

JULIANA DE FÁTIMA SALES

**ATIVIDADE DA CELULASE SOBRE O PROCESSO
GERMINATIVO DE SEMENTES DE CAFEIEIRO
(*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de **Lavras**, como parte das exigências do **Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal**, para **obtenção** do título de "Mestre".

Orientador

Prof. DR. Amauri Alves de Alvarenga

LAVRAS
MINAS **GERAIS** - BRASIL

2002

O coração do homem dispõe o seu caminho, mas é o Senhor quem dirige seus passos (Pr 16,9)

A Deus,

Aos Meus Pais, Moacir e Maria Aparecida,

Por todo amor, dedicação e carinho;

Ao meu irmão, Tadeu (in memoriam), pelo incentivo de sempre;

OFEREÇO

Ao Fabiano, pelo amor, compreensão;

Aos meus familiares, pelo carinho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida *e* por **estar** sempre presente, guiando e iluminado meu caminho, dando força *e* coragem, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao Fabiano, por **todos** os momentos **juntos**, pelo grande amor, paciência, carinho, compreensão, apoio *e* ajuda.

A meus pais, Moacir e Maria, pelo apoio, estímulo e incentivo para que **pudesse** chegar a *esse* momento.

Ao **Sr. Aldeson** *e* D. Irma pela grande amizade.

À Universidade Federal de Lavras *e* ao **Setor** de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso.

Ao professor **Amauri** Alves de Alvarenga pela **orientação**, apoio, amizade *e* ensinamentos.

Aos pesquisadores **João** Almir de Oliveira *e* Francisco Dias Nogueira pela excelente **co-orientação**, amizade, ensinamentos e apoio sempre, sem os quais tudo sena **mais** difícil.

Ao professor Nelson Delú Filho pela ajuda na parte bioquímica *e* ensinamentos transmitidos durante o curso.

Ao professor **Renato** Mendes **Guimarães** pela participação na **pré-banca** *e* sugestões **no** decorrer **do** trabalho **e** pelos ensinamentos.

Ao consórcio Brasileiro de Pesquisas *e* Desenvolvimento do **café** (CBP&D-Emprapa/Café) pelo **patrocínio** parcial desta pesquisa.

Aos bolsistas Lúcio *e* **André** pela ajuda na **condução** dos experimentos.

Aos colegas de curso pela amizade *e* convivência: **Gabriela**, Erivaldo, **Sandra**, Cláudio, **Darlan** *e* aos demais colegas: Sílvia, Luciano, Breno, Marina, Raniere, Ana **Hortênsia**, *e* **outros** não citados, meu carinho.

Ao amigo **Marcelo Murad Magalhães** e aos funcionários **Izoni, Lena, Tanhan, Evaristo, Joel e Odorêncio**, pela amizade e ajuda.
À **FAPEMIG** pela concessão da **bolsa**.

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Física

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Física

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Física

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract
1 Introdução	1
2 Referencial Teórico	3
3 Material e Métodos	11
4 Resultados e Discussão	16
5 Conclusões	30
6 Considerações Finais	31
7 Referências Bibliográficas	32
Anexos	37

RESUMO

SALES, Juliana de Fátima. Atividade da **celulase** sobre o processo germinativo de sementes de cafeeiro (**Coffea arabica L.**). LAVRAS: UFLA, 2002. 38p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Metabolismo de Plantas e no Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras - MG, tendo como principal objetivo estudar *in vitro*, as atividades da enzima celulase e sua ação *in vivo* sobre a germinação de sementes de cafeeiro, visando o aumento do índice de velocidade de germinação e a redução do período de formação das mudas. Por se tratar de um estudo pioneiro relacionado à atividade da enzima celulase sobre a germinação das sementes de cafeeiro, na 1ª fase foi realizado um estudo preliminar com o objetivo de verificar a ação da enzima celulase sobre a decomposição do endocarpo extraído de sementes de cafeeiro. Avaliando a concentração da enzima, a concentração do substrato e o tempo de incubação, foi constatado que a hidrólise do endocarpo *in vitro* é diretamente proporcional à concentração da enzima celulase utilizada e que a hidrólise do endocarpo cresce linearmente em função do tempo de exposição à enzima. Na 2ª fase, foram realizados 2 experimentos *in vivo* com imersão das sementes de cafeeiro em diferentes soluções, testando-se várias concentrações da enzima. Foi verificado que sementes sem endocarpo apresentam maiores IVG (índice de Velocidade de Germinação), IVE (índice de Velocidade de Emergência), porcentagem de germinação e porcentagem de emergência do que sementes com endocarpo e, também, que sementes com endocarpo imersas por 144 horas em solução de celulase na concentração de 6,4 g.L⁻¹ apresentam maior IVG e porcentagem de germinação.

* **Comitê** Orientador: Amauri Alves de Alvarenga - UFLA (Orientador), Francisco Dias Nogueira - EPAMIG/UFLA, João Almir Oliveira - UFLA.

ABSTRACT

SALES, Juliana de Fátima Sales. Cellulase activity during of coffee seeds (*Coffea arabica* L.). LAVRAS: UFLA, 2002. 38p. (Dissertation · Master in Agronomy/Plant Physiology)

The present work was realized in the Biochemistry and Plant Metabolism and in the **Seed** Analysis of Laboratory the Universidade Federal de Lavras – MG, aiming study in **vitro** the activities of cellulase **enzyme** and its action in vivo on the germination of coffee seeds **with** the scope to increase germination velocity index and reduction of the seedlings growing period. For being a pioneering study related with the activity of the cellulase enzyme on the germination of coffee seeds, in **the first** phase was conducted a preliminary study with the purpose of verifying **the** action of cellulase enzyme **on** the decomposition of **the** endocarp extracted from coffee tree **seeds**. By evaluating the enzyme concentration, substrate concentration and incubation **time** it was found that in **vitro** hydrolysis is directly proportional to the concentration of cellulase enzyme **utilized** and that endocarp hydrolysis augments linearly in terms of the time of exposition to **the** enzyme. In the second phase, **two** in vivo experiments were **performed** by **soaking** coffee tree **seeds** in different solutions by testing a number of concentrations of the enzyme. It was found that endocarpless seeds showed higher IVG (velocity germination index), IVE (velocity emergency index), germination percentage and emergence percentage than **seeds** with an endocarp and also **seeds** with an endocarp soaked for 144 hours in cellulase solution at the concentration of $6.4\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ present a higher IVG and germination percentage.

* Guidance **Committee**: Amauri Alves de Alvarenga - UFLA (Adviser), Francisco Dias **Nogueira** – EPAMIG/UFLA, João Almir Oliveira · UFLA.

1 INTRODUÇÃO

O **Café** representa uma das culturas de maior expressão no cenário agroindustrial brasileiro, sendo o país considerado o maior produtor e exportador mundial.

A região **sul** do Estado de Minas Gerais, segundo Nechet (1999), destaca-se como sendo a **maior** produtora do país, contribuindo com cerca de 34% da produção nacional. 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 ($1,69 \times 10^{10}$ kilos), representando **20,36%** da produção mundial (FAO, 1996).

Por sua importância econômico-social, a busca de inovações tecnológicas para o setor cafeeiro se torna necessária no sentido de aumentar a eficiência da produtividade, aliada à redução nos custos de produção, visando maior competitividade no mercado internacional.

A propagação predominante do cafeeiro é feita por meio de mudas oriundas de sementes, que apresentam problemas para **conservação** prolongada e sua germinação que é lenta e irregular. Este fato tem sido uma das maiores preocupações dos produtores das sementes, uma vez que **estas não** conservam o **seu** poder germinativo em níveis satisfatórios por períodos superiores a seis meses após a colheita. Diante deste fato, a **obtenção** de mudas, muitas vezes, fica concentrada em **Socas** que nem **sempre** são as mais apropriadas para o plantio (Pertel, 2001). Além da difícil **conservação** durante o armazenamento, **as** sementes de cafeeiro **germinam** de maneira lenta e desuniforme, trazendo **transtornos** aos produtores de mudas em muitas regiões, principalmente em Minas Gerais, **cuja época** de semeadura, na maioria das vezes, coincide com o período de temperaturas mais baixas, retardando o desenvolvimento das mudas.

A **época** de plantio da lavoura **cafeeira** tem sido extremamente dependente da **época** de colheita, tendo em vista que a **utilização** de sementes armazenadas não apresenta qualidade fisiológica **satisfatória** no momento ideal para a **formação** das mudas. A possibilidade de obtenção de sementes de **alta** qualidade, em qualquer **época** do ano, oferece ao produtor a oportunidade de programar a instalação de **sua** lavoura na melhor **época** para **sua região** e, conseqüentemente, a formação de lavouras mais **precoces** e produtivas. **Nesse** sentido, a recuperação da qualidade fisiológica das sementes, **por** meio de tratamentos pré-germinativos, tem sido uma alternativa investigada para a solução do problema (**Guimarães, 2000**).

Diante deste fato, toma-se **fundamentalmente** *importante* o desenvolvimento de **técnicas** que permitam a germinação **mais** rápida e uniforme **das** sementes, o que levará a **ganhos** significativos no tempo de obtenção das mudas e **seu** estabelecimento **mais** rápido no **campo**, menor **índice** de replanta, além de permitiu maior uniformidade no desenvolvimento da lavoura e um retorno mais rápido dos investimentos. Com o objetivo de atingir **tal** propósito, procurou-se, **neste** trabalho, **estudar** atividades *in vitro* da **enzima** celulase e sua ação sobre a germinação de sementes de **cafeeiro**, visando aumentar a velocidade de germinação, bem como a **redução** do período **de** formação de mudas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Aspectos fisiológicos da germinação

A germinação da semente é considerada como sendo a retomada das atividades metabólicas do **eixo** embrionário, o qual **se** encontrava paralizado nas **fases finais** do processo de maturação; porém, quando estimulado por condições ambientais, desenvolve-se, ocorrendo, **então**, o rompimento do tegumento pela **radícula**. Essa é uma etapa crítica do biociclo vegetal devido a **esse** processo **estar** associado a **vários** fatores de **natureza extrínseca** (fatores do ambiente físico) e intrínseca, ou seja, a processos **fisio-metabólicos** (Popinigis, 1977; Labouriau, 1983; Andrade e Damião-Filho, 1989; Bianchetti, 1991; Borges e Rena, 1993; Bewley e Black, 1994; Santos, 1999).

