

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E  
BIOQUÍMICAS DURANTE A GERMINAÇÃO  
DE SEMENTES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L. )  
CV. RUBI.

**MARIA DE LOURDES RESENDE**

**2006**

**MARIA DE LOURDES RESENDE**

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS  
DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE  
CAFÉ (*Coffea arabica* L.) CV. Rubi.**

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

Orientador

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Resende, Maria de Lourdes

Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) CV. Rubi / Maria de Lourdes Resende. –  
Lavras: UFLA, 2006.

108 p. : il.

Orientador: Renato Mendes Guimarães.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Café. 2. Semente. 3. Germinação. I. Universidade Federal de Lavras. II.  
Título.

CDD-633.7321

**MARIA DE LOURDES RESENDE**

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DURANTE A  
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) CV. Rubi.**

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

APROVADA em 07 de agosto de 2006.

Pesq. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva	PRODOC CAPES
Pesq. Dr. Antônio Rodrigues Vieira	EPAMIG
Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho	UFLA
Pesq. Dra. Kalinka Carla Padovani de Carvalho Salgado	PRODOC FAPEMIG

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Ézio Resende e Josina Aparecida Resende, pelo exemplo e apoio em todas as etapas de minha vida.

Aos meus irmãos pelo carinho e amizade.

### **DEDICO**

Aos meus filhos Marcos e Isabela, meu estímulo a cada minuto.

E, ao meu esposo Adauton, pelo amor e companheirismo.

### **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça de realizar esse trabalho.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Setor de Sementes pela oportunidade de realização do curso.

Ao Professor Renato Mendes Guimarães, pela excelente orientação, dedicação e amizade demonstrada durante o curso.

Aos Professores João Almir de Oliveira pela coorientação e Édila Vilela Resende Von Pinho, pela amizade, participação e contribuições.

Ao Pesquisador Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, do Departamento de Ciências Florestais pela amizade, participação e coorientação.

À Professora Maria Laene Moreira de Carvalho, pela amizade e colaboração.

Aos colegas de curso Carlos Eduardo e André pelas contribuições.

À Pesquisadora Kalinka Carla Padovani pela amizade e valiosas contribuições.

Às amigas: Dinara, Mariney e Solange pelo convívio e amizade.

Às Mestrandas Tanismare e Priscila pela amizade e inúmeras contribuições durante a realização desta pesquisa.

Às amigas do Setor de Sementes: Dona Elza, Dalva, Andréia e Lenir pela amizade, convívio e ajuda durante a condução do experimento.

À laboratorista Maria Aparecida, pela ajuda e amizade na quantificação dos açúcares.

À Mestranda Maria Leandra, minha irmã, pela dedicação aos meus filhos e contribuições durante o curso.

À minha secretária Dulce pela ajuda e amizade.

A todos amigos do setor de sementes, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

### Página

RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Sementes de cafeeiro .....	4
2.2 Germinação de sementes de cafeeiro.....	4
2.3 Hidrólise e mobilização de reservas na germinação .....	13
2.4 Aspectos de substâncias de reservas e tolerância à dessecação em sementes.....	16
2.5 Polifenoloxidase e polifenóis.....	23
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
CAPÍTULO 2.....	40
INFLUÊNCIA DA LUZ E GIBERELINA NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE CAFEIEIRO ( <i>Coffea arabica</i> , L.).....	40
1 RESUMO.....	41
2 ABSTRACT .....	43
3 INTRODUÇÃO .....	45
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	47
4.1 Ensaio I: Giberelina e luz na germinação de sementes de café. ....	47
4.1.1 Procedimento estatístico .....	48
4.2 Ensaio II: Giberelinas endógenas na germinação de sementes de cafeeiro. ....	49
4.2.1 Procedimento estatístico .....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 Ensaio I: Giberelina e luz na germinação de sementes de cafeeiro. ....	51
5.1.1 Índice de velocidade de germinação.....	51
5.1.2 Porcentagem de germinação .....	53
5.1.3 Tempo para 50% de protrusão .....	55
5.2 Ensaio II: Giberelinas endógenas na germinação de sementes de cafeeiro. ....	55
6 CONCLUSÕES .....	66
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
CAPÍTULO 3.....	69
ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE CAFÉ.....	69
1 RESUMO.....	70
2 ABSTRACT .....	72



3 INTRODUÇÃO .....	74
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	76
4.1.Procedimento estatístico .....	77
4.2 Avaliações.....	77
4.2.1 Análise eletroforética de enzimas .....	77
4.2.2 Análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor .....	78
4.2.3 Atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase .....	78
4.2.4 Conteúdo de açúcares .....	80
4.2.5 Polifenóis .....	81
4.2.6 Polifenoloxidase.....	81
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	82
5.1 Análise enzimática.....	82
5.2 Análise de proteínas resistentes ao calor .....	86
5.3 Atividade da endo- $\beta$ -mananase.....	88
5.4 Teor de açúcares .....	90
5.5 Polifenóis .....	96
5.6 Atividade da polifenoloxidase .....	98
6 CONCLUSÕES .....	100
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
ANEXOS .....	105

## RESUMO

RESENDE, Maria de Lourdes. **Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) cv. Rubi.** 2006. 108 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

A propagação do cafeeiro é realizada por meio de mudas provenientes de sementes, porém a germinação das sementes é lenta e desuniforme. Objetivou-se, com esta pesquisa estudar os aspectos da fisiologia da germinação das sementes de cafeeiro da cultivar Rubi. Foram avaliados os efeitos da luz, giberelina e do paclobutrazol (bloqueador de giberelina) sobre a germinação de sementes. Sementes submetidas aos diferentes tratamentos envolvendo luz, giberelina e paclobutrazol foram submetidas à análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor (LEA proteína) e de enzimas (catalase, superóxido dismutase e peroxidase), determinação do teor de açúcares (sacarose, manose, glicose, frutose, galactose, rafinose e estaquiose), da atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase, da enzima polifenoloxidase e porcentagem de polifenóis em cada tempo de embebição. A velocidade de germinação das sementes de cafeeiro, foi reduzida na presença de giberelina. O paclobutrazol reduz a velocidade de germinação de sementes de cafeeiro, mas não reduz o efeito da luz. Maior velocidade de germinação em sementes de cafeeiro foi observada na ausência de luz. Quanto aos padrões isoenzimáticos e de proteínas ocorrem modificações durante a germinação de sementes de cafeeiro. Os açúcares sacarose e manose atuam durante a germinação. A enzima endo- $\beta$ -mananase aumenta nas sementes embebidas na presença de luz e giberelina. A enzima polifenoloxidase reduz durante os processos de germinação e os polifenóis aumentam.

---

\* Comitê Orientador: Dr. Renato Mendes Guimarães - UFLA (Orientador), Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva - UFLA, Dr. João Almir de Oliveira - UFLA.

## ABSTRACT

RESENDE, Maria de Lourdes. **Physiological and biochemical changes during coffee seed germination (*Coffea arabica* L.) cv. Rubi.** 2006. 108 p. Thesis (PhD. in Plant Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Coffee propagation is performed through seedlings from seeds. However, germination in coffee seed is slow and uneven. Therefore, this work had the objective of studying the physiological aspects of seed germination in *Coffea arabica* cv. Rubi. There were evaluated effect of light, gibberellins and paclobutrazol (inhibitor of gibberellins biosynthesis) during seed germination. Seeds after treatment with light, gibberellins and paclobutrazol were subjected to electrophoresis analysis of proteins resistant to heat (LEA proteins) and the enzymes (catalase, superoxide dismutase and peroxidase), determination of sugar content (sucrose, mannose, glucose, fructose, galactose, raffinose and stachyose), the activity of endo- $\beta$ -mannanase, the enzyme polyphenoloxidase and percentage of polyphenols in each time of imbibition. The speed of seed germination was inhibited in seeds treated with gibberellins. The paclobutrazol decreased speed of seed germination did not decrease the effect of light. Higher speed of germination was observed under absence of light. Regarding the patterns of isoenzymes and proteins there were changes during seed germination. Sucrose and mannose act during seed germination. The enzyme endo- $\beta$ -mannanase increased its activity in seeds imbibed under the presence of light and gibberellins. The enzyme polyphenoloxidase decreased its activity whereas polyphenols increased during germination.

---

\* Guidance Committee: Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães – UFLA (Major Professor); Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva – UFLA; Prof. Dr. João Almir de Oliveira – UFLA.

## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O interesse pelo setor cafeeiro no Brasil tem aumentado significativamente devido a sua importância sócio-econômica, estando sua produção ligada ao desenvolvimento e à industrialização do país. Como essa importância econômica vem aumentando gradativamente, há necessidade de pesquisas e difusão de tecnologias específicas, uma vez que o nível de tecnologia tem aumentado nas regiões onde a cafeicultura se instala. Atualmente, o Brasil é considerado o maior produtor e exportador mundial de café.

Entretanto, essa evolução tecnológica, não tem ocorrido de maneira uniforme em todas as etapas de produção. Uma etapa crítica é durante a formação de mudas, sendo este período demasiadamente longo, o qual pode ser atribuída à lenta e desuniforme germinação das sementes de cafeeiro. Esses fatos têm causado diversos prejuízos no processo de formação de mudas e de instalação da lavoura cafeeira, tanto no que se refere ao custo de produção das mudas, quanto em relação à época de seu plantio. Conseqüentemente, impede que as mudas sejam levadas ao campo na época ideal para o plantio, que coincide com o início da estação das chuvas.

Vários trabalhos relativos ao armazenamento, secagem, tolerância à dessecação e fisiologia da germinação das sementes de cafeeiro condizentes com as demandas geradas pelo alto nível tecnológico da cultura têm sido publicados.

Contudo, ainda são escassas as pesquisas referentes à fisiologia e germinação destas, havendo necessidade de mais estudos nesta área, principalmente no que se referem aos fatores, como: presença e ausência de luz e interação dos hormônios como a giberelina.

Sendo assim, o objetivo neste trabalho foi estudar os aspectos da fisiologia da germinação das sementes de cafeeiro.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Sementes de cafeeiro**

O fruto de cafeeiro é uma drupa elipsóide, formada pelo exocarpo (casca), mesocarpo (mucilagem) e o endocarpo coriáceo (pergaminho), contendo dois lóculos e duas sementes envolvidas separadamente pelo pergaminho. Estas sementes têm formato plano-convexas, elípticas ou ovais, contendo um sulco longitudinal na face plana. As sementes de cafeeiro são constituídas de embrião, endosperma, película prateada ou espermoderma e endocarpo (Dedeca, 1957; Illy & Viani, 1995; Rena & Maestri, 1986).

O endosperma garante as reservas de energia necessárias nos processos de germinação e emergência, sendo composto basicamente de carboidratos (Silva, 2002). Este se divide em endosperma cap, o qual envolve a radícula e endosperma lateral, ou seja, o restante do endosperma, no qual ficam armazenadas as substâncias de reservas da semente. O embrião é localizado na base da semente, composto de eixo hipocótilo/radícula e dois cotilédones (Costa, 2003).

### **2.2 Germinação de sementes de cafeeiro**

De acordo com Bewley & Black, (1994) a germinação engloba eventos que se iniciam com absorção de água pela semente e termina com a alongação do eixo embrionário. Sendo assim, fisiologicamente, o processo germinativo pode ser dividido em fases, como embebição, alongamento celular e divisão celular após protrusão radicular. Outra classificação mais afinada desse processo germinativo ocorre no nível fisiobioquímico, sendo dividido em fases como: a reidratação, aumento da respiração, formação de enzimas, digestão enzimática

de reservas, mobilização e transporte de reservas, assimilação metabólica, crescimento e diferenciação dos tecidos (Popinigis, 1985).

A embebição das sementes de cafeeiro acontece, segundo um padrão trifásico comum, como descrito para muitas outras espécies (Silva, 2002). De acordo com esse autor, durante a embebição da semente, a uma temperatura de 30°C, no escuro, o embrião cresce dentro do endosperma. Os cotilédones crescem em comprimento por volta de 35% e o eixo embrionário em torno de 40%, levando a ocorrência da protuberância na região do endosperma cap. A protrusão da radícula dessas sementes inicia-se em torno do quinto dia de embebição, sendo que no décimo dia pode-se observar a protrusão da radícula em 50% das sementes. Posteriormente, no décimo quinto dia, ocorre protrusão da radícula na maioria das sementes (Silva, 2002). Este autor observou ainda aumento no potencial de pressão do embrião até o quinto dia de embebição, seguido pela liberação do turgor, sugerindo relaxamento das paredes celulares das células do embrião. Assim, no início da embebição, as células do eixo embrionário têm crescimento isodiamétrico, seguido por crescimento longitudinal. Em sementes de cafeeiro, o processo germinativo é considerado lento e desuniforme Válio (1976). São vários os fatores que podem estar relacionados a esta lentidão da germinação. O endocarpo ou pergaminho presente nas sementes de cafeeiro impede a absorção da água e O<sub>2</sub>, sendo necessária a sua retirada, para acelerar o processo da germinação (Guimarães, 1995). Rena & Maestri (1986) relataram que o pergaminho presente nas sementes também reatarda a germinação, principalmente em baixas temperaturas.

O espermoderma película prateada contribui para lenta germinação de sementes desta espécie, sendo este efeito atribuído à presença da cafeína, o qual é considerado inibidor natural (Pereira et al., 2001). Estes resultados corroboram



as afirmações feitas por Suzuki & Waller (1987), os quais demonstraram que as sementes liberam cafeína durante a germinação, inibindo a mesma.

Outro fator que também atua durante a germinação é a alteração hormonal (Válio, 1976). Em geral, a germinação das sementes é determinada por uma malha de efeitos múltiplos de hormônios, as quais sugerem a presença de uma interação entre giberelina, ácido abscísico (ABA), citocinina, etileno e auxina (Salgado et al., 2006).

O ácido giberélico é considerado o mais abundante, agindo na extensibilidade da parede celular, na atividade enzimática, na variação em potencial osmótico, interferindo, portanto, diretamente na germinação, mobilização de açúcares (Guardiã & Benlloch, 1980; Metraux, 1987) e na superação de dormência (Karssen, 1995; Metivier, 1985). Dependendo da espécie as giberelinas podem ser necessárias à expansão foliar, alongação do caule, à indução floral, ao desenvolvimento da semente e à biossíntese de antocianinas (Stephen et al., 1997), uma vez que está presente em toda a planta. Pode ser detectada em folhas, caules, raízes, sementes, embriões e pólen (Weaver, 1972). Tem sido sugerido que a giberelina tem ação importante na germinação das sementes, uma vez que atua no endosperma e no embrião destas (Karssen et al., 1989).

A aplicação exógena das giberelinas, além de contrabalançar a inibição imposta pelo ácido abscísico, induz o crescimento do embrião e estimula os processos germinativos, confirmando sua participação na superação de dormência das sementes (Wang et al., 1998). Também, Bewley (1997), relatou que as giberelinas exógenas proporcionam um papel importante, que estimula a germinação. Este fato pode ser esclarecido por mutantes deficientes em giberelina em *Arabidopsis* e tomate (Groot Karssen, 1987; Koornneef & Van der Veen, 1980), cujas sementes não germinaram na ausência das giberelinas

exógenas. Em sementes de algumas espécies de gramíneas, a aplicação exógena da giberelina pode aumentar a atividade da  $\alpha$ -amilase na camada de aleurona.

As giberelinas têm papel chave na germinação de sementes de muitas espécies. Todavia, em sementes de cafeeiro (Válio, 1976), e de *Stylosanthes humilis* (Burin, 1979) não foi observado efeito das giberelinas exógenas sobre a germinação como ocorre para a maioria das espécies. Também, Maestri & Vieira (1961) relataram resultados controversos, em relação ao efeito das giberelinas sobre a germinação de sementes de cafeeiro. Estes autores trabalhando com essa espécie concluíram que a aplicação de ácido giberélico nas concentrações de 0, 10, 100 e 1000 mg/L, às sementes, por 48 horas, reduziu a germinação, à medida que a concentração era elevada. Maestri & Vieira (1961) concluíram que a giberelina pode causar toxidez às sementes de café, ocasionando a morte ou inibindo a germinação das sementes, ocasionando a morte destas, em virtude de uma permanência demasiadamente longa na sementeira. Resultado semelhante foi encontrado por Takaki et al. (1979), indicando que sementes de cafeeiro tratadas com ácido giberélico tiveram redução na germinação. De acordo com esses autores, o fato deveu-se ao aumento na atividade de enzimas como a celulase, proporcionado pelo regulador, que neste caso atuou, degradando a parede celular do embrião.

Silva et al. (2005) observaram valores de germinação de 30% em sementes de cafeeiro, embebidas numa solução de 1000  $\mu$ M de giberelinas exógenas, em contrapartida quando as sementes foram embebidas numa solução de 1  $\mu$ M deste hormônio houve germinação de 75%. De acordo com esses autores há dois pontos de resposta positiva à giberelina exógena: entre 0 e 1  $\mu$ M e outro, mais elevado entre 10 e 100  $\mu$ M. Estes autores concluíram que esta inibição da protrusão radicular somente foi observada em sementes de cafeeiro e, que a germinação destas sementes depende de nova síntese de giberelina. Os autores também relataram que nas sementes de cafeeiro e outras espécies (Burin,

1979), nas quais há inibição pelas giberelinas, esse fato provavelmente ocorre, em função da concentração utilizada, a qual interfere nos processos fisiológicos da germinação (Silva et al., 2005).

Carvalho et al. (1999) concluíram que a pré-embebição das sementes de cafeeiro em água ou em solução de giberelina não acelerou a velocidade de emergência e nem o desenvolvimento das mudas. O ácido giberélico promove o crescimento de embriões somáticos na maioria das espécies (Evans et al., citado por Carvalho et al., 1999), todavia, em sementes de cafeeiro pode-se inibir a formação destes. A giberelina é considerada como um dos grupos de reguladores de crescimento capaz de atuar no embrião de café, induzindo o aumento de pressão (Silva et al., 2004).

É sabido que as giberelinas endógenas são importantes para a germinação das sementes da espécie em estudo. Válio (1976), relatou que as giberelinas endógenas foram detectadas no endosperma e no embrião e, que estas, também atuam durante a germinação das sementes de cafeeiro. Silva et al. (2005) observaram que em sementes de café *Coffea arabica*, da cultivar Rubi a protrusão da radícula depende da síntese de giberelinas endógenas e que essas foram importantes para promover a alongação das células do embrião e para o enfraquecimento do endosperma cap. De acordo com Válio (1976), o efeito da giberelina endógena decresce com o armazenamento das sementes de café.

Conforme Bewley & Black (1994), as giberelinas induzem a expressão de enzimas hidrolíticas, as quais disponibilizam reservas para o embrião em certas gramíneas. Durante a germinação de gramíneas, o ácido giberélico sai do embrião, para induzir a síntese, ativação e secreção de enzimas hidrolíticas, pelas células na camada aleurona, seguidas pela hidrólise de polissacarídeos de reserva, proteínas, lipídeos citado por (Faria et al., 2003). A enzima  $\alpha$ -amilase é considerada importante para os cereais, uma vez que hidrolisa os

polissacarídeos, que fornecem energia para o desenvolvimento do embrião (Faria et al., 2003).

Algumas enzimas são consideradas essenciais no processo de germinação de sementes. Em sementes de cafeeiro a germinação é limitada pelo endosperma, necessitando do amolecimento deste na região micropilar ou (endosperma cap), para que ocorra a emergência da radícula (Silva et al., 2004). De acordo com estes autores o processo de amolecimento é desempenhado por várias enzimas, principalmente, a endo- $\beta$ -mananase, que está presente no endosperma das sementes desta espécie e que fica na região próxima à radícula, a qual inibe a força de pressão. Desta forma, o amolecimento é considerado uma consequência das atividades das enzimas, que hidrolisam a parede celular, sendo muito investigado nas sementes de tomate, café e alface, nas quais o amolecimento do endosperma correlaciona-se com o aumento da atividade da enzima endo- $\beta$ -1,4-mananase (Groot et al., 1988; Nonogaki et al., 1992).

A atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase aumenta antes da protrusão radicular (Silva et al., 2002). Entretanto, Takaki & Dietrich (1980) observaram que a atividade da mananase em sementes de cafeeiro foi aumentada somente 10 dias após a embebição. A enzima endo- $\beta$ -mananase é sintetizada pelas células do endosperma em sementes de cafeeiro. Giorgini et al. (1996) observaram em experimento realizado durante a germinação das sementes de cafeeiro, que a atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase é controlada em parte pelas giberelinas. Esses autores concluíram que a atividade desta enzima e a mobilização de galactomanano na semente de cafeeiro são consideradas fenômenos essencialmente pós-germinativos e que podem ser totalmente controlados pelo embrião.

Silva et al. (2005) relatam que durante a germinação das sementes de cafeeiro os mananos são degradados pela ação da primeira enzima endo- $\beta$ -mananase, resultando no enfraquecimento das paredes celulares do endosperma.

De acordo com Wolfrom et al. (1961), a inibição da germinação de sementes de cafeeiro pelas giberelinas pode ser causada pela liberação em excesso de manose, provavelmente inibindo o crescimento do embrião, uma vez que a parede celular do endosperma dessas sementes é composta essencialmente de mananos. Já Silva (2002), sugeriu que a inibição da germinação por giberelina exógena provavelmente seja causada pelo excesso desta, liberada durante ou após o enfraquecimento do endosperma e que, conseqüentemente, pode atingir o embrião, causando a morte das células do eixo embrionário. Este autor ainda acrescentou que a giberelina exógena acelerou a degradação deste endosperma.

Bewley et al. (1997) clonaram o gene que codifica para uma endo- $\beta$ -mananase em sementes de tomate. Estes autores encontraram baixa homologia com mananase de fungos (28-30%) e observaram que sua expressão é exclusiva do endosperma, sendo ausente em outras partes da planta. De acordo com esses autores esta seqüência gênica é considerada uma ferramenta valiosa para se estudar o controle da produção da endo- $\beta$ -mananase e, especificamente, compreender como a giberelina e o ácido abscísico afetam o catabolismo dos mananos.

