



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL**

**PRÉ-HIDRATAÇÃO DE SEMENTES DE ERVILHA E SUA INTERFERÊNCIA NA
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FISIOLÓGICO**

CAROLINE JÁCOME COSTA

Engenheira Agrônoma, M.Sc. em Ciências

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, sob orientação do Professor Dr. Francisco Amaral Villela, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

PELOTAS

Rio Grande do Sul - Brasil

Fevereiro de 2007

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL**

**PRÉ-HIDRATAÇÃO DE SEMENTES DE ERVILHA E SUA INTERFERÊNCIA NA
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FISIOLÓGICO**

CAROLINE JÁCOME COSTA

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, sob orientação do Professor Dr. Francisco Amaral Villela, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Fevereiro de 2007**

SUMÁRIO

RESUMO -----	1
ABSTRACT -----	2
INTRODUÇÃO -----	3
REVISÃO DE LITERATURA -----	6
1.Estratégias de aquisição de tolerância à dessecação -----	6
2.Reativação do metabolismo embrionário -----	11
3.Alternativas para minimizar a ocorrência de danos por embebição em sementes -----	12
4.Importância dos íons cálcio, potássio e magnésio para o metabolismo celular -----	14
MATERIAL E MÉTODOS -----	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	19
1.Caracterização dos lotes -----	19
2.Classificação dos lotes, em níveis de vigor, baseada no teste de condutividade elétrica, após diferentes métodos de pré-hidratação das sementes -----	21
3.Lixiviação de cálcio, potássio e magnésio após a pré-hidratação das sementes -----	25
4.Classificação dos lotes, em níveis de vigor, baseada no teste de envelhecimento acelerado, após diferentes métodos de pré-hidratação das sementes -----	30
5.Expressão dos sistemas isoenzimáticos -----	32
CONCLUSÕES -----	40
REFERÊNCIAS -----	40

PRÉ-HIDRATAÇÃO DE SEMENTES DE ERVILHA E SUA INTERFERÊNCIA NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FISIOLÓGICO

AUTORA: Caroline Jácome Costa

ORIENTADOR: Francisco Amaral Villela

RESUMO - O presente trabalho teve o objetivo de estudar alterações bioquímicas e fisiológicas decorrentes da pré-hidratação de sementes de ervilha, com ênfase na lixiviação de eletrólitos e na expressão de diferentes sistemas isoenzimáticos, procurando contribuir para o aperfeiçoamento dos métodos de pré-hidratação de sementes a serem submetidas a testes para avaliação do seu potencial fisiológico. Foram utilizados lotes de sementes de ervilha das cultivares Axé e Maria, caracterizados quanto ao teor de água, germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica e emergência de plântulas em campo. As sementes de cada lote foram pré-hidratadas empregando atmosfera saturada e substrato umedecido, até atingirem teores de água de 10, 12 e 14%. Após a pré-hidratação, as sementes foram avaliadas pelos testes de condutividade elétrica, envelhecimento acelerado, lixiviação de cálcio, potássio e magnésio e caracterizadas quanto ao padrão de expressão dos sistemas isoenzimáticos Malato Desidrogenase, Fosfatase Ácida, Glutamato Desidrogenase e Glutamato Oxalacetato Transaminase. A pré-hidratação de sementes de ervilha empregando atmosfera saturada ou substrato umedecido afeta diferentemente o processo de reestruturação do sistema de membranas celulares das sementes, refletindo-se em alterações no padrão de lixiviação de eletrólitos e na expressão do sistema isoenzimático Fosfatase Ácida. Ocorrem discrepâncias entre resultados obtidos pelo teste de condutividade elétrica para avaliação do potencial fisiológico de sementes de ervilha, dependendo do procedimento adotado para a pré-hidratação das sementes.

Termos para indexação: *Pisum sativum*, condutividade elétrica, envelhecimento acelerado, isoenzimas, lixiviação de eletrólitos.

PEA SEED PRE-HYDRATION AND ITS INTERFERENCE WITH THE EVALUATION OF THE PHYSIOLOGICAL POTENTIAL

AUTHOR: Caroline Jácome Costa

ADVISER: Francisco Amaral Villela

ABSTRACT - The present work had the objective of to study biochemical and physiological alterations in function of pea seed pre-hydration with emphasis in the electrolyte leakage and in the expression of different isoenzymatic systems, trying to contribute for the improvement of the pre-hydration methods of seeds to be submitted to tests for evaluation of its physiological potential. Seeds lots of cvs. Axé and Maria, characterized for the water content, germination, first germination counting, accelerated aging, electrical conductivity and seedling emergence in the field, were used. The seeds of each lot were pre-hydrated in saturated atmosphere and humidified substratum until they reach 10, 12 and 14% of water content. After the pre-hydration, the seeds were submitted to the tests of electrical conductivity, accelerated aging and leakage of calcium, potassium and magnesium and characterized for the expression pattern of the isoenzymatic systems Malate Dehydrogenase, Acid Phosphatase, Glutamate Dehydrogenase and Glutamate Oxalacetate Transaminase. The pre-hydration of the seeds using saturated atmosphere or humidified substratum seems to affect the process of restructuring the seed cellular membranes system differently, being reflected in alterations in the pattern of electrolyte leakage and Acid Phosphatase isoenzymatic expression. Discrepancies take place among results obtained by the test of electrical conductivity for evaluation of the physiological potential of pea seeds, depending on the proceeding adopted to pre-hydrate the seeds.

Index terms: *Pisum sativum*, electrical conductivity, accelerated aging, isoenzymes, elecroltye leakage.

INTRODUÇÃO

A manutenção da funcionalidade celular nos organismos eucariotos é altamente dependente de um sistema eficiente de compartimentalização celular. O complexo sistema de endomembranas atende, em parte, a esse propósito. Dessa forma, para que as células mantenham sua funcionalidade metabólica, é imprescindível que as membranas apresentem-se estrutural e fisiologicamente íntegras.

As membranas celulares apresentam-se basicamente como bicamadas de fosfolipídios intercaladas por um complexo sistema de proteínas. Os fosfolipídios são moléculas de natureza anfipática, isto é, possuem uma região predominantemente hidrofílica (os grupos-cabeça polares) e outra predominantemente hidrofóbica (formada pelas cadeias dos ácidos graxos). Na configuração em bicamada, os grupos polares voltam-se para o exterior e o interior da célula (ou dos compartimentos subcelulares), deixando a região hidrofóbica confinada entre as duas camadas (Simon, 1978). Tal arranjo molecular e estrutural confere permeabilidade seletiva às membranas celulares, controlando o fluxo de entrada e saída de substâncias tanto no interior da célula como entre os diversos compartimentos subcelulares. Para que as membranas sejam fisiologicamente ativas, é necessário que estejam hidratadas, quando assumem o estado cristalino líquido e mantêm a orientação hidrofóbico/hidrofílica.

Nos processos que envolvem a perda de água pelas células, como a dessecação ao longo da maturação das sementes, as membranas alteram seu estado físico, passando do estado cristalino líquido, mais fluido, para o estado de gel, menos fluido. Essa transição acarreta redução na distância entre os grupos-cabeça dos fosfolipídios, aumentando as

interações hidrofóbicas (interações de Van der Waals) entre as cadeias dos ácidos graxos (Crowe et al., 1992).

Quando as sementes são reidratadas, no processo natural de embebição que antecede a retomada do crescimento e desenvolvimento do embrião durante a germinação, ocorre nova transição entre os estados de gel para cristalino líquido nas membranas celulares. Se a embebição ocorrer muito rapidamente, não haverá tempo hábil para que as células retornem ao estado cristalino líquido, situação na qual ocorrem danos celulares e lixiviação de eletrólitos e outras substâncias intracelulares, caracterizando o dano por embebição (Bewley, 1997; De Castro e Hilhorst, 2004; Marcos Filho, 2005).

Trabalhos realizados com sementes de milho submetidas a tratamentos de pré-hidratação previamente à imersão em água mostram acentuada redução na lixiviação de solutos, medida pelo teste de condutividade elétrica (Rosa et al., 2000). Os danos por embebição são reduzidos quando a hidratação inicial das sementes ocorre com a fase de vapor de água, sob alta umidade relativa, ou quando a taxa inicial do influxo de água é reduzida através do revestimento das sementes (De Castro e Hilhorst, 2004).

Dessa forma, é possível que mecanismos moleculares de proteção ao sistema de membranas possam ser ativados durante tais tratamentos de pré-hidratação das sementes, limitando a lixiviação do conteúdo celular, garantindo a compartimentalização celular necessária e permitindo melhor desempenho das sementes durante a germinação.

Contudo, possivelmente, sementes de potencial fisiológico inferior apresentam deficiências no processo de reparo e/ou proteção ao sistema de membranas durante a fase inicial de embebição, o que poderia levar a perturbações em todas as fases subsequentes do processo de germinação.

A disponibilidade de testes de vigor suficientemente sensíveis para detectar essas alterações metabólicas em suas fases iniciais é restrita. Dos testes disponíveis, poder-se-ia afirmar que o teste de condutividade elétrica é o único teste cujo princípio está diretamente relacionado à integridade das membranas celulares, medindo indiretamente o seu grau de estruturação. Atualmente, esforços com o objetivo de padronização do teste de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes de ervilha têm sido empreendidos pela pesquisa na área de ciência e tecnologia de sementes, notadamente no âmbito dos comitês internacionais da International Seed Testing Association - ISTA.

Entretanto, a recomendação de métodos adequados que permitam a hidratação das sementes, caso estas encontrem-se fora da faixa considerada adequada para a condução do teste (teor de água de 10% a 14%) necessita de aprimoramento. A ISTA recomenda dois métodos para hidratação das sementes: hidratação em substrato umedecido e hidratação em atmosfera saturada. Todavia, estudos preliminares mostram haver diferenças não apenas na velocidade de absorção de água pelas sementes entre os dois métodos, como também diferenças no ranqueamento de lotes ao utilizar os dois procedimentos.

Dessa forma, o presente trabalho teve o objetivo de estudar alterações bioquímicas e fisiológicas decorrentes da hidratação de sementes de ervilha, com ênfase na lixiviação de eletrólitos e na expressão de diferentes sistemas isoenzimáticos, procurando contribuir para o aperfeiçoamento dos métodos de hidratação de sementes a serem submetidas a testes para avaliação do seu potencial fisiológico.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Estratégias de aquisição de tolerância à dessecação

Os processos metabólicos que determinam a aquisição de tolerância à dessecação revestem-se de importância estratégica sob o ponto de vista da sobrevivência de muitas espécies vegetais, sobretudo naquelas estruturas envolvidas na dispersão da espécie, tais como sementes, esporos e pólen. Tais estruturas podem suportar a perda de 90 a 95% de seu conteúdo de água, tornando-se metabolicamente quiescentes (Kermode, 1997). No caso das sementes ortodoxas, a aquisição de tolerância à dessecação pode ser considerada um evento metabólico pré-programado, que demarca o limite entre os processos associados ao desenvolvimento das estruturas essenciais que compõem a semente e aqueles voltados para a germinação e reativação do seu metabolismo (Kermode, 1997; Nedeva e Nikolova, 1997).

Nesse sentido, tão ou mais importante do que desenvolver mecanismos de proteção que possam se contrapor às alterações decorrentes da perda de água no interior das células é desenvolver a habilidade de reparar possíveis danos que a reativação do metabolismo, desencadeada pela absorção de água nos tecidos, possa causar. Dessa forma, estratégias de aquisição de tolerância à dessecação devem envolver a habilidade em efetivamente reparar as estruturas vitais após a subsequente reidratação, bem como a capacidade em acumular substâncias protetoras que limitem a intensidade dos danos provocados pela perda de água nos tecidos (Bewley e Oliver, 1992; Ingram e Bartels, 1996; Kermode, 1997).

