



TATIANA BOTELHO FANTAZZINI

**TESTE DE TETRAZÓLIO EM CAFÉ: FISIOLOGIA E
BIOQUÍMICA DE ENZIMAS NA ESTIMAÇÃO DA
GERMINAÇÃO DAS SEMENTES**

**LAVRAS - MG
2018**

TATIANA BOTELHO FANTAZZINI

**TESTE DE TETRAZÓLIO EM CAFÉ: FISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DE ENZIMAS
NA ESTIMAÇÃO DA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

Dra. Aline da Consolação Sampaio Clemente
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Fantazzini, Tatiana Botelho.

Teste de Tetrazólio em Café : Fisiologia e Bioquímica de
Enzimas na Estimulação da Germinação das Sementes / Tatiana
Botelho Fantazzini. - 2018.

117 p. : il.

Orientador(a): Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa.

Coorientador(a): Aline da Consolação Sampaio Clemente.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Viabilidade. 2. Coffea arabica L. 3. Isoenzimas. I. da Rosa,
Sttela Dellyzete Veiga Franco. II. Clemente, Aline da Consolação
Sampaio. III. Título.

TATIANA BOTELHO FANTAZZINI

**TESTE DE TETRAZÓLIO EM CAFÉ: FISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DE ENZIMAS
NA ESTIMAÇÃO DA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES**

**TETRAZOLIUM TEST IN COFFEE: PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF
ENZYMES IN THE ASSESSMENT OF SEED GERMINATION**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2018.

| | |
|--|---------|
| Dr. Renato Mendes Guimarães | UFLA |
| Dr. João Almir de Oliveira | UFLA |
| Dra. Lílian Padilha | EMBRAPA |
| Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho | UFLA |

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

Dra. Aline da Consolação Sampaio Clemente
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2018**

*A Deus, por sempre me abençoar e iluminar o meu caminho.
Aos meus amados pais, Mateus e Marisa, pelo exemplo de dedicação, amor, humildade e carinho, sempre estarem ao meu lado, mostrando o caminho certo a seguir. Ao meu querido irmão Tarley, pelo amor incondicional e pelo imenso incentivo, que me dão forças pra seguir sempre em frente. Ao vô Tarley, à vó Yonne (in memoriam), ao vô Mário, à vó Terezinha (in memoriam), meus maiores exemplos de vida. Aos meus demais familiares e amigos por torcerem pela minha vitória.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade e apoio durante a realização deste trabalho.

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

À minha orientadora pesquisadora Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa pelo carinho, paciência, dedicação, ensinamento, amizade e brilhante orientação, que proporcionou imensas contribuições para minha formação profissional.

À minha coorientadora, Dra. Aline da Consolação Sampaio Clemente e aos professores Dr. Renato Mendes Guimarães e Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho pelo apoio na condução dos trabalhos.

Aos orientados da pesquisadora Sttela pela amizade, colaboração, respeito e ótima convivência. Cada um de vocês contribuiu de alguma forma para que este trabalho fosse finalizado e fico muito feliz por isso. Em especial, agradeço à Aline e à Cristiane pela amizade e grande ajuda.

Aos professores e pesquisadores do Setor de Sementes, pelos conhecimentos transmitidos, que foram de grande valia para a realização deste trabalho.

Ao pesquisador Antônio Rodrigues Vieira (in memoriam), pelos conselhos e amizade.

Aos colegas do Setor de Sementes pela amizade e ensinamentos durante o curso.

Ao apoio financeiro da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Fundação Procafé (Programa Integrado de Apoio à Tecnologia Cafeeira) pelo fornecimento das sementes de café.

Aos funcionários do Departamento de Agricultura e do Setor de sementes, pela ajuda na execução das atividades.

À Marli, secretária da pós-graduação do Departamento de Agricultura, pela atenção e colaboração de sempre.

Aos meus pais, Mateus e Marisa, ao meu irmão Tarley, ao meu avô Tarley (in memoriam), minha vó Yonne (in memoriam), ao meu vô Mario e minha vô Terezinha (in memoriam) pelo amor, carinho, compreensão e incentivo. Amo muito vocês.

Às minhas grandes amigas, Bárbara, Cristiane e Stefânia que Deus colocou no meu caminho e que fizeram a diferença nessa etapa da minha vida. Sou muito grata pela imensa ajuda e por todos os momentos felizes que passamos juntas. Apesar de estar finalizando essa fase, quero ter sempre a amizade de vocês em minha vida.

Às amigas Roseane, Ariadne, Noêmia, Janaína, Raquel, Isabela e Ana Paula pela imensa amizade, carinho, incentivo e por torcerem por mim.

Ao Diego pela disponibilidade, paciência e ajuda com os trabalhos.

E, em especial, a Deus, por me permitir conquistar um título tão batalhado e sonhado.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Devido às discrepâncias entre os resultados do teste de germinação e do teste de tetrazólio na avaliação da qualidade de sementes de café, quatro estudos foram realizados objetivando-se investigar estas discrepâncias. Foram avaliadas as mudanças metabólicas que ocorrem em sementes de café com diferentes níveis de qualidade em relação aos testes de germinação e de tetrazólio. Primeiramente, foi realizado um estudo estatístico de dados históricos de resultados do teste de germinação e do teste de tetrazólio em amostras de sementes de café, analisando-se a correlação existente entre estes resultados, por meio de modelos de Regressão Generalizados Aditivos de Localização, Escala e Forma (GAMLSS). De acordo com os resultados da análise GAMLSS, a estimativa da germinação pelo teste de tetrazólio é variável em função das classes de percentuais de germinação. Há maiores correlações de GAMLSS entre as porcentagens de plântulas normais e de viabilidade no teste de tetrazólio, para valores de germinação acima de 70% e baixas correlações abaixo deste valor, evidenciando que a avaliação de sementes de café, baseada apenas no teste de tetrazólio, pode não corresponder ao real desempenho fisiológico. No segundo estudo foi avaliada a aplicabilidade do teste de tetrazólio para estimar a viabilidade de sementes de café com diferentes tipos e níveis de estresses. Constatou-se que o teste de tetrazólio pode superestimar o potencial de sementes de café para produzir plântulas normais, principalmente em lotes de sementes com baixo nível de qualidade. No terceiro estudo, as alterações fisiológicas, respiratórias e de enzimas desidrogenases foram avaliadas em endospermas e embriões de sementes de café submetidas a diferentes tipos de estresses. O teste de tetrazólio superestima a germinação das sementes de baixa qualidade, principalmente quando estas são submetidas aos estresses de secagem em alta temperatura, exposição à temperatura subzero e armazenamento em ambiente não controlado. As enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase, álcool desidrogenase e glutamato desidrogenase apresentam maior atividade em embriões do que em endospermas de sementes de café. Ocorrem variações na atividade das isoformas das enzimas xantina desidrogenase e diaforase nos embriões e endospermas das sementes de café. No quarto e último estudo, foram avaliadas as alterações fisiológicas e do sistema enzimático antioxidante em endospermas e em embriões de café, após estes serem submetidos a diferentes condições de estresse. As discrepâncias entre os resultados do teste de germinação e os resultados do teste de tetrazólio com superestimação da germinação foi confirmada neste estudo. As enzimas catalase e isocitrato liase apresentam maior atividade em endospermas do que em embriões, sendo esta atividade associada à maior deterioração. A enzima peroxidase não apresenta atividade em embriões de sementes de café.

Palavras-chave: Viabilidade. *Coffea arabica* L. Isoenzimas. Qualidade.

ABSTRACT

Due to the discrepancies between the results of the germination test and the tetrazolium test in the evaluation of the quality of coffee seeds, four studies were carried out aiming to investigate these discrepancies. The metabolic changes that occurred in coffee seeds with different levels of quality were evaluated in relation to the germination and tetrazolium tests. First, a statistical study of the historical results of the germination test and the tetrazolium test in coffee seed samples was carried out, analyzing the correlation between these results, using Generalized Regression Models, scale and form (GAMLSS). According to the results of the GAMLSS analysis, the germination estimation by the tetrazolium test is variable according to the percentage of germination classes. There are higher GAMLSS correlations between normal seedlings and viability percentages in the tetrazolium test, for germination values above 70% and low correlations below this value, showing that the evaluation of coffee seeds based only on the tetrazolium test may not correlate with the physiological performance. The second study evaluated the applicability of the tetrazolium test to estimate the viability of coffee seeds with different types and levels of stress. It was found that the tetrazolium test can overestimate the potential of coffee seeds to produce normal seedlings, especially in low-quality seed lots. In the third study, the physiological, respiratory and dehydrogenase enzymes alterations were evaluated in endosperms and embryos of coffee seeds, submitted to different types of stress. The tetrazolium test overestimates the germination of low quality seeds, especially when the seeds are subjected to drying stress at high temperature, exposure to sub-zero temperature and storage in an uncontrolled environment. The enzymes glucose-6-phosphate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase and glutamate dehydrogenase have higher activity in embryos than in coffee seed endosperms. Changes occur in the activity of the isoforms of the xanthine dehydrogenase and diaphorase enzymes in the embryos and endosperms of the coffee seeds. In the fourth and last study, the physiological and antioxidant enzymatic system alterations were evaluated in endosperms and coffee embryos, after being subjected to different stress conditions. The discrepancies between the results of the germination test and the results of the tetrazolium test with overestimation of germination were confirmed in this study. The enzymes catalase and isocitrate lyase present greater activity in endosperms than in embryos, being this activity associated to the greater deterioration. The enzyme peroxidase has no activity in coffee seed embryos.

Keywords: Viability. *Coffea arabica* L. Isoenzymes. Quality.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|-----------|
| | CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL..... | 11 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 12 |
| 2.1 | Importância da cafeicultura..... | 12 |
| 2.2 | Caracterização e qualidade de sementes de Coffea arabica L..... | 12 |
| 2.3 | Testes fisiológicos e atividade respiratória na avaliação da qualidade de semente de café..... | 14 |
| 2.3.1 | Teste de Germinação..... | 14 |
| 2.3.2 | Teste de Tetrazólio..... | 15 |
| 2.3.3 | Atividade Respiratória..... | 17 |
| 2.4 | Deterioração de sementes e atividade enzimática..... | 18 |
| | CAPÍTULO 2 CORRELAÇÃO POR GAMLSS ENTRE DADOS HISTÓRICOS DO TESTE DE GERMINAÇÃO E DO TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE CAFÉ..... | 28 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 31 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 33 |
| 2.1 | Descrição do modelo GAMLSS – Generalized Aditive Model for Location Scale and Shape aplicado na avaliação da viabilidade das sementes de café pelos testes de germinação e de tetrazólio..... | 34 |
| 2.2 | Modelo GAMLSS para a distribuição beta inflacionada de 0 e 1..... | 34 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 36 |
| 4 | CONCLUSÕES..... | 40 |
| | REFERÊNCIAS..... | 41 |
| | ANEXO A – Resíduos do modelo GAMLSS Beta Inflacionado..... | 43 |
| | CAPÍTULO 3 APLICABILIDADE DO TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE CAFÉ COM DIFERENTES TIPOS E NÍVEIS DE ESTRESSES..... | 47 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 50 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 51 |
| 2.1 | Material vegetal..... | 51 |
| 2.2 | Obtenção de sementes com diferentes níveis de qualidade..... | 52 |
| 2.2.1 | Estresse por diferentes tipos de processamento..... | 52 |
| 2.2.2 | Estresse por envelhecimento artificial..... | 52 |
| 2.2.3 | Estresse por secagem em alta temperatura..... | 53 |
| 2.2.4 | Estresse por exposição à temperatura subzero..... | 53 |
| 2.2.5 | Estresse por armazenamento em condição não controlada..... | 53 |
| 2.3 | Determinação do teor de água das sementes..... | 54 |
| 2.4 | Avaliações fisiológicas..... | 54 |
| 2.5 | Delineamento experimental..... | 55 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 55 |
| 3.1 | Avaliação do perfil das sementes recém-colhidas..... | 55 |
| 4 | CONCLUSÕES..... | 64 |
| | REFERÊNCIAS..... | 65 |
| | APÊNDICE A – Tabela da análise de variância do artigo 2..... | 67 |

**CAPÍTULO 4 ATIVIDADE DIFERENCIAL DE ENZIMAS
DESIDROGENASES EM ENDOSPERMAS E EMBRIÕES ISOLADOS DE
CAFÉ: PORQUE O TESTE DE TETRAZÓLIO PODE SUPERESTIMAR A
GERMINAÇÃO..... 68**

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 71 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 73 |
| 2.1 | Colheita dos frutos e obtenção das sementes..... | 73 |
| 2.2 | Obtenção de sementes com diferentes níveis de qualidade..... | 73 |
| 2.2.1 | Estresse por diferentes tipos de processamento..... | 73 |
| 2.2.2 | Estresse por envelhecimento artificial..... | 74 |
| 2.2.3 | Estresse por secagem em alta temperatura..... | 74 |
| 2.2.4 | Estresse por exposição à temperatura subzero..... | 74 |
| 2.2.5 | Estresse por armazenamento em condição não controlada..... | 75 |
| 2.3 | Determinação do teor de água das sementes..... | 75 |
| 2.4 | Análises fisiológicas..... | 75 |
| 2.5 | Análises bioquímicas..... | 76 |
| 2.6 | Delineamento experimental..... | 77 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 77 |
| 3.1 | Avaliações fisiológicas..... | 77 |
| 3.2 | Avaliações bioquímicas..... | 80 |
| 4 | CONCLUSÕES..... | 88 |
| | REFERÊNCIAS..... | 89 |

**CAPÍTULO 5 RELEVÂNCIA DO SISTEMA ENZIMÁTICO
ANTIOXIDANTE EM ENDOSPERMAS E EMBRIÕES DE CAFÉ NA
ESTIMAÇÃO DA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES..... 92**

| | | |
|--------------|---|------------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 95 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 97 |
| 2.1 | Colheita dos frutos e obtenção das sementes..... | 97 |
| 2.2 | Obtenção de sementes com diferentes níveis de qualidade..... | 97 |
| 2.2.1 | Estresse por diferentes tipos de processamento..... | 97 |
| 2.2.2 | Estresse por envelhecimento artificial..... | 98 |
| 2.2.3 | Estresse por secagem em alta temperatura..... | 98 |
| 2.2.4 | Estresse por exposição à temperatura subzero..... | 98 |
| 2.2.5 | Estresse por armazenamento em condição não controlada..... | 99 |
| 2.3 | Determinação do teor de água das sementes..... | 99 |
| 2.4 | Análises fisiológicas..... | 99 |
| 2.5 | Análises bioquímicas..... | 100 |
| 2.6 | Delineamento experimental..... | 101 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 101 |
| 4 | CONCLUSÕES..... | 111 |
| | REFERÊNCIAS..... | 113 |

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Entre os produtos agrícolas, o café é destaque no quadro de exportações do Brasil. O país apresenta liderança absoluta na produção mundial, sendo estimadas 54,4 milhões de sacas beneficiadas para a safra de 2018 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2018). O estado de Minas Gerais é responsável por 56,3% da produção nacional, ou seja, 30,6 milhões de sacas, com destaque para a espécie *Coffea arabica* L.

Para a implantação e renovação de lavouras de café, são utilizadas mudas provenientes de sementes, as quais agregam tecnologias desenvolvidas em programas de melhoramento. No entanto, sementes de café apresentam algumas limitações com relação à tolerância a dessecação e baixa longevidade.

Estas limitações dificultam os processos de pós-colheita e a conservação das sementes por períodos prolongados. Estas características, aliadas à germinação lenta e desuniforme intrínseca das sementes, dificulta a avaliação da qualidade fisiológica dos lotes em tempo hábil para a formação das mudas.

Assim, o teste de tetrazólio, caracterizado pela sua rapidez, é recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a determinação da viabilidade de sementes café, e os resultados são utilizados como subsídios para a comercialização de lotes. Apesar das vantagens, em pesquisas recentes, tem-se confirmado que o teste de tetrazólio pode superestimar a qualidade dos lotes, principalmente em sementes com baixo nível de qualidade.

Sabendo-se que o teste de tetrazólio pode superestimar a análise da viabilidade em sementes, a proposta nesta pesquisa foi avaliar as mudanças que ocorrem em sementes de café com diferentes níveis de qualidade em relação aos testes de germinação e de tetrazólio.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da cafeicultura

O café é uma planta dicotiledônea pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*. Dentre as várias espécies conhecidas, as mais comercializadas são a *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre. Pelo fato de possuir propriedades organolépticas mais pronunciadas e refinadas (EL-ABASSY; DONFACK; MATERNY, 2011), a espécie *Coffea arabica* L. possui mais demanda no mercado consumidor, sendo responsável por aproximadamente 81% da área existente com lavouras de café no País, uma vez que quase 69% desta área está concentrada no estado de Minas Gerais (CONAB, 2018).

Exportado por diversos países, o café é uma das *commodities* de maior importância agrícola mundial, proporcionando, aos países produtores, renda média anual de oito bilhões de dólares (CONAB, 2018). Além disso, é uma das culturas mais tradicionais da agricultura brasileira (FAGAN et al., 2011) e de indiscutível importância socioeconômica para o País, devido às divisas geradas com a exportação e a mão de obra empregada nas diferentes etapas do processo de produção (ARAUJO et al., 2008).

2.2 Caracterização e qualidade de sementes de *Coffea arabica* L.

O fruto do cafeeiro é uma drupa elipsoide que, geralmente, contém dois locos e duas sementes. As sementes são plano-convexas, elípticas ou ovais, sulcadas longitudinalmente na face plana, sendo constituída de embrião, endosperma e uma película prateada ou espermoderma. O endosperma é composto por células poliédricas de paredes muito espessas onde as hemiceluloses apresentam uma função de reserva (DEDECA, 1957; RENA; MAESTRI, 1986). Segundo Silva (2002), o endosperma é o principal tecido de reserva nas sementes de café, representando 95% da massa seca da semente, contendo cerca de 10 a 14% de proteínas e 0,5 a 2% de aminoácidos. Este se divide em endosperma *cap*, o qual envolve a radícula e o endosperma lateral, ou seja, o restante do endosperma, onde ficam armazenadas as substâncias de reservas da semente. A semente de café arábica apresenta teores entre 55 a 65,5% de carboidratos; 8 a 11% de ácidos, entre os quais se destaca: ácido cítrico, málico, clorogênico, acético, butírico e valérico; 1 a 3% de lignina; 15 a 18% de lipídeos; 11 a 15% de compostos nitrogenados; 8,5 a 12% de proteína; 0,8 a 1,4% de cafeína; 3 a 5,4% de minerais.

O embrião do cafeeiro é pequeno (3 a 4 mm) e se localiza na base da semente, na sua face convexa, apresentando um hipocótilo (eixo embrionário) e dois cotilédones (COSTA, 2003).

A avaliação da qualidade fisiológica de sementes de café é realizada principalmente pelos testes de germinação e de tetrazólio, sendo que no primeiro, é avaliada a germinação das sementes sob condições ideais, e no segundo, o potencial germinativo das sementes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

O teste de germinação e a emissão do boletim de análise são atividades obrigatórias para a comercialização das sementes de café aos produtores de mudas, segundo o Sistema Nacional de Sementes e Mudas (SNSM) (BRASIL, 2003). Porém, as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) estabelecem um período de 30 dias para a realização do teste de germinação, sendo esse período considerado longo, tendo em vista que as sementes de café apresentam germinação lenta, demandando, no mínimo, seis meses para a obtenção das mudas para o plantio (ROSA et al., 2010).

Diante desse contexto, a utilização do teste de tetrazólio, caracterizado pela sua rapidez, para a avaliação da viabilidade das sementes de café, é autorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). No entanto, podem ocorrer divergências entre os resultados do teste de germinação e o de tetrazólio, principalmente, em sementes com diferentes níveis de qualidade, pois, no teste de tetrazólio, somente o embrião é avaliado, não considerando a influência do endosperma nos resultados, como no teste de germinação. Além disso, o teste de tetrazólio é realizado em menor tempo, o que reduz a ação de possíveis fatores adversos que possam vir a interferir na avaliação dos embriões (CERVI; MENDONÇA, 2009).

No estudo do comportamento das sementes de *Coffea arabica* L. submetidas à secagem rápida em sílica em gel e à secagem lenta em soluções salinas, Coelho et al. (2015) verificaram que a porcentagem de plântulas normais próximas de zero, no teste de germinação de sementes secadas até 5% de umidade, contrasta com a elevada viabilidade dos embriões no teste de tetrazólio, indicando que os danos de secagem estão mais relacionados aos endospermas. Dussert e Engelmann (2006) e Figueiredo (2016) trabalhando com sementes de *Coffea arabica* L. criopreservadas, verificaram mais sensibilidade do endosperma ao resfriamento do que o embrião. Pereira (2017), estudando a formação de mudas de café a partir de sementes com baixos níveis de qualidade, constatou que é possível formar plântulas normais a partir do cultivo de embriões extraídos destas sementes, havendo fortes indícios de que os endospermas aparentam ser mais sensíveis do que os embriões à deterioração.

Pelo exposto, entende-se que as diferenças entre a porcentagem de plântulas normais pelo teste de germinação e de embriões viáveis pelo teste de tetrazólio podem levar a uma superestimação ou subestimação da real qualidade das sementes, principalmente em sementes com baixa qualidade. Por isso, torna-se importante o estudo da correlação entre os testes de germinação e o de tetrazólio.