Para **que uma** semente germine, é necessário, além de temperatura ideal, **que** o meio forneça água suficiente, permitindo a ativação **das** reações **químicas** relacionadas ao metabolismo e, com isto, a retomada do processo do desenvolvimento do embrião. A embebição é um processo físico relacionado às propriedades dos colóides e ocorre tanto **em** sementes vivas **quanto** mortas (Mayer & Mayber, 1978; Copeland & McDonald, 1995).

O processo germinativo tem início com a embebição de água pelos tecidos da semente, seguida da retomada das atividades metabólicas, sobretudo da **síntese** de novas enzimas e do aumento das atividades **das** hidrolases pré-existentes, visando a **mobilização** dos compostos de reservas para a retomada de crescimento do *eixo* embrionário.

Os principais *componentes* químicos das sementes, responsáveis pela embebição e aumento de **tamanho**, são **as** proteínas e, **em** menor intensidade, a celulose e substâncias **pécticas**; o amido e **os** lípidios apresentam interferência reduzida **no** processo (Mayer & Mayber, 1978; Copeland & McDonald, 1995).

O tegumento **exerce** várias funções nas sementes, dentre elas, a de regular a velocidade de hidratação da semente, diminuindo ou evitando possíveis **danos** causados pelas pressões desenvolvidas durante a embebição. Quando **esta** C impedida, em virtude **da impermeabilidade do tegumento, a germinação não** ocorre (Bradford, 1995).

Em trabalhos relacionados com embebição, considerando diferentes **tamanhos** de sementes, tem sido constatado que as sementes de menor **tamanho** atingem teores de água superiores aos observados para sementes de maior **tamanho** (Calero, West e Hinson (1981); Hsu, Kim e Wilson (1983); Souza, 1996). Esse *fato está* relacionado à maior área de **contato** por unidade de massa nas sementes menores.

De acordo com Abdul-Baki (1980), durante a embebição **os** sistemas de membranas **das** sementes **se** reorganizam readquirindo sua permeabilidade, e o ideal é que este processo ocorra **no** menor período possível para reduzir a ocorrência de **misturas** indesejáveis do conteúdo celular e a **lixiviação** comprometedora de eletrólitos.

O tempo necessário para ocorrer a germinação de uma semente é uma característica variável **entre** espécies, sendo que **nesta**, a germinação das sementes do **cafeeiro** em condições de viveiro pode chegar a ocorrer num período de **até 90 dias**, **que** pode ser estendido aos **120 dias**, sobretudo quando **semeadas** logo após a **sua colheita**, o **que**, em nossa região, geralmente **se** inicia **entre os** meses de abril e maio (Carvalho, 1979). Este período de semeadura coincide com as condições de baixa **temperatura**, o que leva a uma queda substancial na velocidade do processo germinativo. Concomitantemente à época de semeadura, **as** sementes do **cafeeiro** apresentam uma *estrutura* coriácea e prateada conhecida como endocarpo (pergaminho), que geralmente contribui para retardar o processo germinativo da semente (Rena & Maestri, 1986).

Segundo Bendaña (1962), a germinação das sementes do cafeeiro é lenta por causa do pergaminho, efeito devido, provavelmente, à sua impermeabilidade **relativa** à água. Sobre este **aspecto**, existem controvérsias entre os autores, Valio (1976) acredita que *esta* lentidão **na** germinação **não se** deve à insuficiência na absorção de água, mas provavelmente a algum mecanismo de resistência inerente à rigidez imposto pelo pergaminho sobre o desenvolvimento embrionário. Bendaña (1962) e Huxley (1965) acreditam que o pergaminho constitui **limite** mecânico ao crescimento do embrião. **Outra** influência do pergaminho foi relatada por Huxley (1965), segundo o qual o pergaminho restringe a passagem de oxigênio para os tecidos da semente.

Misturando sementes de alface a extratos aquosos de espermoderma ou "película prateada" em diferentes **concentrações**, Alves *et al.*(1996) determinaram que à medida que a **concentração** do **extrato** foi aumentada, houve acréscimo no número de plântulas anormais e sementes mortas ou dormentes, aumentando também o número de dias para **ocorrer** a germinação. **Os** resultados permitiram concluir que o espermoderma pode contribuir **para** a lenta germinação das sementes de cafeeiro, possivelmente devido à **presença** de substâncias inibidoras.

Algumas estratégias têm sido utilizadas com o **intuito** de obter mudas com desenvolvimento vegetativo vigoroso, ideal e **numa época** mais propícia para plantio, de **tal maneira** que a lavoura recém-instalada ~~tenha~~ tenha um período de **chuva** mais longo e outros **fatores** climáticos **mais** favoráveis para um rápido estabelecimento e desenvolvimento das plantas no campo.

Neste sentido, alguns estudos têm sido desenvolvidos com sementes do gênero *Coffea* e **outras** espécies, utilizando **tratamentos** pré-germinativos na tentativa de aumentar o índice de velocidade de germinação (IVG), bem como o percentual de germinação **das** sementes.

Segundo Guimarães (1995), Rena & Maestri (1986), a retirada manual do pergaminho de sementes do cafeeiro é **um** a prática que contribui para acelerar a germinação, reduzindo, conseqüentemente, o período de formação das mudas e o tempo de permanência destas sob condições de viveiro, embora seja inviável por causar injúrias mecânicas.

Sementes quiescentes, quando colocadas para germinar em condições adequadas de suprimento de água e temperatura, apresentam um padrão trifásico de embebição, fator essencial à germinação. A duração de cada **iãse** dependerá, evidentemente, de algumas propriedades da semente, como **tamanho**, composição química, e de **fatores** do meio, como **os** citados anteriormente (Bewley & Black, 1994).

Em café, Lima (1999) verificou que sementes **intactas** e sem endocarpo embebidas em água completaram a **fase I** em dois e quatro **dias**, respectivamente, atingindo um **grau** de umidade em torno de 45%. **O** mesmo autor verificou que a **iãse III** foi atingida somente nas sementes sem endocarpo no 10^o e 18^o dia, **respectivamente**, em sementes embebidas em água e em solução de Polietileno glicol (PEG 6000) – 0,4 Mpa. **Os** conteúdos médios de água das sementes **chegaram** a 55%, coincidindo com a emissão da radícula.

Sementes de cafeeiro embebidas em água por 34 horas apresentam incrementos de vigor e de germinação, podendo **ser este** procedimento indicado, sobretudo para lotes de sementes com baixa qualidade fisiológica. **Neste** estudo também foi observado **que as** sementes, quando submetidas ao condicionamento fisiológico (priming) e armazenadas por 90 **dias**, apresentaram **um** incremento de 41% na germinação (Lima **et al.**, 2001).

A embebição de sementes por períodos prolongados em água ou em solventes orgânicos associados à temperaturas elevadas pode afetar sobremaneira a germinação. Sementes de cafeeiro, quando embebidas em água, etanol ou ácido acético por 1 hora a 50°C, tomaram-se fisiologicamente inativas.

Contudo, nestas condições, porém a 40°C, não foram constatados danos às sementes. Sementes embebidas em ácido acético por períodos de 12 a 24 horas apresentaram danos irreversíveis, comprometendo o processo germinativo. Segundo Miranda et al. (1990), a imersão das sementes em água ou etanol a 40°C, por períodos de até 3 horas, acelera a germinação de sementes do cafeeiro.

Estudando o efeito de tratamentos pré-germinativos sobre sementes do cafeeiro em soluções de natureza inorgânica e reguladores de crescimento, Alvarenga et al. (1981) concluíram que sementes embebidas em água a 5°C por 24 horas apresentaram maior velocidade de emergência das plântulas e maior stand final em relação aos demais tratamentos testados, reduzindo, assim, o período entre a germinação e a emergências das plântulas na sementeira.

Enzimas

Os principais agentes que participam das transformações das células pertencem a um grupo de proteínas chamadas enzimas. Estas são sintetizadas numa célula viva e catalisam uma reação termodinamicamente possível. Sendo uma proteína, uma enzima perde suas propriedades catalíticas se submetida a agentes como calor, ácidos fortes ou bases, solventes orgânicos ou outro material que desnatura a proteína. Como é verdade para qualquer catalisador, a velocidade de uma reação catalisada por enzima depende diretamente da sua concentração.

Com concentração fixa de enzima, um aumento do **substrato** resultará, de início, numa rápida ascensão da velocidade da reação. À medida que a concentração do **substrato** continua a crescer, **entretanto**, o aumento na velocidade de reação **começa** a diminuir até que, com uma grande concentração de **substrato**, nenhuma mudança posterior é observada. Existem fatores que podem influenciar a atividade enzimática, como:

a) Efeito da temperatura

Uma **reação** enzimática é sensível a mudanças de temperatura. **Por causa da natureza** protéica de uma enzima, a desnaturação térmica da proteína enzimática com temperaturas crescentes **diminuirá** a **concentração** efetiva de **uma** enzima e, conseqüentemente, a velocidade da **reação**.

b) Efeito do pH

Uma vez que **as** enzimas são proteínas, mudanças de pH afetarão profundamente o caráter iônico dos aminogrupos e **grupos** carboxílicos na proteína e afetarão, portanto, o **sítio** catalítico e a conformação de uma **enzima**. Além dos efeitos puramente iônicos, **valores** baixos ou **altos** de pH podem causar desnaturação considerável e, conseqüentemente, inativação da proteína enzimática.

e) Especificidade

Uma importante característica da enzima é sua especificidade pelo substrato, isto é, por causa da **configuração** da **complexa** molécula protéica, a singularidade de **seu sítio** ativo e a configuração estrutural da molécula do substrato, **uma** enzima selecionará somente um número limitado de compostos a **abaco**.

d) Inibição

Um importante número de **compostos** tem a habilidade de combinar com **certas** enzimas, mas **não** servem como substratos e, portanto, bloqueiam a **catálise** por **essas** enzimas. **Esses** compostos **são** chamados de inibidores competitivos e não-competitivos (Conn e Stumpf, 1975).