A principal consequência da desidratação, ao nível celular, é a aproximação entre os grupos polares dos fosfolípidios de membrana e entre as superfícies das próprias membranas celulares, gerando forças de tensão, altamente repulsivas, originárias da polarização não-aleatória das moléculas de água. Esse processo incrementa as interações

hidrofóbicas entre as cadeias de ácidos graxos que compõem os fosfolipídios de membrana, gerando alterações estruturais nas membranas celulares. Tais modificações podem culminar com a destruição parcial ou total da conformação funcional das membranas, originalmente lamelar, e com a transição de estado das mesmas, passando da fase líquido-cristalino para gel (Crowe et al., 1992).

A desestruturação do sistema de membranas celulares acarreta a perda de sua capacidade seletiva por ocasião da reidratação, comprometendo, muitas vezes, a integridade e viabilidade celulares (Simon, 1978; Crowe et al., 1992; Hoekstra et al., 1999; Hoekstra e Golovina, 1999; Bryant et al., 2001).

Assim, como as membranas celulares são consideradas o sítio primário dos danos relacionados à perda de água pelas células, adaptações na composição e/ou estrutura das mesmas são essenciais para o processo de tolerância à dessecação. Desse modo, várias estratégias adotadas para conferir maior resistência à dessecação em sementes têm sido identificadas. As mais freqüentes incluem o acúmulo de oligossacarídeos, proteínas específicas e a síntese de enzimas relacionadas à degradação e/ou reparo de proteínas anormais e à remoção de intermediários metabólicos tóxicos resultantes do metabolismo oxidativo e da peroxidação de fosfolipídios de membrana (Blackman et al., 1992; Kermode, 1997; Nedeva e Nikolova, 1997; Bryant et al., 2001).

Dentre os oligossacarídeos relacionados à proteção ao sistema de membranas durante a dessecação celular merecem destaque sacarose, maltose e aqueles pertencentes à classe da série rafinósica, como rafinose, trealose, verbascose, ajugose e estaquiose (Crowe et al., 1984; Leopold e Vertucci, 1986; Carpenter et al., 1987; Koster e Leopold, 1988; Blackman et al., 1992; Oliver et al., 1998; Bryant et al., 2001; Buitink et al., 2002; Liu et al., 2005; Halperin e Koster, 2006).

Acredita-se que a presença desses açúcares nas células durante a dessecação possa promover alterações benéficas na estrutura das membranas celulares, estabilizar proteínas através da formação de pontes de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila dos açúcares e os resíduos polares presentes nas proteínas, atuar na substituição de moléculas de água nos sítios de ligação junto às membranas ou simplesmente restringir a mobilidade das moléculas no interior das células, pela consolidação de um estado vítreo no citoplasma, minimizando possíveis reações químicas deletérias à integridade celular (Nedeva e Nikolova, 1997; Crowe et al., 1998; Oliver et al. 1998; Wolfe e Bryant, 1999; Bryant et al., 2001; Crowe et al., 2001).

O principal efeito de solutos no comportamento das membranas durante a dessecação resulta, segundo Bryant et al. (2001), simplesmente das relações hídricas predominantes nessa condição: ao aumentar a concentração de solutos no interior das células, como açúcares solúveis, aumenta-se a pressão osmótica; maior pressão osmótica resulta em menores forças de sucção sob quaisquer potenciais hídricos negativos. Dessa maneira, menos água é removida entre as membranas e, portanto, maior distância persiste entre elas, minimizando as conseqüências que sua aproximação poderia acarretar. A perda da tolerância à dessecação em sementes de soja (*Glycine max* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.) e milho (*Zea mays* L.) foi correlacionada com a diminuição no conteúdo de oligossacarídeos (estaquiose e rafinose, principalmente) em trabalho realizado por Koster e Leopold (1988). Os autores argumentam que a presença desses oligossacarídeos é necessária para evitar a cristalização das moléculas de sacarose, mantendo-as funcionais durante a dessecação das sementes, preservando as membranas celulares dos efeitos deletérios que a perda de água acarreta ao sistema.

Além do acúmulo de açúcares, a regulação da síntese e o acúmulo de proteínas específicas na fase final de desenvolvimento das sementes parecem ter papel fundamental na aquisição de tolerância à dessecação. Nesse grupo incluem-se as LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) proteínas, uma classe de proteínas hidrofílicas, abundantes na fase final de desenvolvimento de sementes ortodoxas e supostamente envolvidas em mecanismos de tolerância à dessecação (Kermode, 1997).

A expressão dos genes que codificam essas proteínas parece ser induzida tanto por fatores relacionados ao próprio desenvolvimento como por sinais ambientais. Assim, o papel das LEA proteínas parece ser fundamental tanto no processo de maturação da semente, durante sua dessecação natural, como na posterior retomada do metabolismo durante a germinação (Kermode, 1997).

As características intrínsecas dessa classe de proteínas auxiliam na proteção dos componentes celulares durante a perda de água, seja através do seqüestro de íons que tendem a se acumular em decorrência da perda de água, proteção e reparo de outras proteínas ou proteção do sistema de membranas (Kermode, 1997; Nedeva e Nikolova, 1997).

Outra alternativa visando minimizar os efeitos que a transição de fase nas membranas celulares provoca seria a utilização de ácidos graxos de cadeias mais insaturadas para a constituição dos fosfolipídios de membrana (Lynch e Steponkus, 1989). Nos últimos dez anos, um grupo minoritário de fosfolipídios de membrana vem sendo estudado nas plantas e acredita-se que uma de suas possíveis funções esteja relacionada à proteção do sistema de membranas sob condições de estresse. Trata-se dos N-AcilFosfatidiletanolaminas (NAPEs), um grupo de fosfolipídios de membrana modificados, obtidos através de uma reação de transacilação entre ácidos graxos livres e um fosfolipídio

comumente encontrado nas membranas celulares, a fosfatidiletanolamina (Moore, 1982; Chapman e Moore, 1993).

Ainda não é conhecida a função exata dos NAPes nas membranas celulares. Em animais, há evidências de que eles se acumulam nos tecidos sob condições patológicas que envolvam a degradação das membranas intracelulares (Epps et al., 1979, 1980; Natarajan et al., 1983). Estudos biofísicos demonstram o potencial dos NAPes em estabilizar a configuração em bicamada das membranas celulares (LaFrance et al., 1990; Schmid et al., 1990), notadamente em razão da presença de uma terceira cadeia carbonada adicionada ao grupo polar da fosfatidiletanolamina. Isso leva a um maior grau de hidratação da superfície das membranas e à imobilização relativa dos fosfolipídios que as compõem (LaFrance et al., 1990).

A dinâmica de síntese e degradação desses fosfolipídios de membrana, todavia, parece estar relacionada a diferentes respostas fisiológicas nos vegetais, incluindo mecanismos de defesa ao ataque de patógenos (Tripathy et al., 2003) e eventos relacionados à germinação de sementes (Shrestha et al., 2002), através da geração de moléculas derivadas dos NAPes com função sinalizadora nos vegetais. De toda forma, a precisa contribuição desse grupo de fosfolipídios aos vegetais ainda é inconclusiva. Sandoval et al. (1995) levantaram a hipótese de que a biossíntese de NAPE durante a embebição de sementes de algodão tenha a função de estabilizar as membranas intracelulares por reduzir a concentração de ácidos graxos livres, produzindo um fosfolipídio modificado que, por si só, apresenta a propriedade de estabilizar a estrutura das membranas. Esse processo, portanto, minimizaria possíveis danos por embebição. Rawyler e Braendle (2001) também levantam a possibilidade de que a síntese desses fosfolipídios de

membrana possa ter o efeito de estabilizar a estrutura das membranas em células de batata submetidas à anoxia, auxiliando na manutenção da compartimentalização subcelular.

Vale ressaltar, todavia, que o processo de aquisição de tolerância à dessecação envolve vários fatores atuando em conjunto, de modo que nem sempre o acúmulo de tais compostos, isoladamente, é capaz de conferir tolerância à perda de água. Em sementes de soja, por exemplo, existem relatos de que o acúmulo de proteínas relacionadas às LEA proteínas, nos estádios finais de maturação das sementes, não é suficiente para induzir a tolerância à dessecação. Nesse caso, um componente essencial para aquisição de tolerância à dessecação parece ser o acúmulo de açúcares solúveis pertencentes à classe da série rafínosica, particularmente estaquiose. Embora alguns autores atribuam à estaquiose o papel fisiológico de reserva de carbono durante a germinação, há evidências de que formas alternativas de carbono reduzido cumprem essa finalidade, destinando a estaquiose para proteção aos sistemas vitais contra danos provenientes da dessecação dos tecidos (Blackman et al., 1992).

2. Reativação do metabolismo embrionário

A reativação do metabolismo embrionário, levando à germinação de sementes não dormentes e viáveis, inicia-se pelo processo de absorção de água pelas sementes. A hidratação gradual dos tecidos que compõem a semente promovem o aumento da atividade respiratória, com conseqüente liberação de energia para a retomada do crescimento embrionário, além de envolver a ativação de enzimas e síntese de proteínas a partir de mRNA armazenado ao final do processo de maturação (Marcos Filho, 2005). Considerando o padrão trifásico de absorção de água durante a embebição das sementes, proposto por Bewley e Black (1978), pode-se dizer que é durante a fase II que uma semente viável ativa

sistemas de produção de energia, repara danos acumulados durante o armazenamento ou dispersão e prepara-se para o crescimento do embrião (De Castro e Hilhorst, 2004).

De acordo com Bewley e Black (1994), durante as fases iniciais da embebição, ocorre a formação de polissomos a partir de ribossomos livres, subsidiando a retomada do processo de síntese de proteínas. Grande parte dessas proteínas está relacionada aos processos de mobilização de reservas, essenciais para o crescimento do embrião.

3. Alternativas para minimizar a ocorrência de danos por embebição em sementes

Sabe-se que, no início do processo de reidratação das sementes (embebição), sempre ocorrerá efluxo de íons, até que a semente atinja a hidratação plena e consiga, através de mecanismos próprios de reparo, regular a saída de solutos para o meio. Todavia, o teor de água inicial das sementes e a temperatura na qual ocorre a reidratação são fatores cruciais determinantes da ocorrência de alterações permanentes ou transitórias na estrutura das membranas celulares (Hoekstra et al., 1999). Desse modo, mecanismos naturais, desenvolvidos ao longo do próprio processo de maturação das sementes, bem como mecanismos artificiais, aprimorados pela tecnologia de produção de sementes, podem ser encontrados com o objetivo de minimizar os efeitos adversos decorrentes da rápida reidratação das sementes.

Dentre os mecanismos naturais de prevenção à ocorrência de danos por embebição em sementes podem ser relacionados o acúmulo de açúcares solúveis no citoplasma celular durante a maturação das sementes e a alteração na composição dos fosfolipídios de membrana. Sabe-se que, no processo de dessecação, natural ou induzida, ocorre aumento gradual na temperatura de transição do estado das membranas celulares (T_m) em razão das forças de hidratação e estresses físicos impostos às membranas e macromoléculas durante a perda de água (Bryant et al., 2001).

Todavia, a presença de açúcares solúveis durante a dessecação das sementes promove o abaixamento da temperatura de transição de fase, de modo que as membranas celulares possam manter-se no estado líquido-cristalino, à temperatura ambiente, impedindo que a reidratação dos tecidos, por ocasião da germinação das sementes, ocasione danos por embebição (Oliver et al., 1998).

Além disso, a alteração da composição dos ácidos graxos presentes nos fosfolipídios de membrana, aumentando a proporção de insaturações, tende, igualmente, a reduzir a T_m dos lipídeos de membrana (Lynch e Steponkus, 1989).