2.3 Testes fisiológicos e atividade respiratória na avaliação da qualidade de semente de café

2.3.1 Teste de Germinação

A germinação de sementes é definida como a protrusão e o desenvolvimento da plântula a partir do embrião, sustentado pelas estruturas essenciais. Para o café, todas essas estruturas podem ser indicativos da capacidade da semente em produzir uma planta normal sob condições favoráveis (INTERNACIONAL RULES FOR SEED TESTING - ISTA, 2007).

Segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), objetiva-se com este teste determinar o potencial máximo de germinação de um lote de sementes, cuja utilização permite comparar a qualidade de diferentes lotes e também estimar o valor da semeadura em campo. Para a realização do teste de germinação faz-se necessária a padronização e o controle das condições de execução do teste, a fim de possibilitar a reprodução e a comparação dos seus resultados.

Para o gênero *Coffea*, as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) padronizam a execução do teste de germinação em rolo de papel ou entre areia, sob temperatura alternada de 20°C e 30°C ou temperatura constante de 30°C. A primeira avaliação é realizada no décimo quinto dia após a semeadura, e a avaliação final no trigésimo dia após a semeadura, computando-se as plântulas normais, as quais possuem potencial para continuar o seu desenvolvimento e dar origem a plantas normais, sob condições favoráveis. É importante ressaltar que, anterior à semeadura, é recomendada a retirada do pergaminho das sementes de café.

Embora o teste de germinação seja o método mais utilizado para avaliar a qualidade fisiológica de sementes, alguns autores atribuem a ele sérias limitações quando empregado exclusivamente (KRZYZANOWSKI; FRANÇA NETO; HENNING, 1991). No caso das sementes de café, o tempo gasto de 30 dias para a conclusão do teste é considerado longo,

podendo não refletir o verdadeiro estado fisiológico das sementes devido à rápida perda do vigor e da viabilidade.

Aspectos como germinação lenta, desuniforme e baixa velocidade no processo de retomada do crescimento do embrião de sementes de café têm sido investigados por meio de diversos estudos (MEIRELES, 2004; MEIRELES et al., 2007; REIS et al., 2010; RUBIM et al., 2010; ZONTA et al., 2010), e têm sido sugeridas como prováveis causas, a presença do endocarpo, a baixa absorção de água e O₂, a presença de inibidores naturais, ou ainda o balanço hormonal. No entanto, a lenta germinação das sementes de café permanece, ainda, não totalmente esclarecida.

2.3.2 Teste de Tetrazólio

Tendo em vista o interesse na avaliação de forma mais rápida da viabilidade de sementes de café, o teste de tetrazólio vem sendo legalmente utilizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2012). A vantagem do teste é a avaliação do potencial de germinação de forma rápida, além de ser de fácil execução e avaliação (SERA; MIGLIORANZA, 2003). Nesse sentido, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de se obter a melhor metodologia a ser adotada para a sua execução.

O teste de tetrazólio foi inicialmente desenvolvido por Lakon (1949) e posteriormente aperfeiçoado e divulgado por Moore (1972) com a finalidade de estimar a qualidade de sementes de cereais e, desde então, vem sendo utilizado em sementes de diferentes espécies (FRANÇA NETO et al., 1998; SAVONEN, 1999). É um teste bioquímico, que se baseia na atividade das enzimas desidrogenases, as quais catalisam as reações respiratórias no interior das mitocôndrias durante o ciclo de Krebs (FOGAÇA et al., 2011). Essas enzimas liberam íons de hidrogênio, os quais reagem com o sal 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio, reduzindo-o e formando um composto não difusível de cor vermelha, conhecido por trifenilformazan (DELOUCHE et al., 1976). Essa reação ocorre nos tecidos vivos dos embriões de café, indicando que as enzimas desidrogenases estão ativas e, conseqüentemente, que há atividade respiratória nas mitocôndrias.

Para a utilização do teste de tetrazólio na avaliação da viabilidade de sementes, é necessário o treinamento do analista, além de metodologia específica para cada espécie (MARCOS FILHO et al., 1987). A maior dificuldade na aplicação do teste de tetrazólio em sementes de café, consiste na metodologia a ser adotada para sua condução, uma vez que o

embrião que precisa entrar em contato direto com a solução encontra-se envolvido por tecidos do endosperma.

Segundo as Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009), é estabelecido que, para a execução do teste de tetrazólio, deve-se retirar o pergaminho, embeber as sementes em água por 18 horas a 25°C, em seguida fazer um corte longitudinal, iniciado pela concavidade, e remover o endosperma na região onde se encontra o embrião, deixando-o mais exposto ou cortar a semente na sua extremidade distal, em torno de $\frac{1}{4}$ do seu tamanho. Estas porções devem ser embebidas em solução de tetrazólio a 1% por 24 a 28 horas a 30°C. Após a coloração, o embrião deve ser separado do endosperma para posterior avaliação.

Dias e Silva (1986) recomendam um período de embebição das sementes em água de 18 a 24 horas a 30°C. No entanto, por meio de resultados de pesquisas tem sido demonstrado que este tempo é insuficiente para amolecer as sementes. Alguns autores defendem a utilização da embebição das sementes de café por maior tempo, facilitando a excisão dos embriões e a coloração dos mesmos (CLEMENTE et al., 2011; VIEIRA et al., 1998). Após a pré embebição, Dias e Silva (1986) e Vieira et al. (1998) sugerem o corte de parte do endosperma contendo o embrião e que essas porções (endosperma + embrião) sejam embebidas em solução de tetrazólio a 0,1% durante 14 a 16 horas a 30°C (DIAS; SILVA, 1986), ou extrair completamente os embriões (CLEMENTE et al., 2011; VIEIRA et al., 1998).

A avaliação da viabilidade das sementes é realizada com base na coloração, local e extensão do dano nos embriões, e deve ser feita com o auxílio de uma lupa. A coloração vermelho carmim claro indica tecido viável; o vermelho intenso com presença de manchas no eixo hipocótilo-radícula, devem ser efetuados cortes para verificar a profundidade do dano. Quando a mancha atinge apenas o córtex, os embriões são considerados viáveis; já quando atinge o tecido condutor, os embriões são classificados como inviáveis. Os danos próximos ao eixo embrionário ou aqueles que o atingem diretamente são mais prejudiciais do que aqueles localizados na metade superior dos cotilédones (VIEIRA et al., 1998).

Os embriões classificados como viáveis são aqueles que apresentam os cotilédones, eixo hipocótilo-radícula e a região de translocação colorida pelo sal de tetrazólio, que podem apresentar pequenos danos na região da radícula causados durante a sua extração ou ainda aqueles que possuem menos de 50% da área cotiledonar afetada. Já os embriões classificados como inviáveis, apresentam danos consideráveis na região de ligação entre os cotilédones e o eixo hipocótilo-radícula ou aqueles que apresentam mais de 50% de sua reserva

comprometida e danos no eixo hipocótilo-radícula mostrando-se totalmente descoloridos (VIEIRA et al., 1998).

2.3.3 Atividade Respiratória

A respiração é a oxidação completa de compostos de carbono a CO_2 e água, por meio de uma série de reações, usando oxigênio como aceptor final de elétrons. Sucintamente, é a oxidação de compostos orgânicos para a produção de energia e compostos secundários. A energia é liberada e conservada na forma de ATP, o qual pode ser prontamente utilizado para a manutenção e o desenvolvimento da semente (TAIZ; ZEIGER, 2013). Os substratos respiratórios podem ser carboidratos como amido, sacarose, frutose, glicose e outros açúcares; lipídeos; ácidos orgânicos e proteínas (MARENCO; LOPES, 2007).

Piña-Rodrigues, Figliolia e Peixoto (2004) relatam que a respiração é a primeira atividade metabólica observada em sementes logo após a reidratação, passando de uma taxa próxima de zero a valores elevados em relativamente pouco tempo, dependendo da espécie. A atividade e integridade das mitocôndrias de embriões viáveis aumentam a partir do início da embebição, tornando mais eficiente a produção de ATP, refletindo a elevação do consumo de oxigênio e conseqüentemente maior liberação de CO_2 (BEWLEY; BLACK, 1994).

Tanto a respiração quanto a atividade de enzimas, organelas e a síntese de proteínas são fundamentais para o desenvolvimento do processo de germinação e preparo para o crescimento subsequente do embrião. Importantes macromoléculas, como DNA e RNA, proteínas, lipídeos, clorofilas, carotenóides e fitormônios, são formadas por esqueletos carbonados desviados da via respiratória. Para a síntese desses novos materiais indispensáveis ao crescimento, são necessárias também substâncias de alto poder redutor (NADH , FADH_2) e elevado conteúdo energético (ATP). No entanto, nem todo carbono contido no substrato respiratório é liberado na forma de CO_2 , e nem todos os elétrons contidos nos nucleotídeos reduzidos (NADH , FADH_2) se combinarão com O_2 para produzir H_2O (MARENCO; LOPES, 2007).

A velocidade respiratória da semente é influenciada pelo seu grau de umidade, pela temperatura, pela permeabilidade das membranas, pela tensão de oxigênio e gás carbônico e pela luz. O aumento da atividade respiratória da semente pode ser avaliado pela quantidade de gás carbônico liberado, pela quantidade de oxigênio consumido ou pela relação entre CO_2 liberado e O_2 consumido, denominada quociente respiratório (QR) (POPINIGIS, 1977).

A medição da atividade respiratória de sementes em condições de laboratório é uma técnica utilizada na determinação do vigor pela alta relação com a qualidade de sementes. Porém, não é um procedimento comum, mas pode se tornar uma importante ferramenta de auxílio à tomada de decisões sobre a qualidade de um lote de sementes (MENDES et al., 2009).

2.4 Deterioração de sementes e atividade enzimática

Durante o processo de deterioração das sementes, pode ocorrer a desnaturação de biomoléculas e acúmulo de toxinas, intimamente ligados à queda da integridade das membranas celulares. Destaca-se que o início da deterioração das sementes está relacionado à atividade das enzimas associadas à biossíntese de novos tecidos. Sendo assim, o monitoramento das alterações bioquímicas advindas da deterioração é correlacionado às variações dos perfis de enzimas específicas do processo respiratório, peroxidação de lipídeos e remoção de radicais livres (TIMÓTEO, 2011).

Os sistemas enzimáticos removedores de radicais livres são utilizados como marcadores da deterioração e a sua correlação com o desempenho fisiológico permite um melhor entendimento da perda de qualidade das sementes.

Espécies reativas de oxigênio, ou radicais livres, são moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, são espécies químicas, altamente reativas e tóxicas. Elas são responsáveis pelos danos oxidativos em biomoléculas, como o ácido desoxirribonucleico (DNA), carboidratos, lipídeos e proteínas, e incluem o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH) e ânion superóxido (O_2^-) (GILL; TUTEJA, 2010; MITTLER, 2002; TATONE et al., 2010). Porém, a produção destes radicais pode estar associada ao desenvolvimento das plantas, indicando que o nível de controle e a capacidade celular antioxidante definem a atividade que estes radicais irão exercer (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011).

Os danos oxidativos induzidos por EROs podem resultar na peroxidação de lipídeos da membrana, seguida da desintegração desta, levando à morte celular (BARREIROS et al., 2006; HENDRY et al., 1993). A reparação dos danos de membrana depende da atuação de um sistema enzimático eficiente composto principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (PO), sendo que a redução na atividade destas enzimas aumenta a sensibilidade das sementes a estresses oxidativos (BHATT; TRIPATHI, 2011;

KAYIHAN et al., 2012). Estas enzimas atuam na remoção de radicais livres presentes nas células, neutralizando o oxigênio singlete e outros radicais livres, formados em condições de estresse (BERJAK, 2006; DUSSERT; ENGELMANN, 2006), como as que ocorrem durante os processos de pós-colheita.

A superóxido dismutase (SOD) exerce importante função como antioxidante, sendo a primeira enzima a atuar contra danos causados por EROs nas células, pois converte o radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (FOYER; NOCTOR, 2005; GILL et al., 2015). Esta enzima é uma metaloproteína que apresenta três formas distintas, classificadas pelos seus cofatores: Fe-SOD (cloroplasto), Mn-SOD (mitocôndria e peroxissomo) e Cu/Zn-SOD (cloroplasto e citosol) (GILL; TUJETA, 2010).

A CAT é uma enzima comumente encontrada nos organismos e está presente nos peroxissomas. São catalisadoras do peróxido de hidrogênio produzido em condições de estresse, convertendo-o em água (H_2O) e molécula de oxigênio livre (O_2), sem que ao final sejam produzidos radicais livres (DUBEY, 2011). Em plantas, esta enzima apresenta três isoformas, as quais podem dismutar diretamente o H_2O_2 ou oxidar substratos, tais como metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico (BREUSEGEM et al., 2001).

As peroxidases (PO) também desempenham um importante papel no mecanismo de limpeza de EROs, reduzindo os níveis de H_2O_2 e atua na biossíntese de lignina, na suberização e formação da parede celular, contribuindo para a integridade estrutural destas (LOCATO et al., 2010).

A isocitrato liase é uma enzima primordial no processo de germinação, pois quebra lipídeos armazenados e, sua atividade, pode aumentar durante a senescência do organismo (IGAMBERDIEV; LEA, 2002). Nakada et al. (2010) relataram que esta enzima é indicativa de deterioração das sementes.

Outra enzima que tem sido utilizada para detectar a deterioração em sementes é a glutamato oxaloacetato transaminase ou aspartato transaminase segundo Alfenas (2006). A GOT é uma das mais importantes transaminases, pois catalisa a transferência do grupo amino de um aminoácido (aspartato) para o α -cetoglutarato para formar o glutamato + oxaloacetato. A GOT reage em diferentes velocidades com praticamente todos os outros aminoácidos, em uma reação reversível. Essas reações ocorrem, sobretudo, no citoplasma e o glutamato, ao qual a membrana mitocondrial é permeável, entra na matriz, onde pode ser novamente transaminado ou ser desaminado pela glutamato desidrogenase. Portanto, essa é uma enzima

atuante no processo de degradação e síntese de proteínas (CONN; STUMPF, 1990), apresentando um importante papel na germinação de sementes.

A atividade das enzimas é também monitorada pela respiração das células, principalmente quando atuam no metabolismo de reserva. As enzimas álcool desidrogenase (ADH) e malato desidrogenase (MDH) têm sua atividade ligada ao processo de respiração.

A MDH é uma enzima que atua na respiração aeróbica nas mitocôndrias, catalisa a conversão de malato a oxaloacetato, tendo importante função na produção de NADH para o ciclo de Krebs (TUNES et al., 2011), que é um produto fundamental na produção de ATP e de compostos intermediários essenciais ao funcionamento das células (TAIZ; ZEIGER, 2013). A MDH, no citoplasma, tem o papel inverso ao que acontece nas mitocôndrias: catalisa a reação de oxaloacetato em malato e produz NAD^+ , necessário para a glicólise. Outra função que a MDH desempenha é na oxidação da malato em oxaloacetato, no ciclo do glioxilato, que se liga a acetil-CoA nos glioxissomos para produzir citrato. Já no citosol, oxida malato, transportado da mitocôndria, à oxaloacetato que será convertido a fosfoenolpiruvato e produzirá sacarose pela gliconeogênese (TAIZ; ZEIGER, 2103).

No metabolismo anaeróbico (fermentação alcoólica) o piruvato, primeiramente produzido na glicólise, é convertido a acetaldeído pela ação da enzima piruvato descarboxilase, sendo o acetaldeído reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase (ADH) (GADOTTI; MENEGHELLO; TILLMANN, 2013). Ou seja, a ADH atua no processo respiratório removendo essas substâncias tóxicas que são produzidas quando as células passam a respirar anaerobicamente (LIMA, 2008). Segundo Zhang et al. (1994) essa enzima fica mais susceptível à ação deletéria do acetaldeído quando sua atividade é diminuída.

Outras enzimas que têm sua atividade relacionada com o processo de respiração das sementes são a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutamato desidrogenase (GTDH), xantina desidrogenase (XDH) e a diaforase (DIA).

A glicose-6-fosfato desidrogenase atua na via das pentoses fosfato, convertendo glicose-6-fosfato (G6P) em 6-fosfogluconolactona e reduz NADP^+ a NADPH. O NADPH produzido é importante para fornecer uma proteção celular contra o estresse oxidativo por espécies reativas, pois detoxifica e regenera a forma reduzida da glutathiona (GSH) através da GR (SHAN-ZHI et al., 2005).

A glutamato desidrogenase (GTDH) é uma enzima que catalisa a desaminação oxidativa do glutamato, formando amônia e α -cetoglutarato. A amônia pode ser recuperada e reutilizada a aminoácidos. Embora a amônia e o α -cetoglutarato sejam catalisados pela mesma

enzima, o uso de coenzimas (NAD^+ e NADPH) diferentes pela glutamato desidrogenase, possibilita a regulação independente da desaminação do glutamato e da aminação do α -cetoglutarato (LEHNINGER, 1992). Esta enzima atua na oxidação de aminoácidos fornecendo energia para as células (ciclo do ácido cítrico) e/ou na redução do α -cetoglutarato para a síntese de aminoácidos, pode desempenhar importante papel na germinação de sementes.

A enzima XDH catalisa a oxidação da xantina na presença de NAD^+ para a formação de ácido úrico e NADH , concomitantemente à formação de O_2^- . Além disso, tem ação sobre uma variedade de purinas e aldeídos (CANTU-MEDELLIN; KELLEY, 2013).

A enzima Diaforase catalisa a redução de vários corantes que atuam como aceitadores de hidrogênio a partir da forma reduzida de nucleotídeos de difosfopiridina e trifosfopiridina, isto é, NADH , NADPH (STRAUB, 1939).

As reações metabólicas da respiração são divididas em três estágios, sendo estes a glicólise, o Ciclo do ácido carboxílico (ou Ciclo de Krebs) e a Cadeia de transporte de elétrons. No Ciclo do ácido tricarboxílico, que ocorre na membrana mitocondrial, o piruvato é oxidado em CO_2 e a capacidade de realizar redução é ativada. O ciclo corresponde à etapa final da oxidação de energia metabólica, além disso, origina unidades monoméricas para biossíntese de carboidratos, lipídeos e aminoácidos não essenciais. São oito reações sucessivas que o compõe, em que substratos orgânicos são oxidados para formar CO_2 , H_2O e coenzimas reduzidas NADH e FADH_2 (CAMPBELL, 2000).

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2006. 627 p.
- ARAÚJO, R. F. et al. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) despolpado e não despolpado. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 71-78, maio 2008.
- BARREIROS, A. L. B. S. et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, jan./fev. 2006.
- BERJAK, P.; SERSHEN, B. V.; PAMMENTER, N. W. Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 21, n. 3, p. 187-203, Sept. 2011.
- BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 16, n. 1, p. 1-15, Mar. 2006.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seed: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.
- BHATT, I.; TRIPATHI, B. N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, New York, v. 29, n. 6, p. 850-859, Dec. 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 35, de 29 de novembro de 2012**. Disponível em: <http://www.lex.com.br/legis_24015030_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_35_DE_29_DE_NOVEMBRO_DE_2012.aspx>. Acesso em: 28 ago. 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 36**. Aprova a tabela anexa, que fixa os valores dos serviços públicos de que trata a Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 29 dez. 2004, Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 399 p.
- BREUSEGEM, F. V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Limerick, v. 161, p. 405-414, Aug. 2001.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.
- CANTU-MEDELLIN, N.; KELLEY, E. E. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: insights regarding where, when and how. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 34, n. 1, p. 19-26, Nov. 2013.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2012. 588 p.

CERVI, F.; MENDONÇA, E. A. F. Adequação do teste de tetrazólio para sementes de algodoeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 1, p.177-186, jan. 2009.

CLEMENTE, A. C. S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, jul. 2011.

COELHO, S. V. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, jun. 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café, safra 2018: primeiro levantamento**. Brasília, 2018.

CONN, E. E.; STUMPF, P. K. **Introdução à bioquímica**. São Paulo: E. Blucher, 1990. p. 383-385.

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, 2003.

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.

DELOUCHE, J. C. et al. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1976. 103 p.

DIAS, M. C. L. L.; SILVA, W. R. Determinação da viabilidade de sementes de café através do teste de tetrazólio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 21, n. 11, p. 1139-1145, nov. 1986.

DUBEY, R. S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science, 2011. Chap. 9, p. 178-203.

DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. New determinants for tolerance of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. **CryoLetters**, Cambridge v. 27, n. 3, p. 169-178, May/June 2006.

EL-ABASSY, R. M.; DONFACK, P.; MATERNY, A. Discrimination between Arabica and Robusta green coffee using visible micro Raman spectroscopy and chemometric analysis. **Food Chemistry**, London, v. 126, n. 3, p. 1443-1448, June 2011.

FAGAN, E. B. et al. Efeito do tempo de formação do grão de café (*Coffea* sp) na qualidade da bebida. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 5, p. 729-738, set./out. 2011.

FIGUEIREDO, M. A. **Secagem e resfriamento de sementes de *Coffea arabica* L. visando à criopreservação**. 2016. 45 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

FOGAÇA, C. A. et al. Teste de tetrazólio em sementes de *Copaifera langsdorffii* e *Schizolobium parahyba*. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 41, n. 4, p. 895-904, jun. 2011.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in physiological context. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 1056-1071, Aug. 2005.

FRANÇA NETO, J. B. et al. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1998. 72 p.

GADOTTI, I. G.; MENEGHELLO, G. E.; TILLMANN, M. A. A. Faixa de exigência e influência do pH no teste de germinação. **Revista de la Facultad de Agronomía**, La Plata, v. 112, n. 1, p. 27-34, Apr. 2013.