A  $\beta$ -manosidase é considerada outra enzima que atua nos processos de germinação em sementes de cafeeiro. Silva (2002) observou que esta enzima tem sido pouco monitorada nas diferentes partes das sementes, nas quais, sua atividade é aumentada, principalmente no endosperma cap antes de ocorrer a protrusão. Durante a germinação a  $\beta$ -mananase quebra a cadeia de mananos, liberando 4 resíduos, de manose e a  $\beta$ -manosidase quebra esses resíduos liberando uma manose (Bewley & Black, 1994), as quais tem sido caracterizadas em diversas espécies. Silva et al. (2005) observaram acréscimo da enzima  $\beta$ -manosidase no endosperma cap aos 11 dias de embebição em água. Esses autores, ainda observaram que essa enzima atua no enfraquecimento do endosperma cap. Esses mesmos autores, também observaram que, quando as

sementes foram embebidas numa concentração de 100  $\mu$ M de giberelina a atividade da  $\beta$ -manosidase foi mais alta aos oito dias de embebição.

A luz representa outro fator ambiental, com efeito, sobre o processo germinativo, podendo estimulá-lo ou inibi-lo. As sementes podem ser consideradas fotoblásticas positivas, quando dependem da luz para promoverem a germinação; fotoblásticas negativas, quando a germinação é reduzida ou inibida na presença de luz e fotoblásticas independentes, quando germinam indiferentemente à condição de luz (Marcos Filho, 2005). Em muitas espécies fotoblásticas positivas, a necessidade de luz para a germinação pode ser substituída pela aplicação exógena de giberelinas (Grubisic et al., 1988).

A ativação das sementes pela luz está relacionada a um pigmento denominado fitocromo, o qual ao absorver luz num determinado comprimento de onda, muda de estrutura bioquímica, permitindo ou não resposta fotomorfogenética (Borges & Reno, 1993). O fitocromo está sempre associado ao funcionamento das membranas biológicas, regulando, provavelmente, sua permeabilidade e, controlando dessa maneira, o fluxo de inúmeras substâncias dentro das células e entre elas (Taiz & Zeiger, 2004).

Outro fator que pode inibir a germinação de sementes de cafeeiro é a luz. Válio (1976) descreveu que a inibição por esse fator é devido aos processos enzimáticos que ocorrem no endosperma. Esse autor ainda relata que, possivelmente, o efeito inibitório da luz seja devido à síntese ou liberação de giberelinas, embora a luz e giberelina não inibam o crescimento do embrião. Desta forma, é provável que o efeito inibitório do ácido giberélico sobre a germinação das sementes de cafeeiro seja indireto, causado pela manose, que é o produto de reações enzimáticas ativadas no endosperma. Já Takaki & Dietrich (1980) observaram em sementes de café que a luz somente adia o processo de germinação.

Silva et al. (2005) observaram que a semente de cafeeiro, embebida em água, no escuro, teve germinação de quase 100%, em contrapartida, quando realizada no claro e em água, a germinação foi de apenas 75%. Também, Válio (1976) observou que a giberelina numa concentração de 0.1  $\mu\text{M}$  no escuro inibiu a germinação de sementes da espécie em estudo. Esse autor revelou que este efeito é mais evidente, quando as sementes são embebidas na luz, pois estas sementes são sensíveis à luz. Desta forma, a germinação das sementes de cafeeiro no escuro é mais rápida do que no claro.

Outro fator associado ao processo de germinação de sementes é referente aos retardantes de crescimento, que podem atuar no controle da germinação, crescimento e florescimento. Um dos retardantes bastante utilizado é o paclobutrazol ou PBZ ( $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{OCIN}_3\text{O}$ ), pertencente ao grupo químico dos triazoles, com atividade sobre o retardamento do crescimento de plantas (Greabe, 1987). Este regulador é absorvido pelas raízes com mais eficiência do que pelos ramos, sendo considerado um inibidor da biossíntese das giberelinas endógenas (Rademacher, 2000 e Silva, 2005). Ele reduz a divisão e o alongamento das células (Albuquerque et al., 1999) e, também, pode melhorar a germinação das sementes em algumas espécies (Karssen et al., 1989; Rademacher, 2000). Várias espécies têm sido tratadas com este regulador e, em geral, os efeitos parecem comuns, contudo, pouco se conhece sobre seus efeitos nos processos fisiológicos das plantas (Wample & Culver, 1983).

O principal efeito bioquímico do paclobutrazol é a supressão da formação de giberelina pela inibição da oxidação do caurene para ácido caurenóico no metabolismo biossintético. Esses inibidores de crescimento têm tido grande potencial de utilização na agricultura, em função de seus efeitos sobre diferentes processos fisiológicos das plantas (Resende et al., 2001).

Conforme resultados obtidos por Debeaujon & Koornneef (2000), a adição de giberelinas exógenas em sementes de *Arabidopsis* reverteu

completamente o efeito dos inibidores como o paclobutrazol ou tetraciclase que podem causar a esta espécie. De acordo com este autor este fato ocorreu, porque as giberelinas são sintetizadas de novo durante a germinação. Também, Silva et al. (2004) observou que a adição de 100  $\mu\text{M}$  de giberelinas exógenas às sementes de *Tabebuia impetiginosa* aumentou o tamanho da radícula. Entretanto, a germinação foi totalmente inibida, quando estas sementes foram embebidas numa solução 100  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol. Este fato pode ser explicado, uma vez que as giberelinas exógenas superam a inibição da germinação imposta pelo paclobutrazol, confirmando que as giberelinas são sintetizadas de novo durante a germinação. Os autores também concluíram que as giberelinas são consideradas importantes reguladores do processo de germinação em *Tabebuia impetiginosa*.

Em pesquisa realizada com sementes de cafeeiro, Silva et al. (2005) observaram que a germinação foi completamente inibida, quando as sementes foram embebidas numa concentração de 300  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol. No entanto, esses autores ressaltaram que com a aplicação de 2  $\mu\text{M}$  de giberelina na solução de paclobutrazol às sementes, houve uma germinação de 70%. Esse fato, provavelmente ocorreu devido ao requerimento da biossíntese de giberelina, na germinação de sementes de cafeeiro. Assim, embora a giberelina exógena iniba a germinação, há necessidade de giberelina endógena para ocorrer a germinação.

### **2.3 Hidrólise e mobilização de reservas na germinação**

As substâncias de reservas (carboidratos, lipídeos e proteínas) armazenadas nas sementes são mobilizadas após a germinação, durante o desenvolvimento das plântulas e seus produtos de degradação são usados para diferentes propósitos, como a geração de energia e a produção de matéria prima (proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídeos), para a construção de novos tecidos e células (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975). Estas substâncias de



reservas não podem ser transportadas de uma célula para outra, até os pontos de crescimento do embrião e, tão pouco, serem utilizadas na formação de novos tecidos e paredes celulares, antes de serem simplificados. Desta forma, o processo de hidrólise das reservas e sua transformação em substâncias solúveis e difusíveis, sob controle enzimático, caracteriza a digestão das reservas (Marcos Filho, 2005).

Durante a germinação das sementes o processo de hidrólise das reservas, é realizado por várias enzimas hidrolíticas, que atuam numa determinada substância de reserva.

Os galactomananos como compostos de reservas foram detectados em sementes de pimenta (Watkins et al., 1985), aipo (Jacobson & Pressmann, 1979), tomate (Groot et al., 1988), alface (Halmer & Bewley, 1979) e no café tem os mananos como compostos de reserva (Wolfrom et al., 1961).

As sementes de cafeeiro possuem muito pouco amido e alto conteúdo de polissacarídeos associados à parede celular (Wolfrom & Patin, 1964). Destes, a celulose e hemicelulose são encontradas em maior quantidade em sementes dessa espécie. Os mananos e galactomananos são considerados os principais hemiceluloses, os quais são insolúveis em água, contendo aproximadamente 2% de galactose (Bewley & Black, 1994), e também podem servir como reserva, para o desenvolvimento das plântulas (Reid, 1985). Desta forma, esses polissacarídeos que são depositados como fonte de reservas na semente, são degradados durante a germinação pelas enzimas hidrolíticas, principalmente endo- $\beta$ -mananase,  $\beta$ -manosidase, galactosidase e celulase, resultando no enfraquecimento das paredes celulares do endosperma (Silva et al., 2004). O embrião das sementes de cafeeiro é muito pequeno e tem poucas reservas depositadas, dependendo totalmente do endosperma para se desenvolver. As paredes celulares são degradadas durante a germinação, para prover de energia necessária ao crescimento da plântula (Marcos Filho, 2005). A degradação do

resto do endosperma e a mobilização das reservas ocorrem na fase II da germinação das sementes de café, onde as reservas vão suprir o crescimento do embrião (Silva, 2002).

O galactomanano é degradado em seus monossacarídeos constituintes, como a manose e galactose, sendo que ao mesmo tempo ocorre produção de sacarose (Buckeridge et al., 2000). Assim, a sacarose é considerada o açúcar de transporte, que levará os produtos da mobilização de reserva até o embrião em crescimento. Paralelamente à degradação do galactomanano no endosperma, o amido é produzido temporariamente nos cotilédones (Buckeridge & Dietrich, 1996; Reid, 1971). Assim, Dirk et al. (1999), observaram que a degradação de reservas de parede celular e a síntese de amido poderiam estar bioquimicamente relacionadas.

Ao final do processo de mobilização há uma grande quantidade de açúcares livres e, ao mesmo tempo se estabelece a relação fonte-dreno entre o órgão de reserva e o eixo embrionário. No entanto, a utilização de amido ou de açúcares solúveis é variável, dependendo da espécie, podendo ocorrer durante a germinação ou no estágio de plântula. Suda & Giorgini (2000) observaram que o acúmulo de açúcares solúveis ocorreu no embrião de *Euphorbia heterophylla* durante a germinação.

Em sementes de cafeeiro, a celulose encontra-se associada aos polissacarídeos, como a hemicelulose, pectina e, lignina, dificultando a sua degradação citado por (Sales et al., 2003). É considerada um componente básico da parede celular e um dos compostos mais abundantes na natureza (Marcondes et al., 1983). A celulase foi pesquisada em sementes de cafeeiro e foi verificado que o aumento da atividade desta enzima ocorre no período de pós-emergência, estando presente em toda a região do endosperma (Takaki & Dietrich, 1980). Esses autores verificaram que a atividade da celulase é aumentada mais precocemente nas sementes incubadas com giberelina. Sales et al. (2003)

observaram em sementes de café cultivar Acaiá, *Coffea arabica* com pergaminho, embebidas em diferentes concentrações de celulase de *Aspergillus niger*, maior índice de velocidade de protrusão radicular e porcentagem de germinação, entretanto não foi observado ganho representativo nos valores de emergência. Segundo esses autores o resultado alcançado, provavelmente ocorreu devido à ação dos microrganismos presentes no substrato (solo), que aceleraram o processo de degradação do pergaminho das sementes, conforme descrito por (Guimarães, 1995).

A síntese de proteínas se inicia após completada a hidratação das células nas sementes, sendo que o tempo requerido para o seu início varia de acordo com a espécie, podendo ocorrer dentro de poucos minutos ou demorar várias horas; citado por (Silva et al., 1998). As proteases são enzimas que hidrolisam proteínas de reserva em seus aminoácidos constituintes. Segundo Bewley & Black (1994), as sementes também armazenam triacilgliceróis como fonte de reserva para germinação e crescimento pós-germinativo das plântulas. Os carboidratos, além de serem materiais de reserva em sementes, também vêm sendo associados à tolerância à dessecação.

#### **2.4 Aspectos de substâncias de reservas e tolerância à dessecação em sementes.**

São muitos os mecanismos que envolvem a aquisição e manutenção da tolerância à dessecação, as quais conferem proteção contra as conseqüências da perda de água. Brandão Júnior (2000) relatou que as sementes de cafeeiro são classificadas como intermediárias e que a tolerância à dessecação reduz durante o processo de germinação das sementes. Guimarães (2000) verificou redução no vigor e viabilidade das sementes de *C. arabica* cv. Rubi, colhidas nos estádios verde, verde cana e cereja, quando submetidas a qualquer tipo de secagem. Isso demonstra o caráter de intolerância à dessecação das sementes de cafeeiro.

A aquisição da tolerância à dessecação ocorre durante a maturação, antes que as sementes passem por uma severa redução no seu teor de água. Porém, não se pode determinar se a tolerância é adquirida antes ou em resposta à perda de água durante a maturação (Bewley, 1979). De acordo com Guimarães (1999), as sementes, quando secas, dispõem de alguns mecanismos de proteção capazes de manter estruturados os sistemas de membrana das células, bem como as estruturas das macromoléculas. Após a embebição essas membranas e macromoléculas recuperam suas funções fisiológicas. O desenvolvimento desses mecanismos depende de características genéticas das espécies, que determinam a presença de substâncias, tais como: açúcares solúveis, antioxidantes, enzimas que atuam contra o sistema de oxidação lipídica e, também, as proteínas LEA (late embryogenesis abundant proteins).

O acúmulo de açúcares não redutores tem sido associado à aquisição de tolerância à dessecação. Os açúcares específicos têm se destacado como substitutos da água, os quais podem prevenir os efeitos severos que ocorrem durante a dessecação em sementes, por estabilizarem membranas e proteínas, ou ainda, pela formação de vidro no citoplasma (Leprince et al., 1993). Os tecidos tolerantes são caracterizados por conterem alta quantidade de sacarose e oligossacarídeos, como estaquiiose e rafinose e, ainda, por conterem pequena quantidade de monossacarídeos redutores, como: a galactose, manose, frutose e glicose (Kuo et al., 1998 e Leprince et al., 1992). Segundo Brenac et al. (1997), os oligossacarídeos estão distribuídos em muitas espécies de sementes, localizados em tecidos que permanecem viáveis após a dessecação, incluindo o embrião e a camada de aleurona.

As sementes de cafeeiro contêm muitos carboidratos que são divididos em grupos distintos, de acordo com seus pesos moleculares. Os polissacarídeos são considerados constituintes importantes em sementes de cafeeiro e estão em quantidades que variam de 40% a 50% (Clark & Macrae, 1985). Os teores de

carboidratos em *Coffea arabica* variam de 55% a 65%, dos quais 6% a 12,5% são de carboidratos solúveis; 34% a 53%, de insolúveis e 15 a 3%, de lignina (Rinantonio, 1987).

A sacarose destaca-se como sendo o açúcar encontrado em maior quantidade na semente de cafeeiro. Os teores de sacarose dependem da espécie, variedade, estágio de maturação das sementes e das condições de processamento e armazenamento (Clark & Macrae, 1985). Abraham (1992) encontrou porcentagem de sacarose, em base seca, de 6% a 10%. Estes resultados corroboram com os encontrados por Rotemberg & Iachan (1972), onde a porcentagem deste açúcar foi 7,2% e, também, aqueles encontrados por (Guimarães, 2000), que observou teores médios de 5,99% de sacarose em embriões de sementes de cafeeiro. Também Lima (2005) observou que a sacarose foi o açúcar encontrado em maior porcentagem nas sementes de cafeeiro, em torno de 6,1%.

Segundo Rogers et al. (1999), a glicose e a frutose são classificadas como açúcares redutores encontrados em maior quantidade em sementes da espécie em estudo, no início da maturação dos frutos.

Durante a maturação das sementes, além das mudanças que ocorrem no conteúdo de açúcares, há, também, aquelas que ocorrem nas proteínas como as LEA. Estas proteínas são consideradas coadjuvantes de importância nos mecanismos que previnem os danos provenientes da remoção de água dos tecidos, que são acumuladas durante os estádios mais tardios do desenvolvimento, antes ou durante a secagem. Essas proteínas conferem às sementes capacidade de germinarem após secagem e subsequente reidratação (Bewley & Black, 1994; Faria et al., 2003; Guimarães, 2000). As proteínas LEA têm função protetora e são induzidas por ABA (Leprince et al., 1993), sendo que sua expressão cessa rapidamente após embebição das sementes (Blackman et al., 1991; Blackman et al., 1992).

Guimarães et al. (2002), trabalhando com sementes de café cv. Rubi, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento observou aumento de proteínas LEA e também que estas podem contribuir para a tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro.

As proteínas LEA têm alta solubilidade e estabilidade em água, mesmo em ebulição, sendo esta característica atribuída à proporção de aminoácidos hidrofílicos, principalmente glutamina e glicina (Walters et al., 1997). Além da função protetora, esta pode atuar na formação de pontes de água e substituição de água, ajustamento osmótico e, ainda, podem atuar como agentes protetores de componentes celulares, principalmente pela habilidade de formar espirais amorfas, com o objetivo de protegê-las contra danos de rompimento na ausência de água (Black et al., 1999; Kermode, 1997). Estas proteínas resistentes ao calor foram primeiramente descobertas em embriões de algodão e, mais tarde, detectadas em outras espécies, como: ervilha, soja, arroz, cenoura, mamona, beterraba, *Arabidopsis* e cereais, atuando em estádios tolerantes à dessecação, durante o desenvolvimento das sementes ou após o início de embebição (Blackman et al., 1992; Koornneef et al., 1989).

Walters et al. (1997) sugerem que as proteínas LEA podem ligar íons e água, podendo estar associadas aos açúcares, controlando a taxa de perda de água, mantendo assim, a viabilidade das sementes ortodoxas em seu estado seco. Estas proteínas são extraídas em condições de alta temperatura e não possuem atividade catalítica aparente.

As deidrininas, consideradas o grupo mais importante de LEA, acumuladas durante a fase final da embriogênese, são produzidas pelas partes vegetativas das plantas, em resposta às baixas temperaturas, à aplicação do ABA ou, ainda, por condições que impõe um estresse hídrico. No entanto, estas proteínas, devido a sua natureza anfipática são capazes de inibir a desnaturação de macromoléculas e, ainda, estabilizar estruturas intracelulares, sob condições

de estresse, incluindo estresse hídrico severo (Blackman et al., 1995; Close, 1997).

As proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins-HSPs) constituem uma classe de proteínas resistentes ao calor, que são expressas durante o desenvolvimento das sementes, em respostas ao calor e outros estresses, amenizando os problemas causados pela agregação e má estruturação de proteínas.

Segundo Vertucci & Farrant (1995), a função das HSPs está relacionada à preservação e ao reparo das estruturas macromoleculares durante a desidratação ou reidratação. Estas proteínas têm, geralmente, seu peso molecular conhecido e é representado em kDa, como as Hsp 60; Hsp 70; Hsp90 e Hsp100 (Gurley, 2000). Dentre elas, as “small Heat Shock Proteins-sHSPs,” são as que mais ocorrem em plantas (Mansfield, 1987) e apresentam baixo peso molecular, variando de 15 a 28 kDa (Sun et al., 2002; Vierling, 1991).

Gallardo et al. (2001) observaram que a quantidade de algumas proteínas LEA e Hsp 70 reduziram com o final do processo de germinação, ao passo que outras permaneceram constantes, durante todo esse processo, indicando que algumas LEA e HSPs podem exercer uma função protetora, não somente durante a maturação das sementes, mas também ao longo de todo o processo germinativo.

Outros mecanismos que conferem proteção às sementes são os antioxidantes e as enzimas, que atuam contra o sistema de oxidação lipídica. Os antioxidantes são moléculas removedoras de radicais livres, dentre eles os lipossolúveis, como: tocoferol (vitamina E e  $\beta$ -carotenos, flavonóides) e os solúveis em água (ácido ascórbico, vitamina C, glutatona). Os tocoferóis são considerados bloqueadores da peroxidação de lipídeos. As sementes contêm altas concentrações dessas substâncias, variando conforme os diferentes tecidos e sementes (Franzen & Haas, 1991).

Segundo Gorecki & Harman (1987), os antioxidantes reduzem a velocidade de envelhecimento de sementes, uma vez que alguns processos oxidativos podem ser importantes na deterioração. Wilson Júnior & McDonald Júnior (1986), relataram que estas substâncias podem ter um papel importante nas pesquisas no intuito de aumentar o período de armazenabilidade das sementes. Os antioxidantes como a vitamina C, E e  $\beta$  carotenos auxiliam no controle da oxidação dos ácidos graxos, ligando-se ao oxigênio ativado. Essas substâncias evitam que o oxigênio se ligue ao ácido graxo insaturado e provoque a quebra dos mesmos, os quais gerariam radicais livres e peróxidos instáveis, que são prejudiciais às sementes de cafeeiro.

A redução na atividade das enzimas removedoras de peróxidos podem contribuir com o processo de deterioração. Basavarajappa et al. (1991) concluiu que a redução na atividade dessas enzimas faz com que as sementes se tornem mais sensíveis aos efeitos do  $O_2$  e radicais livres. Segundo McDonald (1999), a produção de radicais livres afeta a formação de várias enzimas e degrada a síntese de novas proteínas, que ocorrem durante a germinação.

Os radicais livres são produzidos durante o metabolismo da planta, particularmente em cloroplastos e mitocôndrias (Puntarulo et al., 1991). O dióxigênio ( $O_2$ ) é considerado não reativo (não ativo) e não tóxico, porém, devido à estrutura instável dos elétrons na sua camada externa pode dar origem a estados excitados, como os radicais livres, com reatividade muito maior (Rice-Evans et al., 1991; Scandalios, 1993). O  $O_2$  é um elemento essencial à vida dos organismos superiores, todavia em excesso pode tornar-se perigoso. Desta forma, se a produção de radicais livres não for controlada, esses podem tornar-se destrutivos para as células e tecidos, podendo reagir com ácidos graxos insaturados das membranas e alterar a sua funcionalidade, diminuir a capacidade de fixação de carbono em cloroplastos, promover peroxidação de lipídios,



inativação de enzimas e degradação de ácidos nucleicos (Goodman, 1994; Rice-Evans et al., 1991; Scandalios, 1993).

Os radicais livres são formados por fatores estressantes como radiações ultravioletas, iônicas, campos magnéticos, fatores químicos (desordem nutricional e redistribuição de íons metálicos), fatores mecânicos (impacto osmótico, mudanças drásticas de temperatura e pressão) e influências biológicas, que induzem a ativação dos processos oxidativos e antioxidativos (Goodman, 1994; Rice-Evans et al., 1991).