Quanto aos métodos artificiais, há relatos de que a pré-hidratação das sementes, mantendo-as em equilíbrio com a fase de vapor de água, previamente à hidratação plena, reduz significativamente a ocorrência de danos por embebição. Da mesma forma, o aumento da temperatura na qual ocorre a reidratação das sementes parece ter o mesmo efeito (Hoekstra et al., 1999). A explicação para a eficácia desses métodos reside no fato de se evitar que transições do estado de gel, predominante nas sementes secas, para o estado líquido-cristalino, característico das sementes hidratadas, ocorram nas membranas celulares enquanto estas são expostas à rápida entrada de água. Desse modo, quando as sementes são colocadas em contato direto com a água, por ocasião da reidratação, as membranas já terão readquirido sua capacidade seletiva e, portanto, os danos decorrentes da rápida entrada de água serão minimizados (Simon e Raja Harun, 1972; Simon e Wiebe, 1975).

Considerando que sementes de ervilha disponíveis para a comercialização podem apresentar teor de água inferior a 9%, a condução de testes que permitam a avaliação de seu potencial fisiológico pode requerer a pré-hidratação das sementes. Nesse caso, o objetivo da pré-hidratação é evitar que a possível ocorrência de danos ao sistema de membranas celulares afete a precisão dos resultados obtidos nos testes empregados para avaliação do

potencial fisiológico das sementes, notadamente naqueles nos quais o teor de água represente característica importante, como o de condutividade elétrica e envelhecimento acelerado.

4. Importância dos íons cálcio, potássio e magnésio para o metabolismo celular

É bastante difundido o conceito de que o cálcio participa na estruturação das membranas celulares, afetando sua integridade, estabilidade e permeabilidade. De fato, o cálcio é um componente integrante das membranas celulares, mantendo a ligação entre os fosfolipídios, através de pontes de fosfato e grupos carboxílicos, o que promove os efeitos mencionados (Legge et al., 1982). Muitas das funções do cálcio como componente estrutural de macromoléculas são relacionadas à sua capacidade para coordenação, o que proporciona estabilidade e conexão intermolecular reversíveis, predominantemente nas paredes celulares e na membrana plasmática.

No caso dos sistemas de produção agrícola, esse conceito é amplamente aplicado para aumentar a eficiência das práticas de conservação e armazenamento de frutos, favorecendo a manutenção da firmeza dos tecidos e reduzindo a incidência de infecções fúngicas (Holland, 1993; Gonçalves et al., 2000). A proteção do cálcio às membranas celulares é maior sob condições adversas, como baixas temperaturas (Zsoldos e Karvaly, 1978) e anaerobiose.

Nesse sentido, o cálcio tem recebido atenção considerável, devido aos seus efeitos desejáveis no controle de desordens fisiológicas e no retardo da senescência de frutas e hortaliças. Loster (1996) verificou que a aplicação de cálcio em melão pode retardar as mudanças relacionadas à senescência dos frutos através da redução da perda de fosfolipídios de membrana, proteínas e ATPases dependentes de H^+ .

No caso dos íons potássio e magnésio, sabe-se que atuam como ativadores de vários sistemas enzimáticos, muitos deles relacionados à respiração, fotossíntese e síntese protéica. No caso de sementes, portanto, espera-se que tenham papel fundamental nas etapas iniciais da germinação, afetando a eficiência respiratória e o processo de mobilização de reservas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, da Universidade Federal de Pelotas, nos laboratórios de Análise de Sementes, Biosementes e de Solos, no período de agosto de 2005 a agosto de 2006.

Foram utilizados cinco lotes de sementes de ervilha, cultivar Axé, de tegumento rugoso e quatro lotes da cultivar Maria, de tegumento liso, cedidos pela Embrapa Hortaliças. Os lotes foram caracterizados quanto ao teor de água, germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica e emergência das plântulas em campo.

A germinação e o teor de água dos lotes foram determinados conforme as recomendações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), sendo a germinação conduzida em rolos de papel, empregando quatro amostras de 50 sementes, temperatura de 20°C e avaliações aos cinco e sete dias. O teor de água foi determinado em duas subamostras, empregando o método da estufa a $105\pm 3^{\circ}\text{C}$, por 24 horas.

A primeira contagem de germinação consistiu na avaliação da percentagem de plântulas normais obtidas no quinto dia após a instalação do teste de germinação.

Na condução do teste de envelhecimento acelerado, seguiram-se as recomendações de Marcos Filho (1999), sendo as sementes distribuídas sobre telas de alumínio, fixadas no

interior de caixas plásticas (tipo *gerbox*) contendo 40 mL de água destilada. As caixas foram fechadas e mantidas em câmara regulada a 41°C por 72 horas. Após esse período, as sementes foram colocadas para germinar conforme metodologia descrita anteriormente, computando-se a percentagem de plântulas normais no quinto dia após a instalação do teste.

No teste de condutividade elétrica, quatro subamostras de 50 sementes de cada lote foram pesadas, colocadas em copos plásticos de volume 500 mL, imersas em 250 mL de água deionizada e mantidas a 20°C durante 24 horas, conforme recomendações da ISTA (2004), sem, no entanto, ajustar o teor de água das sementes para a faixa de 10-14%. Após esse período, determinou-se a condutividade elétrica da solução, utilizando um condutivímetro. Os resultados foram expressos em $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de sementes.

Para a emergência de plântulas em campo, quatro subamostras de 100 sementes de cada lote foram semeadas em sulcos de quatro metros de comprimento e 0,05 metro de profundidade, cobertas com uma fina camada de solo. A avaliação foi realizada aos 10 dias após a semeadura, computando-se o número de plântulas emergidas.

Amostras de sementes de cada lote foram submetidas a dois métodos de hidratação, até atingirem três teores de água (10, 12 e 14%), monitorados pelo ganho de massa, resultando 30 tratamentos para a cultivar Axé (2 métodos de hidratação x 3 níveis de umidade x 5 lotes) e 24 tratamentos para a cultivar Maria (2 métodos de hidratação x 3 níveis de umidade x 4 lotes). Os métodos de hidratação foram os seguintes:

- Hidratação em substrato umedecido - as sementes foram mantidas entre quatro folhas de papel germitest, umedecidas com quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes a sua massa, formando-se rolos semelhantes àqueles confeccionados para condução do teste de germinação, a 20°C, até atingirem os teores de água desejados;

- Hidratação em atmosfera saturada - as sementes foram colocadas sobre telas de alumínio, fixadas no interior de caixas plásticas (tipo *gerbox*), contendo 40 mL de água destilada no fundo, mantidas em câmara a 20°C, até atingirem os teores de água desejados.

O teor de água das sementes foi monitorado através da fórmula $P_i (100 - U_i) = P_f (100 - U_f)$, onde:

P_i e P_f correspondem aos pesos inicial e final das amostras, respectivamente;

U_i e U_f correspondem às umidades inicial e final das amostras, respectivamente.

Após a hidratação das sementes, foram retiradas amostras destinadas à condução dos testes de condutividade elétrica, lixiviação de potássio, cálcio e magnésio, envelhecimento acelerado e à caracterização do padrão de expressão dos sistemas isoenzimáticos Malato Desidrogenase (MDH), Fosfatase Ácida (FAC), Glutamato Desidrogenase (GDH) e Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT).

Os testes de condutividade elétrica e envelhecimento acelerado foram conduzidos conforme descrito anteriormente.

Para a determinação da lixiviação de potássio, cálcio e magnésio, quatro amostras de 25 sementes foram imersas em 125 mL de água deionizada, a 20°C, por seis horas. O teor de potássio foi determinado por espectrofotometria de chama, a partir de alíquotas de 1 mL retiradas da água de imersão das sementes e diluídas em 5 mL de água destilada. Os teores de cálcio e magnésio foram determinados diretamente na água de imersão das sementes, por espectrofotometria de absorção atômica. Os resultados foram expressos em mg de cada íon por litro de solução ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

O período de seis horas de imersão das sementes foi definido com base em trabalhos anteriores, realizados com sementes de soja e ervilha, nos quais estabeleceu-se que, após

cinco horas de imersão das sementes em água, completa-se o processo de absorção de água das sementes, estando os cotilédones e eixo embrionário completamente hidratados (Parrish e Leopold, 1977; Duke e Kakefuda, 1981; Pietrzak et al., 2002).

Para a caracterização do padrão de expressão isoenzimático, quatro amostras de 25 sementes de cada tratamento foram imersas em 125 mL de água deionizada, a 20°C, por seis horas, conforme Duke e Kakefuda (1981). Posteriormente, os eixos embrionários de cada uma das 25 sementes foram removidos, macerados em *gral* de porcelana sobre cubos de gelo e imersos na solução extratora (tampão do gel - 9 partes de tris-citrato 0,2M, pH 8,3 e 1 parte de borato de lítio 0,2M, pH 8,3 - + 0,15% de 2-mercaptoetanol), na proporção 1:3 (p.v⁻¹), permanecendo 18 horas em refrigerador. As amostras foram posteriormente centrifugadas por cinco minutos e, do sobrenadante, 25 µL foram aplicados em gel de poliacrilamida 6%. Foram realizadas quatro réplicas, para cada uma das amostras. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida vertical, no sistema tampão contínuo, conforme descrito por Scandális (1969), com diferença de potencial de 10 V cm⁻¹, em câmara fria, a 4°C, por período suficiente para que a linha de frente formada pelo azul de bromofenol atingisse a parte inferior do gel. Foram empregados os sistemas de revelação citados por Alfenas (1998), para as enzimas Malato Desidrogenase, Glutamato Oxalacetato Transaminase e Glutamato Desidrogenase e o sistema proposto por Scandális (1969) para a enzima Fosfatase Ácida. Os resultados foram interpretados baseando-se na análise visual dos géis de eletroforese, levando em consideração a presença/ausência e a intensidade das bandas formadas.

Para a caracterização dos lotes, os dados de germinação, primeira contagem de germinação, emergência de plântulas em campo, envelhecimento acelerado, condutividade

elétrica e lixiviação de cálcio, potássio e magnésio foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (lotes) para a cultivar Maria e cinco tratamentos para a cultivar Axé. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Para cada cultivar, os dados relativos aos efeitos dos teores de água e sua interação com os lotes e os métodos de hidratação foram submetidos à análise de variância utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com quatro lotes, três teores de água e dois métodos de hidratação, para a cultivar Maria e cinco lotes, três teores de água e dois métodos de hidratação, para a cultivar Axé. As médias foram analisadas por regressão polinomial, ao nível de 5% de probabilidade ou comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, conforme o caso.

Os dados de germinação, primeira contagem de germinação, emergência de plântulas em campo e envelhecimento acelerado foram transformados em $\arcsen (\%/100)^{1/2}$. Nas tabelas, foram apresentados os dados originais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Caracterização dos lotes

Na Tabela 1, são apresentados os resultados de teor de água, germinação, primeira contagem de germinação, emergência de plântulas em campo, envelhecimento acelerado e condutividade elétrica, utilizados para caracterizar o potencial fisiológico dos lotes de sementes de ervilha avaliados no presente trabalho. Conforme observado, embora os lotes apresentem diferenças quanto ao potencial fisiológico, seus teores de água foram similares, variando de 8,2% a 8,7%, na cultivar Axé, e de 8,4% a 8,7% na cultivar Maria. Da mesma forma, a germinação dos lotes também foi semelhante, variando de 94% a 96%, na cultivar

Maria e de 87% a 96%, na cultivar Axé, sendo similares os lotes A, B, C e D e o lote E, inferior ao lote D.