GILL, S. S. et al. Superoxide dismutase - mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsbergis, v. 22, n. 14, p. 10375-10394, July 2015.

GIL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 12, p. 909-930, Dec. 2010.

HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 3, n. 3, p. 141-153, Sept. 1993.

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. **Phytochemistry**, London, v. 60, n. 7, p. 651-674, Aug. 2002.

INTERNATIONAL RULES FOR SEED TESTING. **International rules for seed testing**. Zurich, 2007. 180 p.

KAYIHAN, C. et al. Cu/Zn superoxide dismutase activity and respective gene expression during cold acclimation and freezing stress in barley cultivars. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 56, n. 4, p. 693-698, May 2012.

KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A. Relatos dos testes de vigor disponíveis as grandes culturas. **Informativo ABRATES**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 15-50, mar. 1991.

LAKON, G. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 24, n. 3, p. 389-394, July/Sept. 1949.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1992. 725 p.

LIMA, M. G. S. **Deteção de genes e expressão enzimática em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) crescidas sob estresse salino**. 2008. 93 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

- LOCATO, V. et al. Reactive oxygen species and ascorbate glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science, 2010. p. 45-64.
- MARCOS FILHO, J. et al. **Avaliação da qualidade de sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230 p.
- MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2007. 469 p.
- MEIRELES, R. C. **Efeito do hipoclorito de sódio e da embebição em água na germinação de sementes de café (Coffea arabica L.)**. 2004. 67 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.
- MEIRELES, R. C. et al. Secafé: metodologia para acelerar a germinação das sementes de café. **Revista Brasileira de Sementes**, Viçosa, MG, v. 29, n. 3, p. 90-96, jun. 2007.
- MENDES, C. R. et al. Respiratory activity for the differentiation of vigor on soybean seeds lots. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 171-176, Dec. 2009.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, Cambridge, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.
- MOORE, R. P. Interpretation of color differences in tetrazolium testing. **Seed Technologist News**, Louisville, v. 44, n. 3, p. 22-24, July/Sept. 1972.
- NAKADA, P. G. et al. Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 42-051, abr. 2010.
- PEREIRA, C. C. **Cultura de embriões e germinação de sementes de diferentes níveis de qualidade para a produção de mudas de café**. 2017. 58 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.
- PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Testes de qualidade. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 283-297.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: Agiplan, 1977. 289 p.
- REIS, L. S. et al. Lercafé: Novo teste para estimar o potencial germinativo de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 9-16, jan. 2010.
- RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: RENA, A. B. et al. **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos, 1986. p. 13-85.

- ROSA, S. D. V. F. et al. Staging coffee seedling growth: a rationale for shortening the coffee seed germination test. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 38, n. 2, p. 421-431, July 2010.
- RUBIM, R. F. et al. Tratamento com hipoclorito de sódio para remoção do pergaminho e aceleração da germinação de sementes de café conilon. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 88-98, jan. 2010.
- SAVONEN, E. An improvement to the topographic tetrazolium testing of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 26, n. 1, p. 49-57, Jan. 1999.
- SERA, G. H.; MIGLIORANZA, É. Avaliação visual do potencial germinativo de sementes de café pelo formato e coloração do embrião. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 307-310, jul./dez. 2003.
- SHAN-ZHI, L. et al. Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in freezing induced freezing resistance of *Populus suaveolens*. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 31, p. 34-40, Feb. 2005.
- SILVA, E. A. A. **Coffee (*Coffea arabica* L. cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation**. 2002. 105 p. Thesis (Ph.D. in Crop Science) - Wageningen University, Wageningen, 2002.
- STRAUB, F. Isolamento e propriedades de uma flavoproteína do tecido do músculo cardíaco. **Biochemical Journal**, London, v. 33, p. 787, 1939.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 934 p.
- TATONE, C. et al. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. **Gynecological Endocrinology**, London, v. 26, n. 8, p. 563-567, Aug. 2010.
- TIMÓTEO, T. S. **Condições de armazenamento e conservação do potencial fisiológico de sementes em diferentes genótipos de milho**. 2011. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2011.
- TUNES, L. M. et al. Influência dos diferentes períodos de colheita na expressão de isoenzimas em sementes de cevada. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 58, n. 2, p. 178-184, mar. 2011.
- VIEIRA, M. G. G. C. et al. **Testes rápidos para determinação da viabilidade e da incidência de danos mecânicos em sementes de cafeeiro**. Lavras: UFLA, 1998. 34 p. (Boletim Agropecuário, 26).
- ZHANG, M. et al. A mechanism of seed deterioration in relation to volatile compounds evoked by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 1, p. 49-56, Mar. 1994.

ZONTA, J. B. et al. Teste lercafé para sementes de cafeeiro com diferentes teores de água.
Revista Brasileira de Sementes, Viçosa, MG, v. 32, n. 1, p. 17-23, ago. 2010.

CAPÍTULO 2

CORRELAÇÃO POR *GAMLSS* ENTRE DADOS HISTÓRICOS DO TESTE DE GERMINAÇÃO E DO TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE CAFÉ

RESUMO

No Sistema Nacional de Sementes e Mudanças, as sementes de café são avaliadas pelos testes de germinação ou de tetrazólio. Porém, em diversas pesquisas têm sido observadas diferenças entre os resultados de ambos os testes, principalmente quando as sementes apresentam mais baixo nível de qualidade. Diante disso, objetivou-se, neste trabalho, avaliar a correlação entre dados históricos de resultados do teste de germinação e do tetrazólio em amostras de sementes de café por meio de Modelos de Regressão Generalizado Aditivo de Localização, Escala e Forma (GAMLSS - *Generalized Additive Model for Location Scale and Shape*). O trabalho foi conduzido no Laboratório Central de Sementes, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Foram utilizados dados históricos de resultados do teste de germinação e do teste de tetrazólio de sementes de café, provenientes de diferentes cultivares e diferentes safras agrícolas. Devido ao excesso de zeros observados nos dados, optou-se por considerar o Modelo de Regressão Generalizado Aditivo de Localização, Escala e Forma, pertencente à classe de modelos GAMLSS adaptado para distribuição Beta Inflacionada de 0 e 1. Assim, diferentes modelos foram ajustados em função das classes de valores de germinação. O Modelo de Regressão Generalizado Aditivo de Localização, Escala e Forma Beta Inflacionado de 0 e 1 (GAMLSS Beta Inflacionado de 0 e 1) é adequado para o ajuste dos dados do teste de germinação e do teste de tetrazólio em sementes de café. De acordo com os resultados da análise de GAMLSS, a estimativa da germinação pelo teste de tetrazólio é variável em função das classes de percentuais de germinação. Há maiores correlações de GAMLSS entre as porcentagens de plântulas normais e de viabilidade no teste de tetrazólio, para valores de germinação acima de 70% e baixas correlações abaixo deste valor, evidenciando que a avaliação de sementes de café, baseada apenas no teste de tetrazólio, pode não corresponder ao real desempenho fisiológico.

Palavras-chave: Análise de Regressão. Avaliação da qualidade. Potencial germinativo. Viabilidade.

ABSTRACT

In the National System of Seeds and Seedlings, coffee seeds are evaluated by germination or tetrazolium tests. However, in several researches have been observed differences between the results of both tests, especially when the seeds have lower quality. The objective of this work was to evaluate the correlation between the historical data of the germination test and the tetrazolium test in coffee seed samples using the GAMLSS - Generalized Additive Model for Location Scale and Shape. The work was conducted at the Central Seed Laboratory, Department of Agriculture, Federal University of Lavras. The results of the germination test and the tetrazolium test of coffee seeds from different cultivars and different agricultural crops were used. Due to the excess of zeros observed in the data, it was chosen to consider the Generalized Regression Model Additive of Lease, Scale and Shape, belonging to the class of GAMLSS models adapted for Beta Inflated distribution of 0 and 1. Thus, different models were adjusted according to the classes of germination values. The Generalized Regression Model Additive of Lease, Scale and Inflated Beta Form 0 and 1 (GAMLSS Beta Inflated from 0 and 1) is adequate for the adjustment of germination test and tetrazolium test data in coffee seeds. According to the results of the GAMLSS analysis, the germination estimation by the tetrazolium test is variable according to the percentage of germination classes. There are higher GAMLSS correlations between normal seedlings and viability percentages in the tetrazolium test, for germination values above 70% and low correlations below this value, showing that the evaluation of coffee seeds based only on the tetrazolium test may not correlate with the real physiological performance.

Keywords: Regression Analysis. Quality assessment. Potential germination. Viability.

1 INTRODUÇÃO

O café brasileiro é um dos produtos agrícolas de indiscutível importância socioeconômica mundial, sendo esta atividade uma grande fonte de renda para a economia do país, devido a sua participação na balança comercial, alcançando o patamar de maior produtor e exportador desse produto (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ - ABIC, 2017; CONAB, 2018).

A implantação da cultura do cafeeiro é feita por mudas provenientes de sementes e, um dos pontos críticos para sua produção, é a utilização de sementes de qualidade. Muitas etapas e cuidados devem ser tomados durante a produção das sementes, que deve ser finalizada com a análise para a avaliação da qualidade final das sementes visando garantir a alta viabilidade e vigor para a formação das mudas com a qualidade necessária à implantação de lavouras vigorosas e produtivas.

Para se avaliar a qualidade fisiológica das sementes de café, é prescrito o teste de germinação (BRASIL, 2009). Porém, devido aos problemas como longo período de duração do teste, associado à rápida perda de viabilidade dessas sementes, os resultados podem não refletir o verdadeiro estado fisiológico da semente (DIAS; SILVA, 1986). Dessa maneira, uma alternativa viável é o teste de tetrazólio, que tem sido utilizado como uma opção ao teste de germinação para sementes de café, pela sua agilidade na determinação da viabilidade (COSTA; MARCOS FILHO, 1994; DELOUCHE et al., 1976; FRANÇA NETO et al., 1988), além de ser de fácil execução e avaliação (SERA; MIGLIORANZA, 2003).

A eficiência do teste de tetrazólio para avaliar a viabilidade das sementes depende do desenvolvimento de metodologias apropriadas para cada espécie, determinando as condições adequadas para a hidratação, o preparo das sementes, a concentração da solução de tetrazólio, o tempo e a temperatura de condicionamento. Essas padronizações são importantes, pois influenciam diretamente na intensidade e na uniformidade de coloração das sementes, ou seja, interferem na avaliação e na interpretação dos resultados (GASPAR-OLIVEIRA et al., 2009; SOUZA; OHLSON; PANOBIANCO, 2010).

A determinação destes parâmetros geralmente ocorre a partir de estudos que comparam os resultados obtidos no teste de tetrazólio com os diferentes testes de avaliação da qualidade de sementes como, por exemplo, o teste de germinação e o teste de emergência de plântulas em campo (BARROS; MARCOS FILHO, 1990; GASPAR-OLIVEIRA et al., 2009; PASHA; DAS, 1982).

Na cultura do café, o teste de tetrazólio pode ser usado para análise da viabilidade das sementes, de acordo com a Instrução Normativa IN - nº 35, de 29 de novembro de 2012, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2012), sendo prescrito pelas Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009) como uma alternativa para a verificação do potencial de germinação de lotes de sementes.

Apesar da utilização frequente do teste de tetrazólio para sementes de café, existem ainda variações quando comparados com os resultados do teste de germinação, sendo observada por autores uma tendência em superestimar ou subestimar, em alguns casos, o potencial germinativo dos lotes (CLEMENTE et al., 2011; COELHO et al., 2015; FIGUEIREDO, 2016; PEREIRA, 2017). Assim, mais pesquisas devem ser realizadas na busca de um melhor entendimento sobre a correlação entre os valores do potencial germinativo estimado pelo teste de tetrazólio e os percentuais de plântulas normais obtidos por meio do teste de germinação, a fim de elucidar as possíveis variações destes resultados.

A modelagem estatística de valores históricos como os de germinação e de viabilidade de sementes de café constitui uma tarefa bastante complexa, uma vez que, considerando um banco de dados histórico, nota-se a presença de muitas observações que correspondem a 0% e 100% de germinação. Tal fato resulta em distribuições estatísticas com elevado grau de assimetria; assim, os métodos usuais de inferência como uma simples regressão linear ou análises de variâncias tornam-se técnicas incoerentes para a comparação de médias e modelagem de dados. Além disso, a presença de múltiplos fatores associados, como diferentes safras, cultivares, efeitos não lineares e variâncias heterogêneas para diferentes níveis (valores) dos fatores devem ser considerados.

Desta forma, tais dados não apresentam um comportamento condizente com a distribuição normal, portanto, métodos mais complexos que permitam acomodar esses efeitos são necessários para que predições relacionadas às taxas de germinação obtidas nos testes sejam confiáveis e precisas. Assim, uma alternativa consiste na aplicação de Modelos Generalizados Aditivo para Localização, Escala e Forma (*GAMLSS - Generalized Additive Model for Location Scale and Shape*) que são adequados para o ajuste de dados de características assimétricas e flexíveis ao ajuste de distribuições que suportam elevadas taxas de observações nulas ou heterogeneidade extra entre unidades amostrais, como por exemplo, a distribuição beta inflacionada de 0 e 1.

Diante do exposto, este trabalho tem por objetivo propor uma modelagem utilizando modelos GAMLSS adaptados à distribuição beta inflacionada de 0 e 1, de modo que a

correlação entre os dados históricos dos resultados do teste de germinação e de tetrazólio em sementes de café possam ser explicados em função de diferentes classes de porcentagem de germinação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras e foram utilizados dados históricos dos resultados do teste de germinação e do teste de tetrazólio de sementes de café provenientes de diferentes safras agrícolas e cultivares. Foram utilizadas 548 amostras de sementes de café, sendo parte correspondente a amostras recebidas no Laboratório de Análise de Sementes para avaliação e emissão de boletins para o sistema de certificação, e parte oriunda de projetos de pesquisa realizadas no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia/Agronomia da Universidade Federal de Lavras.

Todas as amostras de sementes foram submetidas à mesma metodologia de preparo e análise pelos testes de germinação e de tetrazólio, conforme descrito.

Antes de submeter as sementes aos testes de tetrazólio e germinação, foi feita a retirada manual do pergaminho. Para a extração dos embriões, as sementes foram embebidas em água por um período de 48 horas, a 30°C. Após esse período, os embriões foram extraídos manualmente de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

- **Teste de tetrazólio:**

Realizado com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, as quais foram embebidas em água por um período de 48 horas para a extração dos embriões. Os embriões extraídos foram mantidos em solução antioxidante de polivinilpirrolidona (PVP) e, após a extração, os embriões foram lavados em água corrente e imersos em solução de tetrazólio a 0,5%, utilizando-se frascos escuros e acondicionados em temperatura de 30°C por 3 horas (BRASIL, 2009; CLEMENTE et al., 2011). A análise da viabilidade dos embriões foi realizada com auxílio de lupa estereoscópica com aumento de 10x para melhor visualização das estruturas internas e externas e, então, foram classificados em viáveis e inviáveis de acordo com a localização e extensão dos danos (BRASIL, 2009).

- **Teste de germinação:**

Realizado com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, semeadas em rolos de papel toalha tipo "germitest" umedecidos com água destilada na quantidade de 2,5x o peso do papel seco. As sementes foram semeadas e acondicionadas em germinador, regulado a 30° C, na presença de luz (BRASIL, 2009). Foi determinada a porcentagem de plântulas normais aos 30 dias após a semeadura, sendo computadas como plântulas normais aquelas que apresentaram raiz principal e, pelo menos, duas raízes laterais.

2.1 Descrição do modelo GAMLSS – Generalized Additive Model for Location Scale and Shape aplicado na avaliação da viabilidade das sementes de café pelos testes de germinação e de tetrazólio

Para a análise de correlação dos dados de germinação e de tetrazólio foram utilizados os Modelos de Regressão Generalizados Aditivos de Localização, Escala e Forma (*GAMLSS - Generalized Additive Model for Location Scale and Shape*) propostos inicialmente por Rigby e Stasinopoulos (2005).

Esses modelos pertencem a uma classe de modelos mais flexíveis que consideram na sua modelagem: média, dispersão, simetria dos dados ao ajustar modelos que contemplam a natureza da resposta. Neste estudo, dado que as respostas referiram-se a proporções limitadas no intervalo [0,1] e que, um grande número de amostras de sementes que apresentaram observações nulas, ou seja, porcentagem zero de germinação, sendo que, no teste de tetrazólio os valores correspondentes de viabilidade foram maiores que zero, tornou-se necessário o uso de uma modelagem mais complexa, caracterizada pela distribuição beta inflacionada de 0 e 1, adaptada aos modelos GAMLSS, cuja descrição é dada a seguir.

2.2 Modelo GAMLSS para a distribuição beta inflacionada de 0 e 1.

A descrição desse modelo inicia-se por considerar a mistura entre as distribuições Beta e Bernoulli. Conforme Ospina e Ferrari (2010), a função densidade de probabilidade da distribuição beta inflacionada de zero e um (BEINF) é dada por

$$f(y; \alpha, \gamma, \mu, \sigma) = \begin{cases} \alpha(1-\gamma), & y = 0 \\ \alpha\gamma, & y = 1 \\ (1-\alpha)f(y; \mu, \sigma), & y \in (0,1) \end{cases} \quad (1)$$

com $0 < \alpha, \gamma, \mu < 1$ e $\sigma > 0$, onde $f(y; \mu, \sigma)$ é a função densidade beta, dada por

$$f(y; \mu, \sigma) = \frac{\Gamma(\sigma)}{\Gamma(\mu\sigma)\Gamma((1-\mu)\sigma)} y^{\mu\sigma-1} (1-y)^{(1-y)\sigma-1} \quad (2)$$

em que $\Gamma(\cdot)$ é a função gama. Assumindo $\mathbf{y}^T = (y_1, y_2, \dots, y_{755})$, com $n=755$ amostras avaliadas, o vetor de observações da variável resposta e $g_k(\cdot)$, $k = 1, \dots, 4$, uma função de ligação monótona relacionando θ_k com a amostra de semente do café, compreendida por 548 amostras. O preditor linear do modelo aditivo é dado por

$$g_k(\theta_k) = \eta_k = \sum_{j=1}^{J_k} h_{jk}(x_{jk}) \quad (3)$$

onde θ_k e η_k são vetores de tamanho n , $\beta_k^T = (\beta_{1k}, \beta_{2k}, \dots, \beta_{J_k k})$ é um vetor de tamanho J_k , \mathbf{x}_k é uma matriz de delineamento conhecida de tamanho $n \times J_k$, $h_{jk}(x_{jk})$ é uma função desconhecida da variável explicativa x_{jk} . No presente trabalho, $h_{jk}(x_{jk})$ é um beta *spline* penalizado, o qual é caracterizado por polinômios definidos por partes segundo uma função de base beta *spline* na variável explicativa. Os coeficientes das funções de base são penalizados para garantir suficiente suavidade (EILERS; MARX, 1996). O modelo em (3) é denominado GAMLSS semiparamétrico. Dessa forma, será assumido que a taxa de germinação nos diferentes métodos tenha distribuição beta inflacionada de zero e um, ou seja, $\mathbf{y} \square BEINF(\mu, \sigma, \nu, \tau)$, com preditor linear para os parâmetros μ e σ , denominados parâmetros de posição e escala, e ν e τ , denominados parâmetros de forma, dados por

$$\left\{ \begin{array}{l} g_1(\mu) = \eta_1 = \text{logit}(\mu) = \sum_{j=1}^{J_1} h_{j1}(x_{j1}) \\ g_2(\sigma) = \eta_2 = \text{logit}(\sigma) = \sum_{j=1}^{J_1} h_{j2}(x_{j1}) \\ g_3(\nu) = \eta_3 = \log(\nu) = \sum_{j=1}^{J_1} h_{j3}(x_{j1}) \\ g_4(\tau) = \eta_4 = \log(\tau) = \sum_{j=1}^{J_1} h_{j4}(x_{j1}) \end{array} \right. \quad (4)$$

Os parâmetros do modelo foram estimados simultaneamente a partir de algoritmo de *backfitting* RS (RIGBY; STASINOPOULOS, 2007). Esse algoritmo tem a vantagem de não necessitar de estimativas iniciais dos valores de cada um dos parâmetros associados às variáveis preditoras. São necessárias apenas estimativas iniciais dos valores dos parâmetros originais da distribuição da variável resposta.

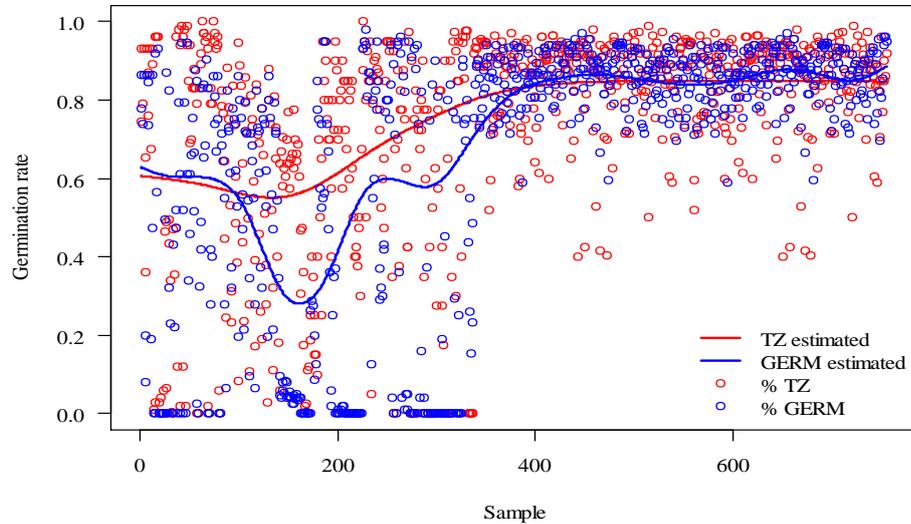
Foi utilizado o gráfico *worm plot* como diagnóstico de ajuste do modelo proposto. Conforme Buuren e Fredriks (2001), o gráfico consiste dos pares ordenados formados pelo quantil da distribuição normal padrão e a diferença entre o quantil empírico do resíduo do modelo proposto e a normal padrão. A forma como os pares ordenados estão dispostos, indica a adequabilidade do modelo.

