, acondicionados em geladeira até o uso no dia seguinte, quando se procedia à corrida eletroforética. No dia seguinte, pela manhã, eram colocados em uma geladeira a 4°C, por aproximadamente uma hora, para seu resfriamento, antes da aplicação das amostras para condução da eletroforese.

3.2.2.3. Aplicação das amostras no gel

Após a retirada dos géis da geladeira, retirava-se a placa de vidro, e fazia-se um corte transversal no gel, com o auxílio de um bisturi, a 4 cm da extremidade catodal, originando duas partes diferentes. A porção menor do gel era afastada para facilitar a aplicação das amostras, e, com o auxílio de uma pinça cirúrgica, aplicavam-se os retângulos de papel-filtro embebidos com extratos da amostra seqüencialmente na face cortada da porção maior do gel, afastados 0,5 cm, num total de nove amostras para cada gel, obedecendo sempre à seqüência: testemunha, PEG e água. Nas extremidades do gel foram inseridas tiras de papel cromatográfico, contendo azul-de-bromofenol, com o objetivo de visualizar a frente de migração e o término da corrida. Em seguida, procedeu-se à junção das partes cortadas, e iniciou-se a corrida eletroforética.

3.2.2.4. Eletroforese

As corridas eletroforéticas foram realizadas em refrigerador com porta frontal transparente, à temperatura de 4°C, em cubas horizontais apropriadas (ALFENAS et al., 1991). As formas de acrílico com os géis foram colocadas entre duas cubas com eletrodos, onde cada cuba recebeu cerca de 100 ml de tampão eletrodo apropriado. Para conexão dos géis às cubas dos eletrodos, utilizou-se uma ponte de pano, tipo “perfex”, dobrado uma vez e previamente embebido na solução-tampão apropriada (CONKLE et al., 1982). É importante cobrir as formas de acrílico com os géis com um plástico transparente, durante a corrida eletroforética, para evitar ressecamento superficial do gel, o que pode prejudicar a corrida.

Para as enzimas álcool e malato desidrogenase, a pré-corrida inicial foi de 20 minutos, pois em um período de tempo maior as bandas ficaram muito escuras. Para as demais enzimas, a pré-corrida foi de 30 minutos, com a fonte fornecedora de corrente elétrica a 100 V, com o propósito de liberar as enzimas das amostras, uniformizando a partida de todas as amostras. Após esse período, a fonte foi desligada, e as tiras de papel foram retiradas, com o auxílio de uma pinça. As duas partes do gel foram, então, reconectadas, e reiniciou-se a corrida eletroforética a 4°C, sob voltagem de 180 V, permanecendo assim até

o final da corrida, que durou aproximadamente cinco a seis horas, quando a cor azul do azul-de-bromofenol atingiu 9,5 cm, a partir da origem.

3.2.2.5. Fatiamento do gel e revelação das bandas

Finalizada a corrida eletroforética, o gel era colocado sobre uma placa de vidro e fatiado longitudinalmente com o auxílio de uma linha de náilon fina, deslizando-se sobre régua de vidro de 2 mm de espessura superpostas, que serviam como guias. Descartaram-se a primeira e a última fatias restando apenas três fatias de aproximadamente 2 mm de espessura cada. Em seguida, essas fatias foram colocadas em bandejas refratárias de vidro tipo “Pyrex”, umedecidas com um pouco de água, e receberam a solução reveladora específica de cada enzima.

3.2.2.6. Fixação e secagem dos géis

A revelação dos sistemas GDH e ADH foi realizada no escuro a aproximadamente 30°C. A ACP realizou-se à temperatura ambiente e, no escuro, até o aparecimento das bandas, enquanto a detecção do sistema PO foi efetuada na temperatura de refrigerador a 8°C , por aproximadamente uma hora.

Após a revelação, procedeu-se ao descarte da solução, à lavagem dos géis em água corrente e, em seguida, à fixação destes em glicerina 10%, por cerca de 12 horas, em refrigerador a 4°C, aproximadamente. Para secagem do gel, umedeceu-se, primeiramente, uma placa de vidro, colocaram-se as fatias de gel sobre a placa de vidro e cobriu-se com uma folha de papel-celofane úmido. As bolhas formadas foram removidas mediante cuidadosa compressão no gel. Pequenas perfurações com estilete de ponta fina foram feitas no celofane, às margens do gel, para facilitar a evaporação. As extremidades excedentes do papel-celofane foram viradas para a parte inferior da placa de vidro, para evitar o seu enrugamento durante a desidratação. Para facilitar a perda de água, o conjunto gel-placa de vidro foi mantido em posição vertical, à temperatura ambiente, até a liberação do excesso de água. A secagem foi

complementada em estufa a 50°C por cerca de 24 horas. Posteriormente, removeu-se o conjunto celofane-gel das placas de vidro, etiquetou-se e arquivou-se para análise dos resultados (ALFENAS et al., 1991).

3.2.2.7. Interpretação das bandas

A avaliação das bandas foi feita de acordo com a sua intensidade, utilizando-se a superfície de um diafanoscópio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ajuste de metodologia

Verificou-se que a solução extratora nº 1 de ALFENAS et al. (1991) apresentou o melhor resultado, modificando apenas a concentração do reagente 2-mercaptoetanol de 0,1% para 2%. As demais soluções extratoras testadas, as de nºs 3, 8 e 9, de ALFENAS et al. (1991), e a solução extratora indicada por BALLVE et al. (1995) não apresentaram resolução de bandas (não foi possível visualizar bandas). Assim, não foi possível ajustá-las para os sistemas enzimáticos testados.

A duração da pré-corrída eletroforética interferiu na qualidade de bandas das enzimas. As enzimas álcool desidrogenase e malato desidrogenase apresentaram bandas mais nítidas quando a pré-corrída eletroforética foi de 20 minutos, porém, nos demais sistemas enzimáticos, o período de 30 minutos mostrou-se melhor.

As combinações de tampões do gel e do eletrodo testadas e a resolução obtida encontram-se no Quadro 1. Os sistemas-tampão (gel-eletrodo) de SHAW e PRASAD (1970) exibiram bandas de qualidade regular nos sistemas álcool e malato desidrogenase. Já nas enzimas peroxidase e fosfatase ácida, não foi possível visualizar bandas nítidas. O sistema-tampão (gel-eletrodo) de SOLTIS et al. (1983) apresentou resolução muito boa para a enzima α e β esterase. Nesse mesmo tampão, a enzima glutamato desidrogenase exibiu resolução ruim.

Quadro 1 - Soluções-tampão utilizadas no preparo do gel para eletroforese, usando-se amostras de sementes de café submetidas aos tratamentos de condicionamento fisiológico

TAMPÃO DO ELETRODO		TAMPÃO DO GEL		ENZIMA	RESOLUÇÃO	REFERÊNCIA
		66,7ml do tampão do eletodo		ADH	Regular	
Ácido cítrico (0,043 M)	9,04 g	diluído para 1 litro		MDH	Regular	SHAW e PRASAD (1970)
Tris (0,155 M)	16,35 g	pH 7,0		PO	Não	
Água destilada	1,00 L			APH	Não	
Ácido bórico (0,3 M)	18,55 g	Ácido cítrico (0,004 M)	0,69 g	EST	Muito boa	
NaOH (0,1 M)	4,00 g	Tris (0,015 M)	1,84 g	GDH	Ruim	SOLTIS et al. (1983)
pH 8,6		pH 7,8		APH	Não	
		67 ml do tampão do eletrodo		PO	Não	SOLTIS et al. (1983)
Ácido cítrico (0,032 M)	6,10 g	diluído para um litro				
Tris (0,135 M)	16,35 g	pH 8,0				

ACP - fosfatase ácida, ADH - álcool desidrogenase, EST – esterase, GDH – glutamato desidrogenase, MDH - malato desidrogenase e PO – peroxidase.

4.2. Análise isoenzimática de bandas

Nos zimogramas, as bandas foram avaliadas conforme a intensidade de coloração.

4.2.1. Álcool desidrogenase (ADH – E.C. 1. 1. 1. 1¹)

Pelos zimogramas (Figura 1), verificou-se que nas sementes dos lotes 2 e 3, cuja germinação média era de 88,4% e 87,4%, respectivamente, houve aumento na intensidade das bandas, confirmando a presença dessa enzima em todos os tratamentos.

As sementes dos lotes 2 e 3 tiveram comportamento semelhante na análise isoenzimática, mas, quanto à qualidade fisiológica, tais lotes se diferiram nos diferentes testes. As sementes do lote 1 se aproximaram das dos lotes 4 e 5. Entretanto, em sementes de baixa qualidade (lotes 4 e 5) houve considerável redução na intensidade da ADH e, até mesmo, ausência de atividade nas sementes do lote 6, cuja germinação foi nula.