Verificou-se que, dos testes empregados para avaliação do potencial fisiológico dos lotes de sementes de ervilha, cultivar Axé, os de envelhecimento acelerado e emergência de plântulas em campo possibilitaram classificar os lotes em níveis de vigor, separando-os em lotes de alto (lote D), médio (lotes B, C e E) e baixo (lote A) potencial fisiológico. Para a cultivar Maria, os resultados do teste de emergência de plântulas evidenciaram a superioridade do lote F relativamente aos lotes G e H, sendo o lote I considerado como de potencial fisiológico intermediário. O teste de condutividade elétrica, por outro lado, possibilitou apenas a separação do lote H, considerado de menor potencial fisiológico, relativamente aos demais.

TABELA 1. Médias do teor de água (TA), germinação (G), primeira contagem do teste de germinação (PC), emergência de plântulas em campo (EC), envelhecimento acelerado (EA) e condutividade elétrica (CE) de diferentes lotes de sementes de ervilha de duas cultivares. Pelotas/RS, 2006.

CULTIVAR	LOTES	TA (%)	G (%)	PC (%)	EC (%)	EA (%)	CE ($\mu\text{S. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)
Axé	A	8,3	95 ab	88 a	54 d	64 c	28,51 c
	B	8,5	94 ab	86 a	74 b	83 b	16,12 a
	C	8,7	89 ab	80 a	66 c	74 bc	20,78 b
	D	8,4	96 a	86 a	86 a	94 a	15,64 a
	E	8,2	87 b	84 a	67 c	76 bc	19,24 ab
CV (%)			5,31	5,44	7,38	7,48	8,39
Maria	F	8,6	94 a	93 a	83 a	91 a	16,50 a
	G	8,7	94 a	90 a	77 b	86 a	16,28 a
	H	8,4	94 a	90 a	78 b	88 a	18,84 b
	I	8,4	96 a	94 a	80 ab	91 a	14,72 a
CV (%)			4,99	4,53	6,91	6,34	6,26

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, para cada cultivar, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2. Classificação dos lotes, em níveis de vigor, baseada no teste de condutividade elétrica, após diferentes métodos de pré-hidratação das sementes

As regras internacionais para análise de sementes estabelecem que, para a condução do teste de condutividade elétrica em ervilha, o teor de água das sementes encontre-se entre 10% e 14% (ISTA, 2004). Todavia, sabe-se que, para algumas regiões produtoras de sementes de ervilha no Brasil, notadamente o Centro-Oeste, é possível encontrar lotes de sementes prontos para a comercialização com teores de água inferiores a 10%, dadas as condições climáticas predominantes na região. Nesses casos, a adoção do teste de condutividade elétrica para avaliação do potencial fisiológico de lotes ficaria condicionada à prévia hidratação das sementes.

Considerando os resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3, em que se avaliou o comportamento de lotes de sementes de ervilha submetidos a diferentes métodos de hidratação previamente à condução do teste de condutividade elétrica, observou-se que, para a cultivar Axé, de tegumento rugoso, houve diferença na classificação dos lotes dependendo tanto do método de pré-hidratação empregado (atmosfera saturada ou substrato umedecido), como dos teores de água dentro de cada método (Tabela 2). Para a cultivar Maria, entretanto, as diferenças na classificação dos lotes foram independentes dos métodos de pré-hidratação empregados, diferindo apenas quanto ao teor de água das sementes (Tabela 3).

O fato de o método empregado para hidratar as sementes ter afetado de forma distinta as duas cultivares pode ser o reflexo das peculiaridades de cada uma delas quanto à sua composição química e características morfo-anatômicas relacionadas aos tecidos da própria semente, notadamente o tegumento. Desse modo, verificou-se que o método de pré-hidratação empregado não provocou diferenças na classificação dos lotes de sementes da

cultivar Maria, quanto ao potencial fisiológico, sendo afetado apenas pelos teores de água alcançados pelas amostras previamente à execução do teste de condutividade elétrica. Nesse caso, verificou-se que a hidratação das sementes até teores de água de 12 a 14%, previamente à execução do teste de condutividade elétrica, promoveu classificação dos lotes semelhante à obtida sem a hidratação das sementes (Tabelas 1 e 3).

TABELA 2. Médias da condutividade elétrica da água de imersão de cinco lotes de sementes de ervilha, cultivar Axé, previamente submetidas à hidratação em atmosfera saturada e substrato umedecido até atingirem teores de água de 10, 12 e 14%. Pelotas/RS, 2006.

Lotes	Atmosfera Saturada			Substrato Umedecido		
	10%	12%	14%	10%	12%	14%
	----- $\mu\text{S. cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ -----					
A	26,76 c	29,42 c	26,12 c	29,14 c	26,78 c	24,08 c
B	24,03 bc	21,37 b	20,78 b	19,70 ab	21,09 b	18,16 b
C	21,18 b	20,17 b	18,60 ab	21,15 b	19,77 ab	18,66 b
D	17,80 a	16,62 a	15,64 a	17,10 a	17,28 a	15,00 a
E	22,77 b	16,44 a	16,77 a	21,28 b	17,50 a	16,48 ab
CV (%)	7,48					

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Todavia, a hidratação das sementes até o teor de água de 10%, previamente à condução do teste de condutividade elétrica, alterou completamente a classificação dos lotes, quanto ao nível de vigor, comparativamente aos resultados obtidos no teste de condutividade elétrica sem a realização da pré-hidratação das sementes. Essa classificação foi, contudo, semelhante à obtida no teste de emergência de plântulas.

No caso da cultivar Axé, a realização do teste de condutividade elétrica após o ajuste do teor de água das sementes para 10%, empregando substrato umedecido, permitiu a obtenção de resultados muito semelhantes aos do teste de emergência de plântulas, separando lotes de alto (lote D), médio (lotes B, C e E) e baixo (lote A) potencial fisiológico (Tabela 2).

TABELA 3. Médias da condutividade elétrica da água de imersão de quatro lotes de sementes de ervilha, cultivar Maria, previamente submetidas à hidratação em atmosfera saturada e substrato umedecido até atingirem teores de água de 10, 12 e 14%. Pelotas/RS, 2006.

Lotes	10%	12%	14%
	----- $\mu\text{S. cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ -----		
F	20,00 b	16,87 ab	15,53 a
G	19,16 b	16,08 a	15,57 a
H	19,63 b	17,38 b	16,86 b
I	17,24 a	15,72 a	14,95 a
CV (%)	5,53		

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nos gráficos que apresentam a tendência da condutividade elétrica e do teor de potássio da água de imersão de sementes de ervilha em função da pré-hidratação das sementes até diferentes teores de água, foram apresentados apenas os resultados mais significativos de cada cultivar, representativos do padrão observado nos demais lotes.

Os gráficos apresentados na Figura 1, referentes à condutividade elétrica da água de imersão de sementes de ervilha submetidas à pré-hidratação utilizando dois métodos até alcançarem diferentes teores de água, demonstraram haver decréscimo da condutividade elétrica conforme incrementou-se o teor de água das sementes previamente à condução do teste. Isso pode ser explicado pelo maior grau de estruturação do sistema de membranas celulares quando as sementes atingiram maior nível de hidratação, independentemente do método empregado. A melhor estruturação das membranas celulares, por sua vez, tende a limitar a lixiviação de íons e outras substâncias presentes no interior das sementes, reduzindo a condutividade elétrica da água de imersão (Parrish e Leopold, 1977).

Segundo Simon e Raja Harun (1972), quanto mais água é absorvida através da pré-hidratação das sementes, menor a lixiviação observada quando elas são imersas diretamente em água. De forma semelhante, Simon e Wiebe (1975) afirmaram que embriões

previamente hidratados, empregando tanto substrato umedecido como vapor de água, apresentaram menor lixiviação ao serem imersos em água. Além disso, verificou-se, entre as duas cultivares estudadas, maiores valores de condutividade elétrica para a cultivar Axé, de tegumento rugoso, em relação à cultivar Maria, de tegumento liso (Tabelas 2 e 3 e Figura 1). Nesse sentido, vários trabalhos têm associado a lixiviação de substâncias intracelulares durante a embebição de sementes com o seu desempenho em campo (Bramlage et al., 1978 e 1979; Duke et al., 1986; Shephard e Naylor, 1996; Miguel e Marcos Filho, 2002). A razão para essa associação não está totalmente elucidada, mas os progressos obtidos até o momento apontam que a maior lixiviação de exsudatos pode refletir um quadro geral de deterioração dos tecidos da semente, além de constituírem substrato favorável ao desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Pode ser, ainda, que a presença de grande quantidade de exsudatos seja o reflexo de um processo de ruptura celular ocasionada pela rápida embebição de água pelas sementes, o que também criaria sítios favoráveis ao ataque de patógenos (Duke et al., 1986).

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem a possibilidade de haver discrepâncias entre resultados obtidos pelo teste de condutividade elétrica ao utilizá-lo com a finalidade de classificar lotes de sementes de ervilha quanto ao potencial fisiológico, dependendo do procedimento adotado para a pré-hidratação das sementes, caso seja necessário. Essa ocorrência implica a necessidade de condução de estudos adicionais que subsidiem a escolha de um método padronizado relacionado à hidratação de sementes a serem submetidas ao teste de condutividade elétrica e mesmo a outros testes nos quais o teor de água das amostras represente característica importante na obtenção dos resultados.

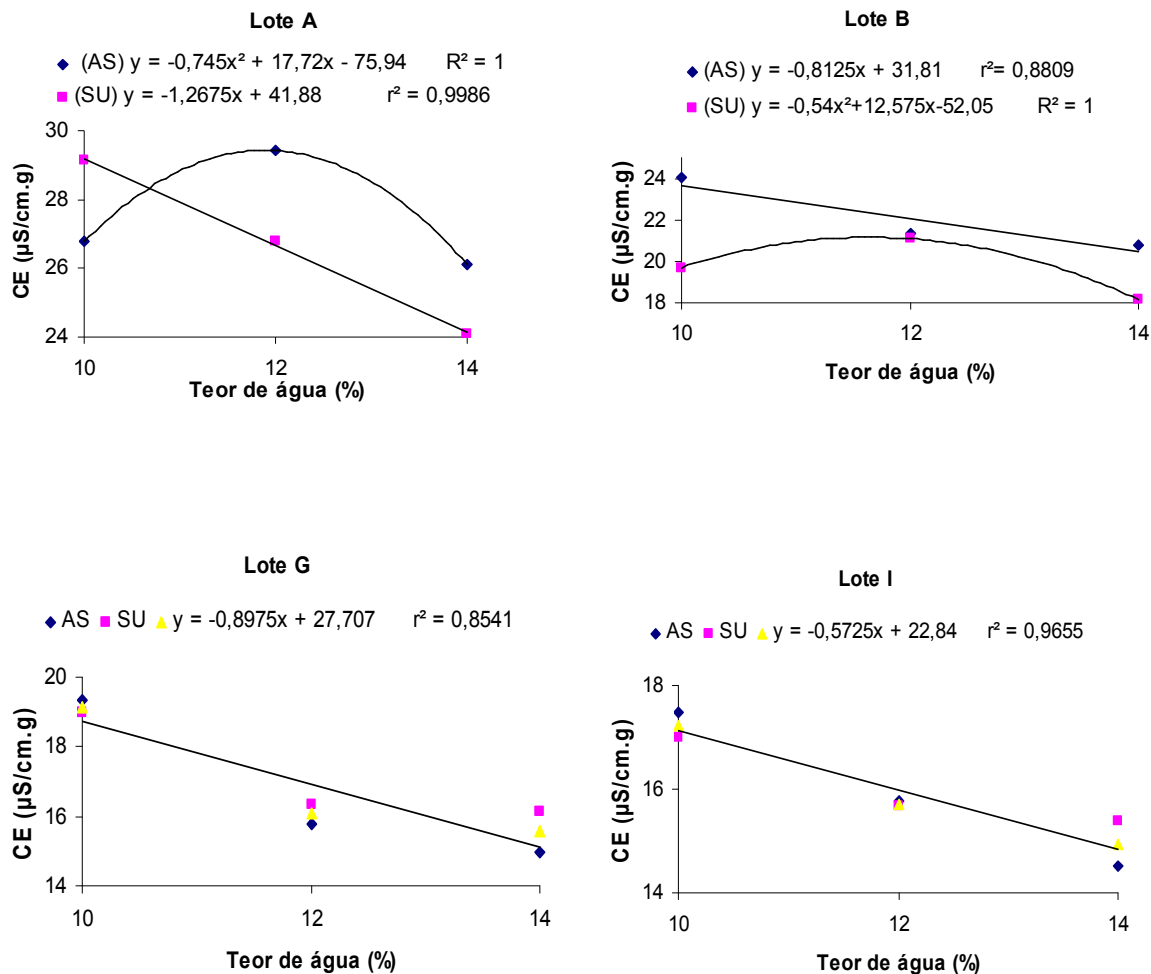


FIGURA 1. Condutividade elétrica da água de imersão de sementes de ervilha, cultivares Axé (lotes A e B) e Maria (lotes G e I), submetidas à hidratação empregando atmosfera saturada (AS) e substrato umedecido (SU) até atingirem diferentes teores de água. Pelotas/RS, 2006.