O ajuste do modelo bem como os gráficos de qualidade de ajuste, foram obtidos por meio do programa R (R CORE TEAM, 2017) com recursos do pacote *gamlss* (RIGBY; STASINOPOULOS, 2017).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, encontra-se representado o resultado do ajuste, por meio do modelo GAMLSS Beta Inflacionado ajustado aos dados de germinação para a porcentagem de plântulas normais e de embriões viáveis pelo teste de tetrazólio.

Figura 1 - Modelo GAMLSS Beta Inflacionado ajustados aos dados de avaliação para as variáveis plântulas normais (azul) e embriões viáveis pelo teste de tetrazólio (vermelho) de sementes de *Coffea arabica* L.

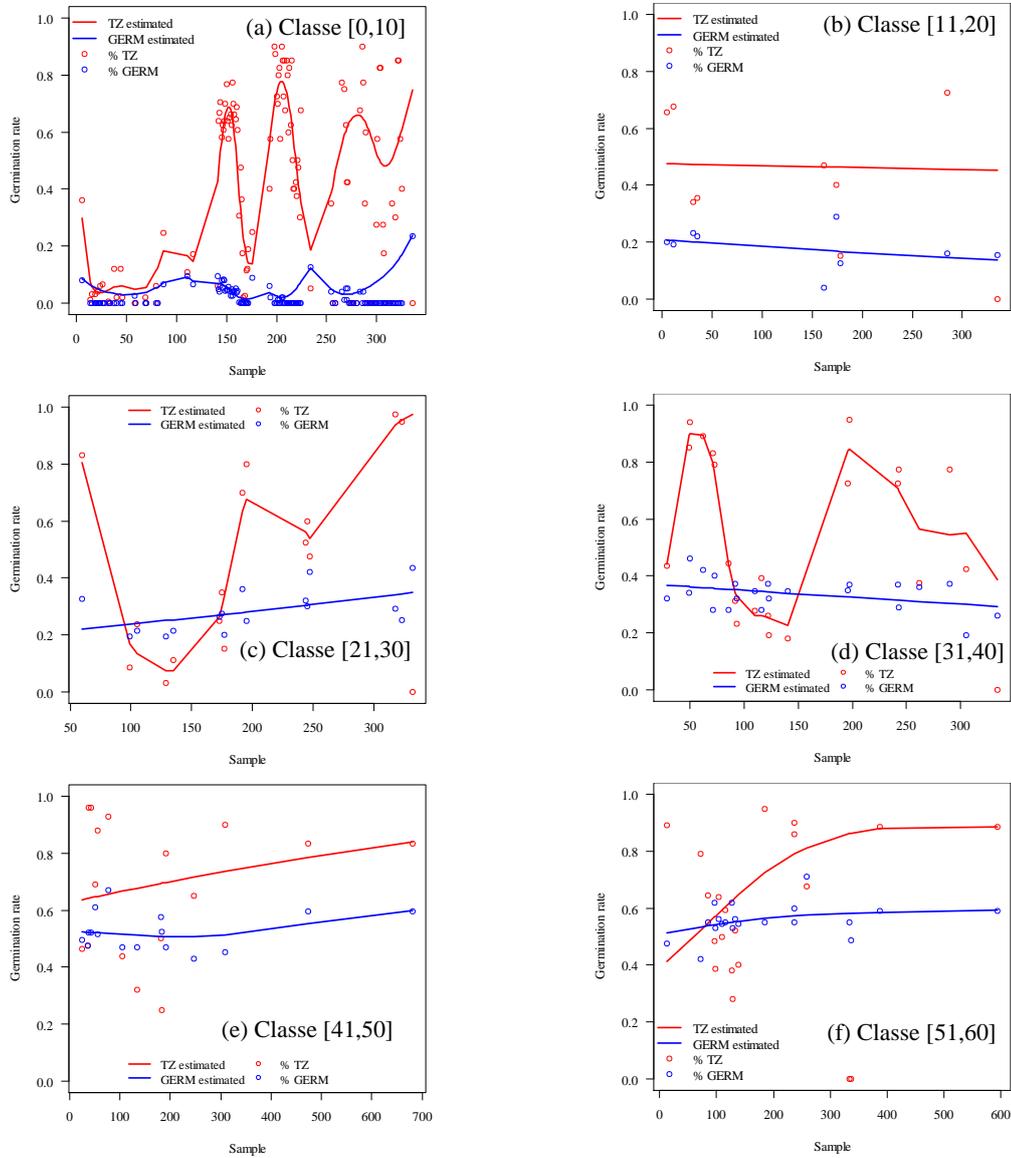


Fonte: Do autor (2018).

A Figura 1 representa o ajuste do modelo, sendo que cada ponto refere-se a cada resultado decimal de germinação (GERM) e de viabilidade (TZ). As linhas contínuas indicam as curvas ajustadas, onde se pode observar que não ocorrem ajustes para a totalidade dos pontos. Assim, percebe-se que o ajuste de um único modelo para todas as observações não é apropriado para explicar as porcentagens de germinação (plântulas normais) e os embriões considerados viáveis pelo teste de tetrazólio. Dessa forma, procedeu-se com a validação do modelo ajustado para os dois testes na estratificação de classes de germinação.

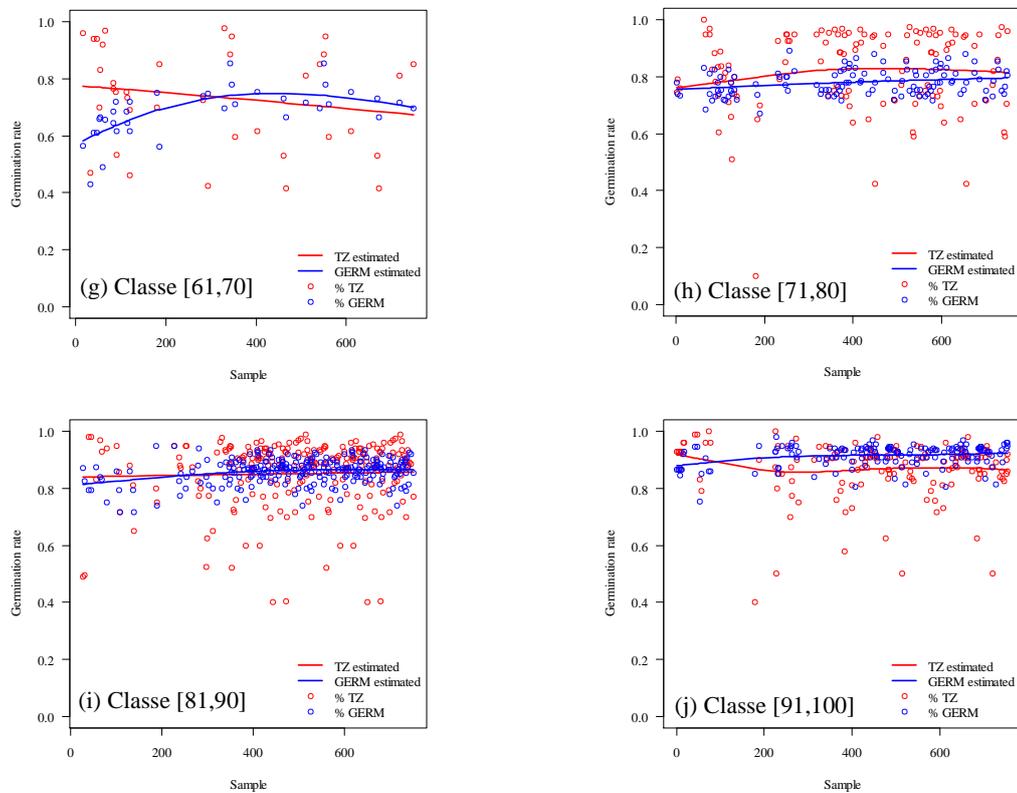
Nesse contexto, nas Figuras 2 e 3 estão apresentados o modelo GAMLSS Beta Inflacionado ajustado aos dados de germinação para a porcentagem de plântulas normais e de embriões viáveis pelo teste de tetrazólio dentro de cada classe: (a) Classe [0,10]; (b) Classe [11,20]; (c) Classe [21,30]; (d) Classe [31,40]; (e) Classe [41,50]; (f) Classe [51,60]; (g) Classe [61,70]; (h) Classe [71,80]; (i) Classe [81,90]; (j) Classe [91,100].

Figura 2 - Modelo GAMLSS Beta Inflacionado ajustados aos dados de avaliação para as variáveis plântulas normais (azul) e embriões viáveis pelo teste de tetrazólio (vermelho), dentro das classes (a) [0,10], (b) [11,20], (c) [21,30], (d) [31,40], (e) [41,50] e (f) [51,60].



Fonte: Do autor (2018).

Figura 3 - Modelo GAMLSS Beta Inflacionado ajustados aos dados de avaliação para as variáveis plântulas normais (azul) e embriões viáveis pelo teste de tetrazólio (vermelho), dentro das classes, (g) [61,70], (h) [71,80], (i) [81,90] e (j) [91,100].



Fonte: Do autor (2018).

Analisando os modelos ajustados nas classes [0,10], [11,20], [21,30], [31,40], [41,50], [51,60] (FIGURA 2) foi possível observar que, de maneira geral, no teste de tetrazólio a porcentagem de embriões viáveis é superior à porcentagem de plântulas normais no teste de germinação, indicando que o teste de tetrazólio superestima o potencial germinativo das sementes nestas classes de valores. Em várias pesquisas tem sido confirmada a discrepância entre os resultados do teste de tetrazólio e de germinação em sementes de café, principalmente em sementes de mais baixa qualidade (COELHO et al., 2015; DUSSERT; ENGELMANN 2006; FIGUEIREDO, 2016; PEREIRA, 2017).

A partir da classe [61,70] (FIGURA 3) observou-se que os valores médios das variáveis plântulas normais e embriões viáveis foram cada vez mais próximos, principalmente para os valores superiores a 70% que, de acordo com o MAPA, é o padrão mínimo para a comercialização das sementes de café (BRASIL, 2009).

De acordo com esses resultados, é possível afirmar que o potencial do teste de tetrazólio para estimar a qualidade das sementes é variável com a classe de valores de germinação. Visto que, em sementes classificadas com germinação inferior a 60%, os resultados do teste de tetrazólio superestimam os valores da germinação, ou seja, não é um bom teste para avaliar a qualidade dessas sementes. Já para as sementes com germinação superior a 60%, os resultados do teste de tetrazólio foram próximos aos valores da germinação, indicando que, para essas sementes, o teste de tetrazólio pode ser utilizado para estimar a qualidade das sementes.

Fica evidenciado pela análise de correlação de GAMLSS, que existe uma boa correlação entre os dados de germinação e de viabilidade para valores acima do padrão mínimo para a comercialização das sementes de café (BRASIL, 2009), ou seja, acima de 70%. No entanto, fica também evidenciado, que a avaliação das sementes baseada apenas no teste de tetrazólio, pode indicar a aprovação de lotes para a comercialização de sementes de café cujo real valor da germinação seja bem inferior ao mínimo.

Visando validar as análises de correlação pelo modelo GAMLSS, foram realizadas análises dos resíduos. De acordo com a correlação dos resíduos em ambos os testes (Anexo A), é possível afirmar que o modelo de regressão GAMLSS Beta Inflacionado de 0 e 1 não apresentou graves evidências de falta de ajuste, uma vez que a maioria está contida nos respectivos intervalos de confiança.

4 CONCLUSÕES

O Modelo de Regressão Generalizado Aditivo de Locação, Escala e Forma Beta Inflacionado de 0 e 1 (GAMLSS Beta Inflacionado de 0 e 1) é adequado para o ajuste dos dados do teste de germinação e do teste de tetrazólio em sementes de café.

De acordo com os resultados da análise de GAMLSS, a estimativa da germinação pelo teste de tetrazólio é variável em função das classes de percentuais de germinação.

Há maiores correlações de GAMLSS entre as porcentagens de plântulas normais e de viabilidade no teste de tetrazólio, para valores de germinação acima de 70% e baixas correlações abaixo deste valor, evidenciando que a avaliação de sementes de café, baseada apenas no teste de tetrazólio, pode não corresponder ao real desempenho fisiológico.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Produção mundial de café - principais países produtores**. Safra 2017. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publicar/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=48#2810>>. Acesso em: 25 out. 2017.
- BARROS, A. S. R.; MARCOS FILHO, J. Testes para avaliação rápida da viabilidade de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 10, p. 1447-1459, out. 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 35, de 29 de novembro de 2012**. Disponível em: <http://www.lex.com.br/legis_24015030_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_35_DE_29_DE_NOVEMBRO_DE_2012.aspx>. Acesso em: 28 ago. 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 399 p.
- BUUREN, S. V.; FREDRIKS, M. Worm plot: a simple diagnostic device for modelling growth reference curves. **Statistics in Medicine**, New York, v. 20, p. 1259–1277, 2001.
- CLEMENTE, A. C. S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, jul. 2011.
- COELHO, S. V. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, jun. 2015.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café, safra 2018: primeiro levantamento**. Brasília, 2018.
- COSTA, N. P.; MARCOS FILHO, J. O emprego do teste de tetrazólio na avaliação da qualidade da semente de soja. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 4, n. 2, p. 53-62, 1994.
- DELOUCHE, J. C. et al. O teste de tetrazólio para viabilidade da semente. Brasília: AGIPLAN, 1976. 103 p.
- DIAS, M. C. L. L.; SILVA, W. R. Determinação da viabilidade de sementes de café através do teste de tetrazólio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 11, p. 1139-1145, nov. 1986.
- DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. New determinants for tolerance of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. **CryoLetters**, Cambridge v. 27, n. 3, p. 169-178, May/June 2006.
- EILERS, P. H. C.; MARX, B. D. Flexible smoothing with B-splines and penalties. **Statistical Science**, Hayward, v. 11, n. 2, p. 89-121, 1996.

FIGUEIREDO, M. A. **Secagem e resfriamento de sementes de Coffea arabica L. visando à criopreservação**. 2016. 45 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

FRANÇA NETO, J. B. et al. **Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1988. 60 p.

GASPAR-OLIVEIRA, C. M. et al. Concentração da solução de tetrazólio e período de coloração do teste para sementes de mamoneira. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 38-47, set. 2009.

OSPINA, R.; FERRARI, S. L. P. Inflated beta distributions. **Statistica Papers**, New York, v. 51, p. 111–126, 2010.

PASHA, M. R.; DAS, R. K. Quick viability test of soybean seed by using tetrazolium chloride. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 10, n. 2, p. 651-655, Feb. 1982.

PEREIRA, C. C. **Cultura de embriões e germinação de sementes de diferentes níveis de qualidade para a produção de mudas de café**. 2017. 58 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2017.

RIGBY, R. A.; STASINOPOULOS, D. M. Generalized additive models for location, scale and shape. **Journal of Applied Statistics**, Abingdon, v. 54, p. 507–554, Apr. 2005.

RIGBY, R. A.; STASINOPOULOS, D. M. **Distributions for modelling location, scale and shape: using (GAMLSS) in R**. Disponível em: <<http://www.gamlss.com/wpcontent/uploads/2018/01/DistributionsForModellingLocationScaleandShape.pdf>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

RIGBY, R. A.; STASINOPOULOS, D. M. Generalized additive models for location scale and shape (GAMLSS) in R. **Journal of Statistical Software**, Los Angeles, v. 23, n. 7, p. 1-46, 2007.

SERA, G. H.; MIGLIORANZA, É. Avaliação visual do potencial germinativo de sementes de café pelo formato e coloração do embrião. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 307-310, jul./dez. 2003.

SOUZA, C. R.; OHLSON, O. C.; PANOBIANCO, M. Avaliação da viabilidade de sementes de aveia branca pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 174-180, ago. 2010.

ANEXO A – Resíduos do modelo GAMLSS Beta Inflacionado

Figura 1 - Resíduos do modelo GAMLSS Beta Inflacionado para a variável tetrazólio e para a variável germinação.

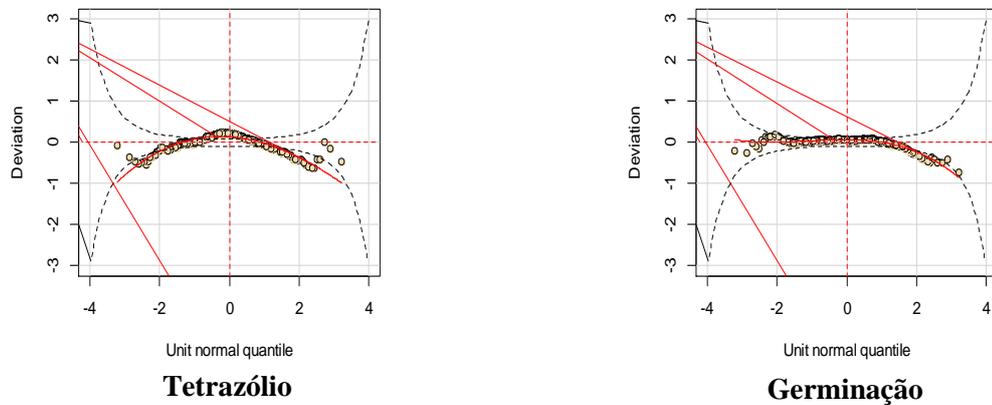


Figura 2 - Resíduos do modelo GAMLSS Beta Inflacionado para as variáveis tetrazólio (a) e germinação (b) na classe [0,10].

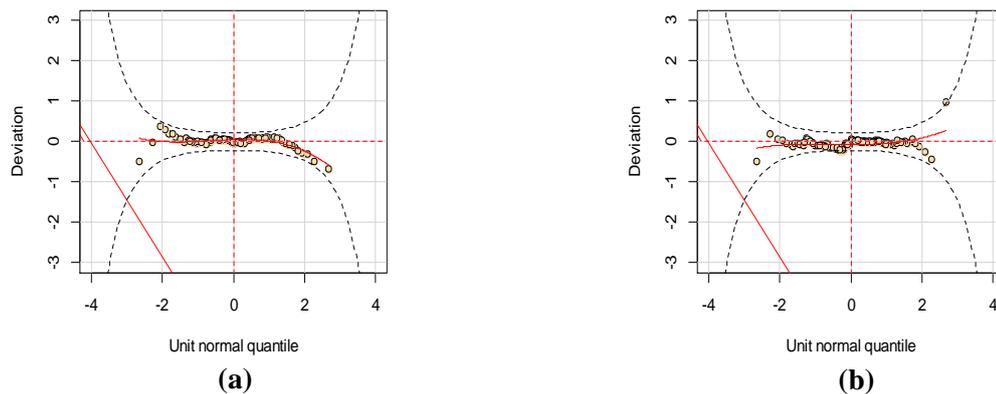


Figura 3 - Resíduos do modelo GAMLSS Beta Inflacionado para as variáveis tetrazólio (a) e germinação (b) na classe [11,20].

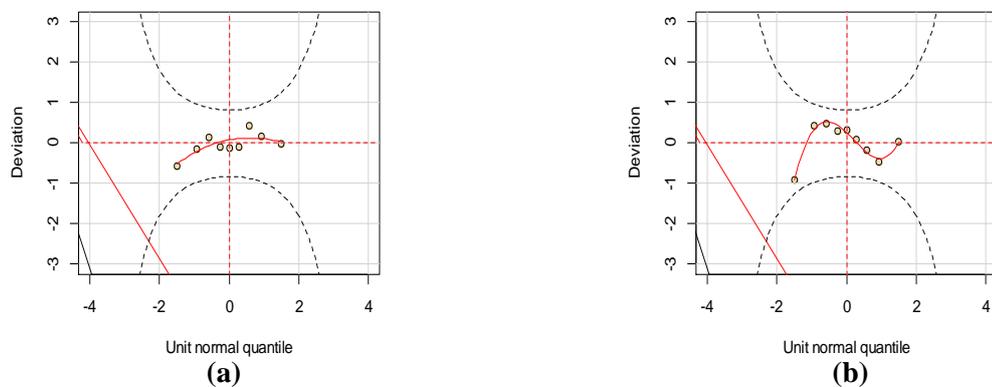


Figura 4 - Resíduos do modelo GAMLSS Beta Inflacionado para as variáveis tetrazólio (a) e germinação (b) na classe [21,30].