Nas sementes do lote 3 houve maior intensidade das bandas em ambos os tratamentos em PEG 6000; em água por quatro e seis dias, pode ter havido problemas de anaerobiose, aumentando, então, a atividade da enzima ADH. Confrontando com os testes de avaliação da qualidade fisiológica (capítulo 1), verificou-se que as sementes condicionadas em PEG 6000 por seis dias prejudicaram o vigor das sementes, como observado pelos resultados dos testes de primeira contagem de germinação e de envelhecimento acelerado, apesar de não diferirem da testemunha. O tratamento em água por seis dias afetou o crescimento das raízes secundárias aos 30 dias e prejudicou o vigor, como demonstrado pelo resultado do teste de envelhecimento acelerado.

Esses resultados estão de acordo com os de VANTOAI et al. (1987), ou seja, à medida que ocorre redução na qualidade fisiológica, provavelmente reduz a concentração de ADH e, conseqüentemente, aumenta a concentração de acetaldeído. Davies (1973), citado por GOMES (1982), verificou que

¹ Códigos internacionais estabelecidos pela “Enzyme Commission” (EC).

aumentos na ADH e no etanol durante as horas iniciais da germinação têm sido observados em muitas plantas, mas os mecanismos bioquímicos não estão totalmente esclarecidos.

A enzima álcool desidrogenase (ADH) atua no metabolismo anaeróbico de plantas, reduzindo o acetaldeído a etanol (VANTOAI et al., 1987). A produção de acetaldeído durante o armazenamento acelera a deterioração das sementes de beterraba (ZHANG et al. 1994). Segundo estes autores, o acetaldeído teve maior efeito prejudicial, independentemente da umidade relativa e da temperatura do ambiente de armazenamento, enquanto o etanol causou deterioração de sementes apenas em condição de umidade relativa alta. Assim, é provável que a atividade da enzima ADH para semente seca (testemunha) esteja associada com um provável acúmulo de acetaldeído. É importante considerar que, após a colheita das sementes de café, uma das etapas do processamento das sementes é a degomagem, ocorrendo nesta fase a fermentação. Assim, durante esse processo, são produzidos o etanol e o ácido acético (MIRANDA et al., 1990).

CAMARGO (1998), trabalhando com sementes de café condicionadas em PEG 6000 a -3, -6, -9 e -12 atm e em água por três, seis, nove e 12 dias, verificou que houve aumento na intensidade de bandas com a elevação das concentrações de PEG 6000.

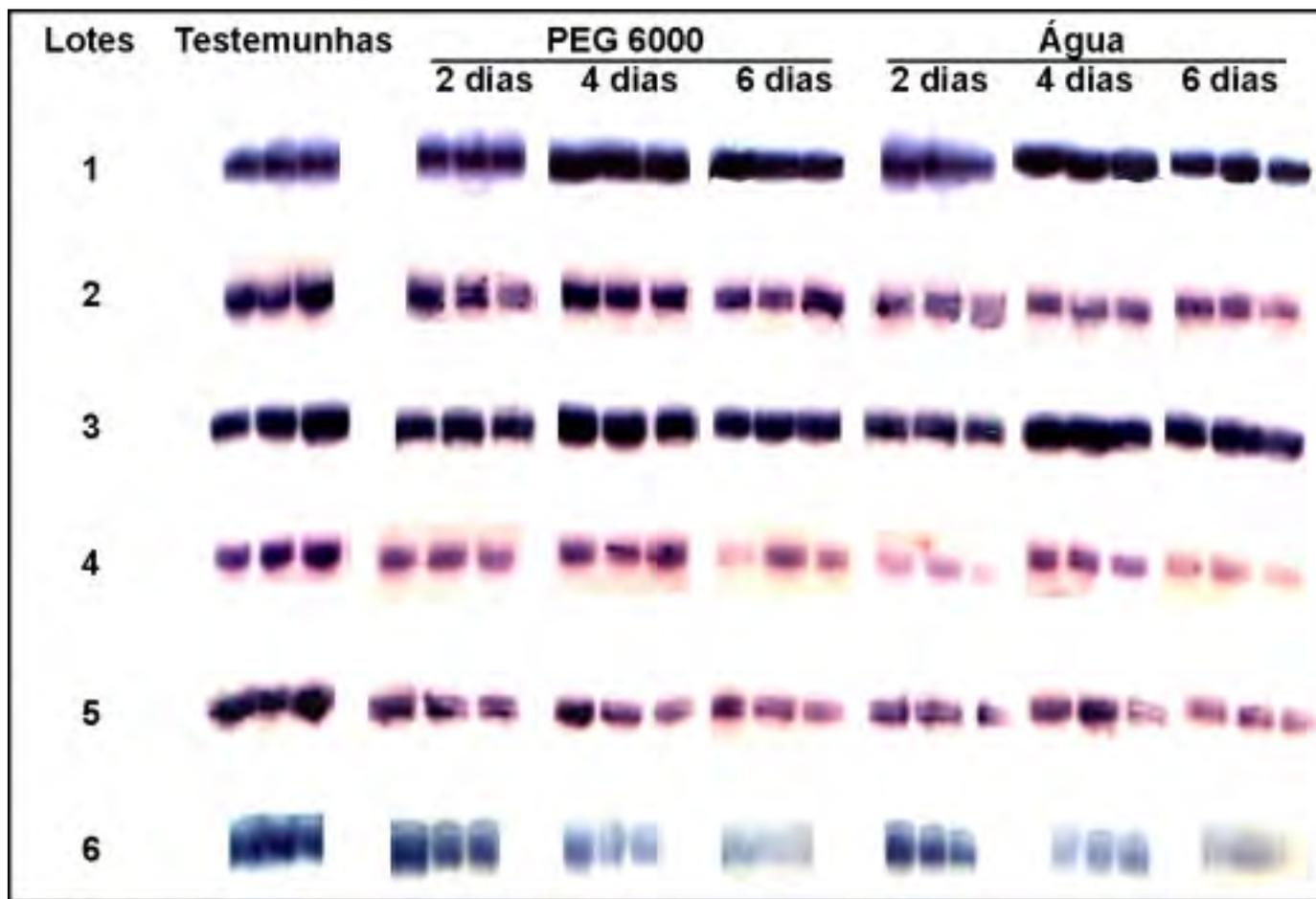


Figura 1 - Padrões isoenzimáticos em sementes de café (lotes 1, 2, 3, 4, 5 e 6), submetidas ao condicionamento fisiológico em PEG 6000 e em água, por dois, quatro e seis dias, e a testemunha (sem tratamento), revelados para álcool desidrogenase (ADH). UFV, Viçosa, MG, 2000.

Todos os tratamentos indicaram a presença da ADH variando a intensidade dentro desses tratamentos. Exceção apenas para o lote 6, no qual não houve diferença dessa enzima para PEG 6000 e em água por seis dias. Houve diferença na intensidade entre os períodos de condicionamento, havendo no período de quatro dias maior intensidade nos lotes as sementes dos lotes 1 e 4, provavelmente pela baixa disponibilidade de oxigênio, aumentando a produção de acetaldeído e estimulando, provavelmente, a síntese dessa enzima.

Observou-se que as sementes dos lotes 4, 5 e 6, nos tratamentos em PEG 6000, tiveram menor intensidade de bandas em relação à testemunha, indicando menor atividade dessa enzima (ADH). BRACCINI (1996), em sementes de soja, verificou que o condicionamento fisiológico com PEG 6000 reduziu a taxa respiratória e evitou possíveis concentrações tóxicas de etanol (resultado da respiração anaeróbica), que pode ocorrer nas primeiras horas de embebição.

4.2.2. Esterase (EST – E.C. 3. 1. 1. 1)

O sistema isoenzimático esterase (EST) está envolvido em reações de hidrólise de ésteres e desempenha papel-chave no metabolismo de lipídios, ponto importante no processo deteriorativo das sementes.

Analisando os zimogramas (Figuras 2 e 3), verificou-se que houve aparecimento de bandas, tanto α como em β esterases, em todos os tratamentos, à exceção das sementes do lote 6. Observou-se que houve diferenças de intensidade com relação às enzimas entre os tratamentos em PEG e em água, bem como na testemunha das sementes dos lotes 1, 4, 5 e 6.

As sementes do lote 3 tiveram sua qualidade fisiológica melhorada com o condicionamento das sementes em água por quatro dias. Observando os zimogramas (Figura 2), houve redução de atividade da esterase nos tratamentos em água.

Nas sementes do lote 4, houve baixa atividade da enzima β esterase nas sementes embebidas em água, principalmente por dois dias. Efeitos mais pronunciados do condicionamento sobre a atividade dessa enzima foram observados nas sementes condicionadas em PEG 6000, especialmente aos

dois dias. Observou-se, também, atividade da β esterase nas sementes não-condicionadas (testemunha). Comportamento semelhante foi observado nas sementes do lote 5.

Na maioria dos lotes, verificou-se tendência de maior intensidade das enzimas α e β esterases nas sementes embebidas em PEG 6000. Resultados semelhantes foram obtidos por KHAN et al. (1978), em sementes de alface.