3. Lixiviação de cálcio, potássio e magnésio após a pré-hidratação das sementes

Durante as seis horas de imersão das sementes em água, a quantidade de cálcio lixiviada não pôde ser detectada por encontrar-se abaixo do limite de detecção do método empregado. É possível que, devido ao maior raio atômico, os íons de cálcio tenham apresentado maior dificuldade em transpor as membranas celulares, o que limitou a sua concentração na água após a imersão das sementes.

Considerando a lixiviação de potássio, a concentração desse íon na água de imersão das sementes, após seis horas, variou, na cultivar Axé, de 26,90 a 59,06 mg . L⁻¹ e de 16,74 a 25,78 mg . L⁻¹, na cultivar Maria (Tabela 4). Para a lixiviação de magnésio, esses valores variaram, na cultivar Axé, de 0,51 a 0,77 mg . L⁻¹ e de 0,07 a 0,35 mg . L⁻¹, na cultivar Maria (Tabela 5).

A lixiviação de potássio como critério para a classificação dos lotes em níveis vigor só foi eficiente para a cultivar Axé. Nesse caso, foi possível confirmar a classificação dos lotes obtida através dos resultados do teste de emergência de plântulas, sendo necessário o ajuste do teor de água das sementes para 10 e 12%, empregando atmosfera saturada (Tabela 4).

Os resultados obtidos no presente trabalho resultantes da lixiviação de potássio e magnésio (Tabelas 4 e 5) e refletidos na condutividade elétrica da solução de imersão das sementes (Tabelas 2 e 3), permitiriam prever desempenho inferior das sementes da cultivar Axé em relação à cultivar Maria. Isso foi confirmado ao comparar o desempenho relativo das sementes das duas cultivares nos testes de germinação e emergência de plântulas em campo. Nesse caso, a germinação da cultivar Axé foi mais intensamente afetada, comparativamente à cultivar Maria, na qual ocorreu redução média de 15 pontos percentuais entre a germinação e a emergência de plântulas em campo, e de 22,8 pontos percentuais, na cultivar Axé (Tabela 1).

Em um estudo comparativo da lixiviação de metabólitos durante a embebição de sementes de diferentes genótipos de milho doce, Wann (1986) encontrou maiores valores de condutividade elétrica para os genótipos que apresentavam o pericarpo mais enrugado. O autor sugeriu que, quanto mais enrugado o pericarpo, maior a suscetibilidade a danos mecânicos durante as etapas de produção e beneficiamento dessas sementes.

TABELA 4. Teor de potássio (K^+) da água de imersão de sementes de ervilha, lotes de duas cultivares, previamente submetidas à hidratação em atmosfera saturada e substrato umedecido até atingirem teores de água de 10, 12 e 14%. Pelotas/RS, 2006.

Cultivar	Lotes	Atmosfera Saturada			Substrato Umedecido		
		10%	12%	14%	10%	12%	14%
-----mg . L ⁻¹ K ⁺ -----							
Axé	A	45,75 d	48,46 d	50,39 c	59,06 c	50,00 d	48,65 c
	B	41,70 c	37,26 c	36,68 a	37,07 b	36,10 c	37,84 b
	C	31,50 ab	31,70 b	41,75 b	29,42 a	31,50 b	37,88 b
	D	29,57 a	27,66 a	37,47 a	30,21 a	30,16 ab	36,29 b
	E	33,48 b	28,16 ab	34,64 a	29,03 a	26,90 a	31,16 a
CV (%)				5,19			
Maria	F	22,87 b	18,47 a	21,55 b	20,96 b	21,84 b	20,52 a
	G	24,24 b	22,21 b	25,78 c	22,61 b	22,31 b	25,58 b
	H	17,81 a	16,74 a	19,71 ab	18,25 a	18,10 a	20,04 a
	I	18,39 a	17,66 a	17,51 a	18,39 a	17,66 a	19,70 a
CV (%)				6,57			

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, para cada cultivar, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 5. Teor de magnésio (Mg^{++}) da água de imersão de sementes de ervilha, lotes de duas cultivares, previamente submetidas à hidratação em atmosfera saturada e substrato umedecido até atingirem teores de água de 10, 12 e 14%. Pelotas/RS, 2006.

Cultivar	Lotes	Atmosfera Saturada			Substrato Umedecido		
		10%	12%	14%	10%	12%	14%
-----mg . L ⁻¹ Mg ⁺⁺ -----							
Axé	A	0,60 ab	0,56 a	0,66 bc	0,70 a	0,53 ab	0,56 a
	B	0,75 c	0,58 a	0,51 a	0,66 a	0,52 a	0,59 a
	C	0,66 abc	0,57 a	0,59 ab	0,62 a	0,60 ab	0,62 a
	D	0,71 bc	0,56 a	0,67 bc	0,70 a	0,62 ab	0,51 a
	E	0,55 a	0,65 a	0,73 c	0,68 a	0,64 b	0,77 b
CV (%)		9,41					
Maria	F	0,35 c	0,17 b	0,16 b	0,19 c	0,22 b	0,15 b
	G	0,27 b	0,20 b	0,27 c	0,19 c	0,20 b	0,24 c
	H	0,11 a	0,12 a	0,08 a	0,08 a	0,08 a	0,14 b
	I	0,10 a	0,07 a	0,08 a	0,13 b	0,09 a	0,07 a
CV (%)		17,18					

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, para cada cultivar, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No caso das sementes de ervilha, sabe-se que as diferenças entre os genótipos que apresentam o tegumento rugoso e os que apresentam o tegumento liso são decorrentes de alterações gênicas que afetam tanto a taxa de síntese quanto a qualidade e estrutura do amido produzido durante o desenvolvimento embrionário. Assim, nas sementes de tegumento rugoso, os grânulos de amido apresentam-se menores e profundamente fissurados, relativamente às sementes de tegumento liso, além do amido apresentar maior conteúdo de amilose em relação à amilopectina (Bhattacharyya et al., 1990). A mutação no gene que confere o caráter rugoso ou liso das sementes de ervilha resulta na redução da atividade de enzimas envolvidas na ramificação do amido, levando à redução na taxa de síntese do próprio amido e, conseqüentemente, ao acúmulo de metabólitos situados no início da rota, como a sacarose. O aumento na concentração de sacarose, por sua vez, resulta em maior potencial osmótico, o que conduz à maior absorção de água ao longo do desenvolvimento das sementes. Como resultado, observa-se maior relação entre o peso fresco e o peso seco das sementes e maior volume e tamanho médio das células. Isso leva à maior deformação dos tecidos que compõem o tegumento, notadamente a testa, após a perda de água no processo de maturação das sementes (Smith e Denyer, 1992). Além disso, o aumento no conteúdo de sacarose interfere em outras rotas metabólicas, como aquelas relacionadas à síntese de proteínas de reserva e de lipídios.

Dessa forma, nos genótipos de tegumento rugoso, pode ser que maiores teores de açúcares solúveis presentes nas sementes por ocasião da dessecação ao final do processo de maturação provoquem maior rapidez na saída de água das sementes e menor aderência do tegumento aos cotilédones, aumentando não somente a suscetibilidade das sementes aos danos mecânicos durante a produção e beneficiamento, mas conferindo-lhes, por si só, menor potencial fisiológico inicial. A maior suscetibilidade das sementes da cultivar Axé a

danos mecânicos pode resultar em maior incidência de rompimentos e fissuras no tegumento o que, segundo Duke et al. (1986), em sementes de soja, acarreta maior suscetibilidade à ocorrência de danos por embebição e menor sobrevivência das plântulas.

Nesse sentido, pode-se afirmar que as sementes da cultivar Axé, cujo desempenho fisiológico mostrou-se inferior ao das sementes da cultivar Maria, apresentaram-se mais sensíveis em relação aos métodos empregados para promover sua hidratação previamente à condução do teste de condutividade elétrica, sendo afetadas de forma diferenciada conforme o método adotado.

Como a principal diferença entre os dois métodos utilizados, quanto aos efeitos, evidencia-se na velocidade de entrada de água nas sementes, observa-se que esta é uma característica importante a ser considerada no estabelecimento do método mais adequado para promover a pré-hidratação das sementes, uma vez que aquelas que apresentem diferenças no potencial fisiológico tendem a se comportar de maneira distinta ao sofrerem diferentes taxas de absorção de água.

Essa premissa já foi anteriormente considerada por Rodrigues et al. (2006) ao investigarem a influência de tratamentos de pré-hidratação em sementes de soja na eficiência do teste de condutividade elétrica. Do mesmo modo, de acordo com Marcos Filho (2005), sementes mais vigorosas conseguem reestruturar mais rápida e eficientemente seu sistema de membranas na fase inicial do processo de hidratação comparativamente às sementes com maior grau de deterioração. Para Vertucci (1989), a ocorrência de estresses durante a embebição das sementes interfere no restabelecimento das organelas celulares, podendo levar ao sucesso ou ao fracasso da germinação.

A rápida entrada de água em sementes que apresentam baixo teor de água pode desencadear alterações na conformação e estrutura do sistema de membranas celulares que

podem ser transitórias ou permanentes, dependendo da intensidade dos danos (Hoekstra et al., 1999).

Para Marcos Filho (2005), diferenças muito acentuadas entre os potenciais hídricos das sementes e do substrato podem acarretar problemas sérios, devido à entrada muito rápida de água nas sementes, especialmente nas menos vigorosas, ocasionando os danos por embebição, ou seja, a liberação de grandes quantidades de exsudatos e ruptura da estrutura celular. Segundo o autor, as sementes com teores de água inferiores a 11% seriam mais sensíveis a esses danos.

Nesse sentido, é possível que, em genótipos naturalmente mais suscetíveis ao dano por embebição, seja preferível que a hidratação das sementes previamente à condução do teste de condutividade elétrica ocorra mais lentamente, de modo que o sistema de membranas tenha tempo hábil para a reparação de possíveis danos pré-existentes e o restabelecimento de sua integridade e funcionalidade, capacitando a semente para a retomada do crescimento após ganhos adicionais de água ao longo do processo germinativo.

4. Classificação dos lotes, em níveis de vigor, baseada no teste de envelhecimento acelerado, após diferentes métodos de pré-hidratação das sementes

Sabendo que os resultados do teste de envelhecimento acelerado também podem ser afetados pelo teor de água das amostras (Marcos Filho, 1999), o desempenho das sementes, após a pré-hidratação, foi avaliado pelo teste de envelhecimento acelerado (Tabela 6).