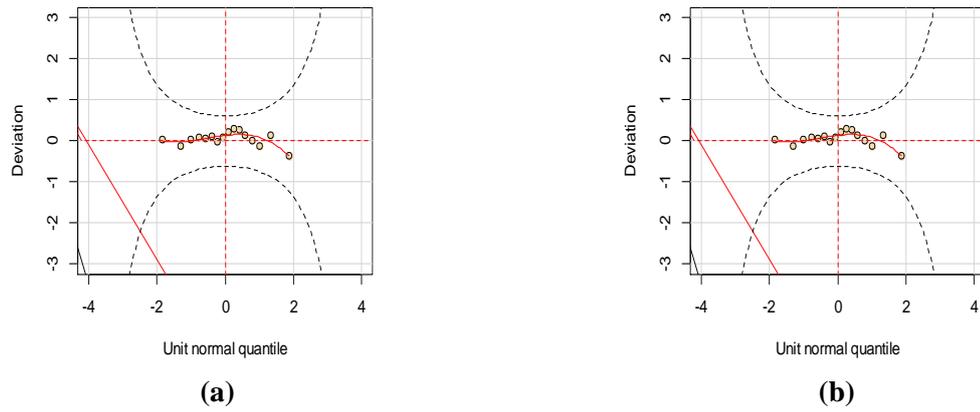


Figura 5 - Resíduos do modelo GAMLSS Beta Inflacionado para as variáveis tetrazólio (a) e germinação (b) na classe [31,40].

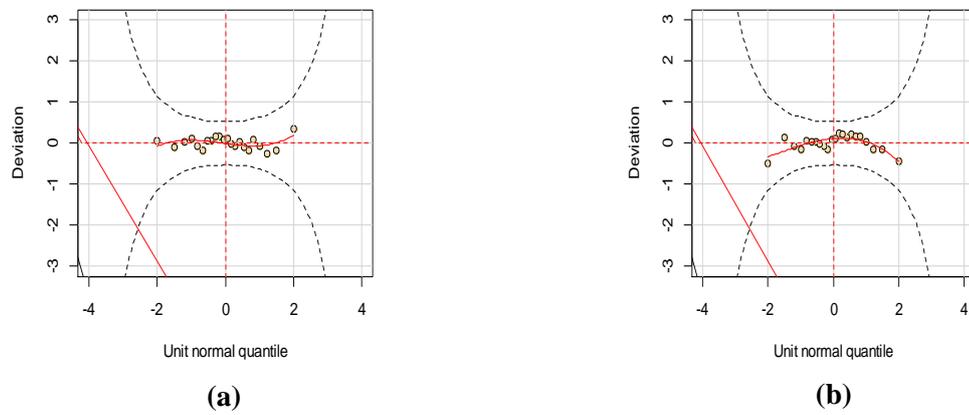


Figura 6 - Resíduos do modelo GAMLSS Beta Inflacionado para as variáveis tetrazólio (a) e germinação (b) na classe [41,50].

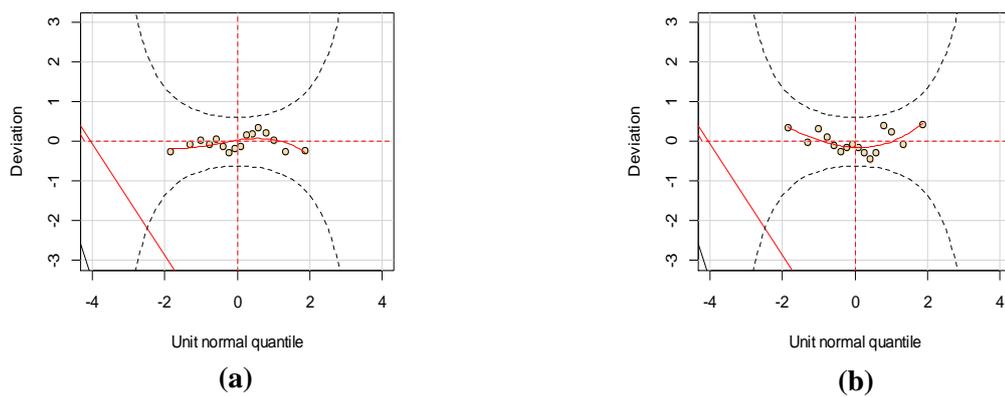


Figura 7 - Resíduos do modelo GAMLSS Beta Inflacionado para as variáveis tetrazólio (a) e germinação (b) na classe [51,60].

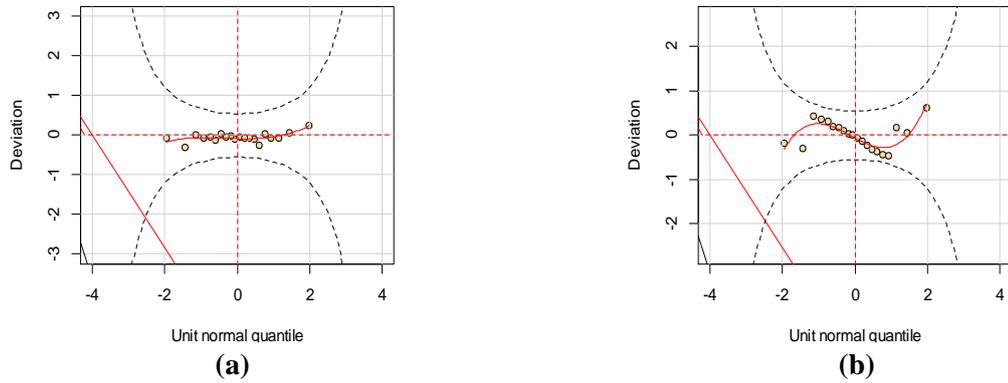


Figura 8 - Resíduos do modelo GAMLSS Beta Inflacionado para as variáveis tetrazólio (a) e germinação (b) na classe [61,70].

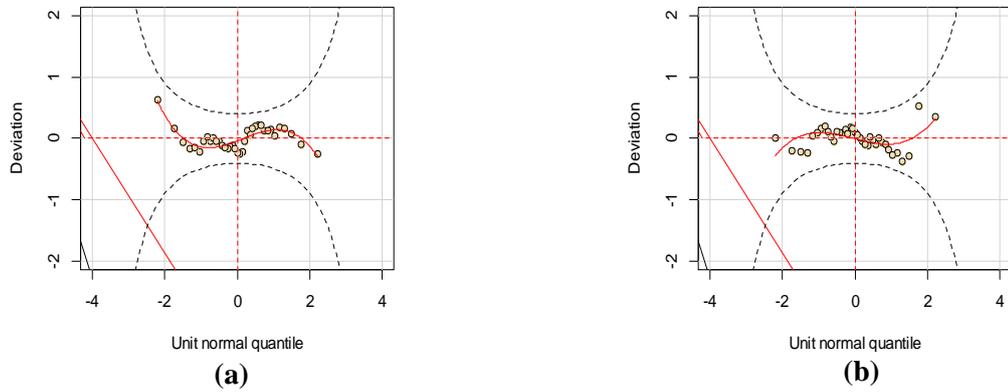


Figura 9 - Resíduos do modelo GAMLSS Beta Inflacionado para as variáveis tetrazólio (a) e germinação (b) na classe [71,80].

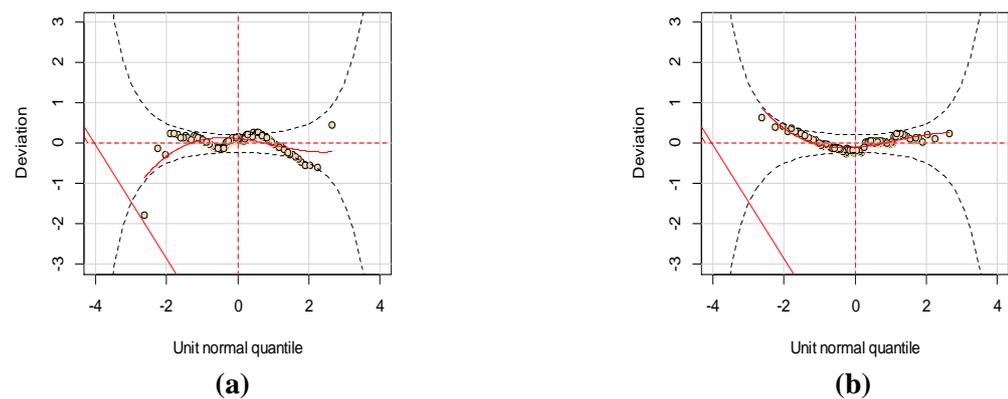


Figura 10 - Resíduos do modelo GAMLSS Beta Inflacionado para as variáveis tetrazólio (a) e germinação (b) na classe [81,90].

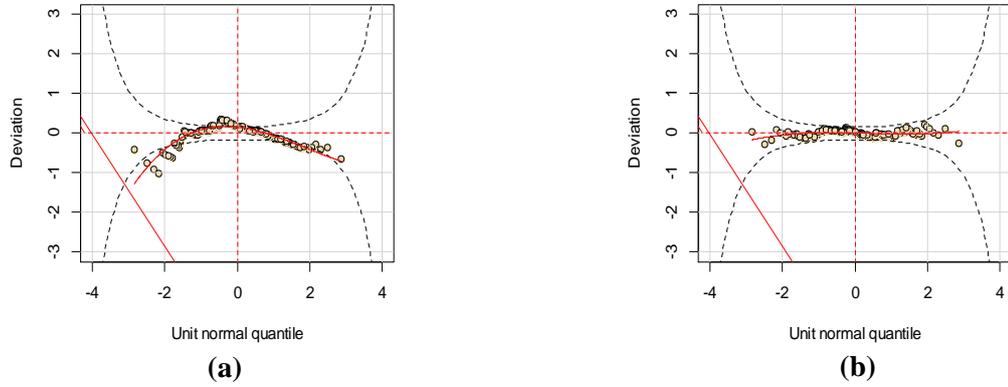
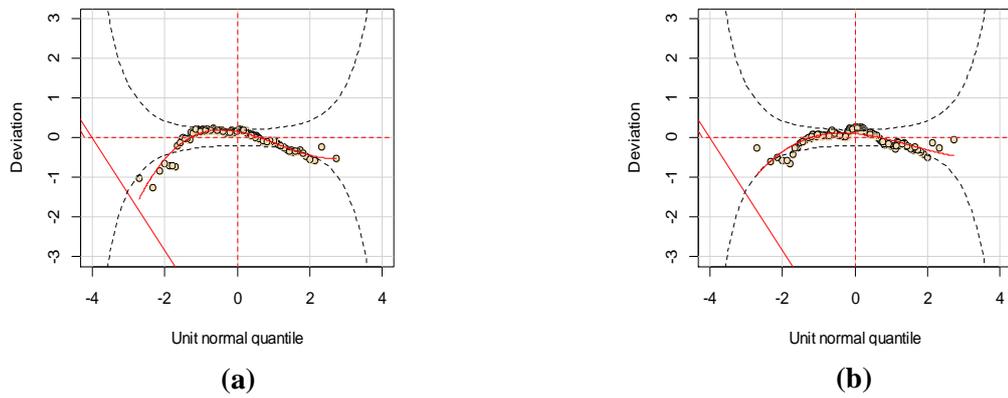


Figura 11 - Resíduos do modelo GAMLSS Beta Inflacionado para as variáveis tetrazólio (a) e germinação (b) na classe [91,100].



Fonte: Do autor (2018).

CAPÍTULO 3

APLICABILIDADE DO TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE CAFÉ COM DIFERENTES TIPOS E NÍVEIS DE ESTRESSES

RESUMO

Para a utilização e comercialização de sementes de café logo após a colheita, é necessário que o produtor tenha informações da qualidade inicial destas, e que atendam aos padrões estabelecidos pelo Sistema Nacional de Sementes e Mudas (SNSM). No entanto, a lenta germinação das sementes de café dificulta a obtenção de resultados da avaliação da qualidade fisiológica de lotes em tempo hábil para a formação das mudas. Uma alternativa para a avaliação rápida da viabilidade de sementes de café que vem sendo legalmente utilizada para a comercialização dessa espécie é o teste de tetrazólio. Porém, ainda existem dúvidas sobre o real potencial do teste para estimar a qualidade das sementes com diferentes níveis de qualidade. Diante disso, objetivou-se avaliar a aplicabilidade do teste de tetrazólio para estimar a viabilidade de sementes de café com diferentes tipos de estresse e níveis de qualidade. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras, em Lavras-MG. Foram utilizadas sementes de *Coffea arabica* L. recém-colhidas, as quais foram submetidas aos seguintes tratamentos: diferentes tipos de processamento, envelhecimento artificial, secagem em alta temperatura, exposição à temperatura subzero e armazenamento em condição não controlada. As sementes foram submetidas ao teste de tetrazólio, realizado em embriões, e ao teste de germinação, avaliando-se a porcentagem de plântulas normais, plântulas com folhas cotiledonares expandidas, massa seca de parte aérea e de raiz. O teste de tetrazólio superestima o potencial de sementes de café para produzir plântulas normais em baixo nível de qualidade fisiológica. As discrepâncias entre os resultados de viabilidade no teste de tetrazólio e de plântulas normais no teste de germinação são variáveis com o nível de qualidade fisiológica e o tipo de estresse sofrido pelas sementes de café. Ressalta-se que o uso do teste de tetrazólio no SNSM, alternativamente ao teste de germinação para aferir a qualidade de sementes de café deve ser revista, tendo em vista que os resultados podem diferir significativamente da sua real capacidade para produzir plântulas normais.

Palavras-chave: Sementes de café. Teste rápido. Viabilidade.

ABSTRACT

For the use and commercialization of coffee seeds immediately after harvesting, the producer must have information on the initial quality of these seeds and that they meet the standards established by the National Seed and Seed System (SNSM). However, the slow germination of coffee seeds makes it difficult to obtain results of the physiological quality evaluation of lots in time for the formation of seedlings. An alternative for the rapid evaluation of the viability of coffee seeds that has been legally used for the commercialization of this species is the tetrazolium test. However, there are still doubts about the real potential of the test to estimate the quality of the seeds with different levels of quality. The objective of this study was to evaluate the applicability of the tetrazolium test to estimate the viability of coffee seeds with different types of stress and quality levels. The work was developed in the Central Seed Laboratory, Federal University of Lavras, in Lavras-MG. Freshly harvested *Coffea arabica* L. seeds were used, which were submitted to the following treatments: different types of processing, artificial aging, drying at high temperature, exposure to sub-zero temperature and storage in an uncontrolled condition. The seeds were submitted to the tetrazolium test, carried out in embryos, and to the germination test, evaluating the percentage of normal seedlings, seedlings with expanded cotyledonary leaves, dry mass of shoot and root. The tetrazolium test overestimates the potential of coffee seeds to produce normal seedlings at a low level of physiological quality. The discrepancies between the viability results in the tetrazolium test and normal seedlings in the germination test are variable with the level of physiological quality and the type of stress suffered by the coffee seeds. It should be noted that the use of the tetrazolium test in the SNSM, in addition to the germination test, to assess the quality of coffee seeds should be reviewed, since the results may differ significantly from their actual ability to produce normal seedlings.

Keywords: Coffee seeds. Quick test. Viability.

1 INTRODUÇÃO

O Sistema Nacional de Sementes e Mudanças (SNSM) compreende, dentre outras atividades, a produção, a certificação, a análise e a comercialização de unidades de propagação vegetal, sementes e mudas, e é regido pela Lei 10.711, de 5 de agosto de 2003, regulamentada pelo Decreto 5.153, de 23 de julho de 2004, com a finalidade essencial de disponibilizar sementes e mudas de qualidade, com garantia de identidade genética e controle de gerações (BRASIL, 2003).

A atividade de análise de sementes, realizada em laboratórios oficiais e os credenciados pelo MAPA, tem por finalidade determinar a identidade e a qualidade de uma amostra de sementes por meio de métodos, padrões e procedimentos oficializados e estabelecidos para cada espécie. Como atividade integrante do SNSM, a análise de sementes é obrigatória para o comércio, o transporte, a utilização e a fiscalização de sementes para fins de produção, sendo essencial para a disponibilização de sementes com identidade genética e de qualidade (BRASIL, 2003).

No caso das sementes de café, as Regras para Análise de Sementes (RAS) estabelecem um período de 30 dias para a realização do teste de germinação, obtenção do resultado e a emissão do boletim de análise, sendo este necessário à comercialização das sementes aos produtores de mudas (BRASIL, 2009). No entanto, este período de 30 dias é considerado longo, tendo em vista que as sementes de café apresentam lenta germinação e a produção das mudas também é lenta, demandando um período mínimo de seis meses para a obtenção das mudas prontas para o plantio (ROSA et al., 2010).

Nesse contexto, é legalmente permitido o uso do teste de tetrazólio, caracterizado pela sua rapidez para aferição da viabilidade das sementes de café, por meio da avaliação de embriões, de acordo com a Instrução Normativa IN - nº 35, de 29 de novembro de 2012, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2012). Porém, ainda existem dúvidas sobre o real potencial do teste para estimar a qualidade das sementes com diferentes níveis de qualidade. As maiores diferenças entre os resultados do teste de tetrazólio e de germinação são mais frequentes em sementes de pior qualidade. Essas diferenças têm sido atribuídas à provável maior sensibilidade às condições de estresse dos endospermas em relação aos embriões (COELHO et al., 2015; DUSSERT et al., 2006; FIGUEIREDO, 2016; PEREIRA, 2017).

Segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), a coloração pode ser realizada após a extração dos embriões ou apenas com a exposição dos mesmos sem retirá-los do endosperma. Nesse sentido, Zonta et al. (2009) compararam as diferentes metodologias do teste de tetrazólio utilizadas em sementes de café. Os autores avaliaram a exposição da porção do endosperma que contém o embrião e a exposição do embrião à solução de tetrazólio a 0,1%, durante 16 horas a 35°C. Os resultados obtidos indicaram que a metodologia realizada com a retirada total do embrião do endosperma é mais promissora para a avaliação da viabilidade e do vigor de sementes de café, com valores equivalentes ao teste de germinação. Enquanto a coloração da porção do endosperma que contém os embriões apresentaram problemas quanto à coloração, gerando dúvidas durante a avaliação da viabilidade das sementes.

Realizado em menor tempo, o teste de tetrazólio minimiza a ação de possíveis fatores adversos que possam vir a interferir na avaliação dos embriões, como por exemplo, o ataque de micro-organismos que se desenvolvem durante o teste de germinação em papel, e prejudica a correta avaliação das plântulas. Isso resulta em discrepâncias encontradas entre os resultados dos dois testes (CLEMENTE et al., 2011), principalmente em sementes de pior qualidade fisiológica.

Pelo exposto, objetivou-se avaliar a aplicabilidade do teste de tetrazólio para estimar a viabilidade de sementes de café com diferentes tipos de estresse e níveis de qualidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Frutos da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo IAC 62, foram colhidos na maturidade fisiológica (cereja) em lavouras da Fazenda Experimental da Fundação Procafé em Varginha - MG e transportados para a Universidade Federal de Lavras, onde foram despulpados mecanicamente. As sementes foram, então, desmuciladas por fermentação em água, por período de 24 horas em temperatura ambiente e, posteriormente, dispostas em camada única em uma tela, mantidas à sombra durante a pré-secagem para a retirada da umidade superficial.

Após o processamento, as sementes foram submetidas à determinação do teor de água inicial e à avaliação da qualidade fisiológica inicial, por meio dos testes de germinação e teste de viabilidade em solução de tetrazólio, no Laboratório Central de Sementes da UFPA.

2.2 Obtenção de sementes com diferentes níveis de qualidade

Após avaliação inicial, as sementes recém-colhidas foram submetidas a diferentes condições de estresse para obtenção de sementes com diferentes níveis de qualidade. Para isso, foram utilizadas metodologias distintas, visando obter três níveis de qualidade das sementes de café. Para o melhor nível de qualidade, em todos os tipos de estresse, foram utilizadas sementes secadas à sombra até atingirem 12% de teor de água.

2.2.1 Estresse por diferentes tipos de processamento

Foram utilizados dois métodos de processamento das sementes de café. Parte das sementes recém-colhidas foi desmucilada e secada em secador sob temperatura de 35°C até atingirem 12% de teor de água. A outra parte foi submetida à secagem nos próprios frutos (café natural), em secador a 35°C até atingirem 12% de teor de água com posterior retirada da polpa, conforme Isquierdo et al. (2013).

2.2.2 Estresse por envelhecimento artificial

As sementes recém-colhidas e secadas à sombra até atingirem 12% de teor de água, foram submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial, definidos de acordo com resultados de experimentos preliminares realizados com sementes de café. Maiores diferenças fisiológicas foram encontradas quando as sementes de café permaneceram por quatro e oito dias em câmara de crescimento do tipo B.O.D a 42°C e 100% de UR.

As sementes foram dispostas sobre uma tela de alumínio fixada em caixa gerbox contendo 40 mL de água destilada, as quais foram tampadas para se obter 100% de umidade relativa em seu interior e mantidos em câmara de crescimento do tipo B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) a 42°C nos tempos preestabelecidos. Após cada período de envelhecimento, as sementes foram submetidas à determinação de umidade e ao teste de germinação, conforme Brasil (2009).

2.2.3 Estresse por secagem em alta temperatura

As sementes recém-colhidas foram submetidas a dois diferentes tratamentos de secagem.

Parte das sementes foi secada em secadores de camada fixa com ar aquecido a 50°C até atingir 30% de teor de água. Após atingir o teor de água de 30%, prosseguiu-se à secagem com ar aquecido a 40°C até as sementes atingirem 12% de teor de água, realizando assim o estresse por alta temperatura intermitente. A outra parte foi secada a 50°C até atingir 12% de teor de água, provocando, dessa maneira, o estresse por alta temperatura contínua, adaptado de Taveira et al. (2012).