Nas sementes do lote 6 (com germinação nula), verificou-se que houve aparecimento de bandas apenas nos tratamentos feitos por dois dias. Vale ressaltar que as sementes deste lote apresentaram alta incidência de microrganismos. VIEIRA (1996) verificou que a ocorrência de fungos em sementes de algodão pode promover maior variação no perfil eletroforético das esterases do que no processo deteriorativo.

AUNG e McDONALD (1995) verificaram que ocorreu redução na atividade da esterase com a perda da qualidade das sementes de amendoim. Esses autores verificaram também que aumentos na atividade da enzima esterase variaram conforme a qualidade das sementes, e isso ocorreu devido à síntese de isoenzimas esterases comumente associadas à germinação e não de reparos em nível de DNA.

De acordo com PEIRCE e BREWBAKER (1973), a intensidade das bandas e o perfil isoenzimático são específicos para determinada parte da planta, tecido e estágio de desenvolvimento. Alguns fatores que afetam o metabolismo das plantas, como qualidade fisiológica, nutrição mineral, temperaturas baixas e doenças, dentre outras, influenciam a atividade das isoenzimas. No presente trabalho, observou-se que, com a variação da qualidade fisiológica das sementes, houve variação nos padrões enzimáticos.

SCANDALIOS (1969), na sua descrição das esterases, afirmou que este é um grupo de enzimas com substratos naturais e funções *in vivo* desconhecidas nas plantas.

Os resultados de condicionamento fisiológico obtidos no capítulo 1 indicaram melhor desempenho das sementes embebidas em água. Os perfis eletroforéticos das esterases indicaram menor atividade dessas enzimas nas sementes embebidas em água em relação à testemunha (com exceção das sementes dos lotes 2 e 4) e àquelas embebidas em PEG 6000.

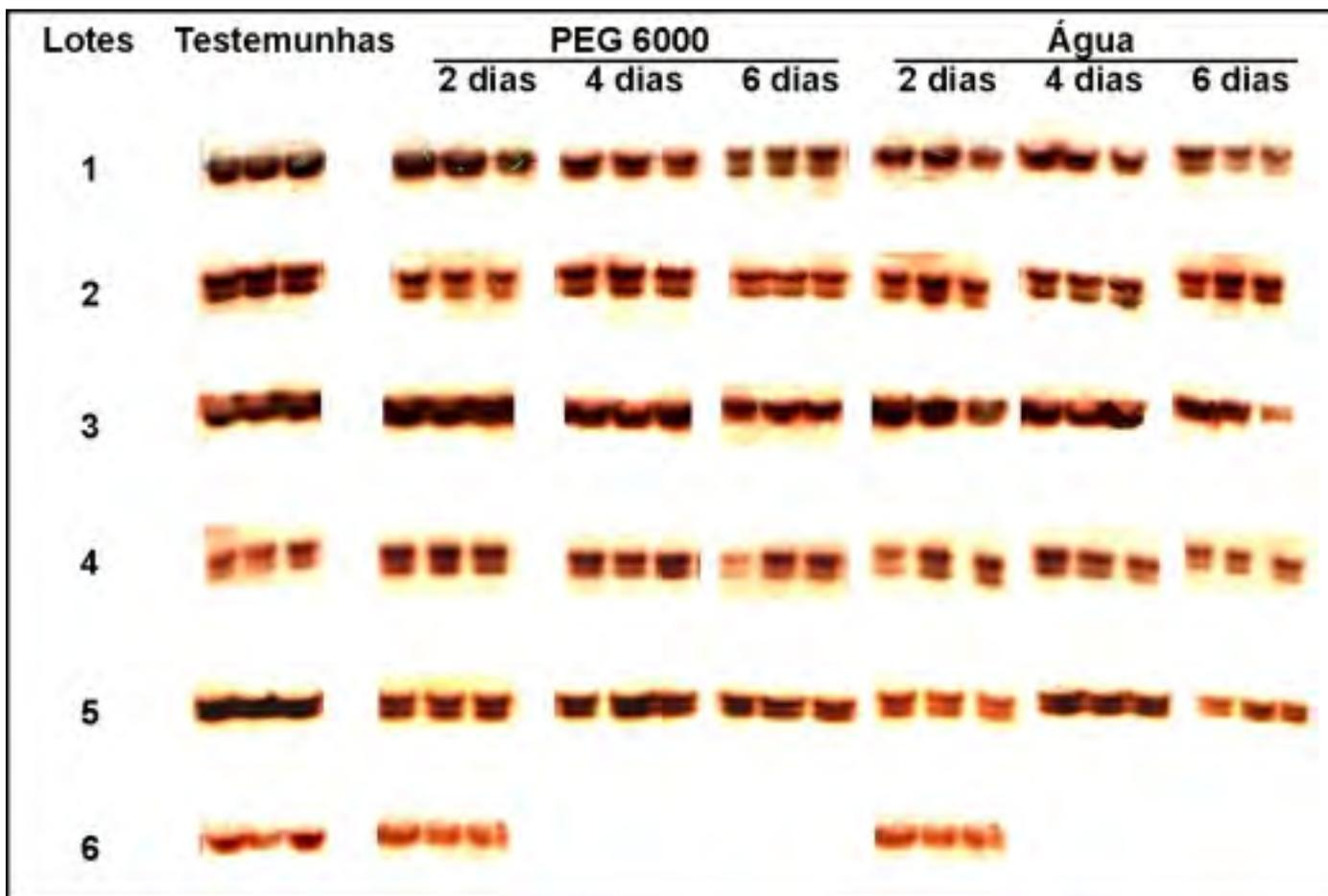


Figura 2 - Padrões isoenzimáticos em sementes de café (lotes 1, 2, 3, 4, 5 e 6) submetidas ao condicionamento fisiológico em PEG 6000 e em água, por dois, quatro e seis dias, e a testemunha (sem tratamento), revelados para α -esterase (EST). UFRV, Viçosa, MG, 2000.

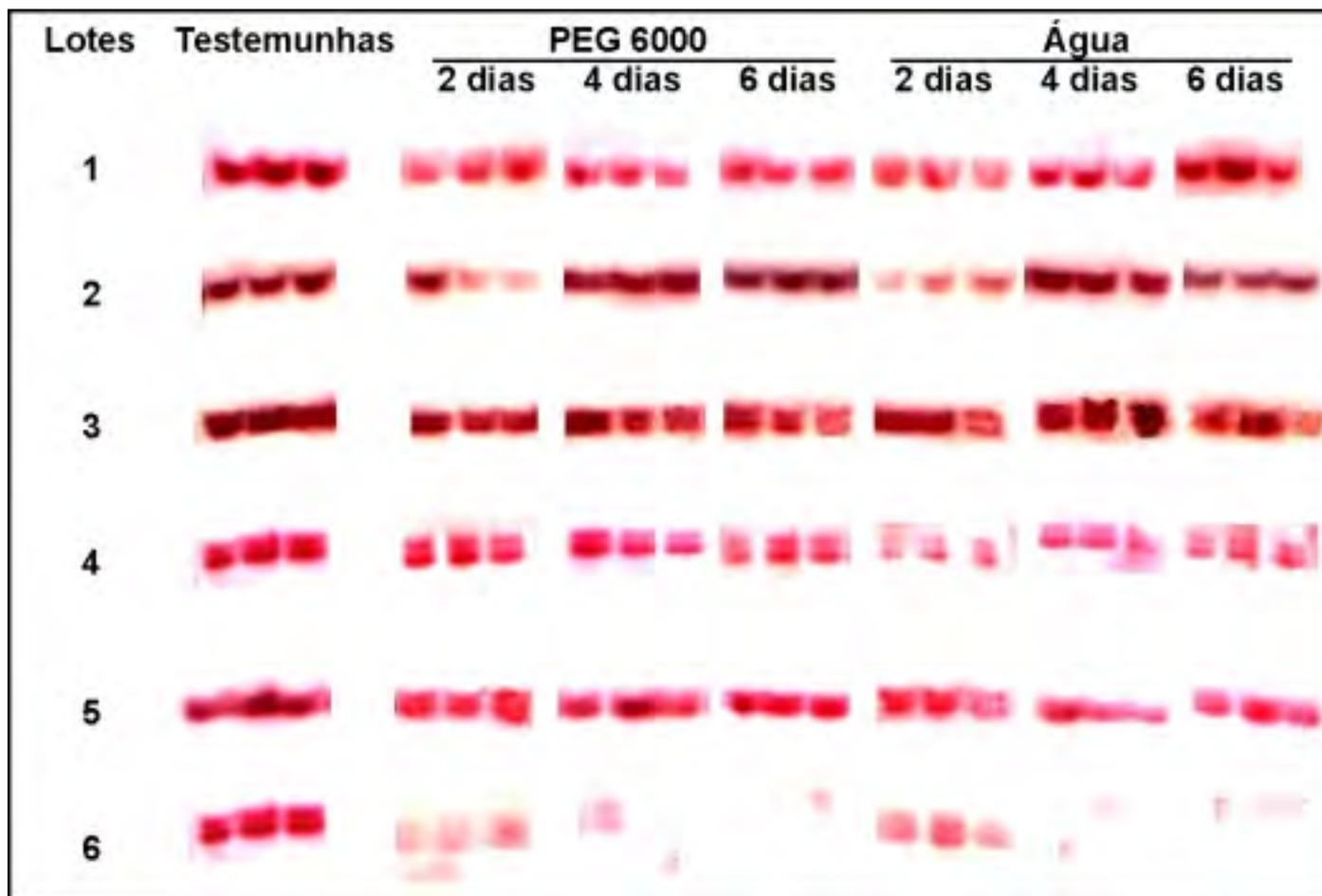


Figura 3 - Padrões isoenzimáticos em sementes de café (lotes 1, 2, 3, 4, 5 e 6) submetidas ao condicionamento fisiológico em PEG 6000 e em água, por dois, quatro e seis dias, e a testemunha (sem tratamento), revelados para β -esterase (EST). UFV, Viçosa, MG, 2000.