Verificou-se que, para a cultivar Axé, a pré-hidratação das sementes melhorou a eficiência do teste de envelhecimento acelerado do ponto de vista da classificação dos lotes quanto ao seu potencial fisiológico (Tabela 6). Entretanto, essa melhoria foi dependente tanto do método de pré-hidratação empregado, quanto do teor de água das sementes. O

emprego de atmosfera saturada para promover a pré-hidratação das sementes até o teor de água de 10% permitiu classificar os lotes em níveis de alto (lote D), médio (lotes B, C e E) e baixo (lote A) potencial fisiológico, de modo semelhante aos resultados obtidos no teste de emergência de plântulas (Tabela 1) e condutividade elétrica (Tabela 2). Todavia, tal método de pré-hidratação, até o teor de água de 10%, não possibilitou a diferenciação dos lotes B, C e E, previamente evidenciada no teste de emergência de plântulas.

TABELA 6. Dados médios do teste de envelhecimento acelerado de sementes de ervilha, lotes de duas cultivares, previamente submetidas à hidratação em atmosfera saturada e substrato umedecido, até atingirem teores de água de 10, 12 e 14%. Pelotas/RS, 2006.

Cultivar	Lotes	Atmosfera Saturada			Substrato Umedecido		
		10%	12%	14%	10%	12%	14%
----- % -----							
Axé	A	1 c	7 c	5 c	5 e	5 d	1 d
	B	56 b	60 a	42 b	37 c	26 c	35 c
	C	51 b	33 b	31 b	21 d	20 c	26 c
	D	79 a	59 a	60 a	77 a	75 a	70 a
	E	57 b	57 a	58 a	65 b	51 b	55 b
CV (%)		10,09					
Maria	F	63 c	70 b	59 c	73 a	57 b	49 b
	G	73 bc	86 a	86 a	83 a	79 a	68 a
	H	87 a	90 a	78 ab	73 a	74 a	58 ab
	I	77 ab	85 a	73 b	76 a	53 b	54 ab
CV (%)		7,74					

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, para cada cultivar, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao pré-hidratar as sementes empregando substrato umedecido até o teor de água de 10%, ocorreu completa separação entre os lotes, resultando cinco classes de sementes, quanto ao potencial fisiológico (Tabela 6). Nesse caso, parece que a rápida, porém limitada entrada de água nas sementes, não foi suficiente para promover a reestruturação do sistema interno de membranas, ocasionando diferenças acentuadas entre os lotes, do ponto de vista

do seu desempenho no teste de envelhecimento acelerado, o que se refletiu na separação dos lotes nas diferentes classes de vigor. Por outro lado, nos casos em que as sementes atingiram teores mais elevados de água, até 12 e 14%, a classificação dos lotes quanto ao potencial fisiológico foi muito semelhante àquela obtida após a pré-hidratação das sementes em atmosfera saturada ou no teste de condutividade elétrica (Tabela 2).

A hidratação das sementes previamente à condução do teste de envelhecimento acelerado não favoreceu a eficiência do teste, quando aplicado à cultivar Maria (Tabela 6).

5. Expressão dos sistemas isoenzimáticos

Da mesma forma que para os gráficos de condutividade elétrica e lixiviação de potássio, apenas os perfis eletroforéticos dos lotes que apresentaram os resultados mais significativos foram apresentados, representando o padrão observado nos demais lotes, de cada cultivar.

Dos quatro sistemas isoenzimáticos estudados, apenas os sistemas enzimáticos Fosfatase Ácida e Malato Desidrogenase proporcionaram bons resultados. Para os sistemas Glutamato Desidrogenase e Glutamato Oxalacetato Transaminase, as revelações dos géis resultaram figuras pouco nítidas devido à má definição das bandas formadas.

Considerando o sistema isoenzimático Malato Desidrogenase, verificou-se que não ocorreram alterações na expressão isoenzimática resultantes da pré-hidratação das sementes, tanto em relação aos métodos empregados, quanto aos teores de água alcançados ao final de cada um deles, para as duas cultivares (Figuras 3 e 4). A malato desidrogenase é uma enzima ativada principalmente durante o processo de respiração celular, regenerando uma molécula de oxalacetato a partir da oxidação de uma molécula de malato, mantendo ativo o fluxo oxidativo durante o ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs), característico de uma das etapas do processo respiratório. Durante a germinação de sementes, essa enzima

também atua no processo de gliconeogênese, responsável pela geração de sacarose a partir de triacilgliceróis presentes no interior dos oleossomos, nos tecidos de reserva da semente.

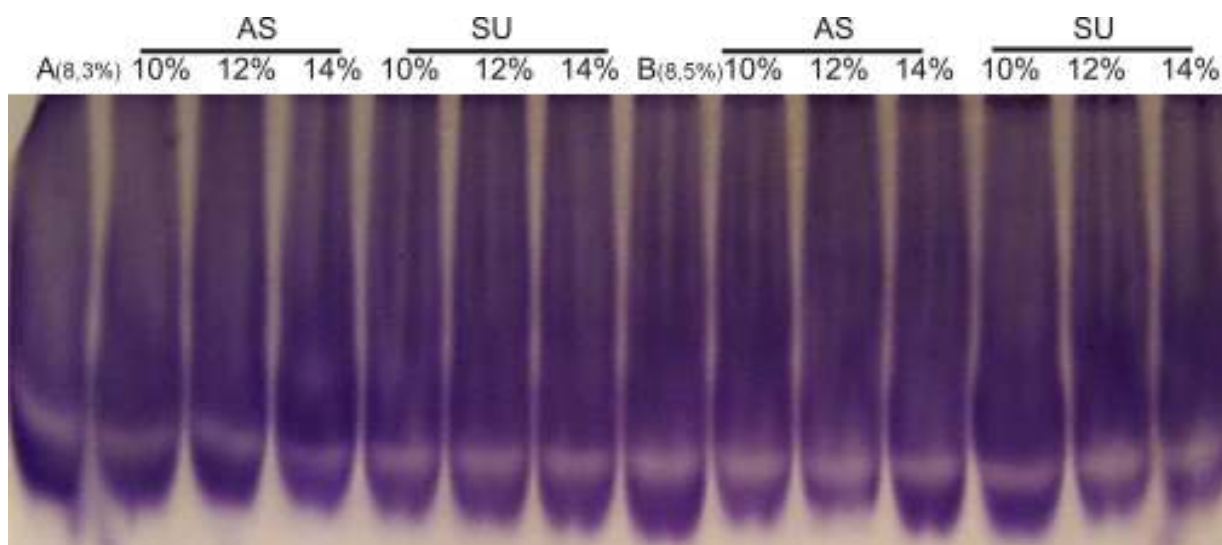


FIGURA 3. Padrão eletroforético de sementes de ervilha, cultivar Axé, lotes A e B, para o sistema enzimático Malato Desidrogenase, após hidratação em atmosfera saturada (AS) e substrato umedecido (SU) até teores de água de 10, 12 e 14%. A(8,3%) e B(8,5%): sementes não hidratadas dos lotes A e B, respectivamente. Pelotas/RS, 2006.

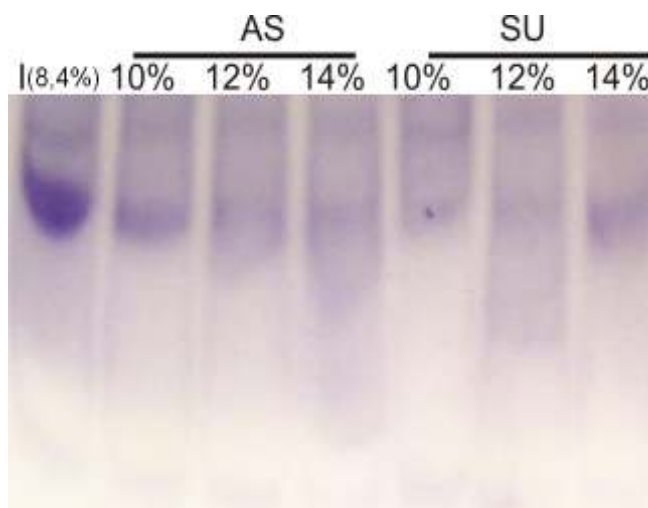


FIGURA 4. Padrão eletroforético de sementes de ervilha, cultivar Maria, lote I, para o sistema enzimático Malato Desidrogenase, após hidratação em atmosfera saturada (AS) e substrato umedecido (SU) até teores de água de 10, 12 e 14%. I(8,4%): sementes não hidratadas do lote I. Pelotas/RS, 2006.

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, observou-se que a pré-hidratação de sementes de ervilha empregando atmosfera saturada ou substrato umedecido até teores de água de 10% a 14% não foi suficiente para provocar alterações acentuadas na atividade da malato desidrogenase, após seis horas de imersão das sementes em água. Isso sugere que a mobilização de reservas durante as fases iniciais do processo germinativo e a taxa respiratória das sementes nesse período provavelmente não foram afetadas pelos diferentes métodos de pré-hidratação empregados, uma vez que, segundo Nawa e Asahi (1971), após seis horas de embebição, a atividade respiratória nas mitocôndrias dos cotilédones de sementes de ervilha equivale a 80% da atividade máxima registrada durante a fase de embebição das sementes. De acordo com esses autores, a atividade de algumas enzimas relacionadas à respiração celular, como a citocromo c oxidase, aumenta rapidamente durante as seis primeiras horas de embebição, quando atinge seu nível máximo. Para eles, é provável que as mitocôndrias passem por um processo de maturação durante a embebição das sementes, caracterizado pelo desenvolvimento de mitocôndrias funcionais a partir de estruturas vesiculares imaturas pré-existentes e pela incorporação de enzimas pré-sintetizadas.

Da mesma forma, Sato e Asahi (1975) relataram a ocorrência de alterações estruturais nas mitocôndrias celulares em sementes de ervilha, durante a embebição. Para os autores, nas sementes secas parecem co-existir mitocôndrias em pelo menos três estádios de desenvolvimento, que evoluem para mitocôndrias parcialmente maduras, dentro das seis primeiras horas de embebição. A estruturação das membranas mitocondriais não requer a síntese *de novo* de proteínas, mas ocorre a partir da mobilização de proteínas pré-existentes que são encaminhadas para as membranas mitocondriais em formação.

A fosfatase ácida, por sua vez, é uma enzima relacionada a processos deteriorativos em sementes, como a desestruturação do sistema de membranas celulares (Carvalho et al., 2000; Spinola et al., 2000; Santos et al., 2005). A análise visual dos géis de eletroforese obtidos no presente trabalho permitiu observar que, para a cultivar Axé, a intensidade na expressão desse sistema enzimático foi geralmente maior ao empregar o método de substrato umedecido para a pré-hidratação das sementes, conforme se observou nos lotes C e E (Figura 5). Contrariamente, em alguns lotes avaliados, o emprego de atmosfera saturada com o mesmo intuito reduziu a intensidade das bandas formadas, indicando que esse método parece ter sido benéfico, do ponto de vista da reestruturação do sistema de membranas, conforme observado no lote D (Figura 6). É possível que, para essa cultivar, o método do substrato umedecido possa ter ocasionado a entrada muito rápida de água nas sementes, desfavorecendo a reparação adequada de seu sistema interno de membranas, o que resultou maior atividade do complexo enzimático Fosfatase Ácida, após imersão das sementes em água.

Em relação à cultivar Maria, considerando o padrão de expressão do sistema enzimático Fosfatase Ácida, os resultados mais expressivos foram obtidos nos lotes H e I. No lote H, o método de pré-hidratação das sementes empregando atmosfera saturada até as sementes atingirem teores de água de 12% a 14% ocasionou menor intensidade de expressão desse sistema enzimático (Figura 7). Para o lote I, entretanto, os dois métodos mostraram-se eficientes, variando apenas os teores de água das sementes (Figura 8). Assim, foi possível obter bandas de coloração menos intensa ao pré-hidratar as sementes empregando atmosfera saturada até o teor de água de 14%, ou substrato umedecido até as sementes atingirem teor de água de 12%. Nesse caso, é provável que, à semelhança dos resultados obtidos com o teste de condutividade elétrica, o teor de água seja fator mais

relevante do ponto de vista da reconstituição da integridade das membranas celulares do que o método adotado para pré-hidratação das sementes, para essa cultivar.