2.2.4 Estresse por exposição à temperatura subzero

As sementes foram submetidas à temperatura subzero, de acordo com metodologias utilizadas por Coelho et al. (2015). Parte das sementes com 17% de teor de água, obtida após secagem em secador a 35°C, foi acondicionada em embalagens impermeáveis e mantidas no freezer (-20°C) por 24 horas. A outra parte das sementes, com 15 % de teor de água, obtidas após secagem natural à sombra, foi acondicionada em embalagens impermeáveis e colocadas no deep-freezer (-86°C) por 24 horas.

Após o período de 24 horas, as sementes foram retiradas das embalagens e descongeladas rapidamente, por imersão em banho-maria à temperatura de 40°C, durante 2 minutos, segundo metodologia proposta por Dussert (1999). Após o descongelamento e repouso para estabilização da temperatura de equilíbrio procedeu-se a retirada dos pergaminhos.

2.2.5 Estresse por armazenamento em condição não controlada

Sementes recém-colhidas e secadas à sombra até atingirem 12% de teor de água, foram submetidas a diferentes períodos de armazenamento em condição não controlada.

As sementes de café foram acondicionadas em sacos de papel trifoliado e armazenadas em condição não controlada por períodos de quatro e oito meses.

Após a obtenção dos lotes de sementes com diferentes tipos de estresse e níveis de qualidade, estas foram submetidas à determinação do teor de água e à avaliação da qualidade

fisiológica por meio do teste de germinação e teste de tetrazólio. No teste de germinação foram avaliadas, além da porcentagem de plântulas normais, a porcentagem de protrusão radicular, de plântulas com folhas cotiledonares expandidas e massa seca de plântulas.

2.3 Determinação do teor de água das sementes

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105°C durante 24 horas (BRASIL, 2009), utilizando-se duas subamostras de 10 sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem média (base seca).

2.4 Avaliações fisiológicas

- **Teste de germinação:**

Realizado com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, semeadas em papel de germinação umedecidos com água destilada na quantidade de duas vezes e meia o peso do papel seco. Os rolos de papel contendo as sementes foram acondicionados em germinador, regulado a 30°C, na presença de luz (BRASIL, 2009). Foram determinadas as porcentagens de protrusão radicular aos 15 dias, e de plântulas normais aos 30 dias após a semeadura, sendo computadas como plântulas normais, aquelas que apresentaram raiz principal e pelo menos duas raízes laterais. Ao final do teste de germinação, determinou-se, também, a porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias após a semeadura.

- **Massa seca de plântulas:**

A massa seca de plântulas foi realizada aos 45 dias após a semeadura, quando a parte aérea foi separada das raízes com auxílio de um bisturi, e o material vegetal colocado em sacos de papel e submetido à secagem em estufa de circulação forçada de ar à 60°C por 4 a 5 dias ou até massa constante. A massa seca foi determinada em balança de precisão.

- **Teste de tetrazólio:**

Sementes de café provenientes dos tratamentos de envelhecimento artificial permaneceram em água por 24 horas e para os demais tratamentos por 36 horas para a extração dos embriões. Os embriões extraídos foram mantidos em solução antioxidante de polivinilpirrolidona (PVP), lavados em água corrente e imersos em solução de tetrazólio a 0,5%, utilizando-se frascos escuros, sendo acondicionados em temperatura de 30°C por 3 horas (BRASIL, 2009; CLEMENTE et al., 2011). A análise da viabilidade dos embriões foi realizada com auxílio de uma lupa estereoscópica com aumento de 10 vezes para visualização do aspecto externo e interno após corte longitudinal, os quais foram classificados em viáveis ou inviáveis de acordo com a localização e extensão dos danos (BRASIL, 2009).

2.5 Delineamento experimental

As sementes submetidas às diferentes condições de estresse não apresentaram desempenho fisiológico similares dentro dos níveis de qualidade como foi planejado obter para compor o delineamento em esquema fatorial simples. Para atender aos objetivos do estudo, de analisar a interação entre os efeitos dos tipos de estresse e níveis de qualidade, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial hierárquico, sendo a primeira fonte de variação os cinco tipos de estresse das sementes (diferentes tipos de processamento, envelhecimento artificial, exposição à temperatura subzero, alta temperatura de secagem e armazenamento em condição não controlada) e a segunda fonte os três níveis de qualidade (nível 1 - alto, nível 2 - médio e nível 3 - baixo) correspondentes aos níveis de estresse dentro de cada tipo. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do perfil das sementes recém-colhidas

Os resultados das avaliações das sementes recém-colhidas, antes de serem submetidas aos diferentes tipos de estresse, encontram-se na Tabela 1. As sementes apresentavam 38,9% de teor de água e qualidade inicial de 90% de plântulas normais e 100% de embriões viáveis.

Estas sementes foram utilizadas como o tratamento de mais alto nível e, também foram submetidas aos diversos tipos de estresse e diferentes níveis de qualidade.

Tabela 1 - Valores médios da porcentagem de teor de água inicial (TI), de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MR), de massa seca da parte aérea (MPA) e de embriões viáveis no teste de tetrazólio (EV) das sementes de *Coffea arabica L.* recém-colhidas.

| Perfil | TI (%) | PR (%) | PN (%) | FC (%) | MR (%) | MPA (%) | EV (%) |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|
| Sementes recém-colhidas | 38,9 | 94 | 90 | 88 | 0,76 | 3,48 | 100 |

Fonte: Do autor (2018).

As sementes submetidas aos diferentes tipos de estresse, ou seja, por diferentes tipos de processamento, envelhecimento artificial, alta temperatura de secagem, exposição à temperatura subzero e por armazenamento em condição não controlada, não apresentaram desempenho fisiológico similares dentro dos níveis médio e baixo, como foi planejado obter para compor o delineamento em esquema fatorial simples. Assim, para atender aos objetivos do estudo, de analisar a interação entre os efeitos de tipos de estresse e níveis de qualidade, foi adotado nas análises de variância o esquema fatorial hierárquico, ou seja, os níveis de qualidade foram hierarquizados dentro de cada tipo de estresse, não sendo possível o esquema fatorial simples, o qual exige níveis balanceados. Pelos resultados das análises, houve efeito significativo do tipo de estresse isoladamente, bem como dos níveis de qualidade hierarquizados dentro de cada tipo de estresse, para todas as variáveis respostas analisadas (APÊNDICE A). Na Tabela 2 estão apresentados os resultados do teste de comparação de médias das variáveis de avaliação fisiológica das sementes provenientes de cada tipo de estresse.

Tabela 2 - Efeito isolado de cada tipo de estresse na porcentagem de plântulas normais (PN), de embriões viáveis em solução de tetrazólio (EV), de protrusão radicular (PR), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca de parte aérea (MSPA), de massa seca de raiz (MSR), de sementes de *Coffea arabica* L.

| Tipos de Estresse | Variáveis da qualidade fisiológica | | | | | |
|---|------------------------------------|--------|--------|--------|----------|---------|
| | PN (%) | EV (%) | PR (%) | FC (%) | MSPA (%) | MSR (%) |
| Tipos de processamento | 82 a | 85 a | 93 a | 77 a | 3,13 a | 0,55 a |
| Envelhecimento artificial | 80 a | 82 b | 92 a | 73 a | 3,00 a | 0,57 a |
| Exposição à temperatura sub-zero | 47 b | 78 c | 60 b | 42 b | 1,76 b | 0,34 b |
| Secagem em alta temperatura | 38 c | 65 d | 50 c | 35 c | 1,46 c | 0,27 c |
| Armazenamento em condição não controlada | 35 c | 54 e | 49 c | 32 c | 1,36 c | 0,28 c |
| CV | 8,74 | 5,17 | 6,09 | 9,87 | 10,23 | 11,37 |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2018).

De maneira geral, foi possível observar redução da qualidade fisiológica das sementes submetidas aos diferentes tipos de estresse, ou seja, por diferentes tipos de processamento, envelhecimento artificial, exposição à temperatura subzero, secagem em alta temperatura e armazenamento em condição não controlada, em todas as variáveis estudadas. O efeito negativo é mais intenso em sementes submetidas à temperatura subzero, à alta temperatura e àquelas armazenadas em condição não controlada.

No teste de germinação, foi possível observar que as sementes secadas e envelhecidas artificialmente resultaram em maiores porcentagens de protrusão radicular, de plântulas normais, de folhas cotiledonares expandidas, de massa seca da parte aérea e de massa seca da raiz. As sementes mais vigorosas, que resultaram em maiores porcentagens de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, foram também as submetidas a diferentes tipos de processamento e envelhecidas artificialmente.

No teste de tetrazólio das sementes, observou-se que a maior viabilidade dos embriões foi obtida em sementes submetidas a diferentes tipos de processamento, seguida do envelhecimento artificial.

Assim como para os resultados do teste de germinação, a porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio também foi menor nas sementes submetidas à temperatura subzero na secagem em alta temperatura e também para aquelas armazenadas em condição não controlada. Entretanto, nota-se que os resultados de viabilidade desses embriões foram

menos discrepantes do que a porcentagem de plântulas normais observada no teste de germinação. Isso indica que existe maior sensibilidade dos endospermas aos tipos de estresse, o que pode prejudicar o desenvolvimento da plântula de café. Esta maior sensibilidade dos endospermas de sementes de café, em relação aos embriões, também foi constatada em estudos sobre os efeitos da secagem, em que foi observado melhor desenvolvimento de embriões em cultura, do que de plântulas normais no teste de germinação, de sementes que sofreram estresse por secagem (DUSSERT; ENGELMANN, 2006).

Houve efeito significativo sobre a qualidade fisiológica, do nível de qualidade hierarquizado dentro de cada tipo de estresse às sementes de café e, desta forma, nas tabelas 3 a 7 estão apresentados os resultados das variáveis da qualidade, analisando, principalmente, a relação entre os resultados da germinação (plântulas normais) e de viabilidade no teste de tetrazólio.

Tabela 3 - Efeito do fator nível de qualidade hierarquizado dentro do fator estresse por diferentes tipos de processamento, sobre a qualidade fisiológica das sementes de *Coffea arabica L.*

| Estresse por diferentes tipos de processamento | | | | |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------|
| Variáveis da qualidade | Níveis de qualidade | | | Médias |
| | Nível 1 (Alto) | Nível 2 (Médio) | Nível 3 (Baixo) | |
| Plântulas normais | 87 a | 85 a | 74 b | 82 |
| Embriões viáveis | 93 a | 87 b | 76 c | 85 |
| Protrusão radicular | 95 a | 94 a | 91 a | 93 |
| Folhas cotiledonares expandidas | 81 a | 81 a | 68 b | 77 |
| Massa seca de parte aérea | 3,39 a | 3,47 a | 2,52 b | 3,13 |
| Massa seca de raiz | 0,66 a | 0,51 b | 0,49 b | 0,55 |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade

Fonte: Do autor (2018).

De modo geral, foi observado que os diferentes tipos de processamento utilizados para a obtenção de sementes com diferentes níveis de qualidade, proporcionaram sementes com níveis próximos de qualidade. Não houve diferença significativa entre os níveis alto e médio, exceto para as variáveis massa seca de raiz e embriões viáveis. Apenas as sementes classificadas como sendo de nível mais baixo apresentaram diferença significativa, quando comparadas às demais. Segundo Dussert e Engelmann (2006), o processo de secagem causa

estresse oxidativo, gerando espécies reativas de oxigênio, o que pode afetar a viabilidade e vigor das sementes de café.

Na avaliação de embriões viáveis, os valores foram comparáveis aos percentuais de plântulas normais obtidos no teste de germinação, indicando que para as sementes submetidas aos diferentes tipos de processamento, o teste de tetrazólio foi adequado para estimar a qualidade das sementes, nos níveis de qualidade estudados.

Para a variável protrusão radicular, não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de qualidade e, de acordo com embriões viáveis, observou-se efeito significativo entre os níveis alto, médio e baixo.

Na Tabela 4, estão apresentados os resultados da comparação de médias das variáveis da qualidade, para as sementes submetidas aos tratamentos de envelhecimento artificial.

Tabela 4 - Efeito do fator nível de qualidade hierarquizado dentro do fator estresse por envelhecimento artificial, sobre a qualidade fisiológica das sementes de *Coffea arabica* L.

| Estresse por envelhecimento artificial | | | | |
|---|----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------|
| Variáveis da qualidade | Níveis de qualidade | | | Médias |
| | Nível 1 Alto | Nível 2 Médio | Nível 3 Baixo | |
| Plântulas normais | 87 a | 78 b | 74 b | 80 |
| Embriões viáveis | 93 a | 75 b | 79 b | 82 |
| Protrusão radicular | 95 a | 96 a | 85 b | 92 |
| Folhas cotiledonares expandidas | 81 a | 71 b | 66 b | 73 |
| Massa seca de parte aérea | 3,39 a | 2,77 b | 2,83 b | 3,00 |
| Massa seca de raiz | 0,66 a | 0,55 b | 0,49 b | 0,57 |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade

Fonte: Do autor (2018).

Os tratamentos de envelhecimento artificial proporcionaram dois níveis distintos de qualidade, avaliados por todas as variáveis da qualidade, exceto pela porcentagem de protrusão radicular.

Observa-se mesma classificação das sementes em níveis de qualidade, por meio dos valores de plântulas normais e de embriões viáveis. As sementes apresentaram valores próximos no teste de germinação e tetrazólio, com mesma classificação em níveis de qualidade.

No entanto, observa-se tendência de superestimação da qualidade no teste de tetrazólio, no nível mais alto e mais baixo de qualidade, e subestimação no nível médio. Mas, de maneira geral, estes valores são comparáveis. Pelo teste de tetrazólio, foi possível observar que a porcentagem de embriões viáveis foi subestimada nas sementes classificadas como de médio nível de qualidade. O mesmo resultado pode ser observado para a porcentagem de plântulas normais, indicando que o envelhecimento artificial causa danos tanto nos endospermas quanto nos embriões das sementes de café.

Além dos danos causados pelo envelhecimento das sementes, a alta umidade, somada às temperaturas mais elevadas, contribui para a elevação da incidência de patógenos nas sementes (BRACCINI et al., 2008), podendo causar a deterioração e morte das mesmas, dificultando a avaliação do teste de germinação e comprometendo consideravelmente a germinação e a formação de mudas (CLEMENTE et al., 2011).

Na Tabela 5, estão apresentados os resultados para as sementes submetidas à secagem em alta temperatura.

Tabela 5 - Efeito do fator nível de qualidade hierarquizado dentro do fator estresse por secagem em alta temperatura, sobre a qualidade fisiológica das sementes de *Coffea arabica L.*

| Estresse por secagem em alta temperatura | | | | |
|---|----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------|
| Variáveis da qualidade | Níveis de qualidade | | | Médias |
| | Nível 1 Alto | Nível 2 Médio | Nível 3 Baixo | |
| Plântulas normais | 87 a | 20 b | 8 c | 38 |
| Embriões viáveis | 93 a | 66 b | 36 c | 65 |
| Protrusão radicular | 95 a | 36 b | 20 c | 50 |
| Folhas cotiledonares expandidas | 81 a | 16 b | 7 c | 35 |
| Massa seca de parte aérea | 3,39 a | 0,70 b | 0,30 c | 1,46 |
| Massa seca de raiz | 0,66 a | 0,09 b | 0,04 b | 0,09 |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade

Fonte: Do autor (2018).

Sementes submetidas aos tratamentos de secagem em alta temperatura sofreram danos severos, conforme se observa nos resultados do teste de germinação, pelos percentuais de plântulas normais das sementes dos níveis médio e baixo. Três níveis distintos de qualidade foram obtidos, o que foi confirmado por todas as variáveis, exceto massa seca de raiz, que classificou as sementes em apenas dois níveis de qualidade. Para as demais variáveis, a alta

temperatura de secagem proporcionou sementes com três níveis de qualidade (alto, médio e baixo), possivelmente por danos no sistema de membranas causados pela alta temperatura de secagem (MARQUES et al., 2008).

Comparando o teste de germinação (% de plântulas normais) com o teste de tetrazólio (% de embriões viáveis), observou-se que sementes com percentuais muito abaixo do limite de 70% considerado para a comercialização de sementes de café, apresentaram valores mais altos de viabilidade pelo teste de tetrazólio. Sementes classificadas como de nível médio de qualidade, com 20% de plântulas normais, apresentaram 66% de viabilidade. Sementes classificadas no nível baixo, com 8% de plântulas normais, também tiveram a qualidade superestimada pelo teste de tetrazólio, apresentando 36% de viabilidade. Nota-se, assim, que o teste de tetrazólio superestima a germinação das sementes com mais baixa qualidade fisiológica, provocada por estresses causados por secagem em alta temperatura.

De acordo com os resultados da tabela 6, foi possível separar as sementes submetidas à temperatura subzero em três níveis decrescentes de qualidade (alto, médio e baixo), de acordo com os resultados de todas as avaliações realizadas no teste de germinação, bem como pelo teste de tetrazólio em embriões de café.

Tabela 6 - Efeito do fator nível de qualidade hierarquizado dentro do fator estresse por exposição à temperatura subzero, sobre a qualidade fisiológica das sementes de *Coffea arabica* L.

| Estresse por exposição à temperatura subzero | | | | |
|---|----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------|
| Variáveis da qualidade | Níveis de qualidade | | | Médias |
| | Nível 1 Alto | Nível 2 Médio | Nível 3 Baixo | |
| Plântulas normais | 87 a | 53 b | 0 c | 47 |
| Embriões viáveis | 93 a | 78 b | 65 c | 78 |
| Protrusão radicular | 95 a | 85 b | 0 c | 60 |
| Folhas cotiledonares expandidas | 81 a | 46 b | 0 c | 42 |
| Massa seca de parte aérea | 3,39 a | 1,90 b | 0 c | 1,76 |
| Massa seca de raiz | 0,66 a | 0,35 b | 0 c | 0,34 |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade

Fonte: Do autor (2018).

As sementes classificadas como de nível alto de qualidade apresentaram maiores valores em todas as variáveis estudadas. À medida que a qualidade foi reduzida para nível médio e nível mais baixo, observou-se redução tanto na porcentagem de plântulas normais

quanto nas variáveis que estimam o vigor das sementes. Também foi observado que a temperatura subzero provocou estresses drásticos em sementes classificadas como de nível baixo, impedindo a germinação destas, tendo apresentado porcentagem zero de plântulas normais. Apesar dessas sementes terem apresentado desempenho fisiológico nulo no teste de germinação, estas apresentaram 65% de embriões viáveis no teste de tetrazólio, indicando uma superestimação da qualidade das sementes de nível baixo, por meio deste teste.

A baixa porcentagem de germinação pode ser reflexo da alta sensibilidade dos endospermas às condições adversas em que as sementes foram submetidas, como foi observado por Coelho et al. (2015), sugerindo que os endospermas são mais susceptíveis aos estresses causados por altas temperaturas de secagem e, pelos resultados observados em nosso trabalho, os endospermas também são mais susceptíveis aos danos provocados pela temperatura subzero.

Na tabela 7 estão apresentados os resultados das análises dos efeitos de níveis de qualidade hierarquizados dentro dos tipos de estresse.

Tabela 7 - Efeito do fator nível de qualidade hierarquizado dentro do fator estresse por armazenamento em condição não controlada, sobre a qualidade fisiológica das sementes de *Coffea arabica* L.

| Estresse por armazenamento em condição não controlada | | | | |
|--|----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------|
| Variáveis da qualidade | Níveis de qualidade | | | Médias |
| | Nível 1 Alto | Nível 2 Médio | Nível 3 Baixo | |
| Plântulas normais | 87 a | 19 b | 0 c | 35 |
| Embriões viáveis | 93 a | 68 b | 4 c | 54 |
| Protrusão radicular | 95 a | 51 b | 0 c | 49 |
| Folhas cotiledonares expandidas | 81 a | 17 b | 0 c | 32 |
| Massa seca de parte aérea | 3,39 a | 0,70 b | 0 c | 1,36 |
| Massa seca de raiz | 0,66 a | 0,16 b | 0 c | 0,28 |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade

Fonte: Do autor (2018).

Pelos resultados apresentados na tabela 7, foi possível classificar as sementes em três níveis de qualidade (alto, médio e baixo) em todas as variáveis. Assim, como nas sementes submetidas aos estresses por exposição à temperatura subzero, naquelas armazenadas em condição não controlada também houve danos drásticos, tendo estas sementes apresentado porcentagem de germinação nula, no nível mais baixo de qualidade e de 19% no nível médio.

Ao serem comparados os resultados do teste de germinação com os do teste de tetrazólio, observa-se que este último superestimou a qualidade das sementes de mais alto nível e de nível médio de qualidade (TABELA 7). Já as sementes de nível mais baixo de qualidade, as quais apresentaram percentual nulo de plântulas normais, indicando morte das sementes, no teste de germinação, também apresentaram porcentagem praticamente nula, de 4% de viabilidade, indicando morte dos embriões. Este resultado difere do que foi observado para sementes que sofreram estresse por secagem em alta temperatura (TABELA 5), as quais também apresentaram baixíssimos percentuais de plântulas normais, mais alta viabilidade no teste de tetrazólio.