4.2.3. Malato desidrogenase (MDH – E.C. 1. 1. 1. 37)

A enzima malato desidrogenase é uma enzima importante na respiração celular. O aumento na intensidade de coloração de bandas dessa enzima pode ser conforme o aumento da respiração que ocorre em sementes que se encontram em processo de deterioração avançada, uma vez que enzimas envolvidas na respiração podem ser ativadas em sementes de qualidade reduzida (SHATTERS et al., 1994).

A enzima malato desidrogenase catalisa a reação da malato à oxaloacetato, tendo importante função no ciclo de Krebs, além de participar do transporte de malato através da membrana mitocondrial e da fixação de CO₂ nas plantas (TAIZ e ZEIGER, 1991).

O lote 1, cujas sementes apresentaram alto vigor, teve menor atividade da enzima MDH na testemunha, apresentando respiração aeróbica típica de tecido vigoroso. Com os tratamentos de condicionamento fisiológico aos dois e quatro dias, houve aumento da atividade da MDH, apesar de não ter refletido em aumento no vigor das sementes.

As sementes condicionadas em PEG 6000 apresentaram maior intensidade de bandas de MDH em todos os períodos, nas sementes dos lotes 1 e 2.

Analisando o zimograma das sementes do lote 3, observou-se que as sementes embebidas em PEG 6000 por dois dias apresentaram maior intensidade de bandas em relação àquelas embebidas em água. Os tratamentos de condicionamento fisiológico em água por dois e quatro dias foram considerados eficientes para melhorar o vigor das sementes desse lote, conforme resultados obtidos na avaliação da qualidade fisiológica das sementes. O arraste verificado no período de quatro dias dificultou as conclusões sobre esse período.

As sementes dos lotes 4 e 5, de pior qualidade fisiológica, apresentaram alta atividade da MDH, e o condicionamento não aumentou a atividade dessa enzima em relação à testemunha, mas tanto as sementes condicionadas em PEG 6000 como em água aos dois dias tiveram redução na atividade dessa enzima. No capítulo 1, verificou-se que, nas sementes do lote 4, o condicionamento em PEG 6000 por dois dias reduziu a germinação e o

vigor das sementes, demonstrado nos testes de germinação, porcentagem de plântulas com raízes secundárias aos 30 dias e crescimento radicar. De fato, os testes de vigor indicaram que o condicionamento fisiológico não melhorou a qualidade das sementes, nas quais, já em processo de deterioração, a enzima MDH teve sua atividade aumentada. SHATTERS et al. (1994) verificaram que sementes em processo de deterioração avançada pode ter aumentado a enzima MDH, conforme a elevação da taxa respiratória. Provavelmente, as sementes do lote 6 não apresentaram alta atividade dessa enzima, pois as sementes já estavam completamente mortas.

CAMARGO (1998), submetendo as sementes de café a diferentes concentrações de PEG 6000, verificou que houve diminuição da intensidade de bandas da MDH com o aumento da concentração da solução, ao contrário do que foi constatado na enzima ADH.

A avaliação da MDH tornou-se difícil, pois, durante a corrida eletroforética, ocorreram arraste nas sementes do lote 6 e alguns tratamentos dos demais lotes. A ocorrência do arraste indicou, provavelmente, degradação de proteínas (ALFENAS et al., 1991), dificultando, assim, tirar conclusões.

Nas sementes do lote 6, verificou-se menor intensidade de bandas da enzima MDH na testemunha, indicando baixa atividade respiratória aeróbica. O condicionamento fisiológico provavelmente ativou a MDH, mas só no período de dois dias em água, ativação essa que não foi suficiente para melhorar a germinação e o vigor. Considerando que as sementes desse lote apresentaram germinação nula e que a MDH catalisa a reação de malato à oxaloacetato no ciclo de Krebs, a baixa atividade dessa enzima indica que a rota aeróbica da respiração foi, possivelmente, comprometida.

Em geral, a intensidade das bandas e o perfil isoenzimático foram específicos para determinada parte da planta, tecido e estágio de desenvolvimento.

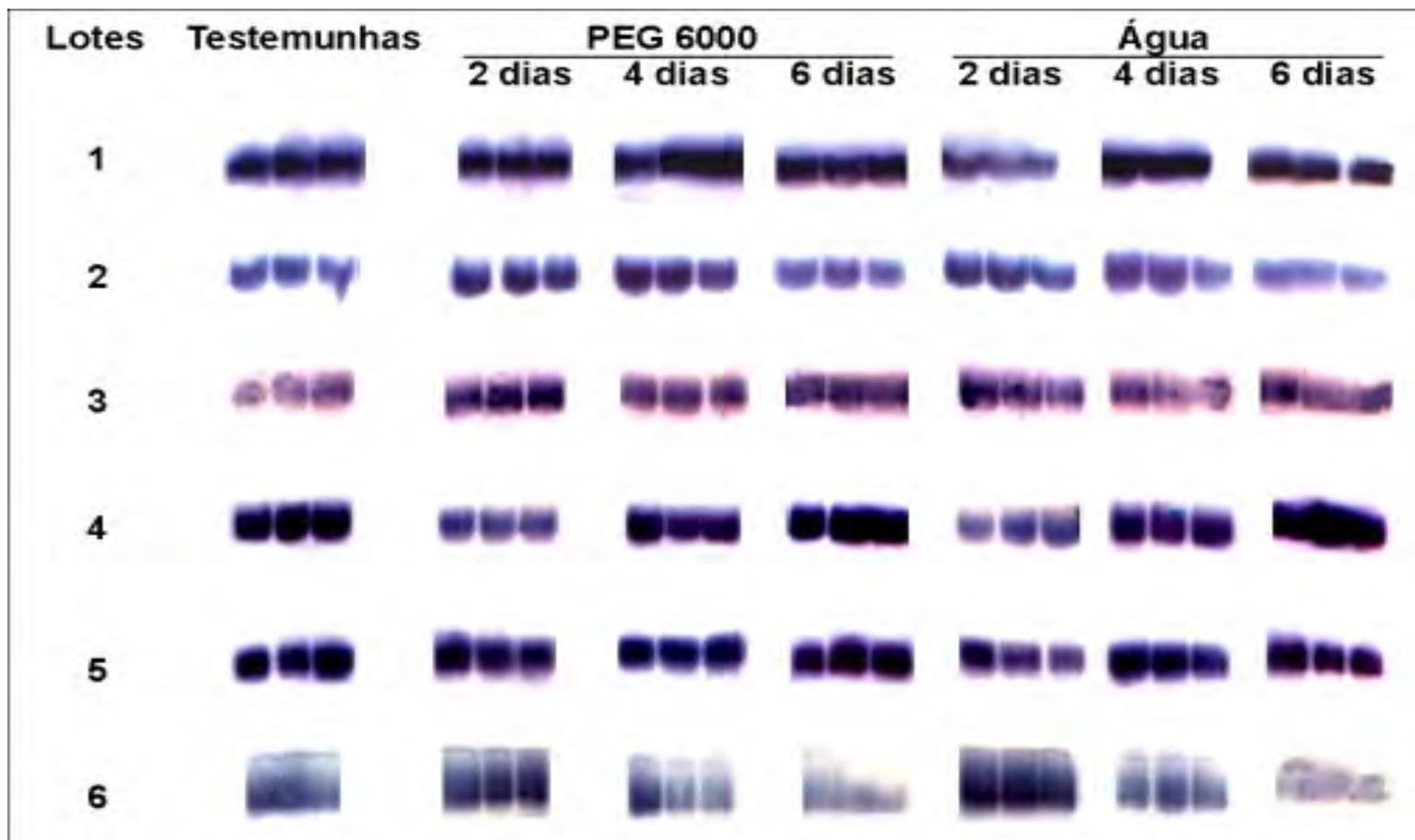


Figura 4 - Padrões isoenzimáticos em sementes de café (lotes 1, 2, 3, 4, 5 e 6) submetidas ao condicionamento fisiológico em PEG 6000 e em água, por dois, quatro e seis dias, e a testemunha (sem tratamento), revelados para malato desidrogenase (MDH). UFV, Viçosa, MG, 2000.