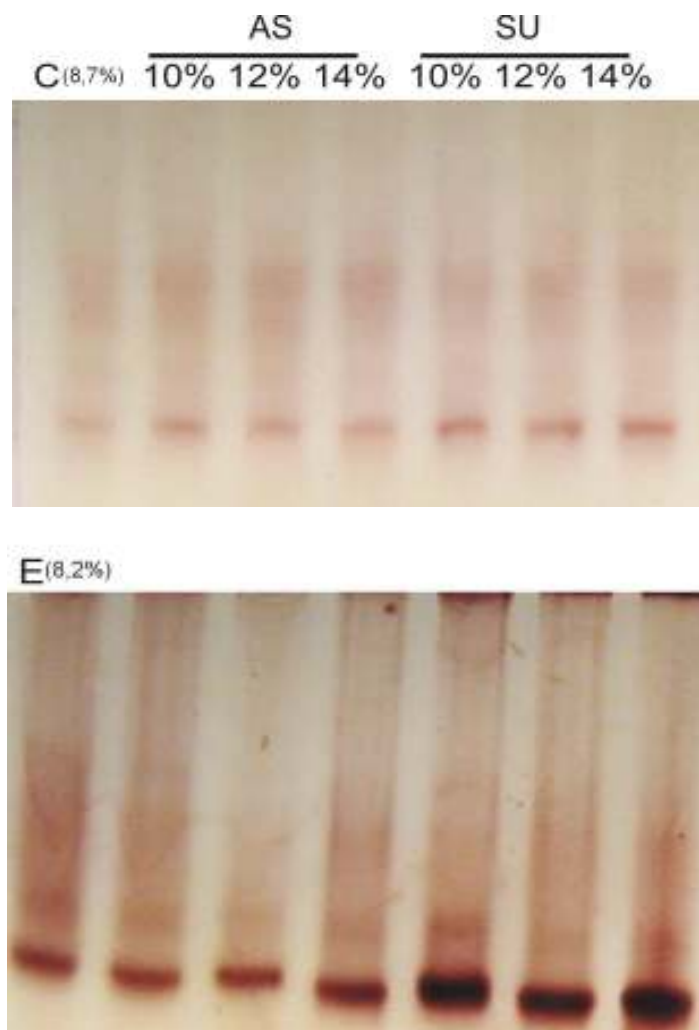


FIGURA 5. Padrão eletroforético de sementes de ervilha, cultivar Axé, lotes C e E, para o sistema enzimático Fosfatase Ácida, após hidratação em atmosfera saturada (AS) e substrato umedecido (SU) até teores de água de 10, 12 e 14%. C(8,7%) e E(8,2%): sementes não hidratadas dos lotes C e E, respectivamente. Pelotas/RS, 2006.

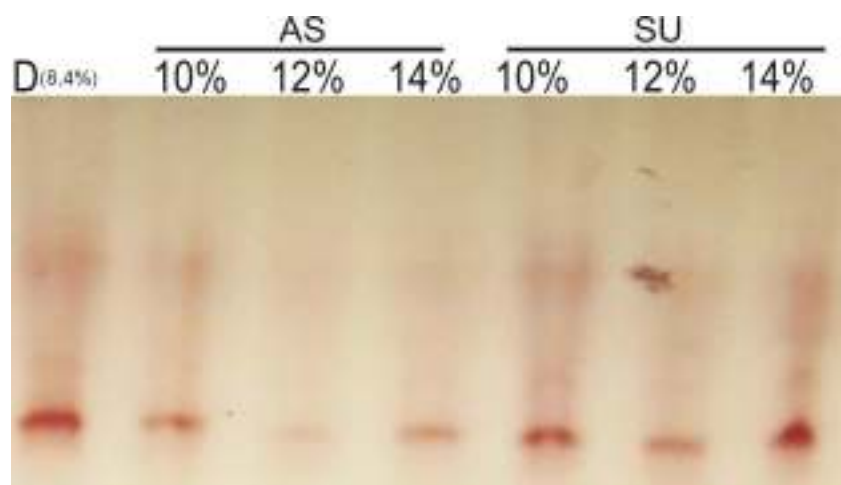


FIGURA 6. Padrão eletroforético de sementes de ervilha, cultivar Axé, lote D, para o sistema enzimático Fosfatase Ácida, após hidratação em atmosfera saturada (AS) e substrato umedecido (SU) até teores de água de 10, 12 e 14%. D(8,4%): sementes não hidratadas do lote D. Pelotas/RS, 2006.

De todo modo, verificou-se que, do ponto de vista da estruturação das membranas celulares, mesmo que tenham ocorrido diferenças no comportamento das sementes das duas cultivares em relação aos métodos empregados para o ajuste do seu teor de água, em nenhum caso as alterações decorrentes da utilização de diferentes métodos de pré-hidratação promoveram modificações no metabolismo oxidativo e/ou germinativo das sementes. Isso pode refletir a atuação de mecanismos compensatórios que permitem a ocorrência de reparos em outros pontos e/ou etapas durante a reativação do metabolismo das sementes, como uma tentativa de dar prosseguimento normal ao processo germinativo. Nesse sentido, merecem destaque os resultados obtidos por Di Nola e Mayer (1987), que investigaram o processo de incorporação de etanolamina (um ácido graxo livre) nos fosfolípidios de membrana durante a embebição de sementes de ervilha. Os autores relataram que a embebição das sementes sob temperatura de 5°C provocou rápida redução no *pool* de etanolamina livre nas células, sugerindo sua possível incorporação na composição de fosfatidiletanolamina, um fosfolípido de membrana. Esse padrão não foi

observado ao promover a embebição das sementes a 25°C. Sabendo que a fosfatidiletanolamina é precursora de N-Acilfosfatidiletanolaminas, um grupo de fosfolipídios de membrana que podem atuar na estabilização das membranas celulares (LaFrance et al., 1990; Shrestha et al., 2002), pode-se sugerir que, sob condições que favoreçam a ocorrência de danos por embebição nas células, como baixas temperaturas durante a embebição das sementes, mecanismos preventivos à ocorrência de danos podem ser acionados, reduzindo a incidência de distúrbios celulares e metabólicos que comprometam o progresso normal do processo germinativo das sementes.

Daí serem alterações sutis, desencadeadas no início do processo de embebição das sementes, as mais sensíveis do ponto de vista da identificação de diferenças entre lotes que apresentam pequenas diferenças no potencial fisiológico. Tais alterações, por sua vez, só conseguem ser detectadas através de testes sensíveis às modificações que ocorrem ao longo do processo de reestruturação celular característico das primeiras horas de embebição das sementes e relacionadas a esse processo. Desse modo, alterações que envolvam modificações na permeabilidade das membranas celulares, decorrentes da reestruturação de sua integridade e indiretamente detectadas pelo teste de condutividade elétrica podem, sendo o teste adequadamente conduzido, levar a resultados que auxiliem na distinção qualitativa entre lotes de sementes. De forma similar, a expressão e/ou atividade de enzimas relacionadas a processos de reparo ou, por outro lado, degradação da integridade das membranas celulares, também pode ser utilizada.

Enzimas envolvidas na síntese ou degradação de fosfolipídios de membrana poderiam ser mais investigadas com esse propósito. Entretanto, devido ao alto custo geralmente associado a esse tipo de prática, na rotina laboratorial, e diante dos resultados obtidos no presente trabalho, poder-se-ia utilizar o padrão de expressão de sistemas

isoenzimáticos específicos, como o sistema da Fosfatase Ácida, como uma ferramenta complementar à avaliação do potencial fisiológico de sementes.

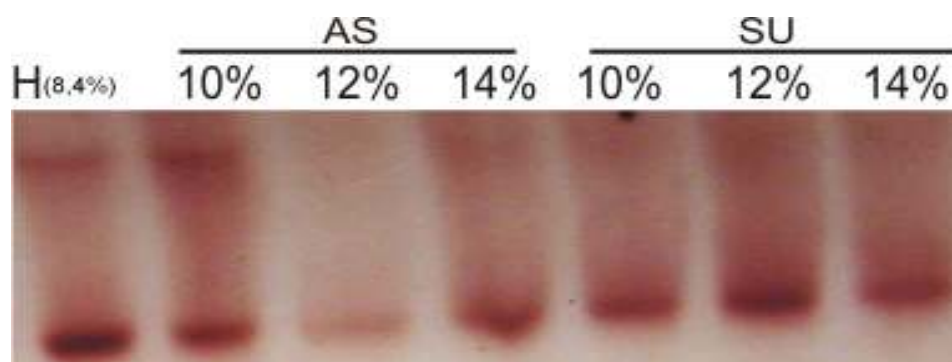


FIGURA 7. Padrão eletroforético de sementes de ervilha, cultivar Maria, lote H, para o sistema enzimático Fosfatase Ácida, após hidratação em atmosfera saturada (AS) e substrato umedecido (SU) até teores de água de 10, 12 e 14%. H(8,4%): sementes não hidratadas do lote H. Pelotas/RS, 2006.

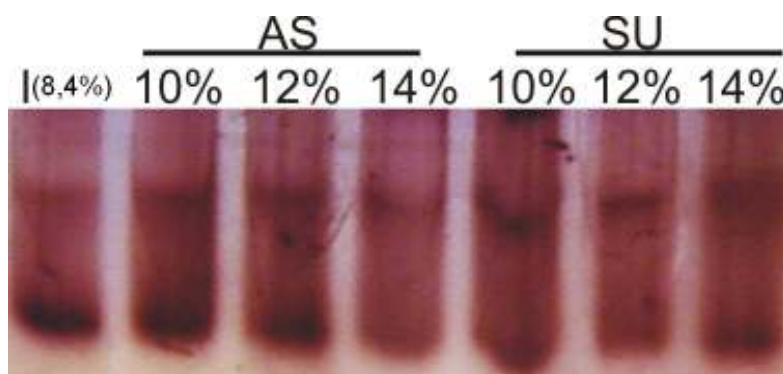


FIGURA 8. Padrão eletroforético de sementes de ervilha, cultivar Maria, lote I, para o sistema enzimático Fosfatase Ácida, após hidratação em atmosfera saturada (AS) e substrato umedecido (SU) até teores de água de 10, 12 e 14%. I(8,4%): sementes não hidratadas do lote I. Pelotas/RS, 2006.

No que se refere aos procedimentos a serem adotados para promover a pré-hidratação de lotes de sementes que se encontrem fora da faixa considerada adequada para a execução de testes específicos, como o teste de condutividade elétrica, recomenda-se a realização de novas investigações que permitam relacionar métodos mais adequados para

esse propósito. Os resultados obtidos nesse trabalho constituem um ponto de partida, todavia, novos caminhos devem ser percorridos e outros aspectos deverão ser avaliados.

CONCLUSÕES

A pré-hidratação de sementes de ervilha empregando atmosfera saturada ou substrato umedecido parece afetar diferentemente o processo de reestruturação do sistema de membranas celulares, refletindo-se em alterações no padrão de lixiviação de eletrólitos e na expressão do sistema isoenzimático Fosfatase Ácida.

Ocorrem discrepâncias entre resultados obtidos pelo teste de condutividade elétrica para avaliação do potencial fisiológico de sementes de ervilha, dependendo do procedimento adotado para a pré-hidratação das sementes.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998. 574p.

BATTACHARYYA, M.K.; SMITH, A.M.; NOEL ELLIS, T.H.; HEDLEY, C.; MARTIN, C. The wrinkled-seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme. **Cell**, v.60, p. 115-122, 1990.