Neste trabalho foi observado um comportamento diferente entre os resultados de viabilidade pelos testes de tetrazólio e de germinação, quando as sementes foram submetidas aos diferentes tipos de estresse. De acordo com os resultados, o potencial do teste de tetrazólio para estimar a qualidade fisiológica de sementes de café é variável com o tipo de estresse ao qual as sementes foram expostas, e com os níveis de qualidade delas em função destes estresses. Em sementes com germinação acima de 70%, tais como as submetidas aos diferentes tipos de processamento (TABELA 3) e ao envelhecimento artificial (TABELA 4), o teste de tetrazólio apresenta resultados comparáveis, embora com tendência de superestimação. Já nas sementes submetidas aos estresses por secagem em alta temperatura (TABELA 5), por exposição à temperatura subzero (TABELA 6) e por armazenamento em ambiente não controlado (TABELA 7), cujos danos foram drásticos, o teste de tetrazólio apresenta resultados muito discrepantes e superestimados dos obtidos no teste de germinação. Embora as sementes de baixa qualidade tenham sofrido estes estresses drásticos, com desempenho fisiológico nulo no teste de germinação, estas apresentaram 65% de embriões viáveis no teste de tetrazólio após dano de congelamento em temperatura subzero e 4% após armazenamento em ambiente não controlado. Isto indica sensibilidades diferentes aos tipos de estresse das diferentes estruturas das sementes, ou seja, dos endospermas e dos embriões.

Resultados semelhantes foram encontrados por Coelho et al. (2015) ao comparar os dados do teste de tetrazólio em embriões de café com os de formação de plântulas normais. O melhor desempenho fisiológico dos embriões, em comparação às sementes inteiras, também corrobora com os resultados de Dussert et al. (2006), que mostraram que ocorre maior sensibilidade dos endospermas à secagem e à baixa temperatura, em comparação aos embriões zigóticos.

Em estudos realizados para investigar a formação de mudas de café a partir de sementes com baixos níveis de qualidade, foi constatado que os embriões extraídos destas sementes são capazes de formar plântulas normais quando cultivados isolados dos endospermas e que há fortes indícios de que estas estruturas aparentam ser mais sensíveis do que os embriões, aos estresses que levam à deterioração das sementes (PEREIRA, 2017). Este fato, corroborado por outros autores (COELHO et al., 2015; DUSSERT et al., 2006) confirma que os embriões podem ser menos sensíveis à deterioração do que os endospermas.

Finalmente, ressalta-se que a deliberação para o uso do teste de tetrazólio no Sistema de Produção de Sementes e Mudas, alternativamente ao teste de germinação, para aferir a qualidade de sementes de café e emitir o boletim de análise, deve ser revista, tendo em vista que os resultados podem diferir significativamente da real capacidade das sementes para produzir uma plântula normal.

4 CONCLUSÕES

O teste de tetrazólio superestima o potencial de sementes de café para produzir plântulas normais em baixo nível de qualidade fisiológica.

As discrepâncias entre os resultados de viabilidade no teste de tetrazólio e de plântulas normais no teste de germinação são variáveis com o nível de qualidade fisiológica e o tipo de estresse sofrido pelas sementes de café.

O uso do teste de tetrazólio no SNSM, alternativamente ao teste de germinação para aferir a qualidade de sementes de café deve ser revista, tendo em vista que os resultados podem diferir significativamente da sua real capacidade para produzir plântulas normais.

REFERÊNCIAS

- BRACCINI, A. L. et al. Conservação de sementes de café robusta (*Coffea canéfora* Pierre ex Frochner) cultivar conillon em função do grau de umidade e do tipo de embalagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 20, n. 2, p. 160-169, maio 2008.
- BRASIL. **Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004**. Aprova o Regulamento da Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças - SNSM, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/decreto/d5153.htm>. Acesso em: 22 jan. 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 35, de 29 de novembro de 2012**. Disponível em: <http://www.lex.com.br/legis_24015030_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_35_DE_29_DE_NOVEMBRO_DE_2012.aspx>. Acesso em: 28 ago. 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 36**. Aprova a tabela anexa, que fixa os valores dos serviços públicos de que trata a Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 dez. 2004, Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 2009. 399 p.
- CLEMENTE, A. C. S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, jul. 2011.
- COELHO, S. V. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, jun. 2015.
- DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. New determinants for tolerance of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. **CryoLetters**, Cambridge v. 27, n. 3, p. 169-178, May/June 2006.
- DUSSERT, S. et al. Oxidative stress, phospholipid and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 127, n. 4, p. 192-204, Apr. 2006.
- DUSSERT, S. Quantitative estimation of seed desiccation sensitivity using a quantal response model: application to nine species of the genus *Coffea* L. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 9, n. 2, p. 135-144, fev. 1999.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./Dec. 2011.
- FIGUEIREDO, M. A. **Secagem e resfriamento de sementes de Coffea arabica L. visando à criopreservação**. 2016. 45 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

ISQUIERDO, E. P. et al. Drying kinetics and quality of natural coffee. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, St. Joseph, v. 56, n. 3, p. 1003-1010, May 2013.

MARQUES, E. R. et al. Eficácia do teste de acidez graxa na avaliação da qualidade do café arábica (*Coffea arabica* L.) submetidos a diferentes períodos de temperatura e pré-secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1557-1562, set./out. 2008.

PEREIRA, C. C. **Cultura de embriões e germinação de sementes de diferentes níveis de qualidade para a produção de mudas de café**. 2017. 58 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

ROSA, S. D. V. F. et al. Staging coffee seedling growth: A rationale for shortening the coffee seed germination test. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 38, n. 2, p. 421-431, July 2010.

TAVEIRA, J. H. S. et al. Perfis proteicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 10, p. 1511-1517, out. 2012.

ZONTA, J. B. et al. Comparação de metodologias do teste de tetrazólio para sementes de cafeeiro. **Idesia**, Arica, v. 27, n. 2, p. 17-23, ago. 2009.

APÊNDICE A – Tabela da análise de variância do artigo 2

Tabela 1 - Resumo da análise de variância dos dados referentes a porcentagens de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MSR), de massa seca da parte aérea (MSPA) e de embriões viáveis no sal de tetrazólio (EV) de sementes de café submetidas a diferentes tipos de danos e níveis de qualidade.

| FV | GL | Quadrados Médios | | | | | | | |
|---|----|------------------|----------|---------|----------|--------|--------|----------|----------|
| | | PR | PN | PNF | FC | MSR | MSPA | EV | R |
| Tipo de dano | 4 | 5868,7** | 6134,0** | 693,9** | 5363,4** | 0,27** | 8,73** | 2007,4** | 0,0032** |
| Níveis de qualidade (Tipo de dano) | 10 | 5216** | 4677,3** | 194,4** | 4180** | 0,29** | 7,46** | 2647,4** | 0,005** |
| Erro | 45 | 17,46 | 24,11 | 18,55 | 26,08 | 0,002 | 0,04 | 14,28 | 0,0003 |
| CV (%) | - | 6,09 | 8,74 | 33,92 | 9,87 | 11,37 | 10,23 | 5,17 | 16,73 |

Fonte: Do autor (2018).

CAPÍTULO 4

ATIVIDADE DIFERENCIAL DE ENZIMAS DESIDROGENASES EM ENDOSPERMAS E EMBRIÕES ISOLADOS DE CAFÉ: PORQUE O TESTE DE TETRAZÓLIO PODE SUPERESTIMAR A GERMINAÇÃO

RESUMO

A avaliação da qualidade fisiológica de sementes de café é de grande importância durante as etapas do processo produtivo e envolve testes de germinação, vigor e viabilidade. Em pesquisas recentes, tem sido confirmado que o teste de tetrazólio pode superestimar a qualidade, principalmente em sementes com mais baixo nível de qualidade. Diante das diferenças entre os resultados do teste de germinação e de tetrazólio, objetivou-se neste trabalho avaliar as alterações fisiológicas, respiratórias e de enzimas desidrogenases em endospermas e em embriões de sementes de café, submetidas a diferentes tipos de estresse. Sementes da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo IAC 62 foram submetidas aos seguintes tratamentos: diferentes tipos de processamento, envelhecimento artificial, secagem em alta temperatura, exposição à temperatura subzero e armazenamento em condição não controlada. Foram realizadas avaliações por meio do teste de germinação e de tetrazólio, bem como a atividade respiratória e das enzimas específicas da respiração: malato desidrogenase (MDH), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), álcool desidrogenase (ADH), glutamato desidrogenase (GTDH), xantina desidrogenase (XDH) e diaforase (DIA). A qualidade fisiológica das sementes de café apresenta resultados distintos entre os testes de germinação, de tetrazólio e a atividade respiratória, variando de acordo com o tipo de estresse. O teste de tetrazólio superestima a germinação das sementes de baixa qualidade, principalmente quando as sementes são submetidas aos estresses por secagem em alta temperatura, exposição à temperatura subzero e armazenamento em ambiente não controlado. A atividade respiratória classificou as sementes em três níveis de qualidade para aquelas que foram armazenadas em condição não controlada. As enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase, álcool desidrogenase e glutamato desidrogenase apresentam maior atividade em embriões do que em endospermas de sementes de café. Ocorrem variações na atividade das isoformas das enzimas xantina desidrogenase e diaforase nos embriões e endospermas das sementes de café.

Palavras-chave: Germinação. Tetrazólio. Deterioração. Enzimas da respiração.

ABSTRACT

The evaluation of the physiological quality of coffee seeds is of great importance during the stages of the production process, and involves tests of germination, vigor and viability. In recent research it has been confirmed that the tetrazolium test can overestimate the quality, especially in seeds with lower level of quality. In view of the differences between the germination and tetrazolium test results, the objective of this study was to evaluate the physiological, respiratory and enzymatic changes in endosperms and coffee seed embryos subjected to different types of stress. Seeds of the species *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo IAC 62 were submitted to the following treatments: different types of processing, artificial aging, drying at high temperature, exposure to sub-zero temperature and storage in uncontrolled condition. Evaluations were performed using the germination and tetrazolium test, as well as respiration and respiration-specific enzymes: malate dehydrogenase (MDH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), alcohol dehydrogenase (ADH), glutamate dehydrogenase (GTDH), xanthine dehydrogenase (XDH) and diaphorase (DIA). The physiological quality of coffee seeds presents different results between germination test, tetrazolium test and respiratory activity, varying according to the type of stress. The tetrazolium test overestimates the germination of low quality seeds, especially when the seeds are submitted to stresses by drying at high temperature, exposure to sub-zero temperature and storage in an uncontrolled environment. The respiratory activity classified the seeds into three levels of quality for those that were stored in an uncontrolled condition. The enzymes glucose-6-phosphate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase and glutamate dehydrogenase have higher activity in embryos than in coffee seed endosperms. Changes occur in the activity of the isoforms of the xanthine dehydrogenase and diaphorase enzymes in the embryos and endosperms of the coffee seeds.

Keywords: Germination. Tetrazolium. Deterioration. Respiration Enzymes.

1 INTRODUÇÃO

A avaliação da qualidade fisiológica de sementes de café durante as etapas do processo produtivo é de fundamental importância e envolve testes de germinação, vigor e viabilidade, sendo que a realização da análise e a emissão do boletim são atividades obrigatórias no Sistema Nacional de Produção de Sementes e Mudanças (SNSM) (BRASIL, 2003). Segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), é estabelecido um período de 30 dias entre a semeadura e a avaliação das plântulas, sendo necessária a emissão do boletim de análise para a comercialização das sementes aos produtores de mudas.

No entanto, o tempo de trinta dias, necessário para a avaliação da germinação de sementes de café é considerado longo, o que dificulta a rápida avaliação da qualidade de lotes comerciais. Assim, testes que possam reduzir o tempo de avaliação do potencial fisiológico das sementes de café, podem permitir a tomada de decisões antecipadas, durante as etapas do processo produtivo, diminuindo riscos e prejuízos.

Uma alternativa para a rápida determinação da viabilidade de sementes de café é o teste de tetrazólio, que se baseia na atividade das enzimas desidrogenases, as quais estão relacionadas com a atividade respiratória nas sementes (FOGAÇA et al., 2011).

As Regras de Análises de Sementes (BRASIL, 2009) prescrevem metodologias para o teste de tetrazólio que incluem ou não os endospermas na avaliação da viabilidade, mas a avaliação apenas dos embriões tem sido a mais utilizada. No entanto, há limitações para a utilização do teste de tetrazólio em sementes de café, tais como exigência por treinamento especial dos analistas e o fato de que os resultados são estimativos do potencial germinativo da semente. Além disso, e principalmente o teste de tetrazólio realizado em embriões de café, pode superestimar o valor da germinação, notadamente em sementes com nível de qualidade mais baixo, com indicativos de uma maior sensibilidade dos endospermas do que de embriões às condições de estresse (COELHO et al., 2015; DUSSERT; ENGELMANN, 2006; FIGUEIREDO, 2016; PEREIRA, 2017).

Outras formas de monitorar a qualidade fisiológica de sementes de café são por meio da medição da atividade respiratória e avaliação de variações bioquímicas nos perfis de enzimas específicas, já que segundo Albuquerque et al. (2009) a deterioração das sementes provoca mudanças na respiração, degrada e inativa enzimas, favorecendo a perda de viabilidade e vigor.

Com o avanço do processo de deterioração, ocorrem alterações na atividade de enzimas como fosfatases, desidrogenases, peroxidases, dentre outras (DEMIRKAYA; DIETZ; SIVRITEPE, 2010; DEMIRKAYA, 2013; KRANNER et al., 2010), estando a atividade dessas enzimas diretamente relacionada com a viabilidade das sementes. Sendo assim, os danos ocorridos nos endospermas e embriões podem afetar a qualidade destas (DEMIRKAYA, 2013; DEMIRKAYA; DIETZ; SIVRITEPE, 2010; PESKE; ROSENTHAL; MEDEIROS ROTA, 2003). Dentre as alterações enzimáticas mais frequentes durante o processo de deterioração, destacam-se mudanças na atividade respiratória, o que acarreta problemas à respiração e atividades gerais de síntese, provocando, conseqüentemente, problemas na germinação e no vigor das sementes.

Segundo Taiz e Zeiger (2013) a atividade respiratória é a principal produtora de energia para a continuidade do metabolismo. A respiração consiste na oxidação completa de compostos de carbono a CO₂ e água, por meio de uma série de reações, usando oxigênio como acceptor final de elétrons. Sucintamente, é a oxidação de compostos orgânicos para a produção de energia e compostos secundários. A energia é liberada e conservada na forma de ATP, o qual pode ser prontamente utilizado para a manutenção e o desenvolvimento da semente.

As reações metabólicas da respiração envolvem o ciclo da glicólise, de Krebs, a fosforilação oxidativa e a rota pentose fosfato com a contribuição de enzimas na regulação de cada rota (TAIZ; ZEIGER, 2013). Assim, a ativação dos sistemas enzimáticos é extremamente importante para o desenvolvimento e germinação das sementes, pois as enzimas estão envolvidas no processo respiratório e na digestão de reservas, produzindo energia para a biossíntese de novos tecidos (BEWLEY; BLACK, 1994).

Entre as enzimas frequentemente associadas ao processo de deterioração das sementes, destacam-se aquelas que atuam no processo de respiração, a exemplo da malato desidrogenase (MDH), álcool desidrogenase (ADH), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), diaforase (DIA), xantina desidrogenase (XDH) ou aquelas envolvidas no metabolismo de ligação nitrogênio-carbono, fundamentais no processo de germinação de sementes como a glutamato desidrogenase (GTDH).

Dessa forma, alterações em enzimas específicas vêm sendo estudadas, dentro da área de biotecnologia de sementes, a fim de encontrar indicadores confiáveis relacionados com o potencial fisiológico das sementes de café e esclarecer os processos que levam à deterioração das mesmas.

Assim, objetivou-se com este trabalho, avaliar as alterações fisiológicas, respiratórias e enzimáticas em endospermas e embriões de sementes de café que foram submetidas a diferentes tipos de estresse.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Colheita dos frutos e obtenção das sementes

Sementes da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo IAC 62, de frutos colhidos em lavouras da Fazenda Experimental de Varginha – Fundação Procafé (Programa Integrado de Apoio à Tecnologia Cafeeira) foram processados na Universidade Federal de Lavras.

Os frutos foram despulpados mecanicamente e as sementes desmuciladas por via úmida, por meio de fermentação em água, por período de 24 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram secadas superficialmente à sombra e levadas ao Laboratório Central de Sementes (LAS) para determinação do teor de água e avaliação da qualidade inicial, por meio dos testes de germinação e teste de tetrazólio.

2.2 Obtenção de sementes com diferentes níveis de qualidade

Após avaliação inicial, as sementes recém-colhidas foram submetidas a diferentes tipos de condições adversas para a obtenção de sementes com diferentes níveis de qualidade. Para isso, foram utilizadas metodologias distintas, visando obter diferenças na qualidade das sementes de café. Para o melhor nível de qualidade, foram utilizadas sementes secadas à sombra até atingirem 12% (bu).

2.2.1 Estresse por diferentes tipos de processamento

Foram utilizados dois métodos de processamento das sementes de café. Parte das sementes recém-colhidas foi desmucilada e secada em secador sob temperatura de 35°C até atingirem 12% (bu). A outra parte foi submetida à secagem nos próprios frutos (café natural), em secador a 35°C até atingirem 12% (bu) com posterior retirada da polpa, conforme Isquierdo et al. (2013).

2.2.2 Estresse por envelhecimento artificial

As sementes recém-colhidas e secadas à sombra até atingirem 12% (bu), foram submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial, definidos de acordo com resultados de experimentos preliminares realizados com sementes de café. Maiores diferenças fisiológicas foram encontradas quando as sementes de café permaneceram por quatro e oito dias em câmara de crescimento do tipo B.O.D a 42°C e 100% de UR.

As sementes foram dispostas sobre uma tela de alumínio fixada em caixa gerbox contendo 40 mL de água destilada, as quais foram tampadas para se obter 100% de umidade relativa em seu interior e mantidas em câmara de crescimento do tipo B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) a 42°C nos tempos preestabelecidos.

2.2.3 Estresse por secagem em alta temperatura

As sementes recém-colhidas foram submetidas a dois diferentes tratamentos de secagem.

Parte das sementes foi secada em secadores de camada fixa com ar aquecido a 50°C até atingir 30% (bu), após atingir 30% (bu), prosseguiu-se à secagem com ar aquecido a 40°C até as sementes atingirem 12% (bu) realizando, assim, o estresse por alta temperatura intermitente. A outra parte foi secada a 50°C até atingir 12% (bu) provocando, dessa maneira, o estresse por alta temperatura contínua, adaptado de Taveira et al. (2012).

2.2.4 Estresse por exposição à temperatura subzero

As sementes foram submetidas à temperaturas subzero, de acordo com metodologias utilizadas por Coelho et al. (2015). Parte das sementes com 17% (bu), obtida após secagem em secador a 35°C, foi acondicionada em embalagens impermeáveis e mantidas no freezer (-20°C) por 24 horas. A outra parte das sementes com 15% (bu), obtidas após secagem natural à sombra, foi acondicionada em embalagens impermeáveis e colocadas no deep-freezer (-86°C) por 24 horas.

Após o período de 24 horas, as sementes foram retiradas das embalagens e descongeladas rapidamente, por imersão em banho-maria a temperatura de 40°C, durante 2

minutos, segundo metodologia proposta por Dussert (1999). Após o descongelamento e repouso para estabilização da temperatura de equilíbrio procedeu-se a retirada dos pergaminhos.

2.2.5 Estresse por armazenamento em condição não controlada

Sementes recém-colhidas e secadas à sombra até atingirem 12% de bu, foram submetidas a diferentes períodos de armazenamento em condição não controlada.

As sementes de café foram acondicionadas em sacos de papel trifoliado e armazenadas em condição não controlada por períodos de quatro e oito meses.

2.3 Determinação do teor de água das sementes

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105°C durante 24 horas (BRASIL, 2009), utilizando-se duas subamostras de 10 sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem média (base seca).

2.4 Análises fisiológicas

- **Teste de germinação:**

Realizado com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, semeadas em papel de germinação umedecidos com água destilada na quantidade de duas vezes e meia o peso do papel seco. Os rolos de papel contendo as sementes foram acondicionados em germinador regulado a 30°C, na presença de luz (BRASIL, 2009). Foram determinadas as porcentagens de plântulas normais aos 30 dias após a semeadura, sendo computadas como plântulas normais aquelas que apresentaram raiz principal e pelo menos duas raízes laterais.

- **Teste de tetrazólio:**

Sementes de café provenientes dos tratamentos de envelhecimento artificial permaneceram em água por 24 horas e para os demais tratamentos por 36 horas para a extração dos embriões. Os embriões extraídos foram mantidos em solução antioxidante de

polivinilpirrolidona (PVP), lavados em água corrente e imersos em solução de tetrazólio a 0,5%, utilizando-se frascos escuros, sendo acondicionados em temperatura de 30°C por 3 horas (BRASIL, 2009; CLEMENTE et al., 2011). A análise da viabilidade dos embriões foi realizada com auxílio de uma lupa estereoscópica com aumento de 10 vezes para visualização do aspecto externo e interno após corte longitudinal, os quais foram classificados em viáveis ou inviáveis de acordo com a localização e extensão dos danos (BRASIL, 2009).

- **Análise da atividade respiratória:**

Quatro repetições de 15 sementes foram pesadas e semeadas em papel de germinação (11x11 cm) umedecido com 2,5 vezes o peso do papel, em água destilada. Após a semeadura, os rolos contendo as sementes foram acondicionados em tubos Falcon de (50mL) com uma abertura na tampa vedada com uma borracha específica, impedindo trocas gasosas com o ambiente, mas permitindo a entrada de uma agulha para a retirada do ar por meio do aparelho PBI - Dansensor CHECKPOINT O₂/CO₂, que funciona com um leitor eletroquímico que absorve uma alíquota de 15 mL da atmosfera da amostra e instantaneamente realiza a leitura da porcentagem de dióxido de carbono (CO₂) e oxigênio (O₂), seguindo metodologia proposta por Pereira (2016).