4.2.4. Glutamato desidrogenase (GDH – E.C. 1. 4. 1. 2), peroxidase (PO – E.C. 1.11.1.7) e fosfatase ácida (ACP – E.C. 3.1.3.2)

Não foi possível verificar a atividade dessas enzimas. De acordo com ALFENAS et al. (1991), a não-detecção de bandas provavelmente seja devida à baixa concentração da amostra ou à realização da corrida de forma muito rápida ou muito demorada.

BALLVE et al. (1995), trabalhando com sementes de café, obtiveram bandas difusas para a enzima fosfatase ácida, e, quanto à peroxidase, esta se manteve instável, dificultando a análise.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi conduzido no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e teve por objetivo determinar as principais alterações enzimáticas ocorridas nas sementes de café submetidas ao condicionamento fisiológico. Para tanto, foram utilizadas sementes de seis lotes de café cultivar Catuaí Vermelho 2144, que foram submetidas ao condicionamento fisiológico, a 25°C, em PEG 6000 a -0,4 MPa e em água, por dois, quatro e seis dias, além da testemunha não-condicionada. As avaliações enzimáticas foram feitas, utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de amido 12% nas isoenzimas álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), glutamato desidrogenase (GDH), fosfatase ácida (ACP), peroxidase (PO) e α e β esterases (EST).

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- A melhor solução extratora foi a nº 1, de ALFENAS et al. (1991),. Modificada.
- As enzimas álcool desidrogenase apresentaram bandas mais nítidas quando a pré-corrída eletroforética foi realizada com 20 minutos e, as demais enzimas, com 30 minutos.
- As avaliações eletroforéticas revelaram que podem ocorrer alterações enzimáticas em razão, principalmente, da qualidade fisiológica dos lotes.

- As avaliações das atividades das enzimas álcool desidrogenase e α e β esterases não apresentaram associações com o vigor das sementes.
- Não foi possível ajustar metodologia para análise das enzimas peroxidase, fosfatase ácida e glutamato desidrogenase.
- Houve maior atividade da enzima MDH nas sementes dos lotes de média e baixa qualidades fisiológicas em relação ao lote de alto vigor.
- Menor atividade das enzimas ADH, EST e MDH foi verificada nas sementes inviáveis.
- Houve redução na atividade da enzima α esterase nas sementes dos lotes de médio vigor acondicionadas em água.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACQUAAH, G. **Practical protein electrophoresis for genetic research**. Oklahoma: Discorides Press, 1992. 186p.
- AKERS, S.W., BERKOWITZ, G.A., RABIN, J. Germination of parsley seed primed in aerated solutions of polyethylene glycol. **HortScience**, Alexandria, v.22, n.2, p.250-252, 1987.
- AKERS, S. W., HOLLEY, K. E. SPS: a system for priming seeds using aerated polyethylene glycol or salt solution. **HortScience**, Alexandria, v.21, n.3, p.529-531, 1986.
- ALFENAS, A.C., PETERS, I., BRUCE, W., PASSADOS, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: SIF, 1991. 292p.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO CAFÉ. Rio de Janeiro, Jornal Coffee Business, 1997.
- ARMSTRONG, H., McDONALD, M.B. Effects of osmoconditioning on water uptake and electrical conductivity in soybean seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.20, n.3, p.391-400, 1992.
- ARMSTRONG, H., McDONALD, M.B. Effects of osmoconditioning on water uptake and electrical conductivity in soybean seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.20, n.3, p.391-400, 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.2, p.101-111, 1995.

- BALLVE, R.M.L., MEDINA FILHO, H.P., BORDIGNON, R., LIMA, M.M.A. Methodology for starch gel electrophoresis and protocols for isozymes of 32 plant genera. **Brazilian Journal of Genetics**, Campinas, v.18, n.3, p.491-502, 1995.
- BASAVARAJAPPA, B.S., SHETTY, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated aging of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.19, n. 2, p.279-286, 1991.
- 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.
- BASU, R.N., PAL, P. Control of rice seed deterioration by hydration-dehydration pretreatments. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.8, n.2, p.151-160, 1980.
- BERJAK, P., VILLIERS, T.A. Ageing in plant embryos. III. Acceleration of Senescence following artificial ageing treatment. **New Phytologist**, Oxford, v.71, n.1, p.513, 518, 1978.
- BEWLEY, J.D., BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445p.
- BEWLEY, J.D., BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1985. 367p.
- BODSWORTH, S., BEWLEY, J.D. Osmotic priming of seeds of crop species with polyethylene glycol as a means of enhancing early and synchronous germination at cool temperatures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.59, n.5, p.672-676, 1981.
- BRACCINI, A.L. **Relação entre potencial hídrico, condicionamento osmótico e qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Viçosa, MG:UFV, 1996. 135p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- BRACCINI, A.L. **Relação entre potencial hídrico, condicionamento osmótico e qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* (L.)Merril)**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 135p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- BRADFORD, K.J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HortScience**, Alexandria, v.21, n.5, p.1105-1112, 1986.
- BRADFORD, K.J. Manipulation of. seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HortScience**, Alexandria, v.21, n.5, p.1105-1112, 1986.

- BRADFORD, K.J., STEINER, J.J., TRAWATHA, S.E. Seed priming influence on germination and emergence of pepper seeds lots. **Crop Science**, Madison, v.30, n.4, p.718-721, 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: 1992. 365p.
- BRAY, C.M., DAVISON, P.A., ASHRAF, M., TAYLOR, R.M. Biochemical changes during osmopriming of leek seeds. **Annals of Botany**, London, v.63, n.3, p.185-193, 1989.
- BRAY, C.M., DAVISON, P.A., ASHRAF, M., TAYLOR, R.M. Biochemical changes during osmopriming of leek seeds. **Annals of Botany**, London, v.63, n.3, p.185-193, 1989.
- BROCKLEHURST, P.A., DEARMAN, J. An comparasion of different chemicals for osmotic treatment of vegetable seed. **Annals of Applied Biology**, London, v.105, n.2, p.391-398, 1984.
- BRUGGINK, G.T., OOMS, J.J.J., TOORN, P. van der. Induction of longevity in primed seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.9, n.3, p.49-53, 1999.
- CAMARGO, R. **Condicionamento fisiológico de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Lavras: UFLA, 1998. p.108. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, 1998.
- CAMARGO, R. **Condicionamento fisiológico de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Lavras: UFLA, 1998. 108p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, 1998.
- CARVALHO, N.M., NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424p.
- CHOJNOWSKI, M., CORBINEAU, F., COME, D. Physiological and biochemical changes induced in sunflower seeds by osmopriming and subsequent drying, storage and aging. **Seed Science and Research**, Wallingford, v.7, n.4, p.323-331, 1997.
- CONKLE, M.T., HODGSKISS, P. D., NUNNALLY, L. B., HUNTER, S.C. **Starch gel eletrophoresis of conifer seeds: a labolatory manual**. Berkeley, CA: USDA, Forest Service, 1982. 18p. (Genetic tech. Rep., PSW-64).
- DE JONG, D.W. An investigation of the role of plant peroxidase in cell wall development by the histochemical method. **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, Burlingame, v.15, n.7, p.335-346, 1967.
- DE, R., KAR, R.K. Seed germination and seedling growth of mung bean (*Vigna radiata*) under water stress induced by PEG-6000. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.23, n.3, p.301-308, 1995.

- DEARMAN, J., BROCKLEHURST, P.A., DREW, R.L. Effects of osmotic priming and ageing on onion seed germination. **Annals of Applied Biology**, London, v.108, n.1, p.639-648, 1986.
- DEL GIÚDICE, M.P. **Condicionamento osmótico de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merril.** Viçosa, MG: UFV, 1996. 130p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- DELL'AQUILA, A. TRITO, V. Germination and biochemical activities in wheat seeds following delayed harvesting, ageing and osmotic priming. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.16, n.2, p.197-212, 1988.
- DELL'AQUILA, A., TARANTO, G. Cell division and DNA-synthesis during osmopriming treatment and following germination in aged wheat embryos. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.14, n.2, p.333-341, 1986.
- EIRA, M.T.S. **Condicionamento osmótico de sementes de alface (*Lactuca sativa*); efeitos sobre a germinação e desempenho sob stresses hídrico, salino e térmico.** Piracicaba, SP: ESALQ, 1988. 90p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1988.
- EIRA, M.T.S., MARCOS FILHO, J. Condicionamento osmótico de sementes de alface I. Efeitos sobre a germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.12, n.1, p.9-27, 1990.
- FAO Q.B.S. Italy, Roma, v.9, n.3/4, p.119, 1996.
- FU, J.R., LU, X.H., CHEN, R.Z., ZHANG, B.Z., LIV, 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.
- 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.
- GOMES, J., JADRIC, S., WINTERHALTER, M., BRKIC, S. Alcohol dehydrogenase isoenzymes in chickpea cotyledons. **Phytochemistry**, Oxford, v.21, n.6, p.1219-1224, 1982.
- GRAY, D., STECKEL, J.R., HANDS, L.J. Responses of vegetable seeds to controlled hydration. **Annals of Botany**, London, v.66, n.4, p.227-235, 1990.
- GROOT, S.P.C., KIELISZEWS-ROKICKA, B., VERMEER, E., KARSSSEN, C.M. Gibberellin induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. **Planta**, Berlin, v.4, n.2, p.174-500, 1988.