Em estudos sobre o papel de antioxidantes durante a germinação foi observado que os mecanismos protetores contra o oxigênio ativado são predominantemente enzimáticos. Estes sistemas incluem as enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase, peroxidase, glutathione redutase (Leprince et al., 1990; Puntarulo et al., 1991), a ascorbato peroxidase e o sistema de reciclagem do ascorbato (Cakmak et al., 1993). Estas enzimas envolvem o sistema de proteção contra a deterioração. De acordo com Jeng & Sung (1994), a presença da enzima SOD em sementes secas poderá ter papel na restrição de dano de peroxidação, após a embebição destas. Isso pode ser explicado pelo fato destas sementes serem incapazes de sintetizar ou ativar essa enzima após a embebição.

A peroxidase é uma enzima removedora de peróxido e a redução de sua atividade faz com que as sementes fiquem mais sensíveis aos efeitos de  $O_2$  e radicais livres sobre ácidos graxos insaturados de membrana, provocando a degeneração das membranas e, assim, comprometendo o vigor (Brandão Júnior, 1996).

A catalase é uma enzima que está envolvida na remoção de peróxido de hidrogênio Fridovich (1986) e que pode desempenhar o controle desses peróxidos, por meio do ciclo de oxidorredução. Nkang et al. (2000) observaram um decréscimo em atividades de catalase e superóxido dismutase, importantes mecanismos de defesa celular, associado aos aumentos, em níveis de

hidroperóxidos, durante o processo de secagem de sementes de *Telfairia occidentalis*, sensíveis à dessecação. Já, Brandão Junior et al. (2002) observaram que as funções metabólicas da enzima catalase sugerem aumento da tolerância à dessecação com a evolução das sementes. Li & Sun (1999) observaram aumentos em peroxidação de lipídios em eixos embrionários de *Theobroma cacao*, durante dessecação e um associado decréscimo em sistemas enzimáticos de proteção. Segundo os autores, esses resultados sugerem um aumento no teor de radicais livres oxidativos, embora não quantificados, os quais podem causar danos em membranas, confirmados pelo aumento em lixiviação de eletrólitos e perda de viabilidade das sementes intolerantes resultando em danos oxidativos.

## **2.5 Polifenoloxidase e polifenóis**

A polifenoloxidase (PPO) é uma enzima cúprica (Robinson & Eskin, 1991), largamente distribuída na natureza. Está relacionada com o escurecimento enzimático de frutos e vegetais e, também, com a qualidade da bebida em café (Amorim, 1978; Carvalho et al., 1997). Esta enzima foi detectada em várias partes do fruto de café e se encontra ligado às membranas celulares. No entanto, quando estas membranas sofrem danos, liberam as PPO que são ativadas, podendo reagir com substratos fenólicos intra e extracelulares, oxidando-os a quinonas (Amorim, 1978). As quinonas inibem a atividade da polifenoloxidase (Whitaker, 1972). Eskin (1990) relatou que esta enzima é intracelular e encontra-se localizada principalmente na membrana dos cloroplastos, participando dos processos de respiração, resistência a infecções e biossíntese de certos constituintes vegetais, como os flavonóides e quinonas.

Diversos fatores como tipo de cultivo, processamento e condições de armazenamento, contribuem para a redução na atividade da PPO (Oliveira et al., 1976; Valência, 1972). Contudo, outros fatores, como por exemplo, o uso de inseticidas, pode diminuir a qualidade da bebida, sem reduzir a atividade da PPO

(Oliveira et al., 1979). De acordo com Amorim (1978), o mecanismo de oxidação de polifenóis pela enzima PPO é considerado como um dos principais eventos bioquímicos indutores da depreciação da qualidade da bebida do café.

Carvalho et al. (1994) observaram que há variações na atividade de polifenoloxidase, as quais permitem separar as classes de bebida de café, sendo que cafés de bebida inferior apresentaram baixa atividade (55,99u/min/g) e cafés de bebida superior apresentaram maior atividade na amostra de (67,66 a 74,66u/min/g). A redução na atividade desta enzima está relacionada à integridade de membranas, onde há comprometimento da estrutura celular, pela alteração nas membranas. Essa enzima, que é exclusiva de plástidos, entra em contato com os compostos fenólicos, armazenados no vacúolo. Assim, durante o processamento haveria a oxidação de fenóis, que convertidos a quinonas reagiriam com as proteínas.

Lima (2005) observou um aumento na atividade da enzima polifenoloxidase nas sementes de café cultivar Robusta Tropical secas à sombra. Esse autor observou que esses resultados podem ser confirmados pelos menores valores de condutividade elétrica e melhor qualidade fisiológica nos testes de germinação, emergência de plântulas e índice de velocidade de emergência. Segundo Amorim (1978), sementes que apresentam atividade desta enzima mais elevada são aquelas que tem maior integridade no sistema de membranas.

Segundo Carvalho et al. (2001 b), os polifenóis são facilmente oxidáveis, pelas enzimas vegetais por metais como ferro e manganês, luz, calor e, também pelo meio alcalino, ocasionando o escurecimento de suas soluções ou de compostos isolados. Os polifenóis podem ser encontrados em quase todos os vegetais. Têm estruturas químicas relativamente simples ou complexas, como taninos e ligninas. Estes são responsáveis pela adstringência dos frutos e, principalmente no café, interferem no sabor e aroma (Menezes et al., 1990).

Dentre os polifenóis, os ácidos clorogênicos são considerados produtos secundários nas plantas e têm como função principal controlar os níveis de ácido indol acético. Segundo Carvalho et al. (2001 b) as concentrações desses ácidos no café são maiores do que na maioria das plantas. Os ácidos clorogênicos proporcionam outras funções como: proteção ao ataque de insetos, pássaros e mamíferos predatórios, contra a invasão de microrganismos, atua como precursor da camada inicial de proteção aos danos físicos sofridos pela planta, precursores na biossíntese da lignina e, também, atua na formação dos pigmentos verdes do grão (Clifford, 1985).

Os polifenóis também apresentam outra função como antioxidantes e protetor dos aldeídos, destacando-se entre eles os ácidos clorogênico e caféico (Amorim & Silva, 1968). Assim, quaisquer condições adversas que ocorram ao grão, tais como, colheita inadequada, problemas no processamento e/ou no armazenamento, podem ativar as enzimas polifenoloxidasas, que irão agir sobre os polifenóis, reduzindo sua ação antioxidante sobre os aldeídos, conseqüentemente, afetando o sabor do café e reduzindo o conteúdo desse composto nas sementes. Lima (2005) observou menores teores de polifenóis nas sementes de café secas, em terreiro suspenso, desmucildas em água, com hidróxido de sódio sem armazenamento e, também, naquelas secas à sombra aos oito meses de armazenamento. Segundo esse autor esse resultado provavelmente ocorreu devido à maior atividade da enzima polifenoloxidase e, conseqüentemente, maior oxidação dos polifenóis, que constituem seu principal substrato.

Ohiokpehai et al. (1982) observaram que sementes velhas de cafeeiro possuem menor atividade de polifenoloxidase e baixas quantidades de ácido clorogênico extraível. No entanto, Amorim et al. (1974) observaram que em sementes novas de cafeeiro, há menores teores de ácido clorogênico em cafés com qualidade superior. Illy & Viani (1995) relataram que há variações nos

teores desses ácidos entre as espécies comerciais, sendo que o *Coffea robusta* contém 7 a 10 %, enquanto o *Coffea arabica* 5 a 7,5 %.

Em sementes de arroz, a restrição à entrada de oxigênio deve-se principalmente à presença de compostos fenólicos na casca, embora estes possam ocorrer também no embrião (Edward 1973, Vieira 1991). Estes compostos fixam o oxigênio que está sendo absorvido, sendo que, a quantidade de gás que chega à semente não é suficiente para que ocorra a germinação. Segundo Amorim (1968), os compostos fenólicos interferem no balanço entre promotores e inibidores da germinação, conseqüentemente, podem ser uma barreira à difusão de gases em sementes umedecidas. Cícero (1986) atribui o consumo de oxigênio pelo tegumento em algumas espécies, à oxidação de vários compostos fenólicos, tais como: floridizin, ácido clorogênico, e ácido para-cumaril-químico, presentes na casca.

Pelo exposto, observa-se que são vários os fatores que interferem na qualidade fisiológica de sementes de cafeeiro, envolvendo a participação de hormônios, enzimas específicas, proteínas específicas e açúcares, sendo que muitos desses fatores não se encontram elucidados.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, K. O. **Guide on food products**. Bombay: Spelt Trade Publications, 1992. v. 2, p. 1-14. (Coffee & coffee products).
- ALBUQUERQUE, L. A. S.; MOUCO, M. A.; REIS, V. C. **Floração da mangueira através do uso de reguladores de crescimento**. Petrolina: EMBRAPA, 1999. v. 12 (Instrução Técnicas).
- AMORIM, H. V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionado com a determinação da qualidade**. 1978. 85 p. Tese ("Livre Docente" em Bioquímica) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- AMORIM, H. V.; SILVA, D. M. Relationship between the polyphenoloxidase activity of coffee beans and the quality of the beverage. **Nature**, London, v. 219, n. 5152, p. 381-382, July 1968.
- AMORIM, H. V.; TEIXEIRA, A. A.; GUERCIDO, M. A.; CRUZ, V. F.; MALAVOLTA, E. Chemistry of Brazilian green coffee and the quality of the beverage: II. Phenolic compounds. **Turrialba**, San José, v. 24, n. 2, p. 217-221, Apr./June 1974.
- BASAVARAJAPPA, B. S.; SHETTY, H. S.; PRAKASH, H. S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n. 2, p. 279-286, 1991.
- BEWLEY, J. D. Physiological aspects of desiccation tolerance. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 30, p. 185-238, 1979.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum press, 1994. 445 p.
- BEWLEY, J. D.; BURTON, R. A.; MOROHASHI, Y.; FINCHER, G. B. Molecular cloning of a cDNA encoding a (1 $\beta$ 4)- $\beta$ -mannan endo-hydrolase from the seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Planta**, Berlin, v. 203, n. 4, p. 454-459, Dec. 1997.

- BLACK, M.; CORBINEAU, F.; GEE, H.; CÔME, D. Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, n. 2, p. 463-471, June 1999.
- BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, n. 4, p. 630-638, Apr. 1995.
- BLACKMAN, S. A.; WETTLAUFER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, n. 1, p. 225-230, Sept. 1992.
- BLACKMAN, S. A.; WETTLAUFER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 3, p. 868-874, July 1991.
- BORGES, R. J.; RENO, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PINÃ-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p. 83-135.
- BRANDÃO JÚNIOR, D. da S. **Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho**. 1996. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- BRANDÃO JUNIOR, D. da S.; CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. G. C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 114-121, 1999.
- BRANDÃO JUNIOR, D. E. **Marcadores de Tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro**. 2000. 144 p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- BRANDÃO JUNIOR, D. da S.; VIEIRA, M. G. G. C.; HILHOST, H. W. Aquisição da tolerância à dessecação nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 673- 681, jul./ago. 2002.
- BRENAC, P.; HORBOWICZ, M.; DOWNER, S. M.; DICKERMAN, A. M.; SMITH, M. E.; OBENDORF, R. L. Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L.) seed development and

maturation. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 150, n. 4, p. 481-488, Mar. 1997.

BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). **Plant Science**, Clare, v. 117, n. 1/2, p. 33-43, May 1996.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, n. 1/2, p. 141-156, May 2000.

BURIN, M. E. **Regulação química da dormência endógena de *Stylosanthes humilis* H. B. K.** 1979. 51 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHENER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 44, n. 258, p. 127-132, Jan. 1993.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G. SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3. ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2001. p. 443-459.

CARVALHO, P. G. B.; BORGHETTI, F.; BUCKERIDGE, M. S.; MORHY, L.; FERREIRA FILHO, E. X. T. Temperature dependent germination and endo- $\beta$ -mannanase activity in sesame seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 2, p. 139-148, ago. 2001.

CARVALHO R. G.; PASQUAL, M.; GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BEARZOTTI, E.; FALCO, L. Efeito do tratamento de sementes na emergência e desenvolvimento de mudas de cafeeiro *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 4, p. 800-808, out./dez. 1999.

CARVALHO, V. D. de. **Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. v. 2, 73 p.

CARVALHO, V. D. de; CHAGAS, S. J. de R.; CHALFOUN, S. M.; BOTREL, N.; JUSTE JÚNIOR, E. S. G. Relação entre a composição físico-química e



química do grão beneficiado e a qualidade de bebida do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 449-454, mar. 1994.

CARVALHO, V. D. de; CHALFOUN, S. M. S.; CHAGAS, S. J. de R. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 183, p. 5-20, 1997.

CÍCERO, S. M. Dormência de sementes. In: CÍCERO, S. M.; MARCOS FILHO, J.; SILVA, W. R. DA. **Primeira semana de atualização em produção de sementes**. Piracicaba: Fundação Cargill, 1986. p. 41-73.

CLARKE, R. J; MACRAE, R. **Coffee**. Essex: Elsevier Science Publisher, 1985. v. 1, p. 306.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. **Coffee**. London: Elsevier Science Publishers, 1985. p. 153-202.

CLOSE, T. J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, n. 2, p. 291-296, June 1997.

COSTA, P. S. C. **Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade de sementes de café. (*Coffea arabica*, L)** 2003. 81 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DEBEAUJON, I.; KOORNNEEF, M. Gibberellin requirement for Arabidopsis seed germination is determined both by testa characteristic and embryonic abscisic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n. 2, p. 415-424, Feb. 2000.

DEDECCA, D. M. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. *Typica* Cramer. **Bragantia**, Campinas, v. 16, n. 23, p. 315-366, dez. 1957.

DIRK, L. M. A.; VAN DER KROL, A. R.; VREUGDENHIL, D.; HILHORST, H. W. M.; BEWLEY, J. D. Galactomannan, soluble sugar and starch mobilization following germination of *Trigonella foenum-graecum* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 37, n. 1, p. 41-50, 1999.

EDWARDS, M. M. Seed Dormancy and seed environment-internal oxygen relationship. In: HEYDECKER, W. (Ed.) **Seed ecology**. Miyage-ken: The Pennsylvania State University Press/University Park, 1973. p. 169-188.

ESKIN, N. A. M. Biochemistry of food spoilage: enzymatic browning. In: \_\_\_\_\_. **Biochemistry of food**. 2. ed. San Diego: Academic press, 1990. p. 401-427.

FARIA, R. V. A. M.; VON PINHO, R. G.; VON PINHO, E. V. de R.; GUIMARÃES, R. M. **Marcadores moleculares da qualidade fisiológica de sementes**. Lavras: UFLA-FAEPE, 2003. 51 p.

FRANZEN, J.; HAAS, M. M. Vitamin E content during development of some seedlings. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 2911-2913, Sept. 1991.

FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Archives Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 147, n. 1, p. 1-11, May 1986.

GALLARDO, K.; JOB, C.; GROOT, S. P. C.; PUYPE, M.; DEMOL, H.; VANDEKERCKHOVE, J.; JOB, D. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 2, p. 835-848, June 2001.

GIORGINI, J. F.; COMOLI, E. Effect of embryo and exogenous GA<sub>3</sub> on endospermic endo- $\beta$ -mannanase activity of *Coffea arabica* L. during germination and early seedling growth. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 8, n. 1, p. 43-49, abr. 1996.

GORECKI, R. J.; HARMAN, G. E. effects of antioxidants on viability and vigour of ageing pea seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 15, n. 1, p. 109-117, 1987.

GOODMAN, B. A. The involvement of O<sub>2</sub>- derived free radical in plant-pathogen interactions. In: CRAWFORD, R. M. M.; HENDRY, G. A. F.; GOODMAN, B. A. (Ed.) **Oxygen and environmental stress in plants**. Edinburgh: Royal Society of Edinburgh, 1994. p. 155-165. (Biological Sciences).

GRAEBE, J. E. Gibberelin biosynthesis and control. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, p. 419-465, 1987.

GROOT, S. P. C.; KARSSSEN, C. M. Gibberellins regulate seed-germination in tomato by endosperm weakening – a study with gibberellin-deficient mutants. **Planta**, Berlin, v. 171, n. 4, p. 525- 531, Aug. 1987.

GROOT, S. P. C.; KIELISZEWSKA-ROKICKA, B.; VERMEER, E.; KARSSSEN, C. M. Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls and gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. **Planta**, Berlin, v. 174, n. 4, p. 500-504, Aug. 1988.

GRUBISIC, D.; KONJEVIC, R.; NESKOVIC, M. The effect of some growth regulators on light-induced germination of *Paulownia tomentosa* seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 72, n. 3, p. 525-528, Mar. 1988.

GUARDIÃ, M. D. DE LA; BENLLOCH, M. Effects of potassium and gibberellic acid on stem growth of whole sunflower plants, **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 49, n. 4, p. 443-448, 1980.

GUIMARÃES, R. J. **Formação de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.): efeitos de reguladores de crescimento e remoção do pergaminho na germinação de sementes e do uso de N e K em cobertura, no desenvolvimento de mudas.** 1995. 133 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GUIMARÃES, R. M. **Fisiologia de sementes.** Lavras: UFLA-FAEPE, 1999. 132 p. (Curso de Especialização Pós-Graduação “Lato Sensu” por tutoria à distância).

GUIMARÃES, R. M. **Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*, L.).** 2000. 180 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GURLEY, W. B. HSPS: A key component for the acquisition of thermo tolerance in plants. **The Plant Cell**, Rokville, v. 12, n. 4, p. 457-460, Apr. 2000.

HALMER, P.; BEWLEY, J. D. Mannanase production by the lettuce endosperm: control by the embryo. **Planta**, Berlin, v. 144, n. 4, p. 333-340, 1979.

ILLY, A.; VIANI, R. **Expresso coffee: the chemistry of quality.** San Diego: Academic Press, 1995. 253 p.

JACOBSEN, J. V.; PRESSMANN, E. A. Structural study of germination in celery (*Apium graveolens* L.) seed with emphasis on endosperm breakdown. **Planta**, Berlin, v. 144, n. 3, p. 241-248, 1979.

JENG, T. L.; SUNG, J. M. hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 22, n. 3, p. 531-539, 1994.

KARSSSEN, C. M. Hormonal regulation of seed development, dormancy, and germination studied by genetic control. In: KIGEL, J. D.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Decker, 1995. p. 333-350.

KARSSSEN, C. M.; ZAGORSKI, S.; KEPCZYNSKI, J.; GROOT. S. P. C. A key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. **Annals of Botany**, London, v. 63, n. 1, p. 71-80, Jan. 1989.

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

KOORNNEEF, M.; HANHART, C. J.; HILHORST, H. W. M.; KARSSSEN, C. M. In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombination of abscisic biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, n. 3, p. 463-469, July 1989.

KOORNNEEF, M.; van der VEEN J. H. Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 58, n. 6, p. 257-263, 1980.

KUO, T. M.; VANMIDDLESWORTH, J. F.; WOLF, W. F. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, n. 1, p. 32-36, jan. 1998.

LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P. C.; ATHERTON, N. M.; HENRY, G. A. F. The role of free radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germination maize (*Zea mays* L.) **New Phytologist**, London, v. 116, n. 3, p. 573-580, Nov. 1990.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccations tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 3, p. 231-246, Sept. 1993.

LEPRINCE, O.; VANDER WERF, DELTOUR, R.; LAMBERS, H. Respiration pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and

soluble sugars. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 84, n. 4, p. 581-588, Apr. 1992.

LI, C.; SUN, W. Desiccation sensitivity and activities of free radical-scavenging enzymes in recalcitrant *Theobroma cacao* seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 3, p. 209-217, Sept. 1999.

LIMA, D. M. **Armazenabilidade de sementes de *Coffea arabica* e *Coffea canéfora* Pierre, submetidas a diferentes métodos de desmucilagem e de secagem**. 2005. 106 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MCDONALD, M. B. Seed Deterioration: Physiology, Repair And Assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.

MAESTRI, M.; VIEIRA, C. Nota sobre a redução da porcentagem de germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L. var. Bourbon), por efeito do ácido giberélico. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 11, n. 65, p. 247-249, 1961.

MANSFIELD, M. A.; KEY, J. L. Synthesis of the low molecular weight heat shock proteins in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 4, p. 1007-1017, Aug. 1987.

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

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. Exeter: Pergamon Press, 1975.

MENEZES, H. C. **Variação de monoisômeros e diisômeros do ácido cafeoilquínico com a maturação do café**. 1990. 120 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

MÉTRAUX, J. P. Gibberellins and plant cell elongation. In DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p. 296-31.

METIVIER, J. R. Dormência e germinação. In: FERRI, M. G. (Ed). **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: EPU, 1985. v. 2, p. 343-392.

NKANG, A.; OMOKARO, D.; EGBE, A. Effects of desiccation on the lipid peroxidation and activities of peroxidase and polyphenoloxidase in seeds of *Telfairia occidentalis*. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2000.

NONOGAKI, H.; MATSUSHIMA, H.; MOROHASHI, Y. Galactomannan hydrolyzing activity develops during priming in micropylar endosperm tip of seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 2, p. 167- 172, June 1992.

OHIKPEHAI, O. **Chlorogenic acids content of green coffee beans**. 1982. Thesis (PhD) - University of Surrey, UK.

OLIVEIRA, J. C.; SILVA, D. M.; AMORIM, H. V.; TEIXEIRA, A. A. Atividade enzimática da polifenoloxidase de grãos de quatro espécies de café durante o armazenamento. **Científica**, Jaboticabal, v. 4, n. 2, p. 114-119, 1976.

OLIVEIRA, J. C.; SILVA, D. M.; TEIXEIRA, A. A.; AMORIM, H. V. Effects of the application of insecticides to control coffee and tea borers on the polyphenol oxidase activity and the beverage quality of coffee. **Científica**, Jaboticabal, v. 7, n. 2, p. 221-224, 1979.

PEREIRA, C. E.; VON PINHO, E. V. R.; KIKUTI, A. L. P. Determinação de inibidores da germinação no espermoderma de sementes de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 12., 2001, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 2001. Informativo ABRATES, 2001. v. 11, n. 2, p. 58. (Resumo 025).

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2. ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289 p.

PUNTARULO, S.; GALLEANO, M.; SÁNCHEZ, R. A.; BOVERIS, A. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1074, n. 2, p. 277-283, July 1991.

RADEMACHER, W. Growth retardants: Effects of the gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 501-531, 2000.

REID, J. S. G. Cell wall storage carbohydrate in seeds: biochemistry of the seed "gums and hemicelluloses". **Advances in Botanical Research**, Orlando, v. 11, n. 1, p. 125- 155, 1985.