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

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. v.1. New York: Springer-Verlag, 1978. 306p.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. 2ed. New York: Plenum, 1994. p.445.

BEWLEY, J.D.; OLIVER, M.J. Desiccation tolerance in vegetative plant tissues and seeds: protein synthesis in relation to desiccation and a potential role for protection and repair mechanisms. In: SOMERO, G.N.; OSMOND, C.B.; BOLIS, C.L. (Ed.). **Water and life**: comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular levels. Berlin: Sprin-Verlag, 1992. p.141-160.

BLACKMAN, S.A.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, p.225-230, 1992.

BRAMLAGE, W.J.; LEOPOLD, A.C.; PARRISH, D.J. Chilling stress to soybeans during imbibition. **Plant Physiology**, Rockville, v.61, p.525-529, 1978.

BRAMLAGE, W.J.; LEOPOLD, A.C.; SPECHT, J.E. Imbibitional chilling sensitivity among soybean cultivars. **Crop Science**, v.19, p.811-814, 1979.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BRYANT, G.; KOSTER, K. L.; WOLFE, J. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. **Seed Science Research**, Wallingford, v.11, n.1, p.17-25, 2001.

BUITINK, J.; HOEKSTRA, F. A.; LEPRINCE, O. Biochemistry and biophysics of tolerance systems. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CABI, 2002. p. 293-318.

CARPENTER, J.F.; CROWE, L.M.; CROWE, J.H. Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.923, p.109-115, 1987.

CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C.; PINHO, E.R.V. Técnicas moleculares em sementes. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.3, n.17, p.44-47, 2000.

CHAPMAN, K. D.; MOORE, S. Jr. Catalytic properties of a newly discovered acyltransferase that synthesizes N-Acylphosphatidylethanolamine in cottonseed (*Gossypium hirsutum* L.) microsomes. **Plant Physiology**, Rockville, v.102, n.3, p. 761-769, 1993.

CROWE, J.H.; CARPENTER, J.F.; CROWE, L.M. The role of vitrification in anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology**, v.60, p.73-103, 1998.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; OLIVER, A.E.; TSVETKOVA, N.; WOLKERS, W.; TABLIN, F. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. **Cryobiology**, v.43, p.89-105, 2001.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. **Science**, Washington, v.223, p. 701-703, 1984.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CARPENTER, J. F.; AURELL WISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemistry Journal**, v.242, p. 1-10, 1987.

CROWE, J.H.; HOEKSTRA, F.A.; CROWE, L.M. Anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology**, v.54, p.570-599, 1992.

DE CASTRO, R. D.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Ed.). **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 149-162.

DI NOLA, L.; MAYER, A.M. Ethanolamine incorporation into membranes of pea embryonic axes during germination. **Phytochemistry**, Great Britain, v.26, n.6, p.1591-1593, 1987.

DUKE, S.H.; KAKEFUDA, G.; HENSON, C.A.; LOEFFLER, N.L.; VAN HULLE, N.M. Role of the testa epidermis in the leakage of intracellular substances from imbibing soybean seeds and its implications for seedling survival. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.68, n.4, p.625-631, 1986.

DUKE, S.H.; KAKEFUDA, G. Role of the testa in preventing cellular rupture during imbibition of legume seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.67, p.449-456, 1981.

EPPS, D. E.; NATARAJAN, V.; SCHMID, P. C.; SCHMID, H. H. O. Accumulation of N-Acylethanolamine glycerophospholipids in infarcted myocardium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 618, p. 420-430, 1980.

EPPS, D. E.; SCHMID, P. C.; NATARAJAN, V.; SCHMID, H. H. O. N-Acylethanolamine accumulation in infarcted myocardium. **Biochemistry and Biophysical Research Community**, v. 90, p. 628-633, 1979.

GONÇALVES, N.B.; CARVALHO, V.D.; GONÇALVES, J.R.A. Efeito do cloreto de cálcio e do tratamento hidrotérmico na atividade enzimática e no teor de fenólicos do abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.10, p.2075-2081, 2000.

HALPERIN, S.J.; KOSTER, K.L. Sugar effects on membrane damage during desiccation of pea embryo protoplasts. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.208, p.1-9, 2006.

HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A. Membrane behavior during dehydration: implications for desiccation tolerance. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.46, n.3, p.295-306, 1999.

HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; VAN AELST, A.C.; HEMMINGA, M.A. Imbibitional leakage from anhydrobiotes revisited. **Plant, Cell and Environment**, v.22, p.1121-1131, 1999.

HOLLAND, N. **Conservação pós-colheita de pêssegos (cv. Biuti): interação entre cálcio e temperatura.** 1993. 116f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1993.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.377-403, 1996.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Seed vigour testing. In: ISTA. **International rules for seed testing.** Bassersdorf: ISTA, 2004.

KERMODE, A.R. Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.7, n.2, p.75-95, 1997.

KOSTER, K.L.; LEOPOLD, A.C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.88, p. 829-832, 1988.

LAFRANCE, D.; MARION, D.; PEZOLET, M. Study of the structure of N-Acylpalmitoylphosphatidylethanolamine in aqueous dispersion by infrared and Raman spectroscopies. **Biochemistry**, v.29, p. 4592-4599, 1990.

LEOPOLD, A.C.; VERTUCCI, C.W. Physical attributes of desiccated seeds. In: LEOPOLD, A.C. (Ed.). **Membranes, metabolism and dry organisms.** Ithaca: Cornell University Press, 1986. p.22-34.

LEGGE, R.L.; THOMPSON, J.E.; BAKER, J.E.; LIEBERMAN, M. The effect of calcium on the fluidity and phase properties of microsomal membranes isolated from postclimacteric Golden Delicious apples. **Plant and Cell Physiology**, v. 23, p.161-169, 1982.

LIU, X.-H.; AKSAN, A.; MENZE, M.A.; HAND, S.C.; TONER, M. Trehalose loading through the mitochondrial permeability transition pore enhances desiccation tolerance in rat liver mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1717, p.21-26, 2005.

LOSTER, G. Calcium alters senescence rate of postharvest muskmelon fruit disks. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.7, p.91-96, 1996.

LYNCH, D. V.; STEPONKUS, P. L. Lyotropic phase behavior of unsaturated phosphatidylcholine species: relevance to the mechanism of plasma membrane destabilization and freezing injury. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.984, p. 267-272, 1989.

MARCOS FILHO, J. Germinação. In: _____. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.197-252.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: VIERA, R.D.; CARVALHO, N. M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1999. p. 133-149.

MIGUEL, M.V.C.; MARCOS FILHO, J. Potassium leakage and maize seed physiological potential. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, n.2, p.315-319, 2002.

MOORE, T.S. Phospholipid biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.33, p.235-259, 1982.

NATARAJAN, V.; SCHMID, P. C.; REDDY, P. V.; ZUARTE-AUGUSTIN, M. L.; SCHMID, H. H. O. Biosynthesis of N-Acylphosphatidylethanolamine phospholipids by dog brain preparations. **Journal of Neurochemistry**, v. 41, p. 1303-1312, 1983.

NAWA, Y.; ASAH, T. Rapid development of mitochondria in pea cotyledons during the early stage of germination. **Plant Physiology**, Rockville, v.48, p.671-674, 1971.

NEDEVA, D.; NIKOLOVA, A. Desiccation tolerance in developing seeds. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, v.23, n.3/4, p.100-113, 1997.

OLIVER, A.E.; CROWE, L.M.; CROWE, J.H. Methods for dehydration-tolerance: depression of the phase transition temperature in dry membranes and carbohydrate vitrification. **Seed Science and Research**, Wallingford, v.8, p.211-221, 1998.

PARRISH, D.J.; LEOPOLD, A.C. Transient changes during soybean imbibition. **Plant Physiology**, v.59, p.1111-1115, 1977.

PIETRZAK, L.N.; FRÉGEAU-REID, J.; CHATSON, B.; BLACKWELL, B. Observations on water distribution in soybean seed during hydration processes using nuclear magnetic resonance imaging. **Canadian Journal of Plant Science**, v.82, n.3, p.513-519, 2002.

RAWYLER, A. J.; BRAENDLE, R. A. N-Acylphosphatidylethanolamine accumulation in potato cells upon energy shortage caused by anoxia or respiratory inhibitors. **Plant Physiology**, Rockville, v.127, p. 240-251, 2001.

RODRIGUES, M.B.C.; VILLELA, F.A.; TILLMANN, M.A.A.; CARVALHO, R. Pré-hidratação em sementes de soja e eficiência do teste de condutividade elétrica. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, n.2, p.168-181, 2006.

ROSA, S. D. V. F.; VON PINHO, E. V. R.; VIEIRA, M. G. G. C.; VEIGA, R. D. Eficácia do teste de condutividade elétrica para uso em estudos de danos de secagem em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 54-63, 2000.

SANDOVAL, J. A.; HUANG, Z.-H.; GARETT, D. C.; GAGE, D. A.; CHAPMAN, K. D. N-Acylphosphatidylethanolamine in dry and imbibing cottonseeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.109, n. 1, p. 269-275, 1995.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.27, n.1, p.104-114, 2005.

SATO, S.; ASAH, T. Biochemical properties of mitochondrial membrane from dry pea seeds and changes in the properties during imbibition. **Plant Physiology**, Rockville, v.56, p.816-820, 1975.

SCANDÁLIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, New York, v.3, n.1, p.37-79, 1969.

SCHMID, H.H.; SCHMID, P.C.; NATARAJAN, V. N-acylated glycerophospholipids and their derivatives. **Progress in Lipid Research**, v.29, n.1, p.1-43, 1990.

SHEPHARD, H.; NAYLOR, R.E.L. Effect of the seed coat on water uptake and electrolyte leakage of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) seeds. **Annals of Applied Biology**, Great Britain, v.129, p.125-136, 1996.

SHRESTHA, R.; NOORDERMEER, M. A.; VAN DER STELT, M.; VELDINK, G. A.; CHAPMAN, K. D. N-Acylethanolamines are metabolized by lipoxigenase and amidohydrolase in competing pathways during cottonseed imbibition. **Plant Physiology**, Rockville, v.130, n. 1, p. 391-401, 2002.

SIMON, E.W. Plant membranes under dry conditions. **Pesticide Science**, v.9, p.169-172, 1978.

SIMON, E.W.; RAJA HARUN, R.M. Leakage during seed imbibition. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.23, n.77, p.1076-1085, 1972.

SIMON, E.W.; WIEBE, H.H. Leakage during imbibition, resistance to damage at low temperature and the water content of peas. **New Phytologist**, New York, v.74, p.407-411, 1975.

SMITH, A.M.; DENYER, K. Starch synthesis in developing pea embryos. **New Phytologist**, New York, v.122, n.1, p.21-33, 1992.

SPINOLA, M.C.M.; CÍCERO, S.M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, n.2, p.263-270, 2000.

TRIPATHY, S.; KLEPPINGER-SPARACE, K.; DIXON, R. A.; CHAPMAN, K. D. N-Acylethanolamine signaling in tobacco is mediated by a membrane-associated, high-affinity binding protein. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, n.4, p. 1781-1791, 2003.

VERTUCCI, C.W. The kinetics of seed imbibition: controlling factors and relevance to seedling vigor. In: STANWOOD, P.C.; McDONALD, M.B. (Ed.). **Seed Moisture**. Madison: CSSA, 1989. p.93-115.

WANN, E.W. Leaching of metabolites during imbibition of sweet corn seed of different endosperm genotypes. **Crop Science**, v.26, p.731-733, 1986.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. **Cryobiology**, v.39, p.103-129, 1999.

ZSOLDOS, F.; KARVALY, B. Effects of Ca²⁺ and temperature on potassium uptake along roots of wheat, rice and cucumber. **Plant Physiology**, v.43, p.326-330, 1978.