Enzimas Celulolíticas e germinação de sementes

São escassas as informações envolvendo o papel de **algumas** enzimas de parede celular sobre a germinação de sementes. **Entretanto**, alguns estudos enzimáticos têm sido desenvolvidos com o intuito de conhecer o papel destas enzimas sobre a degradação de determinadas **estruturas** que envolvem as

sementes, tais como a **testa**, o endocarpo e outras estruturas (Howard & Elliotti, 1988; Grizotto & Menezes, 1997; Dias & Gomez, 1986).

Em algumas espécies, as sementes podem apresentar tegumentos ricos em celulose e outros polissacarídeos, formando até mesmo uma camada que dificulta a entrada de água nos tecidos internos da semente, o que pode levar a uma redução na velocidade de germinação, ou até mesmo inibi-la.

De acordo com Marcondes et al. (1983), a celulose é um componente básico da parede celular e um dos compostos mais abundantes em natureza. É um composto constituído de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo β 1,4. Na maioria das vezes, ela se encontra associada com outros polissacarídeos, como hemicelulose, pectina e, ainda, lignina, dificultando sua degradação.

A hidrólise da celulose pode ser realizada por meio de tratamentos ácidos ou básicos e por ação de enzimas celulolíticas produzidas pela flora microbiana, como pelos fungos *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* (Marcondes et al., 1983), por *Aspergillus sp.*, pela bactéria ruminal celulolítica *Clostridium cellobioparum* (Howard & Elliotti 1988) e, possivelmente, por outros tipos de organismos, como térmitas (cupins).

Segundo Goldman (1988), o sistema celulase é bastante complexo. Por meio de estudos de purificação e fracionamento, concluiu-se que há três principais tipos de enzimas celulolíticas de ocorrência múltipla. O número destas enzimas varia de acordo com o tipo de organismo. Em fungos, geralmente este sistema enzimático encena de 4 a 8 endoglucanases, 1 a 3 celobiohidrolases e 1 a 3 diferentes β glicosidasases.

Trichoderma viride, segundo Mandels, Weber e Parizek (1979), é uma fonte conveniente de celulases C_1 e C_x , as quais são capazes de hidrólise total de celulose natural para glicose. O aumento da produção de celulase tem sido obtido por adição de surfactantes no meio líquido (Reese e Maguire, 1969).

Muitos pesquisadores têm estudado a produção de celulase por cultura submersa. Vários estudos de produção de celulase determinam apenas C₁ celulase, baseados na hidrólise de carboximetilcelulose, sem considerar a C₁ celulase ou outras frações da enzima.

Urieta, Toma e Park (1975) concluíram que a produção de celulase fúngica por cultura semi-sólida de *Trichoderma viride* apresenta mais vantagens, em comparação com a cultura submersa, porque a cultura semi-sólida produz mais C₁ e C₂ celulases. Além disso, uma atividade crescente de C₁ celulase por cultura semi-sólida é importante para a degradação da celulose crua. Na produção de celulase por culturas semi-sólidas e submersa de *Aspergillus niger* e de *Pestalotiopsis westerdijkii* há desvantagens, pois ambos os processos não conseguiram produzir C₁ celulase, embora a cultura semi-sólida produza atividade elevada de C₂ celulase.

Reese et al. (1950) introduziram o conceito de C₁ e C_x para explicar a atividade do sistema celulase, no qual C₁ é capaz de degradar a celulose em cadeias lineares curtas e C_x hidrolisaria essas cadeias, bem como seus derivados solúveis.

De acordo com Howard & Elliotti (1988), tratamentos de sementes de *Euonymus americanus* com fluido ruminal contendo *Clostridium cellobioparum* tiveram sua germinação aumentada substancialmente pelo fato de este microrganismo sintetizar endocelulase, o que favoreceu a embebição e, conseqüentemente, a germinação das sementes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A influência do complexo celulase sobre as sementes de **cafeeiro** foi estudada em duas etapas e condições distintas: uma “in vitro” e outra “in vivo”.

Há **vários** métodos para a avaliação da atividade enzimática: em função do **tempo**, concentração do substrato, concentração enzimática. No presente experimento foi utilizada a metodologia de Howard e Elliott (1988).

A medida da celulase oriunda de *Aspergillus niger* é ~ 0,5 U/mg [1 U corresponde à quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol **OBR-hydroxyetil-cellulose** por **minuto**, em pH 4,8 e 30° C].

Experimento 1:

Foi conduzido em condições “in vitro”, contendo **três ensaios** que foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Metabolismo de Plantas do Departamento de Biologia/Setor de Fisiologia **Vegetal**, com o intuito de **investigar** o efeito da celulase sobre a decomposição do endocarpo das sementes.

Para tanto, foram utilizados endocarpos (pergaminhos) retirados **manualmente** de sementes da cultivar Acaia do Cerrado, colhidas na Estação Experimental da EPAMIG, no município de **Lavras**, MG, no ano de **2001**. Estes foram macerados em Nitrogênio Líquido.

a) Efeito da concentração de celulase sobre a velocidade de reação

Foram testadas **9 concentrações** de celulase de *Aspergillus niger* [0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 e 12,8 gramas da **enzima** por litro da solução tampão sobre uma concentração constante de substrato (6 mg de pergaminho/tubo)], contendo **solução** tampão citrato de potássio 0,05 M, e pH 4,8. Em seguida, foram **retiradas alíquotas de 100 μ L** da reação enzimática, que foram colocadas em tubos de ensaio contendo o substrato. Na sequência,

colocou-se a mistura em banho-maria a **50°C**, por **30** minutos. Posteriormente, adicionou-se **1 mL** de solução de Dinitrossalicilato (DNS), fervendo-se por **5** minutos. Por **fim**, foi adicionado **1,4 mL** de água destilada e as leituras espectrofotométricas, em número de **4** repetições por **tratamento**, foram realizadas a **540 nm** para a quantificação de açúcares redutores.

b) Efeito da concentração de substrato (pergaminho) **sobre a** atividade da enzima celulase

Foram tomadas **alíquotas** de **100 µL** da solução da **enzima** celulase (**1,6 g** de enzima por litro de **tampão** citrato **0,05 M** a pH 4,8) **as quais** foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 10, **20**, **40** e **80** mg do substrato pergaminho. A **seguir**, colocou-se a **mistura** em banho-maria a **50 °C**, por **30** minutos. Posteriormente, acrescentou-se **1 mL** de DNS e ferveu-se por **5** minutos. Acrescentou-se **1,4 mL** de água destilada e, **em** seguida, procederam-se leituras a **540 nm**, em número de **4** repetições por **tratamento**, para a determinação de açúcares redutores presentes **no** meio de reação.

c) Sacarificação enzimática do Pergaminho

Foram tomadas **6 mg** do substrato pergaminho **em** tubos de **ensaio** e a **estas** acrescentadas **alíquotas** de **100 µL** de soluções enzimáticas (**1,6 e 3,2 g.L⁻¹**), preparadas em **tampão** citrato de Potássio **0,05 M**, pH 4,8 e incubadas em banho-maria à temperatura de **50 °C** por **diferentes intervalos** de tempo (**0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; e 10** horas). Acrescentou-se **1 mL** de DNS e ferveu-se por **5** minutos. Foi adicionado **1,4 mL** de água destilada e a atividade celulásica foi determinada **espectrofotometricamente**, a **540 nm**, pelo método do DNS em **4** repetições por **tratamento**, para a quantificação de açúcares redutores.

Na 2ª etapa deste estudo, foram conduzidos dois experimentos em condições *in vivo*, no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura/Setor de Sementes da Universidade Federal de Lavras.

Experimento 2: Efeitos da embebição de sementes de cafeeiro em solução enzimática (1,6 g.L⁻¹) sobre o índice de velocidade de germinação (IVG), índice de velocidade de emergência (IVE), percentual de germinação e percentual de emergência

Neste experimento, sementes de cafeeiro da cultivar Acaiá do Cerrado intactas e sem pergaminho foram imersas em soluções de celulase de *Aspergillus niger* SIGMA (1,6 g.L⁻¹ em tampão citrato de potássio 0,05 M, pH 4,8); imersas apenas em tampão citrato de potássio e imersas somente em água destilada por períodos variados (0, 24, 48, 72 e 144 horas). No tempo 0, sementes foram imersas e logo em seguida retiradas das soluções de imersão.

Após esta operação, algumas sementes foram submetidas ao teste de germinação, colocadas para germinar em rolos de papel “germitest” umedecidos com água destilada na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel e mantidas em câmaras de germinação tipo “Mangelsdorf”, sob luz constante e temperatura de 30 °C, a fim de determinar o IVG e a porcentagem de germinação (plântulas normais).

As avaliações dos testes de germinação foram realizadas por meio de contagens diárias, computando-se o número de sementes que apresentavam início de protrusão da radícula para a determinação do IVG (índice de velocidade de germinação), que foi calculado segundo a fórmula de Maguire (1962), sendo:

$$IVG = G_1/D_1 + G_2/D_2 + \dots G_n/D_n$$

Onde:

IVG= Índice de Velocidade de Germinação

G_1, G_2, \dots, G_n = nº de radículas emergidas, observadas no **intervalo** da 1ª, 2ª, ..., última contagem;

D_1, D_2, \dots, D_n = nº de dias de semeadura à 1ª, 2ª, ..., última contagem.