- REID, J. S. G. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenumgraecum* L. (*Leguminosae*). **Planta**, Berlin, v. 100, n. 2, p. 131-142, 1971.
- RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: RENA, A. B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M.; YAMADA, T. **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos, 1986. p. 13-85.
- RESENDE, G. M.; SOUZA, J. R.; JÚNIOR, O. J. S.; FLORI, J. E. produtividade e qualidade de bulbos de alho em diferentes doses de paclobutrazol e períodos de frigorificação. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 25, n. 6, p. 1350, nov./dez. 2001.
- REYNOLDS, T.; THOMPSON, P. A. Effects of kmetin, gibbrellins and abscisic acid on the germination of lettuce (*Lactuca sativa* L.) **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 28, n. 3, p. 516-522, Mar. 1973.
- RICE-EVANS, C. A.; DIPLOCK, A. T.; SYMONS, M. C. R. **Techniques in free radical research**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, 1991. v. 22, 291 p.
- RINANTONIO, V. Coffee. In: **Ullman's Enciclopédia of Industrial Chemistry**. New York, v. 7, p. 315-338. 1987.
- ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. **Oxidative enzymes in foods**. New York: Elsevier Applied Science, 1991. 314 p.
- ROGERS, W. J.; MICHAUX, S.; BASTIN, M.; BUCHELI, P. Changes to the content of sugars, sugars alcohols, myoinositol, carboxylic acids and inorganic anions in development grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and arabica (*C. arabica*) coffees. **Plant Science**, London, v. 149, n. 2, p. 115-123, Dec. 1999.
- ROTENBERG, B.; IACHAN, A. Método químico automático para diferenciação de “café – bebida”. **Revista Brasileira de Tecnologia**, Brasília, v. 2, n. 2, p. 67-70, jun. 1972.
- SALGADO, K. C. P. C.; VON PINHO, E. V. R. **Uso de técnicas moleculares em estudos fisiológicos e genéticos em sementes**. Lavras: Editora UFPA, 2006. 111 p.

- SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and super oxide dismutase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 1, p. 7-12, Jan. 1993.
- SALES, J. F. ; ALVARENGA, A. A.; OLIVEIRA, J. A.; NOGUEIRA, F. D.; REZENDE, L. C. ; SILVA, F. G. Germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) submetidas a diferentes concentrações e tempos de embebição em celulose. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 557-567, maio/jun. 2003.
- SILVA, A. A. **Coffea (Coffea arabica cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation**. 2002. 105 p. Thesis (Doctorate) - University at Wageningen, Wageningen.
- SILVA, E. A. A. da.; TOROOP, P. E.; NIJSSE, J.; BEWLEY, J. D.; HILHORST, H. W. M. C. Exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination and cause cell death in the embryo. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 413, p. 1029-1038, Mar. 2005.
- SILVA, E. A. A. da.; TOROOP, P. E.; VAN ELST, A. C.; HILHORST, H. W. M. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* L., cv. Rubi) seed germination. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 2, p. 251-261, Dec. 2004.
- SILVA, T. R. G.; CORTELAZZO, A. L.; DIETRICH, M. C. S. Variations in storage compounds during germination and early plantlet growth of *Dalbergia miscolobium*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v. 10, n. 2, p. 119-124, jul./dez. 1998.
- STEPHEN, M.; SWAN, J. B. R.; KAMIYA, Y. Gibberellins are required embryo growth and seed development in pea. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 1329-1338, Dec. 1997.
- SUDA, C. N. K.; GIOGINI, J. F. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v. 12, n. 3, p. 226-245, set./dez. 2000.
- SUN, W.; MOTANGU, M. V.; VERBRUGGEN, N. Small heat shock proteins and estresse tolerance in plants. **Biochimica Biophysica Acta**, Paris, v. 1577, n. 1, p. 1-9, Aug. 2002.



SUZUKI, T.; WALLER, G. R. Allelopathy due to purine alkaloids in tea seeds during germination. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 98, n. 1, p. 131-136, 1987.

TAKAKI, M.; DIETRICH, S. M. C. Effect of GA<sub>3</sub> and light on polysaccharide levels and metabolism in germinating Coffee seeds. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 31, n. 125, p. 1643-1649, 1980.

TAKAKI, M.; DIETRICH, S. M. C.; FURTADO, J. S. Anatomical changes in the hard endosperm of gibberellic acid-treated coffee seeds during germination. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 103-106, dez. 1979.

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

VALÊNCIA, A. G. Actividad enzimática en el grano de café en relación con la calidad de la bebida de café. **Cenicafé**, Caldas, v. 23, n. 1, p. 3-18, ene./mar. 1972.

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, 1976.

VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 237-271.

VIEIRA, A. R. **Efeitos de compostos fenólicos na dormência de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e eficiência de tratamentos pré-germinativos**. 1991. 58 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

VIERLING, E. The role of heat shock proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 579-620, 1991.

WALTERS, C.; RIED, J. L.; SIMMONS, M. K. W. Heat-soluble proteins extracts from wheat embryos have tightly bound sugars and unusual hydration properties. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, n. 2, p. 125-134, June 1997.

WAMPLE, R. L.; CULVER, E. B. The influence of paclobutrazol a new growth regulator, on sunflower. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 1, p. 122-125, jan. 1983.

WANG, M.; van der MEULEN, R. M.; VISSER, K.; van SCHAIK, H. P.; van DUIJIN, B. DE BOER, A. H. Effects to dormancy- breaking chemicals on ABA in barley grain embryos. **Seed Science Research**, Wellionford, v. 8, n. 2, p. 129-137, June 1998.

WATKINS, J. T. ; CANTILIFFE, J. D. HUBER, D.J. ; NELL, T.A Gibberellic acid stimulated degradation of endosperm in pepper. **Journal of the American Society of Horticulture Science**, v. 110, p.61-65, 1985.

WEAVER, R. J. **Plant growth substances in agriculture**. San Francisco, W. H. Freeman and Company, 1972. p. 594.

WHITAKER, H. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. New York: Marcel Dekker, 1972. Cap. 22, p. 571-582.

WILSON, D. O.; McDONALD, M. B. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 14, n. 2, p. 269-300, 1986.

WOLFRON, M. L.; LAVER, M. L.; PATIN, D. L. Carbohydrates of coffee bean. II Isolation and characterization of mannan. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 26, n. 11, p. 4533-4536, 1961.

WOLFRON, M. L.; PATIN, D. L. Isolation and characterization of cellulose in the coffee bean. **Journal or Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 12, n. 1, p. 376-379, Jan./Feb. 1964.

## **CAPÍTULO 2**

### **INFLUÊNCIA DA LUZ E GIBERELINA NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE CAFEIRO (*Coffea arabica*, L.).**

## 1 RESUMO

RESENDE, Maria de Lourdes. Influência da luz e giberelina na germinação de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In:\_\_\_\_\_.**Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L.)** 2006. p. 40-68. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

A germinação consiste na reativação do crescimento do embrião pela seqüência ordenada de eventos metabólicos, resultando na protrusão radicular. Vários são os fatores que interferem no processo de germinação de sementes. Nessa pesquisa foi avaliado o efeito da luz, giberelina e do paclobutrazol, na germinação das sementes de cafeeiro. Foram utilizadas sementes de cafeeiro cultivar Rubi, colhidas no estágio cereja e secadas até atingirem 12% do teor de água. O ensaio I foi realizado em esquema fatorial (2x2), sendo dois ambientes (claro e escuro), com e sem giberelina, em quatro repetições de 50 sementes. A semeadura foi realizada em caixa gerbox, sobre dois papéis mata-borrão, sob uma folha de papel germiteste, umedecidos com 20mL de GA<sub>3</sub> (100µM) e ou água destilada. A embebição das sementes foi efetuada no claro ou escuro (gerbox foram envolvidos em papel alumínio). O ensaio II foi realizado em esquema fatorial (4x2), sendo quatro concentrações do bloqueador de giberelina (paclobutrazol; 0, 0.1, 1.0 e 10 µM); dois ambientes (claro e escuro) em três épocas de armazenamento (0, 4 e 8 meses), com quatro repetições de 50 sementes. A semeadura foi realizada em caixas gerbox sobre dois papéis mata-borrão, sob uma folha de papel germiteste, umedecidos com 20mL do bloqueador e ou água. Em ambos os ensaios foram realizados os teste para 50% das sementes protruírem (T50), o índice de velocidade de germinação (IVG) e a porcentagem de germinação somente no ensaio I. Maiores índices de velocidade de germinação e menor tempo para protrusão radicular foram observados em sementes embebidas no escuro e na ausência de giberelina. No ensaio II também foram observados maiores valores de germinação nas sementes embebidas em água. Em sementes recém-colhidas houve redução nos índices de velocidade de germinação e maior tempo para protrusão radicular, à medida que a concentração do paclobutrazol foi aumentada. Aos quatro meses de armazenamento a embebição no escuro proporcionou menor valor T50 e maior índice de velocidade de germinação independente do regime de luz. O

---

\* Comitê Orientador: Dr. Renato Mendes Guimarães - UFLA (Orientador), Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva - UFLA, Dr. João Almir de Oliveira - UFLA.

tempo para 50% de protrusão radicular, após oito meses de armazenamento foi maior, à medida que aumentou a concentração do bloqueador, independentemente do ambiente em que as sementes foram embebidas. O índice de velocidade de germinação das sementes foi reduzido, à medida que a concentração do bloqueador de giberelina foi aumentada. O bloqueador de giberelina paclobutrazol reduziu a velocidade de germinação de sementes de cafeeiro, mas não reduziu o efeito da luz durante a germinação.

## 2 ABSTRACT

RESENDE, Maria de Lourdes. Influence of light and gibberellins in seed germination of coffee (*Coffea arabica*, L.). **In:\_\_\_\_\_**. **Physiological and biochemical changes during coffee seed germination (*Coffea arabica*) cv. Rubi**. 2006. p. 40-68. Tese (PhD. In Plant Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG\* .

Seed germination consists of reactivation of the embryo growth through coordinated metabolic events, resulting in radicle protrusion. Various are the factors that interfere with seed germination. In this research were evaluated the effect of light, gibberellins and paclobutrazol in coffee seed germination. Seeds of coffee from the cultivar Rubi harvested at the developmental stage known as cherry were dried until 12% of moisture content. The first trial was performed in factorial design (2x2) being two conditions (light and dark), with and without gibberellins in four repetitions of fifty seeds each. Seed sowing was performed in gerbox tray with two blotting papers and germitest paper imbibed with 20mL of GA3 (100mM) and distilled water. Imbibition of the seeds was performed in presence of light and in the dark. The dark condition was created by wrapping the gerbox with an aluminum paper. The second trial was performed in factorial design (4x2), using four concentrations of gibberellins inhibitor (paclobutrazol; 0- 0,1 -1,0 and 10 mM); two conditions(light and dark) in three storage conditions (0, 4 e 8 months), with four repetitions of fifty seeds each. Seed sowing was performed in gerbox tray in two blotting papers and germitest paper imbibed with 20mL of paclobutrazol and or water. In both trails there were performed T50, the speed of germination index (SGI) and percentage of germination only for the first trail. High value of speed of germination index and small period of time for radicle protrusion were observed in seeds imbibed under dark and without gibberellins treatment. The trial number II there was also high values of germination in seeds imbibed in water. Soon after harvesting the seeds showed decrease in the speed of germination index and increased the time required for radicle protrusion with the increase in paclobutrazol concentrations. At four months of storage imbibition of the seeds in the dark showed smaller

---

\* Comitê Orientador: Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães – UFLA (Orientador); Pesq. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva - UFLA; Prof. Dr. João Almir de Oliveira – UFLA.

T50 and higher value of speed of germination index independent of light regime. T50 after eight months of storage showed high value with the increase in paclobutrazol concentrations, which did not depend on the conditions where the seeds were imbibed. The speed of germination index was reduced when there was an increase in paclobutrazol concentrations. Paclobutrazol reduced the speed of germination index but did not reduce the effect of light during seed germination.

### 3 INTRODUÇÃO

A germinação é um processo que consiste na reativação do crescimento do embrião por uma seqüência de eventos metabólicos, resultando na protrusão da radícula. Desta forma, esse processo se inicia pela absorção de água pelas sementes e termina com a elongação da radícula (Bewley & Black, 1994).

Sementes de cafeeiro apresentam germinação lenta e desuniforme, aumentando consideravelmente o processo de formação de mudas. Sabe-se que a propagação predominante do cafeeiro é por meio de mudas oriundas de sementes, que também apresentam problemas de conservação por períodos prolongados. Assim, a semeadura geralmente é feita logo após a colheita das sementes, o que coincide com o período frio do ano, tornando a germinação ainda mais lenta e irregular. Essa lentidão na germinação tem sido atribuída ao pergaminho uma vez que constitui uma barreira, que dificulta a absorção de água pela semente e, também, a outros fatores inclusive hormonais. No entanto, de acordo com Rosa (2002), essa demora no processo de germinação dessas sementes ainda não está totalmente esclarecida, havendo a necessidade de estudar os mecanismos que controlam a germinação.

As giberelinas, por exemplo, têm papel chave na germinação de sementes de muitas espécies, as quais podem substituir luz e temperatura baixa. Porém, em sementes de cafeeiro, os resultados têm se mostrado inconsistentes.

Silva et al. (2005) e Válio (1976) observaram que a germinação das sementes de cafeeiro no escuro é mais rápida do que no claro. Tem sido considerado que efeito inibitório da luz ocorre, porque a luz aumenta a síntese de giberelinas, e, conseqüentemente, vai aumentar a produção da enzima endo- $\beta$ -mananse. Dessa forma a inibição vai ocorrer no produto da reação, havendo



produção de manose em excesso, provavelmente, paralizando a germinação Wolfrom et al. (1961).

O paclobutrazol é considerado inibidor da biossíntese das giberelinas endógenas (Rademacher, 2000 & Silva, 2005), pois, reduz a divisão e o alongamento das células (Albuquerque et al., 1999). Entretanto, ele também pode ativar a germinação de outras espécies (Karssen et al., 1989; Rademacher, 2000). Nesse sentido, várias espécies têm sido tratadas com este regulador e, em geral, os efeitos parecem comuns, contudo, pouco se conhece sobre seus efeitos nos processos fisiológicos das plantas (Wample & Culver, 1983).

O conhecimento dos mecanismos que controlam a germinação de sementes de cafeeiro poderá dar subsídio para o desenvolvimento e o aprimoramento de novas técnicas, que aceleram e ou uniformizam a germinação das sementes no viveiro, trazendo grandes benefícios para os produtores de mudas.

Assim, nessa pesquisa foi avaliado o efeito da giberelina, paclobutrazol e da luz, sobre a germinação das sementes de cafeeiro.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Análise de Sementes, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, MG. Foram utilizadas sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Rubi, provenientes da área experimental de melhoramento do cafeeiro da UFLA. Os frutos foram colhidos manualmente, em estágio cereja, despulpados em despulpador manual e desmucilados por fermentação natural, em água durante 24 horas em temperatura ambiente. Em seguida as sementes foram lavadas e secadas à sombra, sobre papel multifoliado, até atingirem 12% de teor de água.

### 4.1 Ensaio I: Giberelina e luz na germinação de sementes de café.

Sementes de cafeeiro sem pergaminho foram acondicionadas em caixas de acrílico tipo gerbox, sobre duas folhas de papel mata-borrão e sob uma folha de papel germiteste, umedecidas com 20 mL de solução de GA<sub>3</sub> (100 µM) ou com água destilada. A embebição das sementes foi realizada em condições de claro e escuro, sendo que no escuro os gerbox foram envolvidos com papel alumínio. Cada gerbox foi acondicionado em um saco de polietileno, para manter umidade e, em seguida, estes foram levados para um germinador a 30°C. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento. As avaliações foram realizadas diariamente a partir do 5º dia de embebição, até a uniformização da protrusão radicular. A porcentagem de germinação final foi avaliada aos trinta dias, segundo as recomendações das regras para análise de sementes, RAS (Brasil, 1992). Também foi calculado o tempo para protrusão de 50% das sementes (T50) e o índice de velocidade de germinação (IVG). A

contagem das sementes acondicionadas em gerbox envolvidos em papel alumínio foi realizada em ambiente iluminado com luz verde.

O IVG foi calculado segundo a fórmula proposta por Maguirre (1962), utilizando-se os resultados das avaliações, computando-se o número de protrusão de radícula diariamente.

$$\text{IVG} = G1/T1 + G2/T2 + \dots + Gn/Tn$$

Em que:

IVG: Índice de velocidade de germinação;

G: Número de plântula emergida a cada dia;

T: Número de dias da semeadura até a respectiva contagem.

O T50 foi realizado junto com o teste de germinação, de acordo com fórmula abaixo.

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

T<sub>50</sub> = Tempo para a ocorrência de 50% da germinação

G = Metade do valor máximo de germinação

G<sub>1</sub> = Valor de germinação igual ou imediatamente inferior a G

G<sub>2</sub> = Valor da germinação imediatamente superior a G

I = Intervalo entre as contagens

T = Tempo para a ocorrência de G<sub>1</sub>

#### **4.1.1 Procedimento estatístico**

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2x2), em quatro repetições de 50 sementes por tratamento, sendo dois ambientes (claro e escuro) com e sem giberelina. A comparação das médias foi

realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Já as análises dos dados foram realizadas por meio do programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

## **4.2 Ensaio II: Giberelinas endógenas na germinação de sementes de cafeeiro.**

Foi realizado em sementes no início do armazenamento (tempo zero) e nas sementes armazenadas por 4 e 8 meses. Na época zero, as avaliações foram efetuadas assim que as sementes adquiriram 12% do teor de água. Nessas sementes foram aplicados os seguintes tratamentos: quatro concentrações do bloqueador paclobutrazol (0; 0.1; 1.0 e 10  $\mu$ M) e dois ambientes de germinação (claro e escuro). Foram realizados os testes de IVG e T50. A semeadura foi realizada em caixas de acrílico tipo gerbox, sobre dois papéis mata-borrão e sob uma folha de papel germiteste, umedecidos com 20 mL de solução do bloqueador paclobutrazol ou água destilada, com 4 repetições de 50 sementes por tratamento. A embebição em condição de escuro, além dos testes de IVG e T50, seguiram os mesmos procedimentos descritos no ensaio anterior. As avaliações foram realizadas diariamente, computando-se o número de sementes protrundidas.

### **4.2.1 Procedimento estatístico**

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4x2) com quatro repetições de 50 sementes, sendo quatro concentrações do bloqueador (0, 0.1, 1.0 e 10  $\mu$ M); dois ambientes de germinação (claro e escuro), em sementes armazenadas nos três períodos de armazenamento (0, 4 e 8 meses). A comparação das médias entre as épocas foi realizada por meio de regressões e as outras pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Já as análises

dos dados foram realizadas por meio do programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ENSAIO I: Giberelina e luz na germinação de sementes de cafeeiro.

#### 5.1.1 Índice de velocidade de germinação

Pela análise de variância dos dados observados no índice de velocidade de germinação (Tabela 1A), observou-se diferenças para os níveis de giberelina utilizados e na interação entre os fatores níveis de giberelina e ambientes de germinação (escuro e claro), evidenciando que os dois fatores estão interagindo e influenciando no vigor das sementes.

Pelos resultados observados no índice de velocidade de germinação de sementes de cafeeiro (Tabela 1), independente do regime de luz, a adição de giberelina reduziu a velocidade de germinação das sementes. Nas sementes germinadas, na ausência de giberelina não houve diferenças na velocidade de germinação tanto na condição de claro como de escuro, enquanto que para as sementes germinadas na presença de giberelina a velocidade de germinação foi maior no escuro. Esses resultados estão coerentes com aqueles encontrados por Silva et al. (2005) que observaram nas sementes de cafeeiro embebidas numa solução de 1000  $\mu\text{M}$  de giberelinas exógenas, valor de germinação de 30% e em contrapartida, quando as sementes foram embebidas numa solução de 1  $\mu\text{M}$  de giberelinas houve germinação de 75%. Segundo estes autores há dois pontos de resposta positiva à giberelina exógena: entre 0 e 1  $\mu\text{M}$  e outro mais elevado entre 10 e 100  $\mu\text{M}$ . Na presente pesquisa foi utilizada giberelina na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , valor este considerado máximo, em trabalho desenvolvido pelo

referido autor. De acordo com Silva et al. (2005) e Válio (1976) a giberelina exógena atrasa a protrusão radicular das sementes de cafeeiro. A redução da velocidade de germinação observada na presença de giberelina pode estar relacionada à inibição de enzimas hidrolíticas, por produtos de reações catalizadas por enzimas induzida pela própria giberelina endógena. Silva et al. (2005) ressaltaram que a manose, como produto da reação de hidrólise dos carboidratos em sementes de café, é produzida por reação induzida por giberelina que pode inibir vários processos fisiológicos, que ocorrem durante a germinação de sementes de cafeeiro.

TABELA 1 - Valores médios do índice de velocidade de germinação de sementes de cafeeiro submetidas a diferentes ambientes e concentrações de giberelina. UFLA Lavras, MG, 2006.

Ambiente	Giberelina	
	Sem	Com
Escuro	1,93 aA	1,54 aB
Claro	1,96 aA	1,29 bB

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

O fato das sementes embebidas no escuro com giberelina proporcionarem maior índice de velocidade de germinação provavelmente ocorreu, porque no escuro a síntese de giberelina é reduzida. Nesse caso, a síntese da enzima endo- $\beta$ -mananase também é reduzida resultando em níveis mais baixos de manose fazendo com que o processo de germinação ocorra normalmente.

### 5.1.2 Porcentagem de germinação

Pela análise de variância dos dados observados no teste de germinação, houve diferenças significativas entre os níveis dos fatores ambiente e giberelina. Nenhuma interação significativa foi observada (Tabela 1A).