- GUSMAN, A.B., PRADE, R.A. Changes in some reserve components, amylase and acid phosphatase activities during seed germination and seedling growth of. barbatimão (*Stryphnodendron obovatum* Benth) (fabales-Mimosaceae). **Naturalia**, Marília, v.11/12, n.1, p.33-41, 1986/87.
- HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A., HANDA, S., HANDA, A.K. Cellular mechanisms of tolerance to water stress. **HortScience**, Alexandria, v.19, n.3, p.371-377, 1984.
- HEYDECKER, W., COOLBEAR, P. Seed treatments for improved performance-survey and attempted prognosis. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.5, n.2, p.353-425, 1977.
- HEYDECKER, W., GIBBINS, B.M. The priming of seeds. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.1, n.83, p.213-223, 1978.
- HEYDECKER, W., HIGGING, J., TURNER, Y.J. Invigoration of seeds?. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.3, n. 3 e 4, p.881-888, 1975.
- HEYDECKER, W., HIGGING, J., TURNER, Y.J. Invigoration of seeds?. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.3, n.3 e 4, p.881-888,1975.
- ISHIDA, N., KANO, H., KOBAYASHI, T., HAMAGUCHI, H., YOSHIDA, T. The relationship between imbibitional damage and initial water content of soybeans. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.52, n.11, p.2771-2775, 1988.
- 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, 1988.
- JACKSON, W.T. Use of carbowaxes (polyethylene glycols) as osmotic agents. **Plant Physiology**, Bethesda, v.37, n.2, p.531-519, 1962.
- JENG, T.L., SUNG, J.M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.22, n.3, p.531-539, 1994.
- KHAN, A.A. Perplant physiological seed conditioning. **Horticultural Reviews**, New York, v.31, n.3, p.131-181, 1991.
- KHAN, A.A. Preplant physiological seed conditioning. **Horticultural Reviews**, New York, v.31, n.3, p.131-181, 1991.
- KHAN, A.A., BRAUM, J.W., TAO, K.L., MILLIER, W.F., BENSIN, R.F. New methods for maintaining seed vigour and improving performance. **Journal of Seed Technology**, Lincoln, 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**, Jerusalém, v.29, n.1, p.133-144, 1980/81.
- KHAN, A.A., TAO, K.L., KNYPL, J.S., BORKOWSKA, B., POWELL, L.E. Osmotic conditioning of seeds: physiological and biochemical changes. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.38, n.2, p.267-283, 1978.
- KHAN, A.A., TAO, K.L., KNYPL, J.S., BORKOWSKA, B., POWELL, L.E. Osmotic conditioning of seeds: physiological and biochemical changes. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.38, p.267-283, 1978.
- KNYPL, J.S., JANAS, K.M., KOSWIAK, A.R. Is enhanced vigour in soybean dependent on activation of protein turnover during controlled hydration of seeds? **Physiologie Vegetale**, Montrouge, v.18, p.157-161, 1980.
- KNYPL, J.S., KHAN, A.A. Osmoconditioning of soybean seeds to improve performance at suboptimal temperatures. **Agronomy Journal**, Madison, v.73, n.1, p.112-116, 1981.
- KRZYZANOWSKI, F.C., FRANÇA NETO, J.B., HENNING, A.A. Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. **Informativo ABRATES**, Londrina. v.1, n.2, p.15-50, 1991.
- LANTERI, S., SARACCO, F., KRAAK, H.L., BINO, R.J. The effects of priming on nuclear replication activity and germination of pepper (*Capsicum annuum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.4, n.1, p.81-87, 1994.
- LIMA, W.A.A. **Condicionamento fisiológico, germinação e vigor de sementes de café (*Coffea arabica* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 69p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- LIMA, W.A.A. **Condicionamento fisiológico, germinação e vigor de sementes de café (*Coffea arabica* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 69p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- 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**, v.7, n.1/2, p.107. 1997.
- LOPES, H.M. **Embebição e condicionamento fisiológico de sementes de cebola influenciados por temperatura e potencial osmótico da solução**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 103p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.

- MAJOR, W., ROBERTS, E.H. Dormancy in cereal seeds, II. The nature of the gaseous exchange in imbibed barley and rice seeds. **Journal of Experimental Botany**, London, v.19, n.58, p.90-101, 1967.
- MALLETT, B.V.M., MATHESON, N.K. Galactomannan changes in developing *Gleditsia triacanthos* seeds. **Phytochemistry**, Oxford, v.26, n.7, p.1889-1894, 1987.
- MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.
- MEXAL, J., FISHER, J.T., OSTERYOUNG, J., REID, P.P. Oxygen availability in polyethylene glycol solutions and its implications in plant-water relations. **Plant Physiology**, Rockville, v.55, n.1, p.20-24, 1975.
- MICHEL, B.E., KAUFMANN, M.R. The osmotic potencial of polyethylene glicol 6000. **Plant Physiology**, Rockville, v.51, n.1, p.914-916, 1973.
- MICHEL, B.E., KAUFMANN, M.R. The osmotic potencial of Polyethylene glicol 6000. **Plant Physiology**, Rockville, v.51, n.1, p.914-916, 1973.
- MIRANDA, J.M., VIEIRA, M.G.G.C., CARVALHO, M.M. Inativação da germinação de sementes de café após tratamento com etanol, ácido acético e calor. **Ciência e Prática**, Lavras, v.14, n.2, p.202-207, 1990.
- NADA, E., LOTITO, S., QUAGLIOTTI, L. Seed treatments against dormancy in okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.1, n.362, p.133-138, 1994.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e Testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.
- NASCIMENTO, W.M. Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças: potencialidades e implicações. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.16, n.2, p.106-109, 1998.
- NASCIMENTO, W.M. Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças: potencialidades e implicações. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.16, n.2, p.106-109, 1998.
- NATH, S., COOLBEAR, S.N., HAMPTON, J.G. Hydration – desydration treatments to protect or repair stored Karamu wheat seeds. **Crop Science**, Madison, v.31, n.1, p.822-826, 1991.
- OCKERSE, R., SIEGEL, B., GALSTON, A. Hormone-induce repression of A peroxidase isozyme in plant tissue. **Science**, Washington, v.5, n.2, p.151-452, 1966.

- PAIXÃO, G.P. **Pré-condicionamento de sementes de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench): efeitos sobre a qualidade fisiológica e potencial de armazenamento.** Viçosa, MG: UFV, 1998. 56p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- PANDEY, D.K. Priming induced repair in fresh bean seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.16, n.2, p.527-532, 1988.
- PARERA, C.A., CANTLIFFE, D.J. Presowing seed priming. **Horticultural Reviews**, Edinburgh, v.16, n.1, p.109-139, 1994.
- PEIRCE, L.C., BREWBAKER, J.L. Applications of isozyme analysis in horticultural science. **HortScience**, Alexandria, v.8, n.1, p.17-22, 1973.
- PETCH, G.M., MAUDE, R.B., BUJALKSKI, W., NIENOW, A.W. The effects of Re-use of Polyethylene glycol priming osmótica upon the development of Microbial populations and germination of leeks and carrots. **Annals Applied Biology**, Warwick, v.119, n.2, p.365-372, 1991.
- POWELL, A.A., MATTHEWS, S. The damaging effect of water on dry pea embryos during imbibition. **Journal of Experimental Botany**, London, v.29, n.112, p.1215-1229, 1978.
- REID, J.S.G. Cell wall storage carbohydrate in seeds: biochemistry of the seed “gums and hemicelluloses”. **Advances in Botanical Research**, Orlando, v.11, n.1, p.125-155, 1985.
- RENA, A.B., MAESTRI, M., Fisiologia do cafeeiro. In: RENA, A.B., MALAVOLTA, E., ROCHA, M., YAMADA, T. **Cultura do cafeeiro; fatores que afetam a produtividade.** Piracicaba, SP: Assoc. Bras. Pesq. Potassa Fosfato, 1986. p.13-85.
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.3, p.499-514, 1973.
- SARACCO, F., BINO, R.J., BERGERVOET, J.H.W., LANTERI, S. Influence of priming-induced nuclear replication activity on storability of pepper (*Capsicum annuum* L.) seed. **Seed Science Research**, Wallingford, v.5, n.1, p.25-29, 1995.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plant: a review. **Biochemical Genetic**, New York, v.3, n.1, p.37-79, 1969.
- SEEVERS, P.M., DALY, J.M., CATEDRAL, F.F. The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease. **Plant Physiology**, Washington, v.48, n.3, p.353-360, 1971.
- SHARMA, M.L. Simulation of drought and its effect on germination of five pasture species. **Agronomy Journal**, Madison, v.65, n.4, p.982-987, 1973.