A porcentagem de germinação foi obtida após **60** dias de semeadura, computando-se o número de **plântulas normais** obtidas, segundo **as** regras para **análise** de sementes (Brasil, **1992**).

O experimento foi constituído de um **fatorial 2x3x5**, sendo **2 tipos** de sementes (com e sem pergaminho), **3 substâncias** de imersão (celulase na concentração de **1,6 g.L⁻¹** em **tampão** citrato de potássio, somente em **tampão** citrato de potássio e em água destilada) e **5 tempos** (**0, 24, 48, 72 e 144** horas de imersão). O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso, utilizando **4 repetições** de 50 sementes.

Já a **outra** parte **das** sementes foi transferida para bandejas plásticas, contendo uma **mistura** de **terra e** de areia em proporções iguais, a **fim** de determinar o NE e a porcentagem de emergência (**plântulas normais**).

Também através de contagens diárias observou-se o número de plântulas emergidas, **assim** consideradas quando desprenderam do **solo**. O IVE (índice de velocidade de emergência) foi **calculado** de acordo com a fórmula de Maguirre (**1962**) referenciada abaixo e a porcentagem de emergência (**plântulas normais**), após **completa** estabilização do estande, foi **finalizada** aproximadamente aos 80 dias de semeadura.

$$IVE = E_1/D_1 + E_2/D_2 + \dots E_n/D_n$$

Onde:

IVE= Índice de Velocidade de Emergência

$E_1, E_2, \dots, E_n = n^\circ$ de plântulas emergidas na 1ª, 2ª, ..., última contagem;

$D_1, D_2, \dots, D_n = n^\circ$ de dias de semeadura na 1ª, 2ª, ..., última contagem.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância através do programa Saeg, seguido pelo teste de média, o de Tukey, a nível de 5% de probabilidade.

Experimento 3. Embebição de sementes de cafeeiro em diferentes concentrações de celulase sobre o IVG (índice de velocidade de germinação), porcentagem de germinação, IVE (índice de velocidade de emergência) e porcentagem de emergência

O experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura/Setor de Sementes da Universidade Federal de Lavras, utilizando também sementes de cafeeiro da cultivar **Acaia** do Cerrado, colhidas na fazenda experimental da EPAMIG, no município de **Lavras, MG**.

Sementes com endocarpo (pergaminho) foram imersas em **soluções** contendo diferentes concentrações de celulase (1,6; 3,2 e 6,4 g.L⁻¹) preparadas em tampão citrato de potássio 0,05 M a pH 4,8 e sementes imersas somente em água destilada (concentração 0 de celulase). Os tratamentos de pré-embebição variaram de 0, 72 e **144 horas**. Durante o período de imersão, as sementes foram mantidas em **câmara tipo BOD**, numa temperatura constante de 30 °C, sob luz contínua e aeração constante.

Em seguida, algumas sementes foram colocadas para germinar em rolos de papel “germitest” umedecidos com água destilada, na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel, e mantidas em germinador tipo “Mangelsdorf” sob temperatura de 30 °C.

Outra parte das sementes foi transferida para bandejas plásticas contendo uma mistura de terra e de areia em proporções iguais e colocada em sala de crescimento. As avaliações foram as mesmas do experimento 2, em que foram determinados IVG, IVE, porcentagem de germinação e porcentagem de emergência.

O experimento foi constituído de um fatorial 4x3, sendo 4 concentrações da enzima: 0 (imersão em água destilada); 1,6; 3,2 e 6,4 g.L⁻¹ de celulase e 3 tempos de imersão (0, 72 e 144 horas de imersão). O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso, utilizando 4 repetições com 50 sementes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Experimento 1

Na Figura 1 estão apresentados os resultados da atividade da enzima celulase em diferentes concentrações em pergaminho de sementes de cafeeiro. Observa-se que a quantidade de açúcar liberado foi diretamente relacionada com a concentração de enzima, sendo que, em concentrações mais elevadas, aumentou de maneira acentuada a quantidade de açúcares redutores produzidos. Howard e Elliott (1988), fazendo um trabalho com sementes de *Euonymus americanus*, verificaram que a quantidade de açúcar redutor liberado de sementes estava diretamente relacionada com a concentração de enzima na solução enzimática.

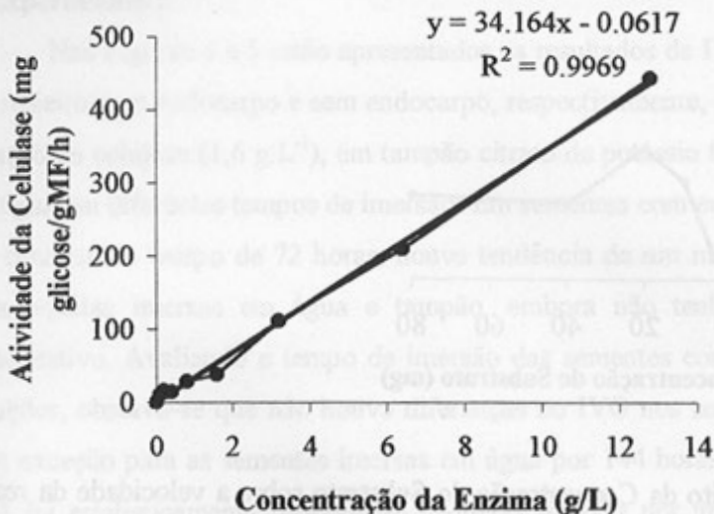


FIGURA 1- Efeito das Concentrações de Enzima sobre a velocidade da reação em pergaminho de sementes de cafeeiro. UFLA, 2002

Na Figura 2 estão apresentados os resultados da atividade da enzima celulase em diferentes concentrações de substrato pergaminho. Verifica-se que na concentração de 20 mg de substrato houve maior atividade da enzima. Na concentração de 40 mg de substrato, houve um decréscimo acentuado devido, provavelmente, a uma inibição parcial da enzima, na concentração de 80 mg houve tendência de estabilização devido à saturação dos sítios ativos.

Pelos resultados apresentados na Figura 3, referentes a açúcares redutores originários da sacarificação enzimática do pergaminho M aplicação exógena de celulase, observa-se que houve aumento expressivo e linear na quantidade de açúcares redutores liberados nas duas concentrações (1,6 e 3,2 g.L⁻¹) à medida que aumentou o tempo de incubação das amostras de substrato (pergaminho) com a solução enzimática.

Notase, também, que houve maior atividade enzimática quando se utilizou a maior concentração (3,2 g.L⁻¹).

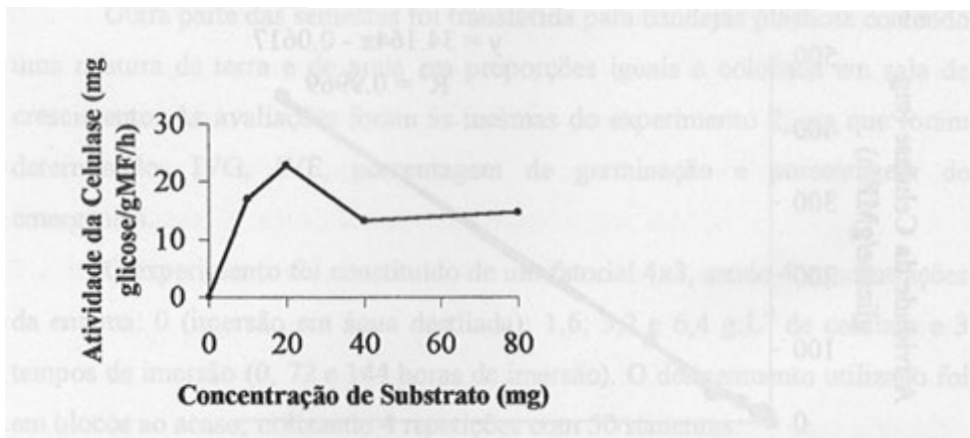


FIGURA 2- Efeito da Concentração do Substrato sobre a velocidade da reação em pergaminho de sementes de cafeeiro. UFLA, 2002.

Howard e Elliott (1988) também *constataram* que houve aumento na quantidade de açúcares redutores com o aumento do tempo de *contato* entre sementes e extratos enzimáticos.