Pelos dados contidos na Tabela 2, foi verificado nas sementes embebidas na presença de luz 72% de germinação, contudo a germinação no escuro foi de 67%. Nesta pesquisa esperava-se um efeito acentuado de giberelina mais luz para a mesma concentração de giberelina. Deve-se ressaltar que a avaliação no teste de germinação foi realizada somente aos trinta dias após o início da instalação do teste e, embora nesse caso, a germinação no escuro tenha propiciado menor número de sementes germinadas, deve-se considerar que houve incidência de plântulas menos vigorosas na ausência de luz. Assim, embora a protrusão, no escuro, tenha ocorrido com maior velocidade no escuro, o número de plântulas normais foi menor ao final do teste. É importante ressaltar que o cotilédone da semente de café é do tipo produtor, sendo importante para o desenvolvimento da plântula como fotossintetizador.

De maneira geral foi observado que no ambiente escuro, a protrusão radicular é mais rápida, porém as plântulas se desenvolvem melhor no ambiente claro.

TABELA 2 - Valores médios de germinação de sementes de cafeeiro submetidas a diferentes ambientes. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Ambientes	% de germinação
Escuro	67 B
Claro	72 A

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



Na Tabela 3, foi observado maior valor de germinação, quando as sementes foram embebidas em água independentemente do ambiente e menor valor de germinação nas sementes embebidas em solução de giberelina. Este resultado provavelmente pode ser explicado pelo fato das giberelinas causarem toxidez às sementes. Os resultados desta pesquisa corroboram com os encontrados por Maestri & Vieira (1961), os quais observaram que sementes de cafeeiro tratadas com giberelina proporcionaram redução na germinação. Segundo esses autores, a giberelina pode causar toxidez às sementes de café, ocasionando a morte ou inibindo a germinação dessas. Os autores atribuíram a morte das sementes, na presença de giberelina à permanência demasiadamente longa na sementeira. Resultado semelhante foi encontrado por Takaki et al. (1979), que demonstraram que sementes de cafeeiro tratadas com ácido giberélico tiveram redução na germinação. De acordo com esses autores, o fato deveu-se ao aumento na atividade de enzimas como a celulase, proporcionado pelo ácido giberélico, que neste caso atuou degradando a parede celular do embrião.

Os resultados observados nesta pesquisa corroboram os resultados encontrados por Silva (2002), onde observou que em concentração mais elevada de giberelina há degradação do endosperma cap e que, conseqüentemente, pode afetar o embrião durante a germinação, causando a morte das células do eixo embrionário e, assim, levando a inibição da protrusão radicular e, conseqüentemente, afetando o desenvolvimento de plântulas.

TABELA 3 - Valores médios de germinação de sementes de cafeeiro embebidas em diferentes concentrações de giberelina. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Giberelina	% de germinação
Sem	91 A
Com	48 B

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

### 5.1.3 Tempo para 50% de protrusão

Pela análise da variância dos dados referentes ao T50 foi observado que tanto os fatores ambientes e giberelina quanto a interação entre os fatores não foi significativa (Tabela 2A).

## 5.2 Ensaio II: Giberelinas endógenas na germinação de sementes de cafeeiro.

Pela análise da variância dos dados referentes ao índice de velocidade de germinação e ao tempo para 50% das sementes protruírem (T50), em relação às sementes de cafeeiro avaliadas no início do armazenamento, foram observadas diferenças significativas apenas para os fatores ambientes e concentrações do bloqueador (Tabela 3A).

Para o T50 (Figura 1) pôde ser observado tendência linear de aumento no número de dias, para que 50% das sementes germinassem, à medida que a concentração de bloqueador de giberelina foi aumentada. Observa-se, também, pela (Tabela 4), que os valores de T50 e de IVG das sementes germinadas no escuro foram mais baixos, revelando que as sementes germinaram mais rapidamente nessa condição.

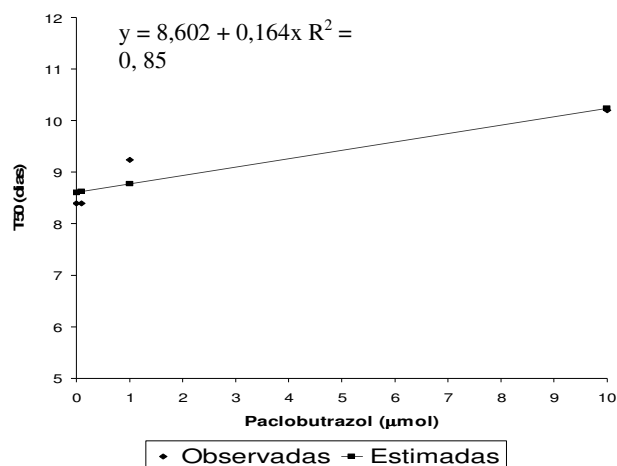


FIGURA 1 - Valores médios de T50 de sementes de cafeeiro, antes do armazenamento submetidas a diferentes concentrações de paclobutrazol. UFLA, Lavras, MG, 2006.

TABELA 4 - Valores médios de IVG e T50 de sementes de cafeeiro, antes do armazenamento submetidas no ambiente claro e escuro. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Ambiente	IVG	T 50
Claro	2,33 B	9,85 B
Escuro	2,69 A	8,26 A

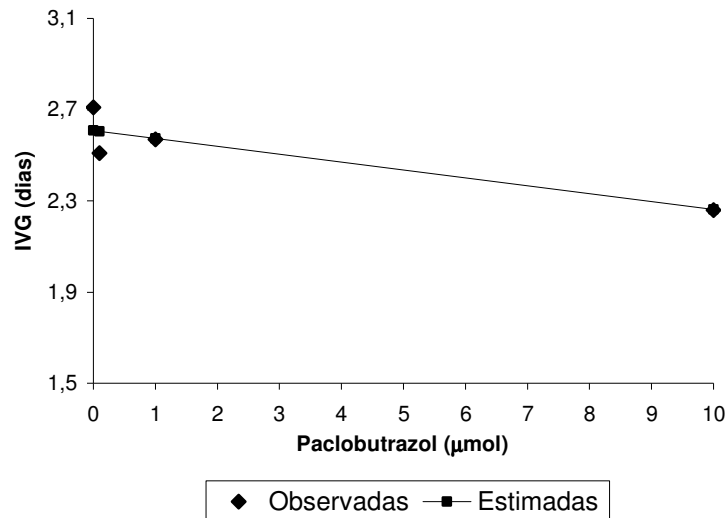
As médias seguidas de uma mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Pela análise desses dados pode-se inferir que houve um crescente prejuízo à velocidade de germinação das sementes com o aumento da concentração do paclobutrazol. Provavelmente, a ação deste, em bloquear a produção de giberelina endógena foi efetiva, na medida em que a velocidade da germinação foi aumentando, na concentração zero, manteve-se em padrões semelhantes aos observados no primeiro ensaio (Tabela 3), onde se avaliou o efeito da giberelina com vantagens para os tratamentos sem esse regulador de crescimento. À medida que as giberelinas endógenas foram bloqueadas houve aumento nos valores de T50. Este comportamento foi observado por Silva et al. (2005), em sementes de café, indicando maior germinação, quando as sementes foram embebidas em água, e redução drástica, à medida que se aumentava a concentração do bloqueador de giberelina. Provavelmente, este resultado pode ser explicado pelo fato das giberelinas serem sintetizadas de novo durante a germinação das sementes de cafeeiro. As giberelinas exógenas inibem a germinação destas sementes, mas ao mesmo tempo as endógenas são necessárias. Entretanto, pode ser observado que ainda faltam estudos no que se refere à concentração de giberelina a ser utilizada.

Em relação ao regime de luz (Tabela 4), foram observados menores valores de T50, quando as sementes foram embebidas no escuro. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Silva et al. (2005), estudando a germinação de sementes de cafeeiro. Este fato provavelmente ocorreu devido ao aumento de giberelina produzida no ambiente claro, a qual aumentou a atividade da endo- $\beta$ -mananase produzindo manose em excesso, inibindo a reação de hidrólise e, conseqüentemente, reduziu a velocidade de germinação.

Na avaliação do índice de velocidade de germinação em sementes recém armazenadas (Figura 2), foi observada tendência linear de redução da velocidade de germinação, à medida que a concentração de paclobutrazol foi aumentada.

Pelos resultados observados na Tabela 4, a velocidade de germinação das sementes, quando germinadas no escuro foi maior em comparação com aquelas germinadas no claro. Esses resultados foram coincidentes com aqueles observados para a variável T50.



Legenda:  $y = 0,034664x - 2,609411$   $R^2 = 0,80$

FIGURA 2 - Valores médios de IVG de sementes de cafeeiro, antes do armazenamento, e submetidas a diferentes concentrações de paclobutrazol. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Na análise da variância para o T50, aos quatro meses de armazenamento, foi observada interação significativa entre os fatores ambientes x concentração, já para o índice de velocidade de germinação somente o fator ambiente foi significativo (Tabela 4A).

Na Figura 3, observa-se que o resultado do T50, para as sementes embebidas nos ambientes claro e escuro, foi semelhante às sementes-recém armazenadas (Figura 1). Menores valores de T50 foram observados em sementes embebidas no escuro, em relação aos observados em sementes embebidas na presença de luz. Em geral, aos quatro meses de armazenamento foi observado aumento acentuado nos valores de T50 independente do ambiente, em relação aos observados em sementes recém-armazenadas. Os resultados obtidos nesta pesquisa estão de acordo com os observados por Veiga (2005) & Lima (2005). Esses autores verificaram redução na velocidade de germinação de sementes de cafeeiro, aos quatro meses de armazenamento, em relação às recém-armazenadas.

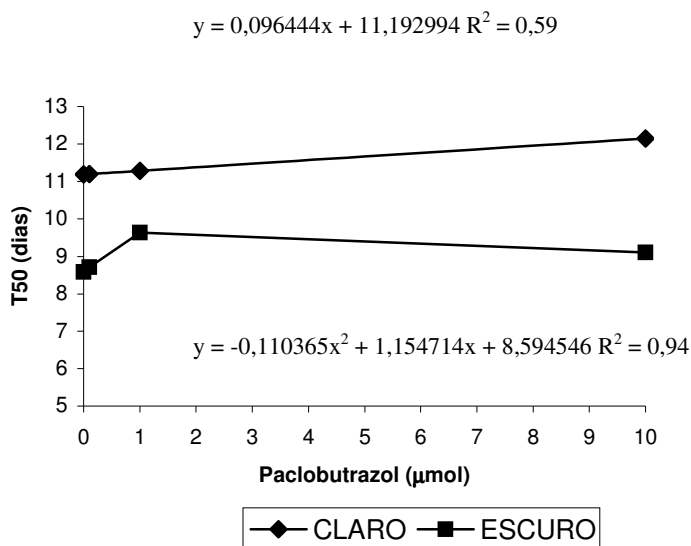


FIGURA 3 - Valores médios de T50 de sementes de café, armazenadas por quatro meses, e submetidas a diferentes concentrações de paclobutrazol, em ambiente claro e escuro. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Após quatro meses de armazenamento, maior índice de velocidade de germinação foi observada em sementes embebidas no escuro, em relação aos observados no claro (Tabela 5). Resultado semelhante também foi observado em sementes recém-armazenadas (Tabela 4). O comportamento das sementes em relação à influência da luz na germinação não foi alterado, quando do armazenamento por quatro meses (Tabela 5).

TABELA 5 - Valores médios de IVG de sementes de cafeeiro, armazenadas por quatro meses, e submetidas nos ambientes de claro e escuro. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>Ambiente</b>	<b>IVG</b>
<b>Claro</b>	2,02 B
<b>Escuro</b>	2,48 A

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

Pelos resultados obtidos na análise de variância (Tabela 5A), foi observada que a interação não foi significativa entre os fatores concentração x ambiente para as variáveis IVG e T50 aos oito meses de armazenamento.

Maiores índices de velocidade de germinação e menores valores de T50 (Tabela 6), foram observados em sementes de cafeeiro armazenadas por oito meses e embebidas no escuro, independentemente da concentração do bloqueador de giberelina. Nesta pesquisa, de uma maneira geral, foi observado que as sementes de cafeeiro tem melhor desempenho, quando embebidas no escuro.

Pelos resultados obtidos no teste T50 (Figura 4), observa-se que o tempo necessário, para que ocorra 50% de protrusão foi maior, à medida que aumentou a concentração do bloqueador independentemente das sementes serem embebidas no claro ou no escuro. Esse resultado também é coincidente com aqueles observados em sementes recém-armazenadas e aos quatro meses (Figuras 1 e 3).



TABELA 6 - Valores médios de IVG e T50 de sementes de cafeeiro, armazenadas por oito meses, e submetidas nos ambiente de claro e escuro. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Ambiente	IVG	T 50
Claro	2,54 B	9,00 B
Escuro	2,68 A	8,27 A

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

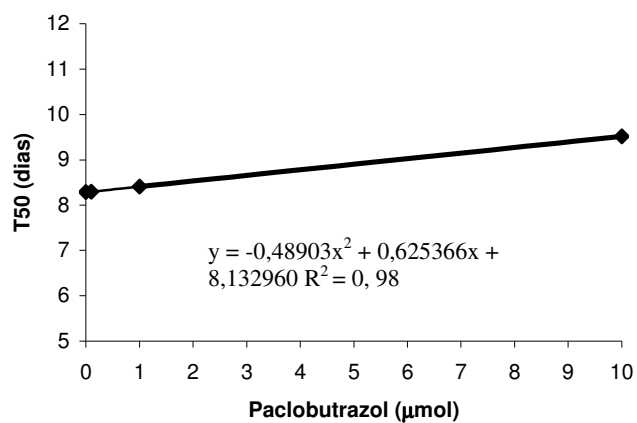


FIGURA 4 - Valores médios de T50 de sementes de cafeeiro, armazenadas por oito meses, e submetidas a diferentes concentrações de paclobutrazol. UFLA, Lavras, MG, 2006.

O índice de velocidade de germinação das sementes armazenadas por oito meses de armazenamento (Figura 5) foi decrescente, à medida que a concentração do bloqueador de giberelina foi aumentada. Em geral, nesta pesquisa, as sementes de cafeeiro armazenadas por diferentes períodos de armazenamento, tiveram o mesmo comportamento, quando submetidas às diferentes concentrações do bloqueador.

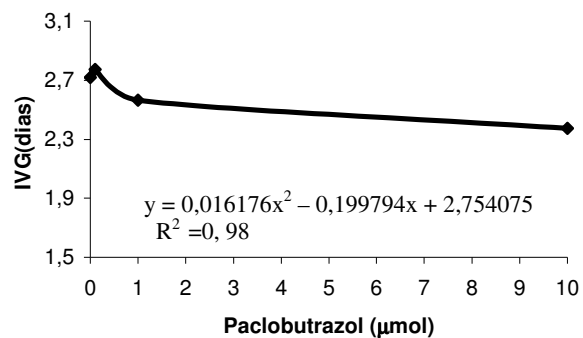
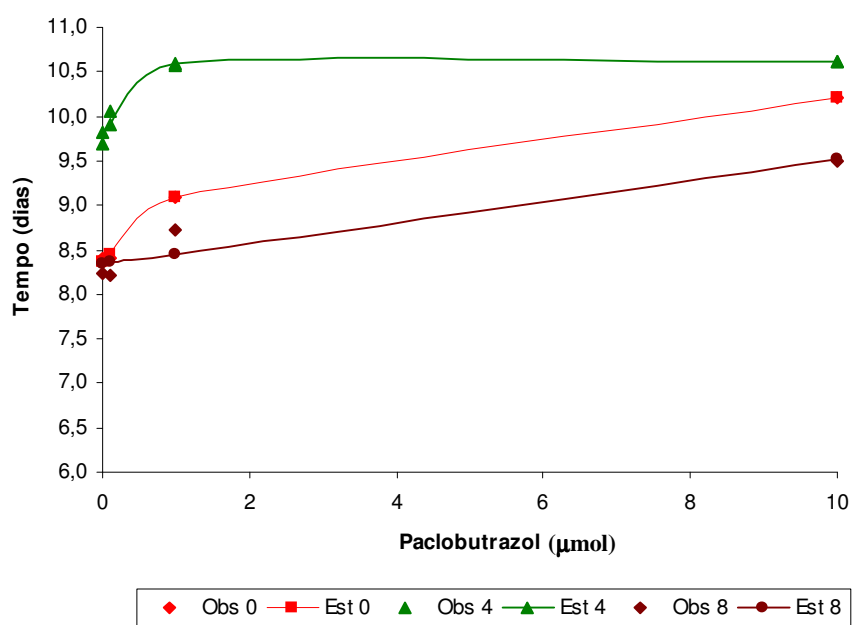


FIGURA 5 - Valores médios de IVG de sementes de cafeeiro submetidas a diferentes concentrações paclobutrazol, aos 8 meses de armazenamento. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Pela análise da variância (Tabela 6A), dos dados referentes à comparação entre o índice de velocidade de germinação (IVG) e o tempo para 50% das sementes germinarem (T50), nas sementes armazenadas por diferentes períodos, em diferentes concentrações do paclobutrazol e em ambientes, foi observado que a interação entre o fator ambiente x época foi significativa para o IVG, e em relação ao T50 foi observado que houve diferenças significativas na interação ambiente x época e concentração x época.

Para o T50 (Figura 6) pôde ser observado que de maneira geral houve aumento no número de dias para que 50% das sementes germinassem à medida que a concentração de bloqueador foi aumentada independente do período de armazenamento e do ambiente aos quais as sementes submetidas. Esse resultado reforça a hipótese de que as sementes de café perdem a qualidade fisiológica durante o armazenamento mesmo quando armazenadas em ambiente refrigerado.



Legenda:

$$\text{Época 0 } y = -0,059135x^2 + 0,774861x + 8,361197 \quad R^2 = 0,99$$

$$\text{Época 4 } y = -0,077011x^2 + 0,849650x + 9,823187 \quad R^2 = 0,93$$

$$\text{Época 8 } y = 0,118605x + 8,335558 \quad R^2 = 0,90$$

FIGURA 6 - Valores médios de T50 de sementes de cafeeiro submetidas a diferentes épocas de armazenamento, a concentrações de paclobutrazol, e ambientes. UFLA, Lavras, MG, 2006.

De uma maneira geral em relação ao ambiente escuro foi observado maior IVG e menor T50 (Tabelas 7 e 8) que no claro, independente do ambiente. E que aos quatro meses de armazenamento houve redução no IVG e maior número de dias para 50 % que as sementes germinassem.

TABELA 7 - Valores médios de IVG em sementes de cafeeiro armazenadas por diferentes períodos de armazenamento, submetidas no claro e escuro. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Ambiente	IVG		
	Época 0	4	8
Claro	2,332 bB	2,022 Bc	2,543 aA
Escuro	2,699 aA	2,479 Ab	2,676 aA

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

TABELA 8 - Valores médios de T50 em sementes de cafeeiro armazenadas por diferentes períodos de armazenamento, submetidas no claro e escuro. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Ambiente	T50		
	Época 0	4	8
Claro	9,85 Bb	11,46 Bc	9,06 Ba
Escuro	8,19 Aa	9,01 Ab	8,27 Aa

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

## **6 CONCLUSÕES**

A adição de giberelina na embebição de sementes de cafeeiro reduz a velocidade e a porcentagem de germinação.

O bloqueador de giberelina paclobutrazol reduz a velocidade de germinação de sementes de cafeeiro.

O paclobutrazol não reduziu o efeito da luz durante a germinação.

Na ausência de luz as sementes de cafeeiro germinam com maior velocidade que na presença de luz.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, L. A. S.; MOUCO, M. A.; REIS, V. C. **Floração da mangueira através do uso de reguladores de crescimento**. Petrolina: EMBRAPA, 1999. v. 12 (Instrução Técnicas).
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum press, 1994. 445 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA PARA A SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., São Carlos, 2000. **Anais...** São Carlos, Universidade de São Carlos, 2000. p. 255-258.
- KARSSSEN, C. M.; ZAGORSKI, S.; KEPCZYNSKI, J.; GROOT. S. P. C. A key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. **Annals of Botany**, London, v. 63, n. 1, p. 71-80, Jan. 1989.
- LIMA, D. M. **Armazenabilidade de sementes de *Coffea arabica* e *Coffea canéfora* Pierre, submetidas a diferentes métodos de desmucilagem e de secagem**. 2005. 106 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal, de Lavras, Lavras, MG.
- MAESTRI, M.; VIEIRA, C. Nota sobre a redução da porcentagem de germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L. var. Bourbon), por efeito do ácido giberélico. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 11, n. 65, p. 247-249, jul./dez. 1961.
- MAGUIRRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.
- RADEMACHER, W. Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 501-531, 2000.

ROSA, S. D. V. D.; SANTOS, C. G. dos; PAIVAR, R.; GUIMARÃES, R. M.; VEIGA, A. A. D.; MELO, L. Q. De Cafeína exógena inibe o desenvolvimento In Vitro de embriões de *Coffea arabica* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 28., 2002 Caxambu-MG. **Anais...** Caxambu, 2002. p. 164-166.

SILVA, A. A. **Coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation.** 2002. 105 p. Thesis (Doctorete) - University at Wageningen, Wageningen.

SILVA, E. A. A. da; TOROOP, P. E.; NIJSSE, J.; BEWLEY, J. D.; HILHORST, H. W. M. C. Exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination and cause cell death in the embryo. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 413, p. 1029-1038, Mar. 2005.

TAKAKI, M.; DIETRICH, S. M. C.; FURTADO, J. S. Anatomical changes in the hard endosperm of gibberellic acid-treated coffee seeds during germination. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 103-106, dez. 1979.

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, 1976.

VEIGA, A. D. **Armazenabilidade de sementes de cafeeiro em diferentes estádios de maturação e submetidas a diferentes métodos de secagem.** 2005. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal, de Lavras, Lavras, MG.

WAMPLE, R. L.; CULVER, E. B. The influence of paclobutrazol a new growth regulator, on sunflower. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 1, p. 122-125, jan. 1983.

WOLFRON, M. L.; LAVER, M. L.; PATIN, D. L. Carbohydrates of coffee bean. II Isolation and characterization of mannan. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 26, n. 11, p. 4533-4536, 1961.