- SHATTERS JR., R.G., ABDELGHANY, A., ELBAGOURY, O., WEST, S.H. Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.4, n.1, p.33-41, 1994.
- SHAW, C.R., PRASAD, R. Starch gel eletrophoresis of enzymes; a compilation of recipes. **Biochemical Genetics**, New York, v.4, n.2, p.297-320. 1970.
- SINGH, M., SINGH, B.B. Effect of salts and PEG-6000 no enzymes in germinating pea seeds. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v.34, n.5 e 6, p.415-422, 1992.
- SMITH, P.T., COBB, B.G., Physiological and enzymatic characteristics of primed, re-dried, and germinated pepper seeds (*Capsicum annuum* L.). **Seed Science and Technology**, Zurich, v.20, n.3, p.503-513, 1992.
- SOLTIS, D.E., HAUFLER, C.H., DARROW, D.C., GASTONY, G.J. Starch gel electrophoresis of frens: a compilation of griding guffers, gel and eletrode buffers, and staining schedules. **American Fern Journal**, Athanta, v.73, n.1, p.9-27, 1983.
- SUNG, F.J.M., CHANG, Y.H. Biochemical activities associated with priming of sweet corn seeds to improve vigor. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.21, n.1, p.97-105, 1993.
- SUZUKI, H., OBAYASHI, S., LUO, H. Effects of salt solutions on the priming of several vegetables seeds. **Journal of the Japan Society for Horticultural Science**, Tokyo, v.58, n.1, p.131-138, 1989.
- SZAFIROWSKA, A., KHAN, A.A., PECK, N.H. Osmoconditioning of carrot seeds to improve seedling establishment and yield in cold soil. **Agronomy Journal**, Madison, v.73, n.5, p.845-848, 1981.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant physiology**. Redwood City: The Benjamin/Cummings, 1991.559p.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant physiology**. Redwood City: The Benjamin/Cummings, 1991. 559p.
- TAKAKI, M., DIETRICH, S.M.C. Effect of GA₃ and light on polysacharide levels and metabolism in germinating coffee seeds. **Journal of Experimental Botany**, Tokyo, v.31, n.125, p.1643-1649, 1980.
- TARQUIS, A.M., BRADFORD, K.J. Prehydration and priming treatments that advance germination also increase the rate of deterioration of lettuce seeds. **Journal of Experimental Botany**, London, v.43, n.1, p.307-317, 1992.
- TILDEN, R.L., WEST, S.H. Reversal of the effects of aging in soybean seeds. **Plant Physiology**, Lancaster, v.77, n.1, p.584-586, 1985.

- TILDEN, R.L., WEST, S.H. Reversal of the effects of aging in soybean seeds. **Plant Physiology**, Washington, v.77, n.2, p.584-586, 1985.
- TOMIYAMA, K., STAHAMAN, M.A. Alteration of oxidative enzyme in potato tuber tissue by infection *Phytophthora infestans*. **Plant Physiology**, Washington, v.39, n.3, p.483-490, 1964.
- VANTOAI, T.T., FAUSEY, N.R., McDONALD JÚNIOR, M.B. Anaerobic metabolism enzymes as markers of flooding stress in maize seeds. **Plant and Soil**, The Hague, 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 tipo 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.
- VIEIRA, M.G.G.C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. Lavras: UFLA, 1996. 118p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, 1996.
- WOLFRON, M.L., PATIN, D.L. Isolation and characterization of cellulose in the coffee bean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.12, n.1, p.376-379, 1964.
- WOODSTOCK, L.W., TAO, K.L.J. Prevention of imbibitional injury in low vigor soybean embryonic axes by osmotic control of water uptake. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.51, n. 2, p.133-139, 1981.
- YAN, Y.T. Effects of PEG priming in preventing imbibitional chilling injury in soybean seeds. **Plant Physiology Communications**, London, v.4, n.1, p.24-27, 1987.
- ZHANG, C.L., PENG, S.F., GUO, J.N. A study on regulation of sugarbeet seed quality. I. Effects of PEG osmoconditioning and hydration-dehydration on germination of seeds with different vigour. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v.1, n.1, p.13-18, 1994.
- ZHENG, C.C., ZOU, Q., CHENG, B.S. Studies on solute exudate during soybean seed imbibition and its relation with seed vigour. **Soybean Science**, London, v.10, n.3, p.226-230, 1991.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Quadro1A - Resumo da análise de variância individual para avaliação do efeito do condicionamento fisiológico na germinação e no vigor de sementes de café - Lote1

F.V.	G.L.	Quadrados Médios							
		TG ¹	PC ²	EA ³	PRS 20 ⁴	PRS 30 ⁵	CR ⁶	CHR ⁷	MS ⁸
Trat.	6	54,6*	582,1**	198,9**	215,7*	54,3**	596,7	391,3**	9,0**
Resíduo	21	8,5	71,1	20,1	80,7	6,5	311,6	42,5	1,8
Média	-	87,3	36,4	82,1	66,7	89,7	54,8	75,1	23,7
C.V.(%)	-	3,3	23,1	5,5	13,5	2,8	32,2	8,68	5,6

** e * significativos a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

¹ Teste de germinação.

² Primeira contagem.

³ Envelhecimento acelerado.

⁴ Plântulas com raízes secundárias aos 20 dias.

⁵ Plântulas com raízes secundárias aos 30 dias.

⁶ Crescimento radicular.

⁷ Comprimento do eixo hipocótilo-radícula.

⁸ Peso de matéria seca

Quadro 2A - Resumo da análise de variância individual para avaliação do efeito do condicionamento fisiológico na germinação e no vigor de sementes de café - Lote 2

F.V.	G.L.	Quadrados Médios							
		TG ¹	PC ²	EA ³	PRS 20 ⁴	PRS 30 ⁵	CR ⁶	CHR ⁶	MS ⁷
Trat.	6	24,5	284,5*	425,9**	180,6*	53,5	1959,2**	198,0**	3,6
Resíduo	21	23,8	85,9	15,6	48,0	23,0	314,9	33,4	2,2
Médias	-	91,4	47,4	84,9	80,9	92,0	61,1	73,7	24,0
C.V.(%)	-	5,3	19,5	4,7	8,6	5,2	29,0	7,8	6,2

** e * significativos a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

¹ Teste de germinação.

² Primeira contagem.

³ Envelhecimento acelerado.

⁴ Plântulas com raízes secundárias aos 20 dias.

⁵ Plântulas com raízes secundárias aos 30 dias.

⁶ Crescimento radicular.

⁷ Comprimento do eixo hipocótilo-radícula.

⁸ Peso de matéria seca.

Quadro 3A - Resumo da análise de variância individual para avaliação do efeito do condicionamento fisiológico na germinação e no vigor de sementes de café - Lote 3

F.V.	G.L.	Quadrados Médios							
		TG ¹	PC ²	EA ³	PRS 20 ⁴	PRS 30 ⁵	CR ⁶	CHR ⁷	MS ⁸
Trat.	6	62,9**	276,7**	49,6	113,6**	14,0	324,4*	84,1**	8,0
Resíduo	21	16,3	62,9	20,5	29,0	12,6	95,5	14,5	7,8
Médias	-	88,4	45,5	90,1	76,9	92,5	76,0	79,3	26,1
C.V.(%)	-	4,6	17,4	5,0	7,0	3,8	12,9	4,8	10,7

** e * significativos a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

¹ Teste de germinação.

² Primeira contagem.

³ Envelhecimento acelerado.

⁴ Plântulas com raízes secundárias aos 20 dias.

⁵ Plântulas com raízes secundárias aos 30 dias.

⁶ Crescimento radicular.

⁷ Comprimento do eixo hipocótilo-radícula.

⁸ Peso de matéria seca.

Quadro 4A - Resumo da análise de variância individual para avaliação do efeito do condicionamento fisiológico na germinação e no vigor de sementes de café - Lote 4

F.V.	G.L.	Quadrados Médios							
		TG ¹	PC ²	EA ³	PRS 20 ⁴	PRS 30 ⁵	CR ⁶	CHR ⁷	MS ⁸
Trat.	6	377,6**	845,9**	151,1**	520,1**	165,9**	2017,8**	278,1**	3,6
Resíduo	21	33,0	40,7	28,2	72,1	16,2	109,1	54,2	1,7
Médias	-	73,9	31,0	76,9	62,4	81,6	68,9	79,9	23,4
C.V.(%)	-	7,8	20,6	6,9	13,6	4,9	15,2	9,2	5,5

** e * significativos a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

¹ Teste de germinação.