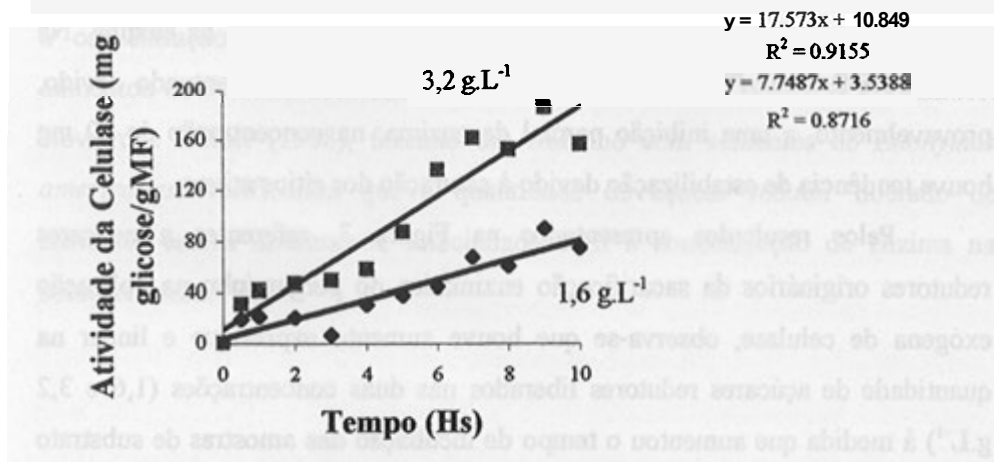
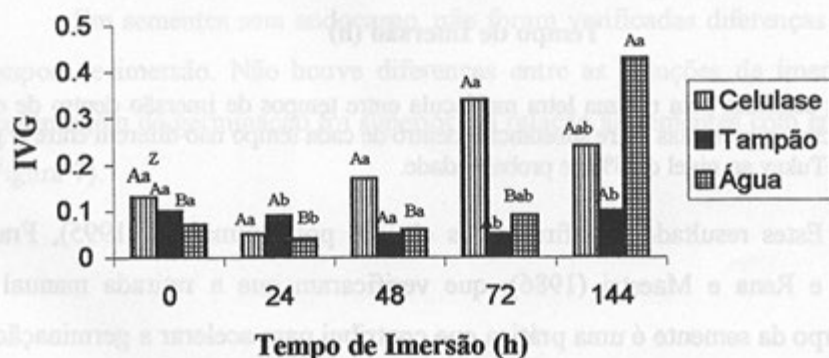


FIGURA 3- Sacarificação enzimática do pergaminho de sementes de cafeeiro em solução de celulase em concentrações de 1,6 e 3,2 g.L⁻¹. UFLA, 2002.

2. Experimento 2

Nas Figuras 4 e 5 estão apresentados os resultados de IVG em sementes de cafeeiro com endocarpo e sem endocarpo, respectivamente, após imersão em solução de celulase ($1,6 \text{ g.L}^{-1}$), em tampão citrato de potássio $0,05 \text{ M}$, pH 4,8 e em água em diferentes tempos de imersão. Em sementes com endocarpo imersas em celulase no tempo de 72 horas, houve tendência de um maior IVG do que para aquelas imersas em água e tampão, embora não tenha havido efeito significativo. Avaliando o tempo de imersão das sementes com endocarpo nas soluções, observa-se que não houve diferenças no IVG nos tempos analisados, com exceção para as sementes imersas em água por 144 horas, para as quais o IVG foi estatisticamente superior ao daquelas imersas por um menor período (Figura 4).

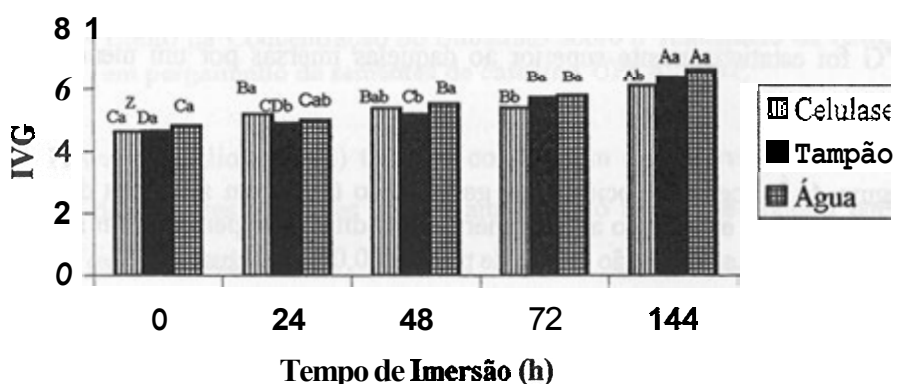
Figura 4- Índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de cafeeiro com endocarpo após a imersão por diferentes períodos em solução de celulase, tampão citrato de potássio $0,05 \text{ M}$ e água.



^ZMédias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tempos de imersão dentro de cada substância e minúsculas entre substâncias dentro de cada tempo não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Guimarães (2000) **constatou** que tratamento de sementes de *cafeeiro* em água por **8 dias**, a **30° C**, aumenta a **taxa** de germinação. Neste mesmo sentido, Camargo (1998) verificou que **o IVG** aumentou de 1,34, **no** tratamento **controle**, para 2,72 em sementes imersas em água por **9 dias**. Verifica-se que sementes sem endocarpo apresentaram IVG superior às sementes com endocarpo, em todas as **soluções de imersão** analisadas (Figura 5).

Figura 5- Índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de *cafeeiro* sem endocarpo após a imersão por diferentes períodos em **solução** de celulase, **tampão** citrato de potássio 0,05 M e **água**.



^zMédias seguidas pela mesma letra **maiúscula** entre **tempos** de imersão **dentro** de cada **substância** e **minúsculas** entre **substâncias** dentro de cada tempo **não** diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de **probabilidade**.

Estes resultados confirmam os obtidos por Guimarães (1995), França (1970) e Rena e Maestri (1986), que verificaram que a **retirada** manual do endocarpo da semente é **uma** prática que **contribui** para acelerar a germinação de sementes de *cafeeiro*. Segundo Lima (1999), sementes de *cafeeiro* com endocarpo absorvem menor **quantidade** de água **em** relação às sementes sem endocarpo.

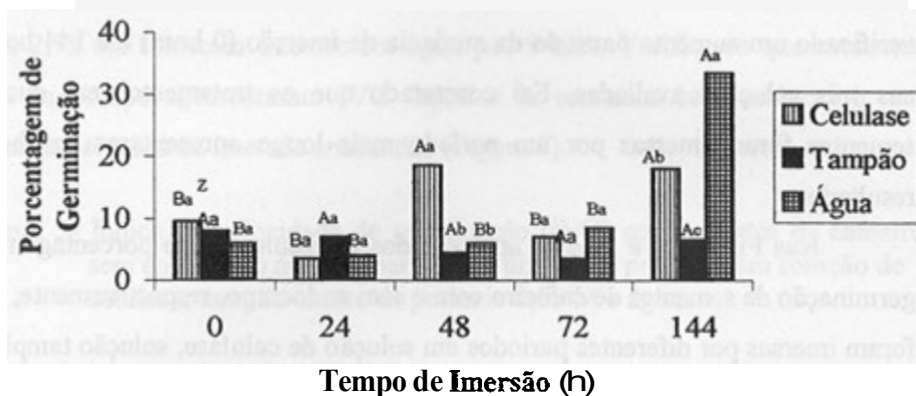
Os maiores índices de velocidade de germinação em sementes sem endocarpo ocorreram em sementes imersas por **144 horas** (Figura 5),

evidenciando que a imersão por um período mais longo faz com que as sementes passem pelas fases preparatórias à germinação mais rapidamente que as não imersas, ocorrendo a germinação mais depressa. De uma maneira geral foi verificado um aumento partindo da ausência de imersão (0 hora) até 144 horas, nas três soluções avaliadas. Foi constatado que os tratamentos em que as sementes foram imersas por um período mais longo apresentaram melhores resultados.

Nas Figuras 6 e 7 estão apresentados os resultados de porcentagem de germinação de sementes de cafeeiro com e sem endocarpo, respectivamente, que foram imersas por diferentes períodos em solução de celulase, solução tampão e água. Observa-se que sementes com endocarpo apresentaram porcentagem de germinação inferior às sementes sem endocarpo devido ao endocarpo ser uma barreira que dificulta a entrada de água, culminando com a lentidão na velocidade de germinação das sementes de cafeeiro. Sementes com endocarpo imersas em celulase por 48 e 144 horas e em água por 144 horas apresentaram porcentagens de germinação superiores (Figura 6).

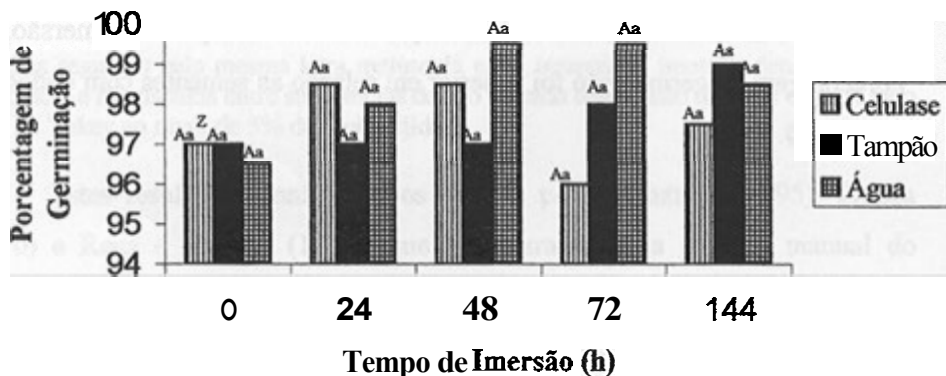
Em sementes sem endocarpo, não foram verificadas diferenças entre os tempos de imersão. Não houve diferenças entre as soluções de imersão, e a porcentagem de germinação foi superior em relação às sementes com endocarpo (Figura 7).

Figura 6- Porcentagem de germinação de sementes de cafeeiro **com** endocarpo após a imersão por diferentes períodos em solução de celulase, tampão citrato de potássio 0,05 M e água.



^ZMédias seguidas pela mesma letra **maiúscula** entre tempos de imersão dentro de cada substância e **minúsculas** entre substâncias dentro de cada tempo não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

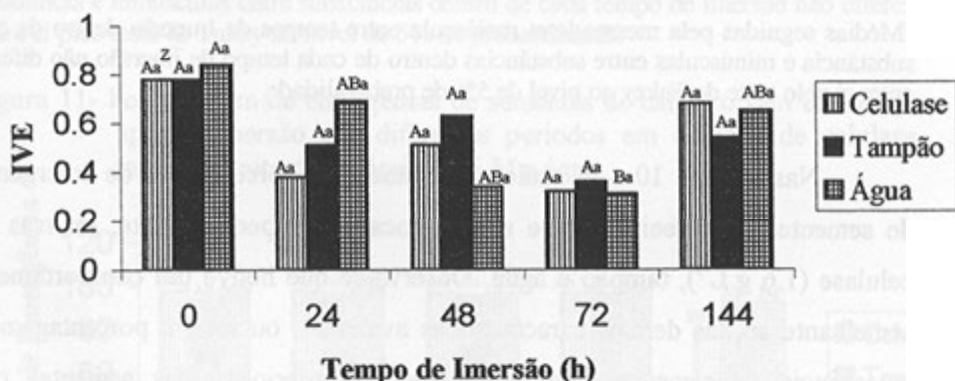
Figura 7- Porcentagem de germinação de sementes de cafeeiro **sem** endocarpo após a imersão por diferentes períodos em solução de celulase, tampão citrato de potássio 0,05 M e água.