## **CAPÍTULO 3**

### **ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE CAFÉ**



## 1 RESUMO

RESENDE, Maria de Lourdes. Alterações bioquímicas na germinação de sementes de café. In:\_\_\_\_\_. **Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L) cv. Rubi**. 2006. p. 69-104. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

\*

A embebição das sementes é de suma importância para a germinação, permitindo a retomada da atividade das enzimas, degradação, mobilização e assimilação de reservas, para o crescimento do embrião. Nesta pesquisa foram avaliados a ação das enzimas, proteínas e açúcares envolvidos na hidrólise durante a germinação das sementes de cafeeiro. Foram utilizadas sementes de cafeeiro da cultivar Rubi, colhidas no estágio cereja e secadas até atingirem 12% do teor de água. Inicialmente foram armazenadas 100 sementes secas (testemunha) no deep-freezer a  $-86^{\circ}\text{C}$ , para serem utilizadas nas análises posteriores. Sementes de cafeeiro foram submetidas ao processo de embebição por períodos de 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias, nos ambientes claro e escuro, em gerbox sobre duas folhas de papel mata-borrão e sob uma folha de papel germitest. Essas sementes foram embebidas na presença de 20 mL de solução de GA3 ( $100\mu\text{M}$ ) e em 20 mL de água destilada por gerbox. Os gerbox foram mantidos em germinador a  $30^{\circ}\text{C}$  e ao final de cada período de embebição as sementes foram armazenadas em deep-freezer a  $-86^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises. Para cada tratamento foram utilizadas quatro repetições com 25 sementes cada. Realizou-se análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor (LEA proteína) e das enzimas (catalase, superóxido dismutase e peroxidase), a determinação do teor de açúcares (sacarose, manose, glicose, frutose, galactose, rafinose e estaquiiose), a atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase, a da enzima polifenoloxidase e da porcentagem de polifenóis em sementes submetidas aos diferentes tratamentos. Foi observada atividade da enzima peroxidase somente nas sementes embebidas com giberelina independente do regime de luz. Para a enzima superóxido dismutase foi observado um único padrão de bandas, independente do tratamento utilizado. Para a catalase houve atividade em sementes secas (testemunha) e nas sementes com dois dias de embebição.

---

\* Comitê Orientador: Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães – UFLA (Orientador); Pesq. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva - UFLA; Prof. Dr. João Almir de Oliveira – UFLA.

Foram observadas alterações nos padrões das proteínas resistentes ao calor durante o processo de germinação. A sacarose foi degradada no início da embebição nas sementes, sendo reduzida ao longo do processo de germinação. Maiores valores de manose foram observadas em sementes embebidas na presença de luz e giberelina. A enzima endo- $\beta$ -mananase aumenta nas sementes embebidas na presença de luz e giberelina. Os polifenóis aumentam durante a germinação das sementes. Quanto aos resultados da atividade da enzima polifenoloxidase foi verificada redução, à medida que o período de embebição foi aumentado.

## 2 ABSTRACT

RESENDE, Maria de Lourdes. Biochemical changes during germination of coffee seed. In:\_\_\_\_\_. **Physiological and biochemical changes during of coffee seed germination (*Coffea arabica* L.) cv Rubi**. 2006. p. 69-104. Tese (PhD. In Plant Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Seed imbibition is an important event for germination, allowing the reactivation of enzyme activities, degradation, mobilization and assimilation of storage reserves, needed for embryo growth. In this research there were evaluated the enzyme activity, proteins and sugars during coffee seed germination. Coffee seeds from the cultivar Rubi were harvested at the maturation stage called cherry and dried until 12% of moisture content. Initially, there were storage 100 seeds (control) in deep freezer at -86°C for further analyses. Coffee seeds were placed to imbibe at periods of 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 days under light and dark conditions in gerbox tray with two blotting papers and germitest paper. The seeds were imbibed with 20 mL of GA3 (100µM) solution and in 20 mL of distilled water. The gerbox trays with seeds were placed at 30°C in an incubator and at the end of each imbibition period the seeds were taken and storage in deep-freezer a -86°C for further analyses. There were used four repetitions of 25 seeds per treatment. Seeds were subjected to electrophoresis analysis of proteins resistant to heat (LEA proteins) and the enzymes (catalase, superoxide dismutase and peroxidase), determination of sugar content (sucrose, mannose, glucose, fructose, galactose, raffinose and staquiose), the activity of endo-b-mannanase, the enzyme polyphenoloxidase and percentage of polyphenols. There were observed activity of peroxidase only in seeds imbibed in gibberellins independent on light regime. The enzyme superoxide dismutase showed a unique pattern of bands independent on the treatment. The enzyme catalase showed activity only in the control (dry seeds) and in two days

---

\* Guidance Committee: Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães – UFLA (Major Professor); Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva – UFLA; Prof. Dr. João Almir de Oliveira – UFLA.

imbibed seeds. There were observed changes in the electrophoretic pattern of proteins resistant to heat during seed germination. Sucrose was degraded in the beginning of the imbibition and decreased during germination. High mannose content was observed in seeds imbibed under the presence of light and gibberellin. The enzyme endo- $\beta$ -mannanase increased its activity under the presence of light and gibberellin. The percentage of polyphenols increased during germination. The enzyme polyphenoloxidase decreased its activity with the increase in the imbibition period.

### 3 INTRODUÇÃO

A longevidade das sementes está relacionada à tolerância à dessecação das mesmas. As sementes de *Coffea arabica* apresentam comportamento intermediário para a tolerância à dessecação Brandão Junior et al. (2002). A aquisição da tolerância à dessecação ocorre durante a maturação, antes que as sementes passem por uma severa redução no teor de água. Porém, não se pode determinar se a tolerância é adquirida antes ou em resposta à perda de água durante a maturação (Bewley, 1979). Durante o desenvolvimento das sementes ocorre síntese de proteínas e de outras substâncias, as quais são utilizadas no processo de germinação. Outro fator que atua na germinação das sementes refere-se aos mecanismos de tolerância à dessecação, que a semente desenvolve para se manter viva, no armazenamento em baixas umidades e que são determinantes da qualidade das sementes após secagem.

A embebição é de suma importância para a germinação, pois permite a retomada das atividades metabólicas, as quais contribuem nos processos de mobilização e assimilação de reservas e alongamento celular (Marcos Filho, 2005). Ao longo do processo de germinação das sementes ocorre redução da tolerância à dessecação.

O processo de hidrólise das reservas e sua transformação em substâncias solúveis e difusíveis, até os pontos de crescimento do embrião, ocorrem por meio da hidrólise. Esse processo é realizado pela atividade de várias enzimas hidrolíticas, as quais têm sido avaliadas no intuito de detectar várias reações metabólicas, que envolvem a síntese e a degradação de substâncias que ocorrem durante o processo de germinação. Os polissacarídeos presentes nas sementes de cafeeiro, depositados como fonte de reservas na semente são degradadas durante a germinação por enzimas hidrolíticas, principalmente, a endo- $\beta$ -mananase,

resultando no enfraquecimento das paredes celulares do endosperma (Silva et al., 2004).

As sementes dispõem de alguns mecanismos de proteção capazes de manter os sistemas de membrana das células vivos, como as estruturas das macromoléculas e as substâncias de reserva, as quais recuperam suas funções fisiológicas, quando são embebidas (Guimarães, 1999).

O acúmulo de açúcares não redutores tem sido associado a aquisição de tolerância à dessecação. Os açúcares específicos têm se destacado como substitutos da água, os quais podem prevenir os efeitos severos que ocorrem durante a dessecação em sementes, por estabilizarem membranas e proteínas ou ainda pela formação de vidro no citoplasma (Leprince et al., 1993).

As proteínas LEA são consideradas importantes coadjuvantes dos mecanismos que previnem os danos provenientes da remoção de água dos tecidos e que são acumuladas durante os estádios mais tardios do desenvolvimento, antes ou durante a secagem. Estas proteínas conferem às sementes capacidade de germinarem após secagem e subsequente reidratação (Bewley & Black, 1994; Faria et al., 2003; Guimarães et al., 2002).

Têm sido estudados mecanismos que conferem proteção às sementes, como proteção: por solúveis, por antioxidantes, por enzimas protetores e por proteínas que atuam na preservação dos sistemas de membranas celulares ou contra a oxidação de macromoléculas por radicais livres.

Entretanto, torna-se evidente a necessidade de se conhecerem os mecanismos envolvidos na germinação de sementes de cafeeiro, principalmente no que se refere à hidrólise e atuação de alguns mecanismos de tolerância à dessecação.

Desta forma, nessa pesquisa o objetivo foi verificar a ação das enzimas, proteínas e açúcares envolvidos na hidrólise durante a germinação das sementes de cafeeiro.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Análise de Sementes e de Eletroforese, do Departamento de Agricultura e no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, MG.

Foram utilizadas sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Rubi, colhidas em estágio cereja, nos campos de produção de sementes da Universidade Federal de Lavras. Os frutos foram colhidos manualmente, despolidos em despolidor manual, desmucilados por fermentação natural em água, durante 24 horas em condição ambiente. Em seguida, as sementes foram lavadas e secadas à sombra, sobre papel multifoliado até atingirem 12% de teor de água.

Inicialmente foram retiradas 100 sementes secas (testemunha) e armazenadas no deep-freezer a  $-86^{\circ}\text{C}$ , para serem utilizadas nas análises posteriores. As sementes foram embebidas, na presença e ausência de luz (gerbox foram envolvidos por papel alumínio), por períodos de embebição (2; 4; 6; 8; 10; 12 e 14 dias), em caixas tipo gerbox sobre duas folhas de papel mata-borrão sob uma folha de papel germiteste. Os substratos, em cada caixa gerbox, foram umedecidos por meio da adição de 20 mL de solução de GA3 (100  $\mu\text{M}$ ) e 20mL de água destilada. Todas as caixas gerbox, contendo as sementes foram acondicionadas em sacos de polietileno, para evitar o ressecamento dos papéis, e mantidos em germinador a  $30^{\circ}\text{C}$ . Após cada período de embebição, as sementes foram armazenadas em deep-freezer a  $-86^{\circ}\text{C}$ , para posteriores análises. Para cada tratamento foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes/cada.

#### **4.1.Procedimento estatístico**

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (7x2x2), em quatro repetições de 25 sementes, por tratamento, sendo sete períodos de embebição; dois ambientes de germinação (claro e escuro); com e sem giberelina.

#### **4.2 Avaliações**

Inicialmente, foram trituradas 37 sementes embebidas de cafeeiro de cada tratamento, em moinho refrigerado a 4°C, na presença de nitrogênio líquido e PVP (polivinilpirrolidone) e armazenadas em deep-freezer, à -86 °C.

##### **4.2.1 Análise eletroforética de enzimas**

Para análise eletroforética das isoenzimas foram pesados 100 mg de cada tratamento das sementes embebidas e moídas como descrito no item 4.2. A extração das enzimas foi efetuada, adicionando a 100 mg do pó 200 µl do tampão de extração (0,2 M Tris, pH 8,0, 0,1% β mercaptoetanol, 0,4% PVP, 0,4% PEG, 1mM EDTA), homogeneizados em vortex e, posteriormente, incubados em gelo na geladeira por 2 horas. Após esse tempo as amostras foram centrifugadas a 14.000xg, a 4°C por 60 minutos. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e 60 µL desse foram aplicados em géis de poliacrilamida a 4,5% (gel concentrador) e 7,5% (gel separador). A corrida eletroforética foi realizada a 150 V durante 4 horas. Os géis foram revelados para: catalase (CAT), peroxidase (PO) e superóxido dismutase (SOD), de acordo com metodologia descrita por Alfenas & Brune (1998).



#### **4.2.2 Análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor**

Para análise eletroforética das proteínas resistentes ao calor foram pesados 200 mg de sementes embebidas e moídas, como descrito no item 4.2 de cada tratamento, em microtubos. A extração das proteínas foi efetuada, adicionando 300 µL do tampão de extração (5mM tris-HCL, pH=7,5; 500 mM NaCl ; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM PMSF) e Antipain em proporção de 5 mg para cada mL de tampão em 200 mg do pó. Em seguida, os microtubos foram agitados em Vortex e centrifugados a 14.000xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi incubado em banho-maria a 85°C, por 15 minutos e, novamente, centrifugado por 30 minutos a 14.000xg. Posteriormente, o sobrenadante foi vertido em microtubos, ao qual foi adicionado 23 µL do tampão da amostra (5mL de glicerol, 2,5 mL de solução tampão do gel concentrador, 2,5 mg de azul de bromofenol e completado o volume para 25mL com água destilada). Em seguida, foram levados ao banho-maria em ebulição por 5 minutos. Em cada canaleta do gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador) aplicou-se 40 µL de cada amostra. A corrida eletroforética foi realizada com tampão de corrida Tris-glicina +SDS pH 8,0 a 150 V por 4 horas. Os géis foram corados em Coomassie Blue (0,5g Coomassie Blue R-250; 250 mL de etanol; 50 mL de ácido acético glacial, completando o volume até 500 mL com água destilada), durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10% e etanol 5%, conforme Alfenas & Brune (1998).

#### **4.2.3 Atividade da enzima endo-β-mananase**

Para a determinação desta enzima foram pesados 200 mg de sementes embebidas e moídas como descrito no item 4.2. de cada tratamento em

microtubos e, em seguida, foram adicionados 600 µl do tampão de extração (0,1M de Hepes e 0,5 M de NaCl pH 8,0; mais ácido ascórbico, na proporção de 5mg por cada mL de tampão). Em seguida, foram homogeneizados em vortex por um minuto e, então, centrifugados a 10.000xg a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, foi retirado o sobrenadante e aplicado em gel confeccionado com 6 mL de LBG (Locust Bean Gum-Sigma nr 0753), mais 0,24 g de agarose e 24 mL de tampão pH 5,0, aquecendo a solução por 2 horas a 80°C, seguida de resfriamento em temperatura ambiente. O tampão pH 5,0 foi composto por 11 ml de ácido cítrico 1M; 50mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mais 149 mL de água destilada, totalizando 210 mL. A limpeza dos suportes do gel com U-frame (Pharmacia 8001106-89) foram realizados com etanol. O suporte do gel foi coberto com Gelbond film (Pharmacia nr 80-112932), sendo que o lado hidrofílico ficou em contato com o gel. Todos os suportes foram presos por prendedores. O gel de agarose foi aquecido em microondas por um minuto até ser dissolvido completamente. Neste mesmo período, o suporte foi aquecido em estufa a 80°C, para evitar o trincamento, que por ventura possa ocorrer por diferenças de temperatura entre o vidro e o gel. Em seguida, verteu-se a agarose no suporte. E o gel solidificado foi armazenado na geladeira por 24 horas, furado com furador de 2mm e succionados com bomba a vácuo, para completar a limpeza dos furos. Foram aplicados 2µL do extrato das amostras, nos furos em triplicata de cada tratamento. Após a aplicação das amostras o gel foi colocado em uma câmara úmida, regulada a 25°C durante 21 horas, para manifestação da ação da enzima.

O gel foi inicialmente lavado em água destilada, depois em tampão do próprio gel por 30 minutos e novamente em água destilada para revelação da enzima. Em seguida, foi corado em uma solução a 0,5% de vermelho congo por 30 minutos e depois colocado em etanol. Posteriormente, o gel foi novamente lavado em água destilada e colocado em uma solução de 1M de NaCl até a

observação visual da formação de halos brancos nos furos que continham as amostras. Em seguida, foi realizada a medição dos halos com paquímetro nas duas direções. A curva padrão foi realizada com a endo- $\beta$ -mananase comercial de *Aspergillus niger* (Megazyme) e, em seguida, foi calculada a atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase de acordo com Downie (1994).

#### **4.2.4 Conteúdo de açúcares**

Para a quantificação dos açúcares foram pesados, em microtubos 200 mg de sementes embebidas e moídas como descrito no item 4.2 de cada tratamento em triplicata. Em seguida, foi realizada a extração dos açúcares adicionando-se 2mL de água ultrapura nos microtubos, homogeneizados em vortex e mantidos por 30 minutos em banho ultrassônico (Ultrason Branson 1510). Posteriormente, os microtubos foram colocados em banho-maria a 72°C, durante 15 minutos e, em seguida, centrifugados por 10 minutos a 4°C e 14.000xg. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,15  $\mu$ m, e armazenado a -86°C em deep-freezer, até a realização das análises.

As determinações dos açúcares foram realizadas por meio da técnica da cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, marca Shimadzu), sendo a quantidade aplicada de 20  $\mu$ L do sobrenadante de cada amostra. Os açúcares foram separados numa coluna Zorbax (840300-908) de 5 $\mu$ m por 4,6mm x 250mm; tendo como fase móvel a acetronitrila/água ultrapura (75/25) e como fluxo de 1,0 mL/min (bomba LC-10) e detector de índice de refração. Para a retirada das bolhas da solução de acetronitrila foi utilizado um degaseificador adaptado à bomba a vácuo.

A quantificação dos teores de açúcares foi determinada à temperatura ambiente. Como padrão, foram utilizados os seguintes açúcares: sacarose,

manose, frutose, galactose, glicose, rafinose e estaquiose, todos na concentração de 10 mg/mL.

#### **4.2.5 Polifenóis**

Os polifenóis contidos nas sementes embebidas de cada um dos tratamentos foram extraídos pelo método de Goldstein & Swain (1963), utilizando 50% de metanol como extrator e identificados pelo método de Folin Denis, descrito pela AOAC (1990).

#### **4.2.6 Polifenoloxidase**

A atividade da enzima polifenoloxidase foi realizada de acordo com o método descrito por Draetta & Lima (1976), de cada tratamento das sementes embebidas. Para a determinação da enzima, as amostras foram previamente moídas, em moinho refrigerado a 4°C, adicionando nitrogênio líquido. A 5 g de cada amostra das sementes de café foram adicionados 40 mL da solução tampão de fosfato de potássio 0,1M pH6,0 e homogenizados em vortex por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 1 a vácuo. Na determinação desta enzima foi utilizado extrato da amostra sem o DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanina) como branco. Foi realizada a curva padrão. A leitura da enzima polifenoloxidase foi realizada em espectrofotômetro Schumaz e os resultados expressos em  $\text{Umin}^{-1} \text{g}^{-1}$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise enzimática

Nas Figuras 7, 8 e 9 estão apresentados os padrões eletroforéticos das enzimas peroxidase, catalase e superóxido dismutase, respectivamente, extraídas de sementes de cafeeiro, submetidas a períodos entre 0 a 14 dias de embebição, durante a germinação, em presença e ausência de luz e com ou sem giberelina.

Pelo perfil eletroforético (Figura 7 B e D) não foi observada atividade da enzima peroxidase nas sementes embebidas em água, independente do regime de luz adotado. No entanto, nas sementes embebidas em solução de giberelina (Figura 7 A e C), foi observada intensidade de bandas da enzima peroxidase aos 10, 12 e 14 dias de embebição, tendo maior atividade aos 14 dias. Esses resultados corroboram com Takaki & Dietrich (1979) que observaram intensidade de bandas da enzima peroxidase, no final do processo de germinação em sementes de café cv. Mundo Novo, tratadas com giberelina. Segundo esses autores a giberelina aumenta a liberação da enzima peroxidase que normalmente ocorre no final do processo de germinação. Esses mesmos autores ainda relataram que a giberelina pode afetar a integridade das membranas. As peroxidases estão ligadas aos sistemas do processamento enzimático de radicais livres, que incluem a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do peróxido ( $O_2^-$ ) em  $H_2O_2$ , catalase, glutathione redutase, ascorbato peroxidase e outras peroxidases. Esses sistemas, provavelmente, estão envolvidos na resposta antioxidativa uma vez que é capaz de neutralizar o oxigênio tóxico ativado formado durante os processos de estresse (Winston, 1990). Essas enzimas catalizam reações removedoras de radicais livres. A redução na atividade dessas enzimas está relacionada à perda de viabilidade (Brandão Júnior, 1999).

Nesse trabalho, foi observada maior atividade dessa enzima nos estádios tardios da germinação e apenas nas sementes tratadas com giberelina (Figura 7 A e C). Provavelmente, este fato ocorreu, como uma resposta de distúrbios fisiológicos causados pela aplicação da giberelina exógena. A aplicação de giberelina pode ter induzido as reações hidrolíticas, com produção de substâncias tóxicas às sementes como, por exemplo, a manose. O provável efeito tóxico da giberelina nas sementes pode estar associado aos menores valores de germinação e IVG e os maiores de T50 observados em sementes embebidas na presença de giberelina (Vide capítulo II).

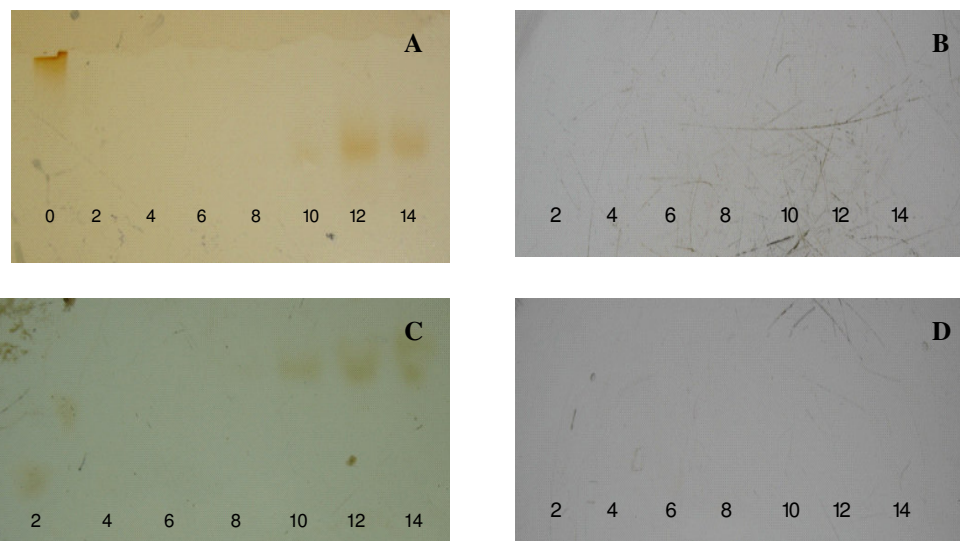


FIGURA 7 - Padrões enzimáticos de peroxidase (PO) em sementes de cafeeiro, submetidas a diferentes períodos de embebição (dias), em diferentes ambientes, com e sem giberelina: (A) escuro e giberelina; (B) escuro e água; (C) claro e giberelina; (D) claro e água. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Para a enzima catalase (Figura 8 A, B, C e D), foi observada maior atividade em semente seca, ou seja, não submetidas ao processo de embebição. Pequena atividade dessa enzima foi observada, quando as sementes foram embebidas por dois dias. Com o avanço do processo de embebição não houve atividade dessa enzima. Provavelmente, essa enzima pode ser sensível à alguma substância que é liberada com a embebição das sementes. A catalase é uma enzima que está envolvida na remoção de peróxido de hidrogênio Fridovich (1986) e que pode desempenhar o controle desses peróxidos, por meio do ciclo de oxidorredução.