² Primeira contagem.

³ Envelhecimento acelerado.

⁴ Plântulas com raízes secundárias aos 20 dias.

⁵ Plântulas com raízes secundárias aos 30 dias.

⁶ Crescimento radicular.

⁷ Comprimento do eixo hipocótilo-radícula

⁸ Peso de matéria seca

Quadro 5A - Resumo da análise de variância individual para avaliação do efeito do condicionamento fisiológico na germinação e no vigor de sementes de café - Lote 5

F.V.	GL	Quadrados Médios							
		TG ¹	PC ²	EA ³	PRS 20 ⁴	PRS 30 ⁵	CR ⁶	CHR ⁷	MS ⁸
Trat.	6	202,0**	154,0**	614,2**	473,3**	117,3*	476,4*	270,7**	2,8
Resíduo	21	47,7	21,0	85,2	77,0	31,5	176,1	69,9	2,3
Médias	-	60,5	14,5	60,9	48,7	70,5	27,2	59,9	22,0
C.V.(%)	-	11,4	31,6	15,2	18,0	8,0	48,8	14,0	6,9

** e * significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

¹ Teste de germinação.

² Primeira contagem.

³ Envelhecimento acelerado.

⁴ Plântulas com raízes secundárias aos 20 dias.

⁵ Plântulas com raízes secundárias aos 30 dias.

⁶ Crescimento radicular.

⁷ Comprimento do eixo hipocótilo-radícula.

⁸ Peso de matéria seca.

Quadro 6A - Qualidade fisiológica inicial dos lotes de sementes de café cultivar Catuaí Vermelho 2144

LOTES	TG ¹ (%)	PC ² (%)	EA ³ (%)	PR 20 ⁴ (%)	PR 30 ⁵ (%)	CR ⁶ (cm)	CEH ⁷ (cm)	MS ⁸ (mg/plântula)
1	93,5	58,5	90,5	90,0	95,5	83,7	76,2	24,2
2	92,5	31,0	84,5	71,5	93,0	81,2	77,5	24,7
3	83,0	20,5	73,5	58,0	85,0	36,2	58,0	21,0
4	77,0	14,5	65,0	64,0	87,0	87,0	73,3	22,7
5	65,5	9,0	60,5	49,0	75,5	30,0	58,7	21,7
6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

¹ Teste de germinação.

² Primeira contagem.

³ Envelhecimento acelerado.

⁴ Plântulas com raízes secundárias aos 20 dias.

⁵ Plântulas com raízes secundárias aos 30 dias.

⁶ Crescimento radicular.

⁷ Comprimento do eixo hipocótilo-radícula.

⁸ Peso de matéria seca.

Quadro 7A - Grau de umidade das sementes de café com endocarpo, submetidas ao condicionamento fisiológico com polietileno glicol (PEG - 6000) a -0,4 MPa e em água, por dois, quadro e seis dias, a 25°C

Lotes	Testemunha (%)	PEG - 6000 (%)			ÁGUA (%)		
		2 dias	4 dias	6 dias	2 dias	4 dias	6 dias
1	11,7	42,2	48,1	51,7	37,7	43,5	50,5
2	11,5	37,7	43,3	53,6	41,6	49,1	48,8
3	13,8	37,9	44,8	47,4	41,9	50,7	54,7
4	14,8	40,5	48,0	51,7	44,5	51,6	56,0
5	13,8	40,1	45,9	51,8	41,3	53,0	55,6
6	13,8	40,0	46,0	51,2	41,0	53,0	55,7

Quadro 8A - Grau de umidade de sementes de café com endocarpo submetidas ao condicionamento fisiológico com polietileno glicol (PEG - 6000) a -0,4 MPa e em água, por dois, quatro e seis dias, a 25°C, após o teste de envelhecimento acelerado

Lotes	Testemunha (%)	PEG - 6000 (%)			ÁGUA (%)		
		2 dias	4 dias	6 dias	2 dias	4 dias	6 dias
1	34,1	43,7	42,0	47,2	46,1	49,5	43,4
2	30,2	34,8	43,2	45,4	39,6	40,0	51,9
3	31,5	40,0	43,1	47,1	42,4	47,7	53,2
4	14,8	40,5	48,0	51,7	44,5	51,6	56,0
5	32,2	37,5	46,1	56,2	45,2	55,0	50,9
6							

1. Composição da solução extratora (ALFENAS et al., 1991) - modificada)

Fosfato de sódio bibásico (0,034 M).....	0,60 g
Sacarose (0,2 M).....	7,00 g
PVP – 40 (2,56%).....	2,56 g
DTT (3 mM).....	0,05 g
L-ácido ascórbico (5,7 mM).....	0,10 g
DIECA (5,8 mM).....	1,00 g
Bissulfito de sódio (2,6 mM).....	0,05 g
Borato de sódio (Borax) (2,5 mM).....	0,05 g
2 – mercaptoetanol (2%).....	2,00 ml
Polietilenoglicol – 6000 (1%).....	100,00 g
Água destilada	100,00 ml

Durante a trituração, adicionou-se uma pitada de PVPP (0,30 g) para remover compostos fenólicos e aumentar a estabilidade da enzima.

2. Protocolo para detecção de atividade enzimática

2.1. Glutamato desidrogenase (GDH - EC 1.4.1.2) - (ACQUAAH, 1992)

Reação: $\text{glutamato} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \alpha\text{-oxoglutarato} + \text{NADH} + \text{NH}_4^+$

NAD ⁺	15,00 mg
NBT.....	10,00 mg
PMS.....	2,00 mg
CaCl ₂ 10 mM.....	0,10 ml
Tris - 0,1 M, pH 7,5.....	50,00 ml
Glutamato de sódio.....	400,00 mg

Incubar no escuro, à temperatura de 30°C, até o aparecimento de bandas.

**2.2. Álcool desidrogenase (ADH – E.C. 1.1.1.1) - (BALLVE et al., 1995),
modificado**

NAD ⁺	20,00 mg
NBT.....	15,00 mg
PMS.....	2,00 mg
Tris (0,1 M) – MgCl ₂ (0,04 M).....	50,00 ml

Ajustar o pH para 7,5 com HCl 3 N e, em seguida:

Álcool etílico absoluto (99%).....3,00 ml

2.3. Malato desidrogenase (MDH – E.C. 1. 1. 1. 37) - (ACQUAAH, 1992)

Reação: malato + NAD⁺ → Oxaloacetato + NADH

Tampão: Na L-malato, pH 7,0

L – ácido málico.....	13,40 g
Na ₂ CO ₃ .H ₂ O, 2 M.....	49,00 ml
Água destilada	1.000,00 ml
Tampão: 0,5 M Tris – HCl, pH 7,1.....	7,50 ml
Água destilada.....	35,00 ml
Na L – malato, 1 M, pH 7,0.....	5,00 ml
NaCN, 0,1 M.....	2,50 ml
NAD ⁺	25,00 mg
NBT.....	15,00 mg
PMS.....	1,00 mg

Incubar no escuro, em estufa a 30°C.

2.4. Fosfatase ácida (ACP – E.C. 3.1.3.2) - (SOLTIS et al., 1983)

Tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0.....	100,00 ml
MgCl ₂ 1,0 M.....	0,50 ml
A – naftil fosfato, sal de sódio.....	100,00 mg
“Fast garnet GBC salt”	80,00 mg

Incubar em temperatura ambiente e no escuro até o aparecimento das bandas.

2.5. Peroxidase (PO – E.C. 1.11.1.7) – (SOLTIS et al., 1983)

3 – Amino – 9 – Etil – carbazole.....	65,00 mg
dissolvidos em:	
Dimetilformamida (DMF).....	5,00 ml
Tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0.....	95,00 ml
CaCl ₂ 0,1 M.....	2,00 ml
H ₂ O ₂ em 3%.....	2,00 ml

Incubar no refrigerador a ± 4°C até o aparecimento das bandas.

2.6. α – Esterase (EST – E.C. 3.1.1.1) – (SOLTIS et al., 1983)

α – naftil acetato.....	20,00 mg
Dissolver em acetona.....	1,00 ml
Tampão fosfato 1,0 M, pH 6,0.....	5,00 ml
Água destilada.....	45,00 ml
“Fast blue RR salt”	50,00 mg

Incubar em temperatura ambiente e no escuro até o aparecimento das bandas.

2.7. β -esterase (EST – E.C. 3.1.1.1) – (SOLTIS et al., 1983)

β – naftil acetato.....	20,00 mg
Dissolvidos em acetona.....	1,00 ml
Tampão fosfato 1,0 M, pH 6,0.....	5,00 ml
Água destilada.....	45,00 ml
“Fast blue RR salt”.....	50,00 mg

Incubar em temperatura ambiente e no escuro até o aparecimento das bandas.