^ZMédias seguidas pela mesma letra **maiúscula** entre tempos de imersão dentro de cada substância e **minúsculas** entre substâncias dentro de cada tempo não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Nas Figuras 8 e 9 estão apresentados os resultados de IVE de sementes de cafeeiro com e sem endocarpo, respectivamente, que foram imersas em solução de celulase ($1,6 \text{ g.L}^{-1}$), tampão e água. Verifica-se que assim como para o IVG e porcentagem de germinação, que o IVE foi menor em sementes com o endocarpo (Figura 8). Neste tipo de sementes quando imersas em água se destacaram apresentando melhores índices em 24 horas de imersão e o maior IVE foi obtido quando estas foram imersas em água por 24 horas, e os demais tempos não diferiram entre si (Figura 9).

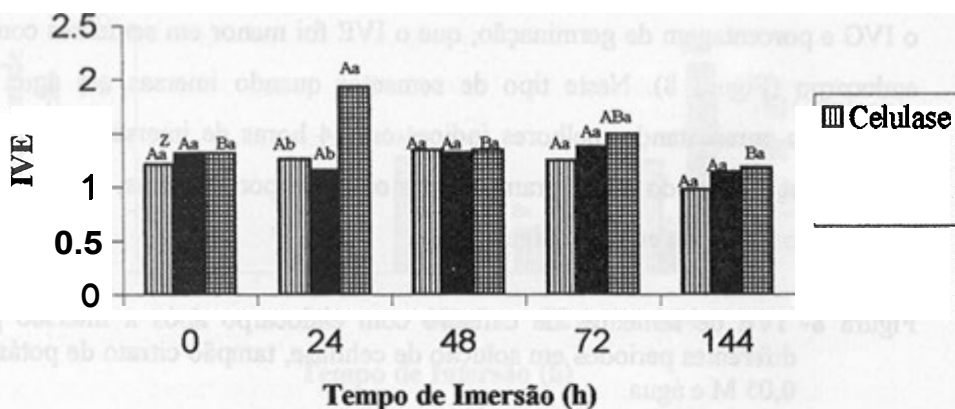
Figura 8- IVE de sementes de cafeeiro com endocarpo após a imersão por diferentes períodos em solução de celulase, tampão citrato de potássio $0,05 \text{ M}$ e água.



²Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tempos de imersão dentro de cada substância e minúsculas entre substâncias dentro de cada tempo de imersão não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em sementes com endocarpo, não houve efeito significativo da solução de imersão sobre o IVE, em todos os tempos analisados (Figura 8), o que não foi observado para sementes sem endocarpo onde as imersas em água apresentaram, em média, maior IVE, seguidas do tampão e, por último, da celulase (Figura 9).

Figura 9- IVE de sementes de **cafeeiro** sem endocarpo após a imersão por diferentes períodos **em** solução de celulase, **tampão citrato** de potássio 0,05 M e água.



^ZMédias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tempos de imersão dentro de cada substância e minúsculas entre substâncias dentro de cada tempo de imersão não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

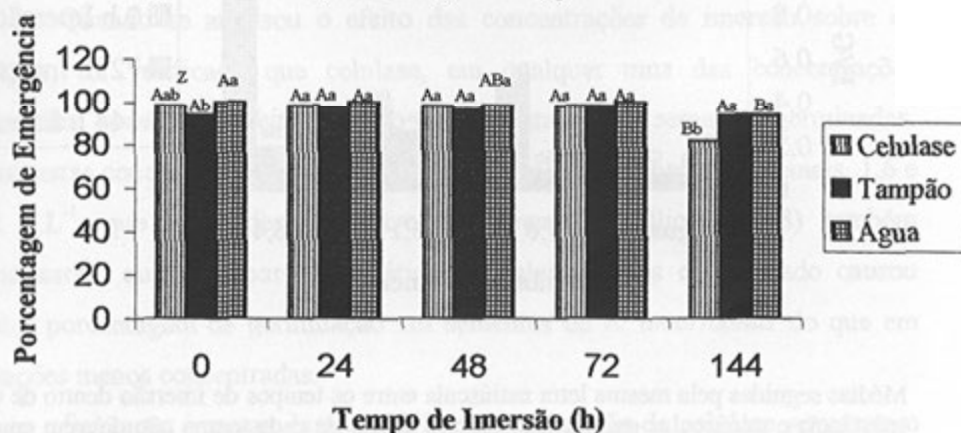
Nas Figuras 10 e 11 estão apresentadas as porcentagens de emergência de sementes de cafeeiro com e sem endocarpo, respectivamente, imersas em celulase (1,6 g.L⁻¹), tampão e água. Observa-se que houve um comportamento semelhante ao das demais características avaliadas, ou seja, a porcentagem de emergência de sementes com endocarpo foi inferior à das sementes com ausência deste. Analisando o efeito do tempo de imersão sobre o tipo de solução em sementes com endocarpo foi verificado que o tempo não exerceu influência significativa sobre a emergência das plântulas (Figura 10). Para sementes sem endocarpo, apenas aquelas imersas 144 horas em celulase diferiram estatisticamente dos demais, apresentando menor porcentagem de emergência (Figura 11).

Figura 10- Porcentagem de emergência de sementes de cafeeiro com endocarpo após a imersão por diferentes períodos em solução de celulose, tampão citrato de potássio 0,05 M e água.



^ZMédias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tempos de imersão dentro de cada substância e minúsculas entre substâncias dentro de cada tempo de imersão não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 11- Porcentagem de emergência de sementes de cafeeiro sem endocarpo após a imersão por diferentes períodos em solução de celulose, tampão citrato de potássio 0,05 M e água.

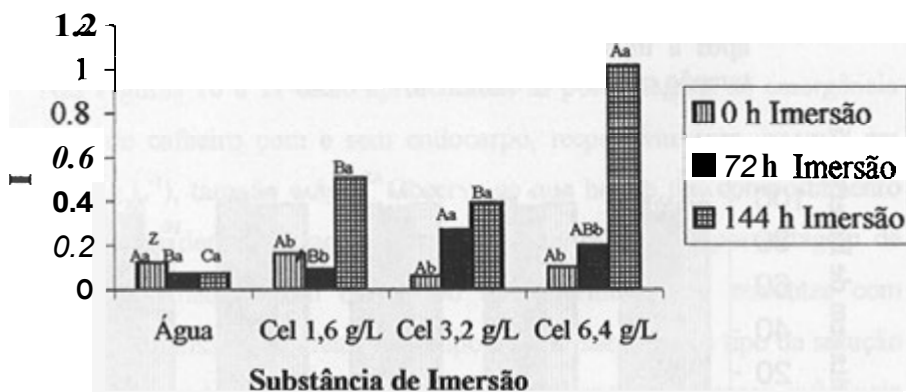


^ZMédias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tempos de imersão dentro de cada substância e minúsculas entre substâncias dentro de cada tempo não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3. Experimento 3

Na **figura 12 estão** apresentados os resultados de IVG de sementes de caféiro submetidas a diferentes tempos e concentrações de celulase (0; 1,6; 3,2; 6,4 g.L⁻¹). Verifica-se que as sementes que foram imersas em **solução enzimática** apresentaram resultados superiores de índice de velocidade de germinação se comparadas com aquelas imersas somente em água (**ou seja, a concentração 0** de celulase), sendo que na **concentração mais** elevada (6,4 g.L⁻¹), as sementes apresentaram maior índice do que na menores concentrações testadas, que **não** diferiram entre si.

FIGURA 12-Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de caféiro submetidas, por diferentes tempos de imersão, a diferentes concentrações de celulase. LAVRAS, UFLA, 2002.



Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre os tempos de imersão dentro de cada substância e minúsculas entre as substâncias dentro de cada tempo não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em 72 horas de imersão as 2 maiores concentrações da enzima proporcionaram maiores resultados (Figura 12). As sementes imersas em solução de celulase por 144 horas apresentaram resultados superiores,

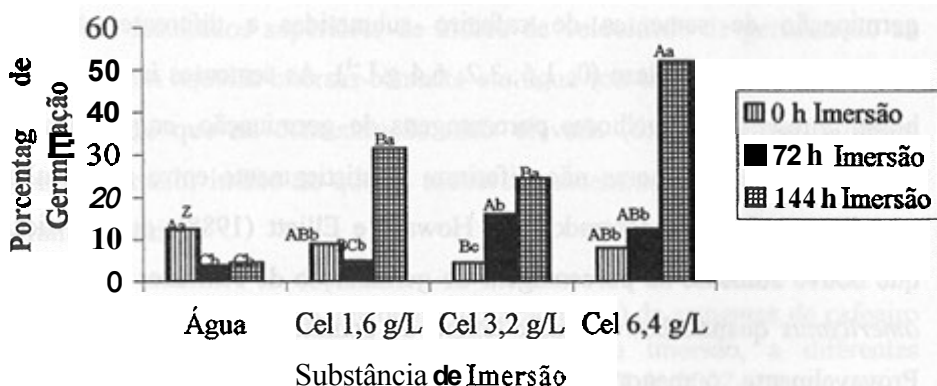
demonstrando ser necessário maior tempo de contato das sementes com a solução enzimática. Melhor IVG foi obtido pelas sementes imersas na maior concentração, ou seja, $6,4 \text{ g.L}^{-1}$.