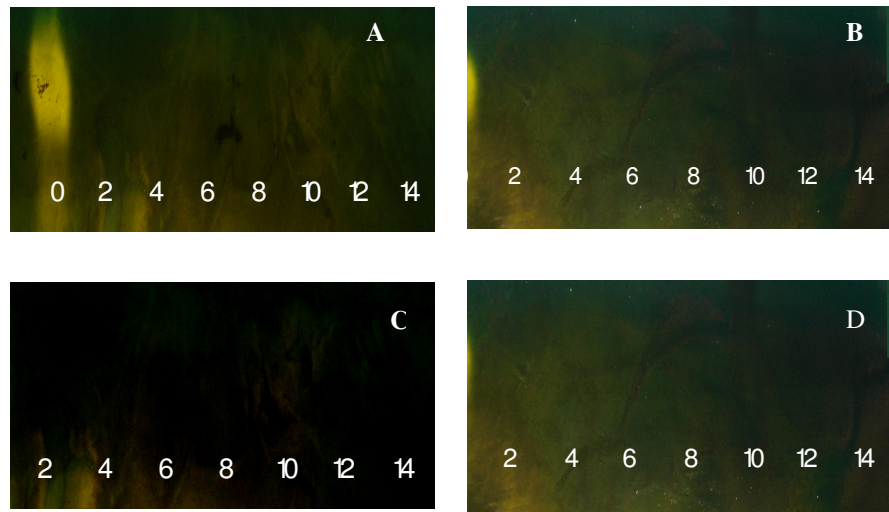


FIGURA 8 - Padrões enzimáticos de catalase (CAT) em sementes de cafeeiro, submetidas a diferentes períodos de embebição (dias), em diferentes ambientes, com e sem giberelina: (A) escuro e giberelina; (B) escuro e água; (C) claro e giberelina; (D) claro e água. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Quanto à enzima superóxido dismutase (Figura 9 C e D) não houve alteração de bandas nas sementes germinadas no claro, independentemente de serem embebidas com giberelina ou água durante a germinação das sementes de cafeeiro. O comportamento da atividade da enzima nas sementes embebidas no escuro, também foi semelhante na presença ou ausência de giberelina (Figura 9 A e B). Entretanto, houve redução na intensidade das bandas com o aumento do tempo de embebição. A enzima SOD atua como mecanismos eficientes de desintoxicação, uma vez que age na remoção de peróxidos. Na medida em que os reparos nas macromoléculas e, principalmente, nas membranas evoluíram com a embebição, a produção de superóxido foi sendo reduzida, podendo ser em consequência da reorganização celular, que ocorreu nas sementes após a embebição. Provavelmente, a redução da atividade da SOD, nesse caso, foi devida à redução do substrato onde a enzima atua. Já nas sementes embebidas no claro (Figura 9 C e D), provavelmente, a hiperatividade das reações hidrolíticas mantiveram a produção de peróxido em níveis mais altos e, conseqüentemente, com a atividade da enzima mais alta.

No capítulo II foram observados menores valores de germinação em sementes germinadas no claro. A provável produção excessiva de manose durante o processo de germinação pode ter influenciado na atividade da enzima superóxido dismutase durante o processo de embebição.



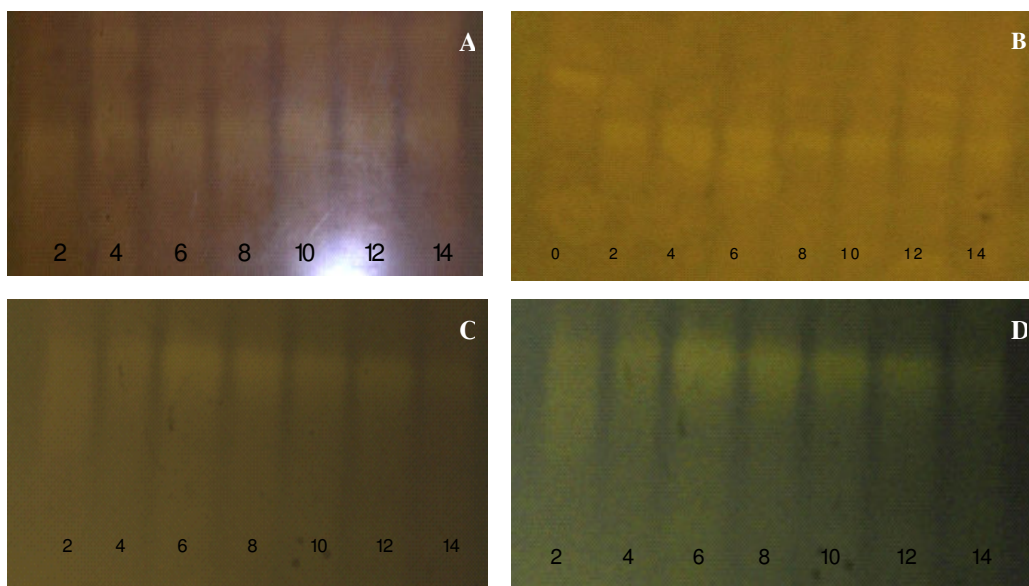


FIGURA 9 - Padrões enzimáticos de superóxido dismutase (SOD) em sementes de cafeeiro, submetidas a diferentes períodos de embebição (dias) e ambientes, com e sem giberelina: (A) escuro e giberelina; (B) escuro e água; (C) claro e giberelina e (D) claro e água. UFLA, Lavras, MG, 2006.

## 5.2 Análise de proteínas resistentes ao calor

Na Figura 10, encontram-se os perfis eletroforéticos de proteínas resistentes ao calor, para as sementes de cafeeiro embebidas no ambiente claro e escuro, com e sem giberelina, durante o processo de germinação. Nas sementes embebidas no escuro e na presença de giberelina (Figura 10 A) houve variação nos padrões das proteínas resistentes ao calor durante o processo de germinação, com redução mais expressiva de intensidade, em sementes submetidas aos períodos de quatro dias de embebição e aos 14 dias. Esse resultado da redução

de intensidade de bandas, ao longo do processo de germinação, provavelmente ocorreu, porque durante este processo há perda da tolerância à dessecação. Albuquerque (2006) observou em sementes de sucupira-preta bandas fortes de proteínas resistentes ao calor ao longo da germinação, sendo reduzida no final desse processo. Esse autor explicou que a presença dessas proteínas podem ter sido responsáveis pela manutenção da capacidade germinativa das sementes armazenadas por um longo período.

Em relação às sementes embebidas no ambiente claro (Figura 10 C e D) independente de presença de giberelina ou água, pôde ser observada, aos quatro dias de embebição diminuição na intensidade de bandas.

Comparando ainda os padrões dessa proteína, em sementes submetidas à luz, durante o processo de embebição, pode ser observada maior estabilidade e intensidade de padrões protéicos, em sementes embebidas, na presença de água (Figura 10 B e D), principalmente à partir de 8 dias de embebição. Conclui-se que a embebição das sementes na presença de luz e giberelina (Figura 10 C e D) podem comprometer a proteção das membranas durante o processo de germinação. De todos os tratamentos testados esse (Figura 10 C e D) parece ter ocasionado maiores danos às sementes. De uma maneira geral, no escuro (Figura 9 A e B), as proteínas resistentes ao calor foram mais estáveis.

É sabido que essas proteínas são acumuladas no final da maturação e, também, estão relacionadas com a tolerância à dessecação (Black et al., 1999 e Walter et al., 1998). Guimarães et al. (2002) observou que em sementes de cafeeiro em diferentes estágios de desenvolvimento, as proteínas resistentes ao calor atuam como agentes protetores de membranas e, também, contribuem para à tolerância à dessecação. Estas proteínas apresentam função protetora e são induzidas pelo ácido abscísico (Leprince et al., 1993), sendo que sua expressão cessa, após a embebição das sementes (Blackman et al., 1991; Blackman et al., 1992).

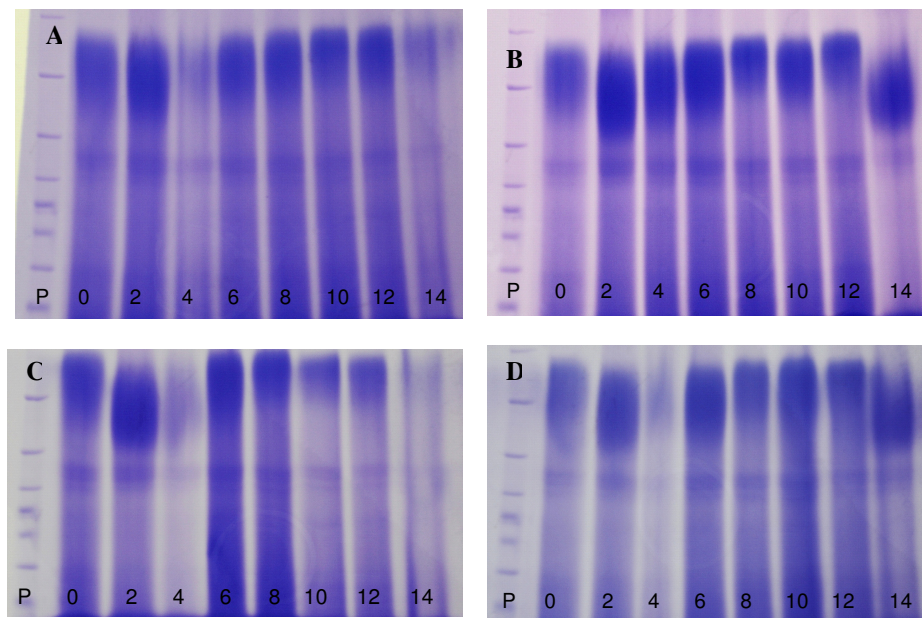
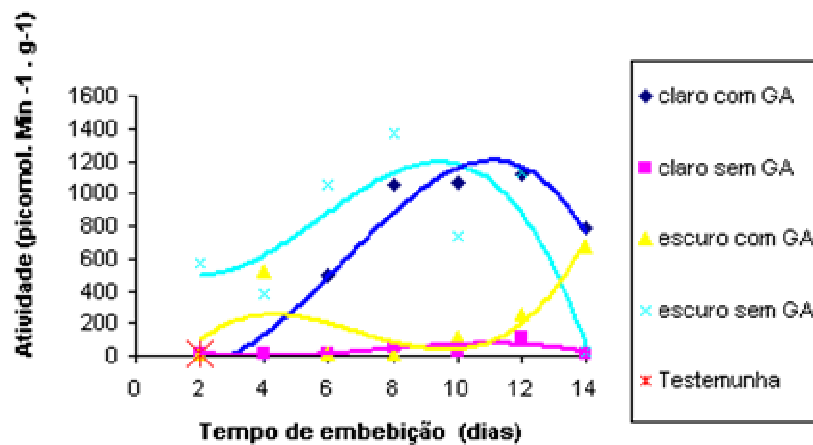


FIGURA 10 - Perfil eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de cafeeiro, submetidas a diferentes períodos de embebição (dias) e ambientes, com e sem giberelina: (A) escuro e giberelina; (B) escuro e água; (C) claro e giberelina (D) claro e água. UFLA, Lavras, MG, 2006.

### 5.3 Atividade da endo- $\beta$ -mananase

Pelos resultados obtidos nesta pesquisa, pode ser observado que durante a germinação das sementes de cafeeiro embebidas no ambiente claro com giberelina, a atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase, inicia-se por volta do terceiro dia de embebição e cresce até o décimo primeiro dia, em seguida, tende a decrescer (Figura 11). Este resultado provavelmente explica a razão das sementes embebidas no claro com giberelina levarem mais tempo para protrundirem. Nas sementes embebidas no claro, quando a giberelina exógena

não foi adicionada, a atividade da enzima foi muito baixa ao longo dos 14 dias de germinação. Pode-se, portanto, constatar a influência da aplicação da giberelina exógena na atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase. Quando as sementes foram embebidas no escuro sem giberelina, a atividade da endo- $\beta$ -mananase já havia iniciado no segundo dia de embebição, sendo crescente até o nono dia e, em seguida, tendeu a decrescer. No escuro, quando a giberelina foi adicionada, a atividade da enzima permaneceu baixa até o décimo segundo dia e cresceu em seguida.



Legenda:

$$\text{ESGA: } y = -3,3923x^3 + 57,924x^2 - 188,88x + 667,96 \quad R^2 = 0,69$$

$$\text{CCGA: } y = -3,1174x^3 + 60,283x^2 - 186,95x + 114,24; \quad R^2 = 0,95$$

$$\text{CSGA: } y = -0,407x^3 + 9,1117x^2 - 52,3x + 85,904; \quad R^2 = 0,49$$

$$\text{ECGA: } y = 2,8277x^3 - 58,975x^2 + 349,45x - 385,94; \quad R^2 = 0,70$$

FIGURA 11 - Atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes de cafeeiro, submetidas a diferentes períodos de embebição (dias) e ambientes, com e sem giberelina. UFLA, Lavras, MG, 2006.

De maneira geral, maior atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase foi observada nas sementes embebidas no ambiente claro com giberelina. Este resultado pode ser comparado aos observados para o teor de açúcar manose, que também aumenta durante a germinação das sementes.

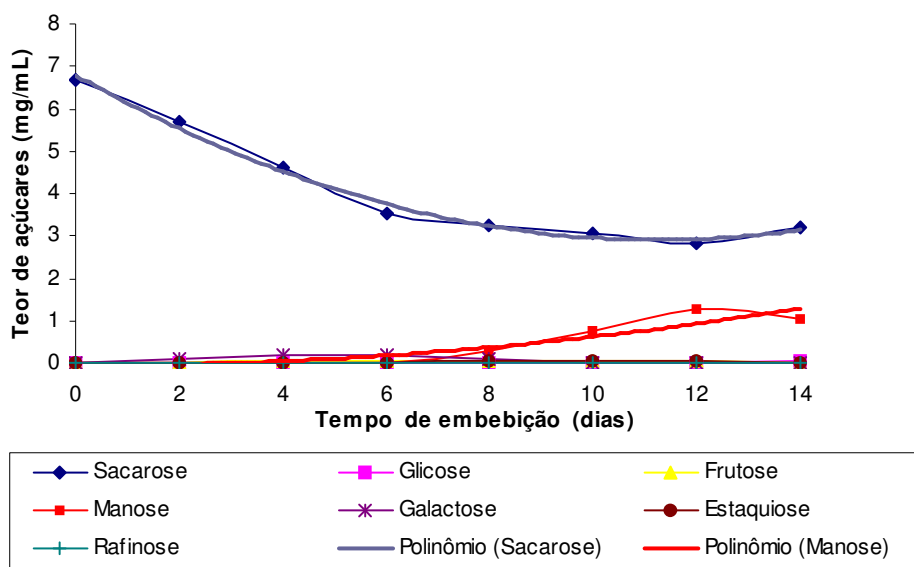
A enzima endo- $\beta$ -mananase atua no processo de germinação e ocorre antes da protrusão radicular, sendo responsável pelo enfraquecimento do endosperma cap em sementes de cafeeiro (Silva et al., 2005). Estes mesmos autores relataram que esta enzima pode estar envolvida na degradação de parede, no processo de germinação das sementes de cafeeiro. Dessa maneira, o início da atividade dessa enzima hidrolítica, antes do segundo dia de embebição, nas sementes submetidas ao ambiente escuro com giberelina é coerente com essas informações, considerando que a protrusão radicular das sementes de cafeeiro embebidas no escuro é mais rápida.

Nesta pesquisa, de uma maneira geral, foi observado que apenas a luz, não foi suficiente para aumentar a atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase, sendo aumentada somente na presença de giberelina. Este resultado, provavelmente, poderá ser explicado, porque a luz induz a produção de giberelina, que conseqüentemente, irá induzir a produção dessa (Bewley & Black 1994). Esse aumento dessa enzima nas sementes embebidas no claro com giberelina está coerente com os baixos valores de IVG e maiores de T50, observados nas sementes germinadas no claro com giberelina.

#### **5.4 Teor de açúcares**

Os resultados da análise cromatográfica de açúcares nas sementes de cafeeiro submetidas ao ambiente claro e escuro com e sem giberelina durante o processo de germinação, podem ser observados nas Figuras 12, 13, 14 e 15. Pela Figura 12, nota-se que o teor do açúcar sacarose teve uma tendência de

decréscimo à medida que se aumentou o período de embebição das sementes no ambiente claro com giberelina. Observa-se ainda que para a manose houve tendência de acréscimo após o sexto dia embebição nas sementes embebidas no claro com giberelina. O resultado da manose nas sementes embebidas no claro com giberelina confirmam os resultados observados na atividade endo- $\beta$ -mananase (Figura 11).



Legenda:

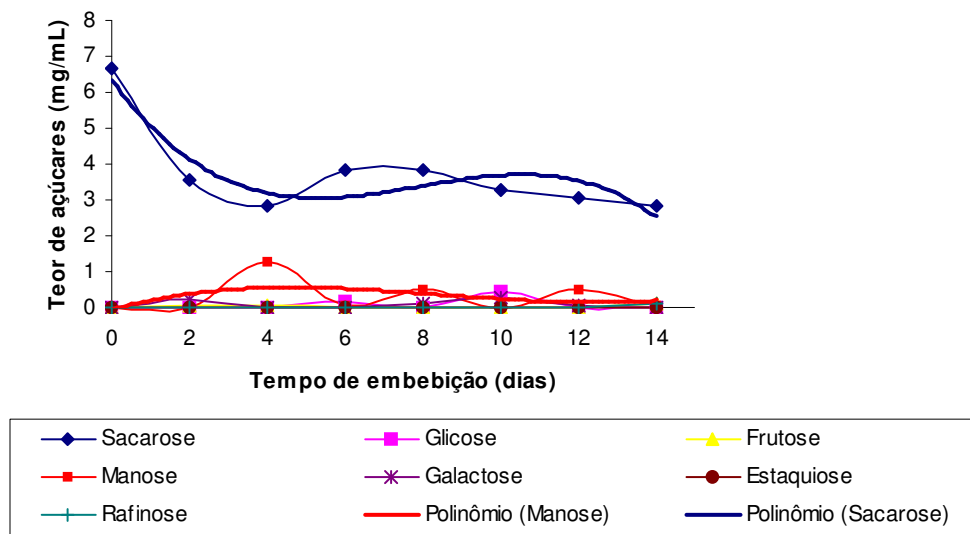
$$y = 0,0308x^2 - 0,6919x + 6,7953 \quad R^2 = 0,99$$

$$y = 0,0072x^2 - 0,0047x - 0,0539 \quad R^2 = 0,86$$

FIGURA 12 - Teor de açúcares (mg/mL) em sementes de café, submetidas a diferentes períodos de embebição (dias), na presença de luz e giberelina. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Pelos resultados obtidos nas sementes embebidas em ambiente claro sem giberelina (Figura 13), pôde ser observada a redução no conteúdo de

sacarose, até o sexto dia da embebição seguida de estabilização, com tendência novamente de redução a partir do décimo segundo dia. Observou-se, ainda, que a sacarose foi degradada no início da embebição, sendo reduzida ao longo do processo de germinação. Em relação à manose nas sementes embebidas no claro sem giberelina pôde ser observado que os resultados não foram consistentes vide valor de R e dados observados.



Legenda:

$$y = -0,0088x^3 + 0,2101x^2 - 1,485x + 6,3404 \quad R^2 = 0,83$$

$$y = 0,0018x^3 - 0,0455x^2 + 0,3077x - 0,0644 \quad R^2 = 0,21$$

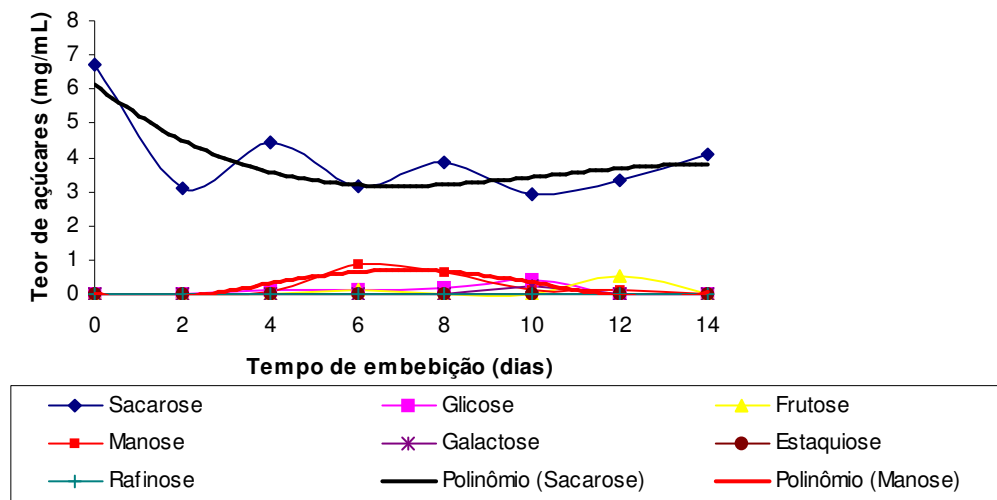
FIGURA 13 - Teor de açúcares (mg/mL) em sementes de café, submetidas a diferentes períodos de embebição (dias), na presença de luz e água. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Comparando as Figuras 12 e 13, em relação ao mecanismo de embebição e a presença de manose, pode-se dizer que a luz aumenta a produção de manose no início da embebição, enquanto que a giberelina aumenta a manose no final da embebição. Sendo que no início da embebição, a manose é metabolizada, causando apenas atraso na germinação, enquanto que na presença de giberelina não há tempo ou condições para ocorrer a metabolização.