Na Figura 13, estão apresentados os resultados de porcentagem de germinação de sementes de cafeeiro submetidas a diferentes tempos e concentrações de celulase (0; 1,6; 3,2; $6,4 \text{ g.L}^{-1}$). As sementes imersas por 144 horas apresentaram melhores porcentagens de germinação, enquanto aquelas imersas por 0 e 72 horas não diferiram estatisticamente entre si. Resultados semelhantes foram encontrados por Howard e Elliott (1988), que verificaram que houve aumento na porcentagem de germinação de sementes de *Euonymus americanus* quando houve maior tempo de contato entre sementes e enzima. Provavelmente, o menor tempo de contato das sementes de cafeeiro com a solução enzimática não tenha sido suficiente para a enzima degradar suficientemente o endocarpo da semente e permitir que a germinação ocorresse mais rapidamente.

Quando se analisou o efeito das concentrações de imersão sobre os tempos, foi verificado que celulase, em qualquer uma das concentrações estudadas, apresentou efeito positivo na porcentagem de sementes germinadas. Entre estas concentrações, $6,4 \text{ g.L}^{-1}$ foi estatisticamente superior às demais, 1,6 e $3,2 \text{ g.L}^{-1}$, que não diferiram entre si. Howard e Elliott (1988) também constataram que o preparo enzimático de celulase mais concentrado causou maior porcentagem de germinação em sementes de *E. americanus* do que em soluções menos concentradas.

Sementes imersas durante 72 horas em solução de celulase apresentam maior germinação, sendo esta mais acentuada nas duas maiores concentrações. Reforçando os resultados obtidos para IVG, em 144 horas de imersão em celulase foi encontrado um efeito positivo na porcentagem de germinação, quando comparado com a imersão em água.

FIGURA 13- Porcentagem da **germinação** de sementes de cafeeiro **submetidas**, por diferentes tempos de imersão, a diferentes **concentrações** de celulase. LAVRAS, UFLA, 2002.

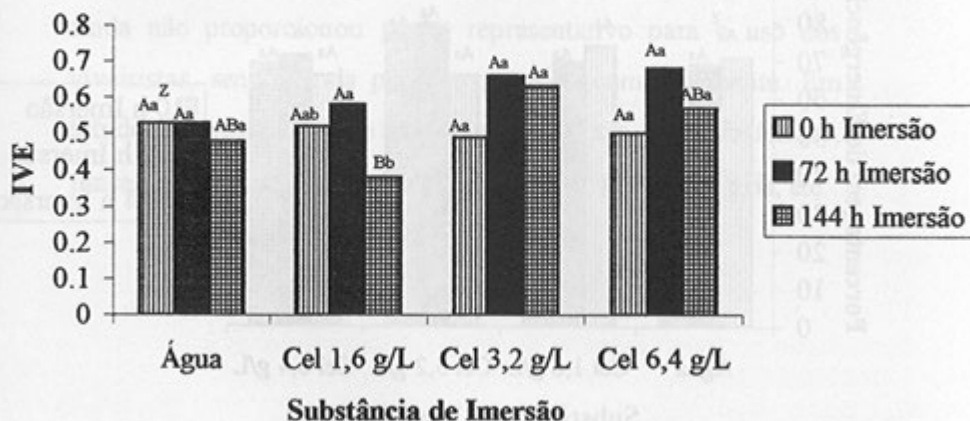


Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre os tempos de imersão dentro de cada substância e minúsculas entre substâncias dentro de cada tempo não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Entre as concentrações de celulase estudadas, sementes imersas **M** concentração de $6,4 \text{ g.L}^{-1}$ apresentaram resultados superiores, atingindo 52% de germinação, sendo que as sementes imersas em concentrações mais baixas apresentaram resultados inferiores, porém **não** diferentes **entre si**, 31,5 e 24,0 % para 1,6 e $3,2 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente (Figura 13).

Na Figura 14, referente ao índice de velocidade de emergência de sementes de cafeeiro imersas em diferentes concentrações da **enzima celulase**, foi verificado que **só houve** diferenças **no** tempo de imersão de 144 horas, quando **se utilizou** celulase **M** concentração de $1,6 \text{ g.L}^{-1}$, em que foi constatado o menor índice, comparado com **outros** tempos e soluções de imersão analisados.

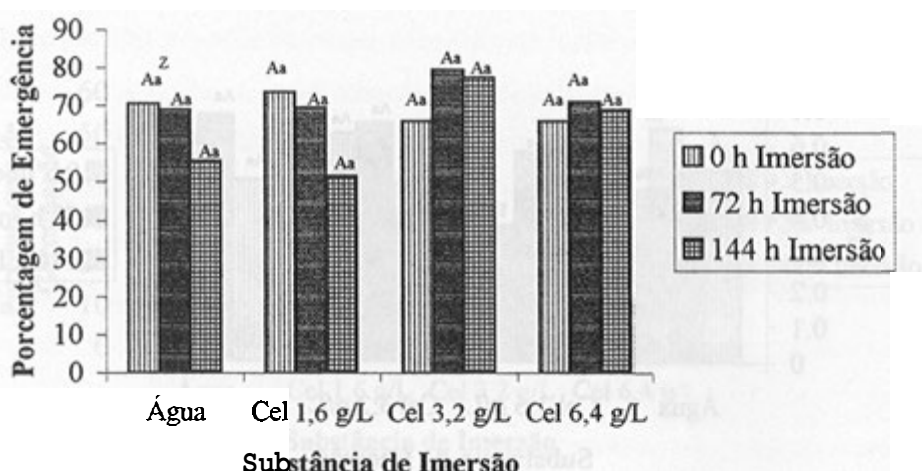
FIGURA 14- Índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de cafeeiro submetidas, por diferentes tempos de imersão, a diferentes concentrações de celulase. LAVRAS, UFLA, 2002.



^ZMédias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tempos de imersão dentro de cada substância e minúsculas entre soluções dentro de cada tempo não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Pelos resultados apresentados na Figura 15, referentes à porcentagem de emergência, verifica-se que não houve diferenças significativas entre as características avaliadas. Estes resultados provavelmente se devem à ação dos microrganismos presentes no substrato (solo), que aceleraram o processo de degradação do pergaminho das sementes, conforme descrito por Guimarães (1995), diferenciando este dos resultados do teste de germinação em meio asséptico, onde foi verificada uma ação positiva da enzima diminuindo o tempo de germinação dessas sementes.

FIGURA 15- Porcentagem de emergência de sementes de cafeeiro submetidas, por diferentes tempos de imersão, a diferentes concentrações de celulase. LAVRAS, UFPA, 2002.



‘Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tempos de imersão dentro de cada substância e minúsculas entre substâncias dentro de cada tempo diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

5 CONCLUSÕES

- A hidrólise do endocarpo do cafeeiro “in vitro” é diretamente proporcional à concentração da enzima celulase utilizada;
- A hidrólise do endocarpo de sementes do cafeeiro cresce linearmente em função do tempo de exposição à enzima celulase;
- Sementes sem endocarpo apresentam maiores IVG, IVE, germinação e emergência que as sementes com endocarpo;
- A enzima celulase na concentração de 6,4 g.L⁻¹ proporciona maior IVG e porcentagem de germinação quando as sementes ficam em contato com a solução por 144 horas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os experimentos demonstraram que a celulase, embora proporcione melhora na germinação das sementes de cafeeiro, ainda não proporcionou ganho representativo para o uso dos viveiristas, sendo ainda pouco expressiva comercialmente. Em estudos futuros, sugere-se testar outras enzimas, como fosfatases, fitases, peroxidases, endo- β -mananase, outros tampões, pHs, etc.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-BAKI, A. A. Biochemical aspects of seed vigor. *HortScience*, Alexandria, v. 5, n. 6, p. 765-771, Dec. 1980.
- ALVARENGA, A. A.; FRAGA, A. C.; SILVEIRA, J. F. da, SEDIYAMA, T. Estudo de métodos físicos e químicos sobre a **redução** do periodo de sementeira e emergência em sementes de *Coffea arabica* L. 32º Congresso Nacional de Botânica – Teresina, PI. vol. 1, pag.102, 1981.
- ALVES, F. R.; PEREIRA, M. R.; FIGUEIREDO JÚNIOR, W. P. de; VON PINHO, E. V. R.; GUIMARÃES, R. J. Avaliação da presença de inibidores da germinação no espermoderma de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 22., 1996, Águas de Lindóia. **Resumos...** Rio de Janeiro: MAARA/PROCAFÉ, 1996.p.95
- ANDRADE, V. M. M.; DAMIÃO-FILHO, C. F. Morfologia vegetal. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1989. 259p.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO CAFÉ. Rio de Janeiro, 1997.
- BIANCHETTI, A. **Tratamentos** pré-germinativos para sementes florestais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE TECNOLOGIA DE SEMENTES FLORESTAIS, 2., 1989, Atibaia. Anais... São Paulo: Instituto Florestal, 1991. p.237-246.
- BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, LB.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLA, M. B. (Coord.). Sementes florestais tropicais. Brasília: ABRATES, 1993.p.83-135.
- BENDAÑA, F. E. Fisiologia de las semillas de café. Turrialba, Turrialba, v. 4, n. 5, p. 99-106, set./oct. 1962.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds:** physiology of development and germination. 2.ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BRADFORD, K. J. Water relations in seed germination. In: KIGEL, Y. GALILI, G. (Ed.) *Seed development and germination*. New York: Marck Dekker, 1995. cap. 3, p.351-356.

BRASIL. Ministério da Agricultura. *Regras para análise de sementes*. Brasília: DNPV-DISEM, 1992. 365p.