Pelos dados das (Figuras 14 e 15) observa-se que a redução da sacarose ocorreu no início da germinação nas sementes embebidas no escuro com e sem giberelina. Em relação ao escuro, pôde ser observado que a degradação da sacarose foi mais rápida do que no claro. A sacarose é considerada o açúcar de transporte, que levará os produtos da mobilização de reserva até o embrião em crescimento (Buckeridge et al., 2000). Os resultados dos teores de açúcares das sementes embebidas no escuro com e sem giberelina (Figuras 14 e 15) estão de acordo com os resultados observados no capítulo II, onde foram observados valores maiores no índice e menores no T50, sendo este tratamento ideal para germinar sementes de café.

Os teores de sacarose encontrados neste trabalho, na semente seca foi de 6,5%, semelhante ao resultado encontrado por Lima (2005), em torno de 6,7%. Segundo Buckeridge et al. (1995) e Buckeridge & Dietrich (1996), embora o produto da hidrólise dos carboidratos de parede celular em sementes seja, principalmente, a manose, a constante transformação deste açúcar em sacarose mantém elevado o nível desse último durante o processo de germinação.





Legenda:

$$y = -0,0036x^3 + 0,1119x^2 - 1,0338x + 6,1419 \quad R^2 = 0,63$$

$$y = 0,0007x^4 - 0,0201x^3 + 0,1627x^2 - 0,3018x + 0,0113 \quad R^2 = 0,75$$

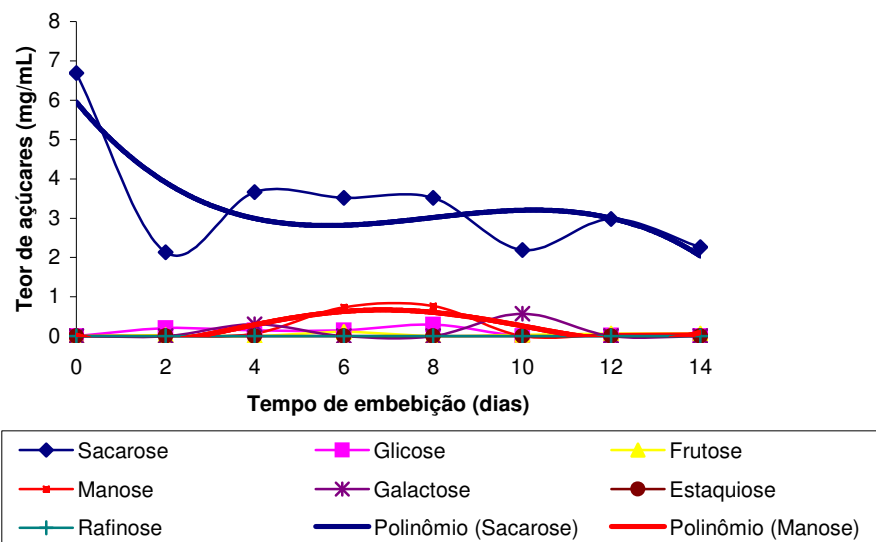
FIGURA 14 - Teor de açúcares (mg/mL) em sementes de cafeeiro, submetidas a diferentes períodos de embebição (dias), na ausência de luz e giberelina. UFLA, Lavras, MG, 2006.

De maneira geral, a sacarose foi o açúcar encontrado em maior quantidade nas sementes de cafeeiro, independente do regime de luz ou da ausência ou presença de giberelina. Esses resultados estão de acordo com os encontrados em sementes de café por Guimarães et al. (2002) em embriões e por Lima (2005) nas sementes inteiras. Segundo este autor, a parcela de contribuição dos açúcares a uma certa tolerância à dessecação, observada nas sementes de café pode ser basicamente atribuída à presença de sacarose. Koster & Leopold (1988) observaram que a sacarose pode servir como agente principal da

tolerância à dessecação em sementes, com os oligossacarídeos, servindo para prevenir a cristalização da sacarose. Em algumas pesquisas têm sido relatado que a sacarose está relacionada à tolerância à dessecação. Assim, esse resultado confirma que durante a germinação há queda na tolerância à dessecação das sementes. Desta maneira, a alta quantidade de sacarose e de oligossacarídeos e pela ausência ou, pelo menos, muito baixa quantidade de monossacarídeos redutores, como: a manose, glicose, galactose e frutose têm sido relacionadas à tolerância à dessecação. A sacarose é um açúcar não redutor, portanto, menos reativo e considerado componente protetor contra radicais livres (Kranter & Grill, 1996).

Em relação a manose (Figuras 14 e 15), no terceiro dia de germinação das sementes embebidas no escuro com e sem giberelina, observou-se um aumento gradativo até o sexto dia seguida de decréscimo. Esta redução da manose ao longo da germinação confirma os resultados observados no capítulo II, quando as sementes foram embebidas no escuro sem giberelina, onde a velocidade da protrusão radicular foi maior em comparação das embebidas no claro com giberelina. Estes resultados corroboram com os encontrados por Takaki & Dietrich (1980), que observaram redução no teor de manose, durante o processo de germinação das sementes de café tratadas com giberelina e germinadas na luz. Dessa forma há evidência que o aumento da manose pode ser responsável pela inibição da germinação. O resultado dessa pesquisa está de acordo com Silva et al. (2005), onde observaram que a giberelina produzida na presença da luz aumentou a atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase, produzindo manose em excesso, a qual inibe a reação de hidrólise, conseqüentemente, reduziu a velocidade de germinação.

De maneira geral, os teores de açúcares glicose, frutose, galactose, estaquiase e rafinose observados nesta pesquisa não foram significativos.



Legenda:

$$y = -0,0079x^3 + 0,1878x^2 - 1,365x + 5,9567 \quad R^2 = 0,61$$

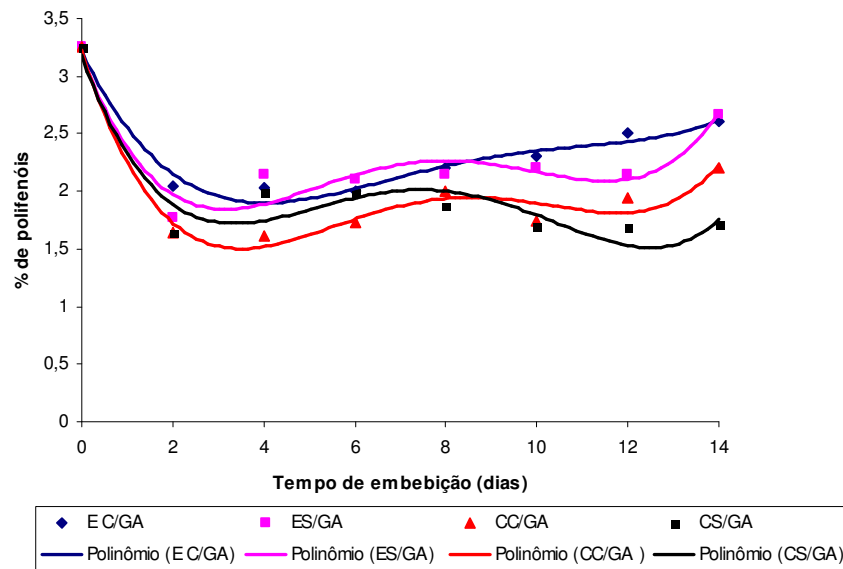
$$y = 1E-05x^5 + 0,0012x^4 - 0,0269x^3 + 0,2007x^2 - 0,3807x + 0,026 \quad R^2 = 0,75$$

FIGURA 15 - Teor de açúcares (mg/mL) em sementes de cafeeiro, submetidas a diferentes períodos de embebição (dias), na ausência de luz e água. UFLA, Lavras, MG, 2006.

## 5.5 Polifenóis

De maneira geral os teores de polifenóis observados na Figura 16, aumentou independente do regime de luz ou da ausência ou presença de giberelina durante o processo de germinação das sementes de café. Este resultado corrobora os resultados encontrados por Guimarães et al. (2002) que

observaram aumento do ácido clorogênico, à medida que se aumentava o período de embebição das sementes de cafeeiro. Já para as sementes embebidas no claro e água pode ser observado que houve acréscimo no teor de polifenóis até o



Legenda:

$$y = 0,0009x^4 - 0,0278x^3 + 0,2857x^2 - 1,1148x + 3,1807 \quad R^2 = 0,91$$

$$y = 0,0009x^4 - 0,0281x^3 + 0,2856x^2 - 1,0792x + 3,1979 \quad R^2 = 0,91$$

$$y = 0,0009x^4 - 0,0284x^3 + 0,3069x^2 - 1,2568x + 3,2251 \quad R^2 = 0,97$$

$$y = 0,0009x^4 - 0,0278x^3 + 0,2857x^2 - 1,1148x + 3,1807 \quad R^2 = 0,91$$

FIGURA 16 - Resultados da (%) de polifenóis em sementes de cafeeiro submetidas a diferentes períodos de embebição e ambientes, embebidas com e sem giberelina. UFLA, Lavras, MG, 2006.

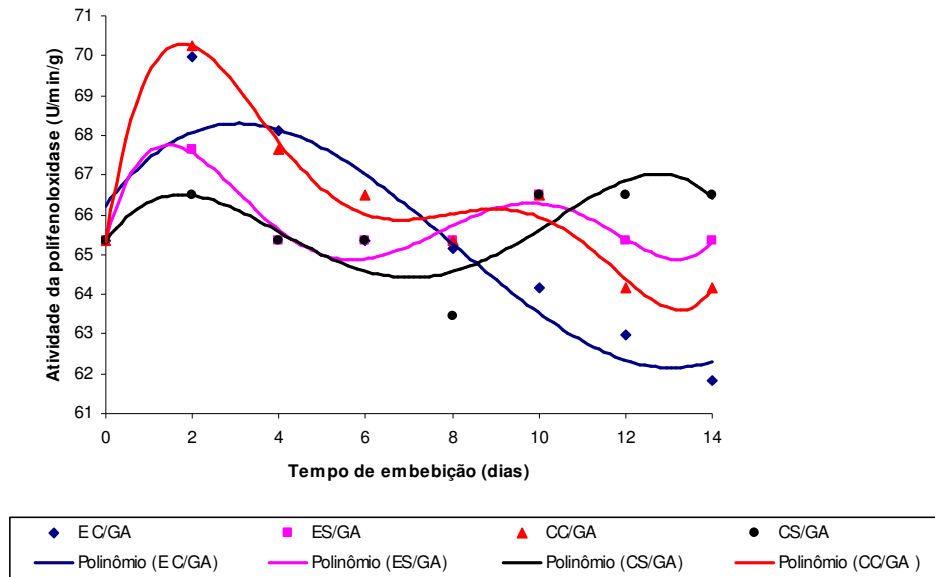
oitavo dia de embebição seguida de redução. De uma maneira geral, os polifenóis, incluindo os ácidos clorogênicos, são os principais ácidos

encontrados no café, os quais são considerados produtos secundários em plantas, tendo como função principal, controlar os níveis de ácido indol acético.

Em relação às sementes secas, foi observado um teor de polifenol, superior ao observado em sementes submetidas ao processo de embebição. Nesta pesquisa, de maneira geral, foi observado que as sementes embebidas no regime de luz e giberelina podem causar um estresse no processo de germinação. Assim, poderá comprometer a estrutura celular, alterando as membranas, pois haverá oxidação dos compostos fenólicos.

## **5.6 Atividade da polifenoloxidase**

Pelos resultados da atividade da enzima polifenoloxidase durante a germinação, pôde ser observado (Figura 17) que nas sementes germinadas no escuro ou no claro, com e sem giberelina, houve tendência de redução da atividade desta enzima, à medida que o período de embebição foi aumentado. Pode-se inferir que a redução da atividade da polifenoloxidase está diretamente relacionada ao nível de reestruturação das membranas celulares das sementes. Durante a dessecação das sementes, principalmente de cafeeiro, que são intermediárias, pode ocorrer danos havendo a liberação da polifenoloxidase, com conseqüente oxidação dos compostos fenólicos. Estas são liberadas e ativadas, podendo reagir com os substratos polifenóis, oxidando-o a quinonas. Estas, quando são formadas, inibem a atividade da enzima polifenoloxidase. Nesse sentido, tem sido observado menor atividade desta enzima, em grãos de café com qualidade inferior (Amorim, 1978). Já nas sementes embebidas no claro com água houve uma redução da atividade desta enzima até o oitavo dia de embebição, seguida de aumento até completar a germinação.



Legenda:

$$y = 0,0122x^3 - 0,2962x^2 + 1,4674x + 66,226 \quad R^2 = 0,82$$

$$y = 0,0007x^5 - 0,0277x^4 + 0,3704x^3 - 2,0525x^2 + 3,9372x + 65,346 \quad R^2 = 0,90$$

$$y = 0,0009x^5 - 0,0366x^4 + 0,5106x^3 - 3,0712x^2 + 6,8399x + 65,325 \quad R^2 = 0,96$$

$$y = -2E-06x^5 - 0,0024x^4 + 0,0711x^3 - 0,6172x^2 + 1,5499x + 65,321 \quad R^2 = 0,65$$

FIGURA 17 - Resultados da atividade da polifenoloxidase ( $U \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) em sementes de cafeeiro, submetidas a diferentes períodos de embebição e ambientes, embebidas com e sem giberelina. UFLA, Lavras, MG, 2006.

## 6 CONCLUSÕES

Os padrões isoenzimáticos e de proteínas são indicadores de transformações que ocorrem durante a germinação de sementes de cafeeiro.

Os carboidratos manose e sacarose atuam durante a germinação das sementes de cafeeiro.

A enzima endo- $\beta$ -mananase aumenta nas sementes embebidas na presença de luz e giberelina.

Os polifenóis aumentam durante a germinação das sementes.

A atividade da polifenoloxidase reduz durante a germinação das sementes de cafeeiro.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, K. S. **Aspectos fisiológicos da germinação de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.)**. 2006. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ALFENAS, A. C.; BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: AMORIM, H. V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos de grão de verde relacionados com a determinação da qualidade**. 1998. 85 p.

AMORIM, H. V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionado com a determinação da qualidade**. 1978. 85 p. Tese (“Livre Docente” em Bioquímica) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Washington, 1990. 2 v.

BEWLEY, J. D. Physiological aspects of desiccation tolerance. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 30, p. 185-238, 1979.

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

BLACK, M.; CORBINEAU, F.; GEE, H.; CÔME, D. Water content, raffinose and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, n. 2, p. 463-471, June 1999.

BLACKMAN, S. A.; WETTLAUFER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, n. 1, p.225-230, Sept. 1992.

BLACKMAN, S. A.; WETTLAUFER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins associated with desiccation on tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 3, p. 868-874, July 1991.

BRANDÃO JUNIOR, D. da S.; CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. G. C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de



sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 114-121, 1999.

BRANDÃO JUNIOR, D. da S.; VIEIRA, M. G. G. C.; HILHOST, H. W. Aquisição da tolerância à dessecação nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de café (*Coffea arabica* L.). **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 673- 681, jul./ago. 2002.

BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). **Plant Science**, Clare, v. 117, n. 1/2, p. 33-43, May 1996.

BUCKERIDGE, M. S.; PANEGASSI, V. R.; DIETRICH, S. M. C. Storage carbohydrate mobilization in seeds of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) following germination. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 171-175, 1995.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, n. 1/2, p. 141-156, Jan. 2000.

DOWNIE, B.; HILHORST, H. W. M.; BEWLEY, J. D. A new assay for quantifying endo- $\beta$ -mananase activity using Congo red dye. **Phytochemistry**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 829-835, July 1994.

DRAETA, I. S.; LIMA, D. C. Isolamentos e caracterização das polifenoloxidasas do café. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 7, p. 3-28, jun. 1976.

GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 371-382, Dec. 1963.

FARIA, R. V. A. M.; VON PINHO, R. G.; VON PINHO, E. V. de R.; GUIMARÃES, R. M. **Marcadores moleculares da qualidade fisiológica de sementes**. Lavras: UFLA-FAEPE, 2003. 51 p.

FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Archives Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 147, n. 1, p. 1-11, May 1986.

GUIMARÃES, R. M. **Fisiologia de sementes**. Lavras: UFLA-FAEPE, 1999. 132 p. (Curso de Especialização Pós-Graduação “Lato Senso” por tutoria à distância).

GUIMARÃES, R. M.; VIEIRA, M. G. G. C.; FRAGA, A. C.; VON PINHO, E. V. R.; FERRAZ, V. P. Tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*, L). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 128-139, jan./fev. 2002.

KRANNER, I.; GRILL, D. Significance of thiol-disulfide exchange in resting stages of plant development. **Botanica Acta**, Stuttgart, v. 109, n. 1, p. 8-14, Feb. 1996.

KOSTER, K. L.; LEOPOLD, A. C. Sugar and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, n. 3, p. 829-832, Nov. 1988.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccations tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 3, p. 231-246, Sept. 1993.

LIMA, D. M. **Armazenabilidade de sementes de *Coffea arabica* e *Coffea canéfora* Pierre, submetidas a diferentes métodos de desmucilagem e de secagem**. 2005. 106 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MARCOS, F. J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, v. 12).

TAKAKI, M.; DIETRICH, S. M. C. Effect of GA<sub>3</sub> and light on polysaccharide levels and metabolism in germinating coffee seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 31, n. 125, p. 1643-1649, 1980.

TAKAKI, M.; DIETRICH, S. M. C. Effect of gibberellic acid on peroxidase from Coffee seeds during germination. **Hoehe**, São Paulo, v. 8, p. 29-33, dez. 1979.

SILVA, E. A. A. da; TOROOP, P. E.; NIJSSE, J.; BEWLEY, J. D.; HILHORST, H. W. M. C. Exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination and cause cell death in the embryo. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 413, p. 1029-1038, Mar. 2005.

SILVA, E. A. A. da.; TOROOP, P. E.; VAN ELST, A. C.; HILHORST, H. W. M. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* L., cv. Rubi) seed germination. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 2, p. 251-261, Dec. 2004.

WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. **Seed Science Research**, Wellingford, v. 8, n. 2, p. 223-244, June 1998.

WINSTON, G. W. Physiochemical basics for free radical formation in cells: production and defenses. In: ALSCHER, R. G.; CUMMING, J. R. (Ed.). **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York: Wiley-Liss, 1990. p. 57-86.

## ANEXOS

	Página	
ANEXO A		
TABELA 1 A	Resumo da análise de variância para índice de velocidade de germinação (IVG) e germinação obtidos de semente de cafeeiro submetidas a diferentes ambientes, com e sem giberelina. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	106
TABELA 2A	Resumo da análise de variância para T50 obtidos de sementes de cafeeiro submetidas a diferentes ambientes, com e sem giberelina. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	106
TABELA 3A	Resumo da análise de variância para T50 e IVG obtidos de sementes de cafeeiro sem armazenamento, submetidas a diferentes concentrações de bloqueador e ambientes. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	107
TABELA 4A	Resumo da análise de variância para T50 e IVG obtidos de sementes de cafeeiro aos 4 meses de armazenamento, submetidas a diferentes concentrações de bloqueador e ambientes. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	107
TABELA 5A	Resumo da análise de variância para T50 e IVG obtidos de sementes de cafeeiro aos 8 meses de armazenamento, submetidas a diferentes concentrações de bloqueador e ambientes. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	108
TABELA 6A	Resumo da análise de variância para T50 e IVG obtidos de sementes de cafeeiro, submetidas a diferentes épocas de armazenamento, a concentrações de bloqueador e ambientes. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	108

TABELA 1 A - Resumo da análise de variância para índice de velocidade de germinação (IVG) e germinação obtidos de semente de cafeeiro submetidas a diferentes ambientes, com e sem giberelina. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QUADRADO MÉDIO	
		IVG	Germinação
Ambiente	1	0,206343*	25,000000*
Giberelina	1	4,493340*	1806,250000*
Ambiente*Giberelina	1	0,325185*	2,250000
Erro	12	0,053202	3,958333
CV (%)		5,73	6,85

\*Significativo 5%

TABELA 2A - Resumo da análise de variância para T50 obtidos de sementes de cafeeiro submetidas a diferentes ambientes, com e sem giberelina. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QUADRADO MÉDIO
		T 50
Ambiente	1	0,6236
Giberelina	1	0,345156
Ambiente*Giberelina	1	1,118306
Erro	12	0,410031
CV (%)		5,79

\*Significativo 5%

TABELA 3A - Resumo da análise de variância para T50 e IVG obtidos de sementes de cafeeiro sem armazenamento, submetidas a diferentes concentrações de bloqueador e ambientes. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QUADRADO MÉDIO	
		T 50	IVG
Ambiente	1	20,3043*	1,0566*
Concentração	3	5,5828*	0,2779*
Ambiente*Concentração	3	0,1358	0,0600
Erro	24	0,4766	0,04453
CV (%)		7,62	8,40

\*Significativo 5%

TABELA 4A - Resumo da análise de variância para T50 e IVG obtidos de sementes de cafeeiro aos 4 meses de armazenamento, submetidas a diferentes concentrações de bloqueador e ambientes. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QUADRADO MÉDIO	
		T 50	IVG
Ambiente	1	47,9710*	1,6722*
Concentração	3	1,5777*	0,1089
Ambiente*Concentração	3	0,8212*	0,0285
Erro	24	0,8212	0,0529
CV (%)		3,51	10,22

\*Significativo 5%

TABELA 5A - Resumo da análise de variância para T50 e IVG obtidos de sementes de cafeeiro aos 8 meses de armazenamento, submetidas a diferentes concentrações de bloqueador e ambientes. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QUADRADO MÉDIO	
		T 50	IVG
Ambiente	1	4,2705*	0,1458*
Concentração	3	3,2372*	0,2566*
Ambiente*Concentração	3	0,0621	0,0334
Erro	24	0,1460	0,0256
CV (%)		4,43	6,13

\*Significativo 5%

TABELA 6A - Resumo da análise de variância para T50 e IVG obtidos de sementes de cafeeiro, submetidas a diferentes épocas de armazenamento, a concentrações de bloqueador e ambientes. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QUADRADO MÉDIO	
		T 50	IVG
Ambiente (A)	1	4,2705*	2,4432*
Concentração (C)	3	3,2372*	0,5398*
Época (E)	2	0,0621*	1,1063*
A x C	3	0,1659	0,0196
A x E	2	5,4860*	0,2249*
C x E	6	0,6472*	0,0552
A x C x E	6	0,4533	0,0524
Erro	72	0,2770	0,0415
CV (%)		5,66	8,29

\* Significativo 5%