CALERO, E.; WEST, S. H.; HINSON, K. Water absorption of soybean associated causal factors. *Crop Science*, Madison, v. 21, n. 6, p. 926-933 Nov./Dec. 1981.

CAMARGO, R. de. *Condicionamento fisiológico de sementes de cafeeiro (Coffea arabica L.)*. UFLA 1998. 108p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia); Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CARVALHO, M. M. de; ALVARENGA, G. Determinação do estágio de desenvolvimento mínimo do fruto do cafeeiro (*Coffea arabica L.*) para a germinação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 7., 1979, Araxá. *Resumos...* Rio de Janeiro: IBC-GERCA, 1979.

CONN, E. E.; STUMPF, P. K. *Introdução à bioquímica*. 3. ed. (Tradução: Lélia Mennucci e M. Júlia Manso Alves), 1975.

COPELAND, L. O.; MCDONALD, M. B. *Principles of seed science and technology*. 3. ed. New York: Chapman & Hall, 1995. 409p.

DIAS, J. C.; GOMEZ, R. J. H. C. Atividade de enzimas celulósicas de *Trichoderma reesei* em casca de semente de cacau (*Theobroma cacao L.*): estudo cinético. *Ciência e Prática*, Lavras, v. 10, n. 3, p. 304-314, set./dez. 1986.

FAO. QBS. *Quartely Bulletin of Statistics*, Roma, v. 9, n. 3/4, p. 119, 1996.

FRANÇA, C. M. *Apontamentos de fisiologia do cafeeiro*. Campinas: Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, 1970. 55p.

GOLDMAN, G. H. Estudos genéticos e produção de celulase em *Aspergillus niger*. 1988. 153p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Escola superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

GRIZOTTO, R. K.; MENEZES, T. J. B. de. Efeito de enzimas de maceração na textura do palmito (*Euterpe edulis* Mart). Ciência e tecnologia de alimentos, Campinas, v. 17, n. 3, p. 203-207, set./dez. 1997.

GUIMARÃES, R. J. Análise do crescimento e da quantificação de nutrientes em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) durante seus estádios de desenvolvimento em substrato padrão. 1995. 113p. Dissertação (Mestrado em Fitotemia). Escola superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

GUIMARÃES, R. M. Tolerância à dessecação e Condicionamento Fisiológico em sementes de Cafeeiro: (*Coffea arabica* L.). 2000. 180p. Tese (Doutorado em Fitotemia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

HOWARD, G. T.; ELLIOTTI, L. P. Effects of cellulolytic ruminal bacteria and of cell extracts on germination of *Euonymus americanus* L. Seeds. Applied and environmental Microbiology, Washington, v. 54, n. 1, p. 218-224, Jan. 1988.

HSU, K. H.; KIM, C. J.; WILSON, L. A. Factors affecting water uptake of soybean during soaking. Cereal Chemistry, St. Paul, v. 60, n. 3, p. 208-211, May/June 1983.

HUXLEY, P. A. Coffee germination test recommendations and defective types. Proceedings of the international seed testing association, Vallebekk, v. 30, p. 705-715, 1965

LABOURIAU, L.G. A germinação da semente. Washington: Secretaria Geral da OEA, 1983. 173p.

LIMA, W. A. A. Condicionamento fisiológico, germinação e vigor de sementes de café (*Coffea arabica* L.). 1999. 69p. Dissertação (Mestrado em Fitotemia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

LIMA, W. A. A.; DIAS, D. C. F. S.; ALVARENGA, E. M.; REIS, M. S.; CECON, P. R. Preconditioning of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: effects on

germination, vigour and storability: Seed Science and Technology, Zurich, v. 29, n. 3, p. 549-555, 2001.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling and vigour. Crop Science, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar/Apr. 1962

MANDELS, M.; WEBER, J.; PÁRIZEK, R Enhanced cellulase production by a mutant of *trichoderma-viride*. Applied Microbiology, Washington, v. 21, n. 1, p. 152, Jan. 1971

MARCONDES, D. M. S. S. V.; SILVA, D. M.; VITTI, L. S. S.; SILVA, J. C. Celulase do extrato de Rúmen **Bovino**. Energia Nuclear e Agricultura, Piracicaba, v. 5, n. 2, p. 145-160, jul./dez. 1983.

MAYER, A. M.; MAYBER, A. P. The germination of seeds. 2. ed. Oxford: Pergamon Press, 1978. 192p.

MIRANDA, J. M.; VIEIRA, M. das G. G. C.; CARVALHO, M. M. de. 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, maio/ago. 1990.

NECHET, K. de L. Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp em cafeeiro (*Coffea arabica* L). 1999. 73p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PERTEL, J. Efeito do condicionamento fisiológico na germinação, no vigor e nas alterações enzimáticas em sementes de café (*Coffea arabica* L.). 2001. 101p. Dissertação (Mestrado em Fitotemia) – Universidade Federal de Viçosa, MG.

POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. Brasília: AGIPLAN, 1997. 289p.

REESE, E. T.; MAGUIRE, A. Surfactants as stimulantes of enzymes production by microorganisms. Applied Microbiology, Washington, v. 17, n. 2, p. 242, Feb. 1969.

REESE, E. T.; SIU, R. G. H.; LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 59, n. 4, p. 485-497, 1950.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE FATORES QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE DO CAFEIEIRO, 1986, Poços de Caldas. Anais... Piracicaba: POTAFÓS, 1986.p.13-85.

SANTOS, S. R. G. dos. Efeito da temperatura na germinação de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith e Downs (Branquilho). 1999. 76p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Produção e Tecnologia de Sementes). Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.

SOUZA, F.H.D. Características físicas das sementes de *Calopogonium mucunoides* Desv. associadas à qualidade fisiológica e ao padrão de absorção de água: I. Tamanho. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v. 18, n. 1, p. 33-40, 1996

URJETA, A. B.; TOMA, M.; PARK, Y. K. Estudo comparativo da produção de celulase fúngica por fermentação submersa e por cultura em semi-sólida. *Revista Brasileira de Tecnologia*, Brasília, v. 6, n. 2, p. 181-188, jun. 1975.

VALIO, I.F.M. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L.) cv. Mundo Novo. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 27, n. 100, p. 983-991, Sep. 1976

ANEXOS A

TABELA 1A- Resumo da análise de variância relativa ao IVG, Porcentagem de germinação, IVE e Porcentagem de emergência em sementes de cafeeiro após a imersão, por diferentes períodos, em solução de celulase (1,6 g.L⁻¹), tampão citrato de potássio 0,05 M pH 4,8 e água. 38

TABELA 2A- Resumo da análise de variância relativa ao IVG, Porcentagem de germinação, IVE e Porcentagem de emergência em sementes de cafeeiro que foram submetidas, por diferentes tempos de imersão, a diferentes concentrações de celulase (0; 1,6; 3,2 e 6,4 g.L⁻¹).. 38

TABELA 1A - Resumo da análise de variância relativa ao IVG, Germinação, IVE e Porcentagem de emergência de sementes de caféiro após imersão por diferentes períodos em solução de celulase (1,6 g.L⁻¹), tampão citrato de potássio 0,05 M e da água. UFLA, Lavras, 2002.

Fontes de Variação	GL	Quadrado médio			
		IVG	% GERM	IVE	% EMERG
Total	119				
Total de redução	32	26,97031'	7414,346*	0,7027422*	1518,281*
Repetição (REPE)	3	0,1896666E-01 ^{ns}	5,900000 ^{ns}	0,4416022*	2,386111 ^{ns}
Tempo imersão (TEMP)	4	3,205892*	219,1333.	0,1559616 ^{ns}	1175,867
Solução imersão (SOM)	2	0,1546407*	119,6333*	0,1950431 ^{ns}	324,0583:
Tipo de Semente (TISE)	1	839,8405'	233553,6*	16,84501'	23660,21
TEMP*SOIM	8	0,7236899E-01*	100,5083*	0,1300266 ^{ns}	616,2042*
TEMP*TISE	4	2,077897'	179,1333'	0,4106884'	2065,667*
SOIM*TISE	2	0,1913273'	91,03333'	0,1315833 ^{ns}	353,2583:
TEMP*SOIM*TISE	8	0,9332224E-01*	108,6583'	0,4473332E-01*	708,4042
Resíduo	87	0,2769947E-01	15,62397	0,7207119E-01	5,891781
Média Geral		2,7823	53,717	0,93233	82,358
Coefficiente Variação		5,9817	7,3585	28,795	2,9472

*Significativa a nível de 5% de probabilidade

"Não significativo

TABELA 2A- Resumo da análise de variância relativa ao IVG, Porcentagem de germinação, N E e Porcentagem de emergência de sementes de caféiro submetidas por diferentes tempos de imersão em diferentes concentrações de celulase (0; 1,6; 3,2 e 6,4 g.L⁻¹). LAVRAS, UFLA, 2002.

Fontes de Variação	GL	Quadrado médio			
		IVG	% GERM	IVE	% EMERG
Total	47				
Total de redução	14	0,2450797*	656,3810'	0,2444180E-01*	220,4642 ^{ns}
Repetição (REPE)	3	0,1051639E-01 ^{ns}	36,22222 ^{ns}	0,9822690E-02 ^{ns}	84,52778 ^{ns}
Solução imersão (SOIM)	3	0,2458216:	590,4445*	0,2955602E-01 ^{ns}	237,6389 ^{ns}
Tempo imersão (TEMP)	2	0,7159199	1966,583*	0,5220288E-01*	322,5833 ^{ns}
TEMP*SOIM	6	0,2050437'	562,6945'	0,1994057E-01 ^{ns}	245,8056 ^{ns}
Resíduo	33	0,7769614E-02	13,73736	0,1146203E-01	168,1036
Média Geral		025425	15,333	0,54623	68308
Coefficiente Variação		34,669	24,172	19,600	19,009

'Significativo a nível de 5% de probabilidade

"Não significativo