Os valores de dióxido de carbono obtidos nas leituras, foram posteriormente divididos pela massa de sementes presentes no tubo e pelo tempo desde o vedamento até a leitura final, realizada após 48 horas, sendo os resultados expressos em %CO₂.g⁻¹.h⁻¹. Como medida de calibração manteve-se quatro tubos Falcon contendo apenas papel de germinação umedecido, sem as sementes (ensaio em branco).

2.5 Análises bioquímicas

- **Eletroforese de isoenzimas:**

Amostras de 50 endospermas e de 1500 embriões de cada tratamento foram acondicionadas, identificadas e armazenadas em deep-freezer a -86°C, para as análises de isoenzimas por meio da técnica de eletroforese. Os materiais foram macerados separadamente na presença de nitrogênio e PVP (polivinilpirrolidona) e armazenados em temperatura de -86°C até o momento das análises. Para a extração foi utilizado o tampão adequado para cada

enzima, na proporção de 320µL por 100mg de pó do material macerado. A solução foi homogeneizada em vórtex e mantida em geladeira por uma hora, seguido de centrifugação a 14.000 RPM por 60 minutos, a 4°C. Foram aplicados 50 µL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética ocorreu em um sistema descontínuo de géis de poliacrilamida (4,5% gel de concentração e 7,5% gel de separação) a 150V durante 6 horas. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o tris-glicina pH 8,9. Ao término da corrida, os géis foram revelados para as enzimas malato desidrogenase (MDH), glicose-6-fosfato desidrogenase (GPDH), álcool desidrogenase (ADH), xantina desidrogenase (XDH), diaforase (DIA) e glutamato desidrogenase (GTDH), conforme metodologia descrita por Alfenas (2006).

2.6 Delineamento experimental

As sementes submetidas às diferentes condições de estresses não apresentaram desempenho fisiológico similares dentro dos níveis de qualidade como foi planejado obter para compor o delineamento em esquema fatorial simples. Para atender aos objetivos do estudo, de analisar a interação entre os efeitos dos tipos de estresses e níveis de qualidade, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial hierárquico, sendo a primeira fonte de variação os cinco tipos de estresses das sementes (diferentes tipos de processamento, envelhecimento artificial, exposição à temperatura subzero, secagem em alta temperatura e armazenamento em condição não controlada) e a segunda fonte os três níveis de qualidade (nível 1- alto, nível 2 – médio e nível 3 - baixo) correspondentes aos níveis de estresse dentro de cada tipo. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliações fisiológicas

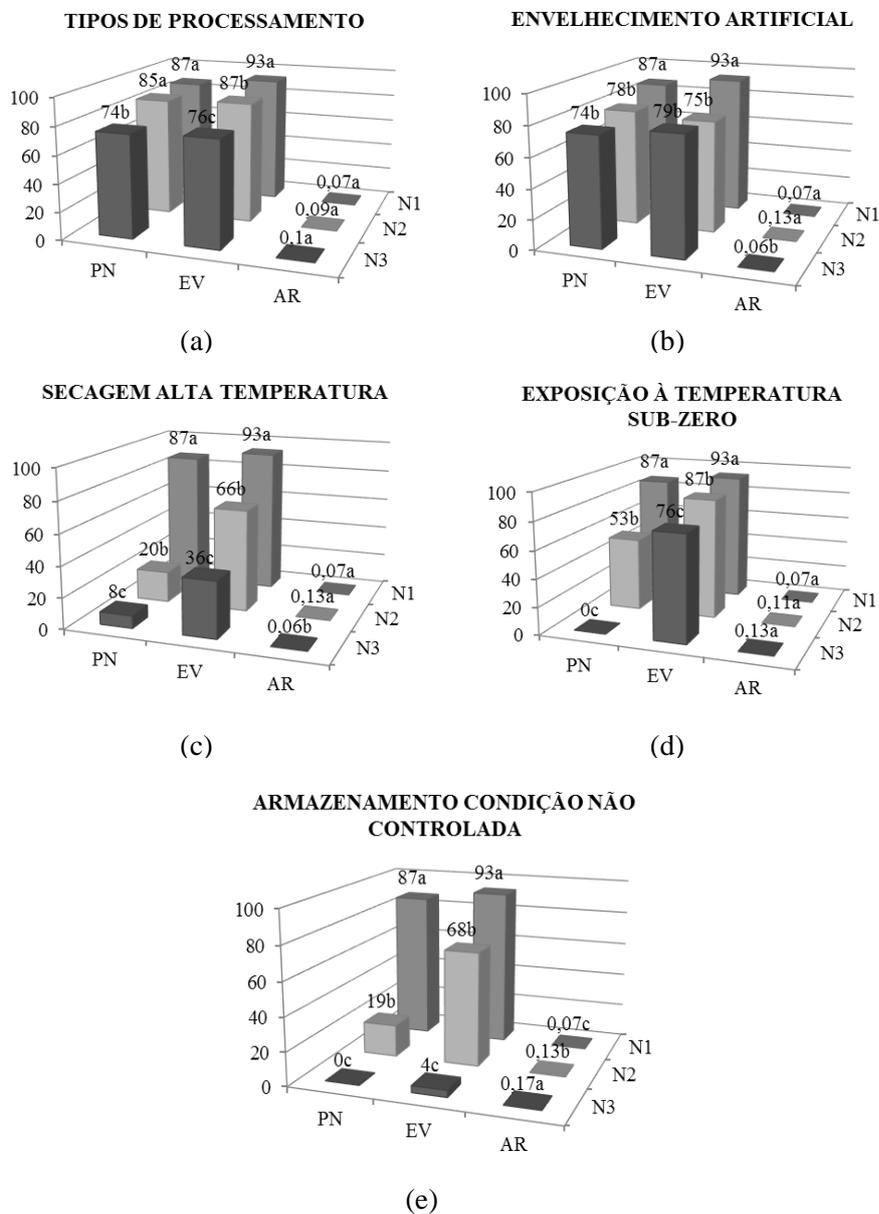
As sementes recém-colhidas apresentaram 90% de plântulas normais no teste de germinação e 100% de embriões viáveis no teste de tetrazólio.

Após as sementes serem submetidas aos diferentes tipos de estresse (por diferentes tipos de processamento, envelhecimento artificial, secagem em alta temperatura, exposição à

temperatura subzero e armazenamento em condição não controlada) foi possível classificá-las em diferentes níveis de qualidade (FIGURA 1).

Figura 1 - Resultados médios de plântulas normais (PN), de embriões viáveis (EV) e da atividade respiratória (AR) de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas aos diferentes tipos de estresse: por diferentes tipos de processamento (a), envelhecimento artificial (b), secagem em alta temperatura (c), exposição à temperatura sub-zero (d) e armazenamento em condição não controlada (e), classificadas em alto nível de qualidade (N1), médio nível de qualidade (N2) e baixo nível de qualidade (N3).

Fonte: Do autor (2018).



Quando as sementes foram submetidas ao estresse por diferentes tipos de processamento (FIGURA 1a) não foi possível observar diferença estatística entre alto e médio nível de qualidade, em relação à variável plântula normal. Apenas as sementes de baixo nível de qualidade diferiram estatisticamente, com redução de aproximadamente 15% de plântulas normais. Em relação à porcentagem de embriões viáveis pelo teste de tetrazólio, foi possível classificar as sementes nos níveis alto, médio e baixo, sendo os menores valores de embriões viáveis observados em sementes de médio (87%) e baixo (76%) nível de qualidade. A diferença entre os resultados do teste de germinação e do teste de tetrazólio foram relativamente pequenas, sendo o teste de tetrazólio um bom teste para avaliar a qualidade das sementes submetidas aos diferentes tipos de processamento. Já pela análise das concentrações de dióxido de carbono mensuradas a partir da respiração das sementes, não houve diferença significativa entre os níveis de qualidade estudados.

Pelos testes de germinação e de tetrazólio (FIGURA 1b) foi possível observar que o envelhecimento artificial classificou as sementes em apenas dois níveis de qualidade, sendo que o teste de tetrazólio apresentou tendência de superestimação da qualidade no nível mais alto e mais baixo de qualidade, e subestimação no nível médio. Para a variável atividade respiratória, apenas as sementes classificadas como de nível baixo apresentaram diferença significativa, com menor valor observado. Alterações responsáveis pela queda do vigor reduzem a taxa respiratória. Em pesquisas também tem sido observado que os mitocôndrios em sementes secas e no início do processo de embebição não têm um sistema organizado de membranas, e a reorganização ocorre à medida que a hidratação prossegue e os mitocôndrios se tornam mais eficientes na fosforilação oxidativa.

A atividade e integridade dos mitocôndrios de embriões viáveis aumentam a partir do início da embebição, o que torna mais eficiente a produção de ATP, refletindo a elevação do consumo de oxigênio e consequente elevação na produção de gás carbônico (BEWLEY; BLACK, 1994). Sendo assim, no lote mais vigoroso, as sementes tendem a respirar mais do que em lote com menor vigor em um mesmo período de tempo.

Com relação aos resultados obtidos no teste de germinação e no teste de tetrazólio das sementes submetidas ao processo de secagem em alta temperatura (FIGURA 1c), foi possível observar redução tanto na porcentagem de plântulas normais quanto na porcentagem de embriões viáveis das sementes com médio e mais baixo nível de qualidade, sendo essa redução mais severa na porcentagem de plântulas normais. Também pode-se observar que o teste de tetrazólio superestimou a germinação das sementes de médio e mais baixo nível de

qualidade, quando submetidas à alta temperatura de secagem. Já a atividade respiratória dessas sementes apresentou o mesmo comportamento daquelas envelhecidas artificialmente, sendo observadas diferenças estatísticas nas concentrações de CO₂ somente nas sementes com baixo nível de qualidade.

Quanto aos estresses de exposição à temperatura subzero (FIGURA 1d), as sementes foram classificadas em três níveis de qualidade (alto, médio e baixo) para as variáveis plântulas normais e embriões viáveis. Menores valores foram observados nos testes de germinação e tetrazólio em sementes com baixo nível de qualidade, sendo que estas apresentaram desempenho nulo no teste de germinação e 65% de embriões viáveis pelo teste de tetrazólio, indicando uma superestimação da germinação dessas sementes. Para a variável taxa respiratória não houve efeito significativo sobre a qualidade fisiológica das sementes.

Em sementes armazenadas em condição não controlada (FIGURA 1e) foi possível observar a separação das sementes em alto, médio e baixo nível de qualidade para todas as variáveis estudadas. Porém, os resultados da porcentagem de plântulas normais e embriões viáveis foram contrários aos da atividade respiratória em sementes de alto e baixo nível de qualidade. No teste de germinação foi possível observar que as sementes de baixo nível de qualidade sofreram estresses drásticos com a morte das sementes. O mesmo comportamento foi observado para o teste de tetrazólio, com somente 4% de embriões viáveis, indicando a morte dos embriões. Comparando a porcentagem de plântulas normais pelo teste de germinação com a porcentagem de viabilidade dos embriões pelo teste de tetrazólio, pode-se observar que há uma superestimação da qualidade das sementes pelo teste de tetrazólio em sementes de alto e médio nível de qualidade.

3.2 Avaliações bioquímicas

Avaliações bioquímicas nos endospermas e embriões de sementes de café submetidas aos diferentes tipos de tratamentos foram realizadas por meio da análise de padrões eletroforéticos de isoenzimas envolvidas no processo de respiração das sementes.

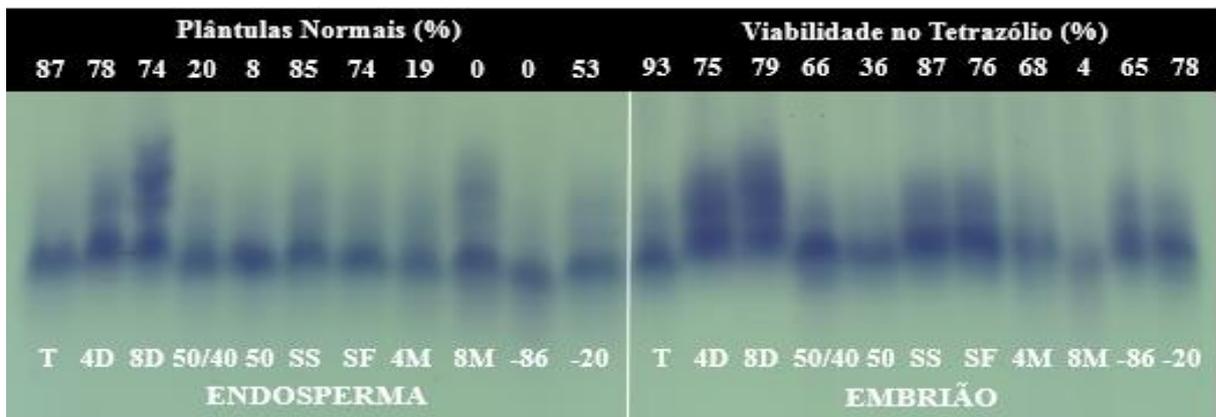
No perfil eletroforético da enzima malato desidrogenase (FIGURA 2), observa-se comportamentos distintos entre os endospermas e embriões das sementes de café submetidas a diferentes condições de estresse. As sementes que foram envelhecidas artificialmente por 4 (4D) e 8 (8D) dias e aquelas submetidas a diferentes tipos de processamento (SS) e (SF) apresentaram maior atividade da MDH nos embriões isolados do que nos endospermas. Estes

resultados corroboram com os resultados do teste de tetrazólio destes embriões (FIGURA 1) indicando que a maior atividade da malato desidrogenase corresponde à maior viabilidade destes. De acordo com Bewley e Black (1994), a atividade e a integridade das mitocôndrias de embriões viáveis aumentam a partir do início da embebição, tornando mais eficiente a produção de ATP, refletindo a elevação do consumo de oxigênio.

Em relação aos endospermas, também foi possível observar maior atividade da enzima MDH nos tratamentos de envelhecimento artificial por 4 (4D) e 8 (8D) dias, indicando que a maior atividade corresponde à maior viabilidade destas (FIGURA 1). Resultados similares foram encontrados por Santos et al. (2016) que, ao estudarem a qualidade fisiológica de sementes de milho por meio da atividade respiratória e enzimática, afirmaram que sementes vigorosas respiram mais comparadas àquelas menos vigorosas, o qual tem um alto consumo de O₂ e conseqüentemente um aumento na produção de CO₂. Para as sementes que foram armazenadas por 8 meses (8M) também foi possível observar alta atividade dessa enzima. No entanto, essa alta atividade pode estar relacionada à maior deterioração das sementes, como comprovada pelos resultados fisiológicos no teste de germinação e pela alta atividade respiratória (FIGURA 1). Caixeta et al. (2014), estudando o efeito do tempo de armazenamento em sementes de pimenta, também relataram que no oitavo mês de armazenamento houve aumento da atividade respiratória e maior atividade da enzima MDH, provavelmente devido as sementes estarem em estágios avançados de deterioração. O aumento na expressão da enzima MDH em diferentes locais das células pode estar diretamente relacionado com o aumento da respiração, que ocorre em sementes em estágios avançados de deterioração, uma vez que enzimas envolvidas na respiração podem ser ativadas em sementes de potencial fisiológico reduzido (SHATTERS JÚNIOR et al., 1994).

A MDH desempenha papel significativo no ciclo de Krebs, uma vez que catalisa a conversão de malato a oxaloacetato, produzindo NADH, que é um produto fundamental na produção de ATP e de compostos intermediários essenciais ao funcionamento das células (TAIZ; ZEIGER, 2013). Assim, essa enzima assume uma função importante em uma ampla variedade de reações biossintéticas, tais como a síntese de aminoácidos, gluconeogênese, manutenção dos potenciais redox e intercâmbio de metabólitos entre o citoplasma e as organelas, podendo ser expressa de forma diferente em sementes com diferentes níveis de deterioração e qualidade fisiológica.

Figura 2 - Atividade da enzima malato desidrogenase (MDH) em endospermas e embriões de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes condições de estresse: Envelhecimento artificial por 4 dias (4D) ou por 8 dias (8D); Secagem sob alta temperatura em 50°C até 30% bu seguida de 40°C até 12% bu (50/40) ou em 50°C até 12% bu (50); Secagem das sementes em 35°C até 12% bu (SS) ou Secagem das sementes nos frutos em 35°C até 12% bu (SF); Sementes armazenadas em 25°C por 4 meses (4M) ou por 8 meses (8M); Sementes com 17% bu expostas à -86°C (-86) ou sementes com 15% bu expostas à -20°C (-20). (T) Testemunha - semente secada até 12% bu. (G) Porcentagem de plântulas normais no teste de germinação. (TZ) Porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio.



Fonte: Do autor (2018).

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (FIGURA 3) apresentou maior atividade nos embriões quando as sementes foram submetidas a diferentes condições adversas em relação aos endospermas, independentemente do tratamento. A enzima G6PDH atua no processo de respiração celular, especificamente, na rota alternativa das pentoses monofosfatadas, sendo responsável pela manutenção de um nível adequado de NADPH nas células (SHAN-ZHI et al., 2005).

Baixa ou nenhuma atividade dessa enzima foi observada nos endospermas dos tratamentos (T), (50/40; 50), (-86; -20), e nos embriões dos tratamentos (50/40; 50), (8M). Porém, foi possível observar isoformas distintas nos endospermas das sementes dos tratamentos (50/40; 50), (SS), (-20). As maiores atividades foram observadas tanto nos embriões quanto nos endospermas das sementes envelhecidas por 8 dias (8D), sendo que os embriões das sementes envelhecidas por 4 dias (4D) também apresentaram alta atividade.

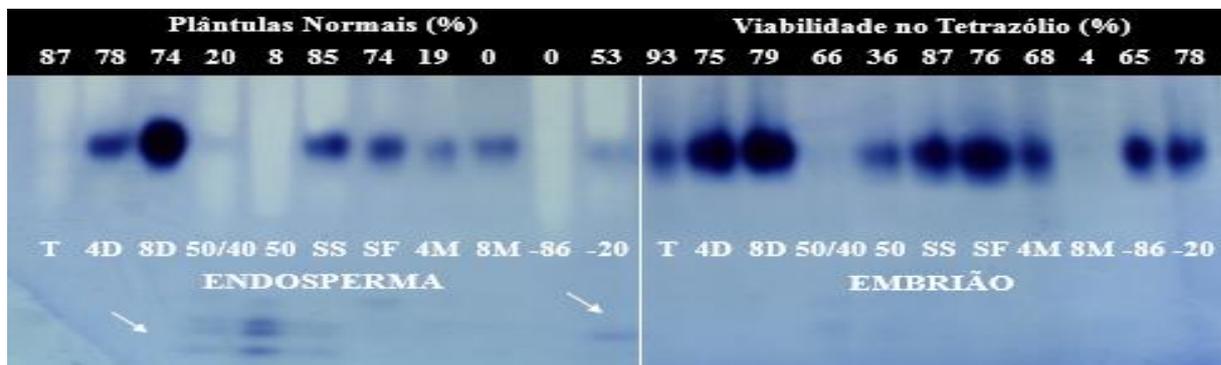
Mudanças nas rotas de respiração das sementes podem ocorrer durante as operações pós-colheita, já que estas são submetidas a diferentes condições de estresses, o que afeta a taxa de respiração. As mudanças nas rotas respiratórias podem determinar diferentes

atividades da G6PDH, já que essa enzima tem importante função na determinação do fluxo através da glicólise (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Em respostas a alguns tipos de estresses, como por exemplo, exposição das sementes em temperatura subzero (-86; -20), pode-se observar que a baixa ou nenhuma atividade nos endospermas dessas sementes pode estar associada ao baixo/nulo desempenho fisiológico no teste de germinação (FIGURA 1). A associação da atividade da G6PDH com a perda da qualidade também foi verificada em sementes de soja (MUNIZ et al., 2007). Comportamento oposto foi observado nos embriões (-86; -20), apresentando alta atividade dessa enzima, podendo essa maior atividade estar associada ao melhor desempenho fisiológico no teste de tetrazólio, com 65% e 78% de embriões viáveis.

Por ser a primeira enzima geradora de NADPH na rota das pentoses fosfatadas (WAKOO et al., 2008), células deficientes em G6PDH são altamente sensíveis ao estresse oxidativo, em comparação àquelas que expressam atividade endógena adequada da enzima (LIU et al., 2007), associado ao fato de a enzima G6PDH ser uma enzima reguladora da rota oxidativa (TAIZ; ZEIGER, 2013), o que permite supor que os estresses causados às sementes de café possivelmente resultaram em menor energia disponível para os processos de biossíntese durante a germinação.

Figura 3 - Atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em endospermas e embriões de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes condições de estresse: Envelhecimento artificial por 4 dias (4D) ou por 8 dias (8D); Secagem sob alta temperatura em 50°C até 30% bu seguida de 40°C até 12% bu (50/40) ou em 50°C até 12% bu (50); Secagem das sementes em 35°C até 12% bu (SS) ou Secagem das sementes nos frutos em 35°C até 12% bu (SF); Sementes armazenadas em 25°C por 4 meses (4M) ou por 8 meses (8M); Sementes com 17% bu expostas à -86°C (-86) ou sementes com 15% bu expostas à -20°C (-20). (T) Testemunha - semente secada até 12% bu. (G) Porcentagem de plântulas normais no teste de germinação. (TZ) Porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio.

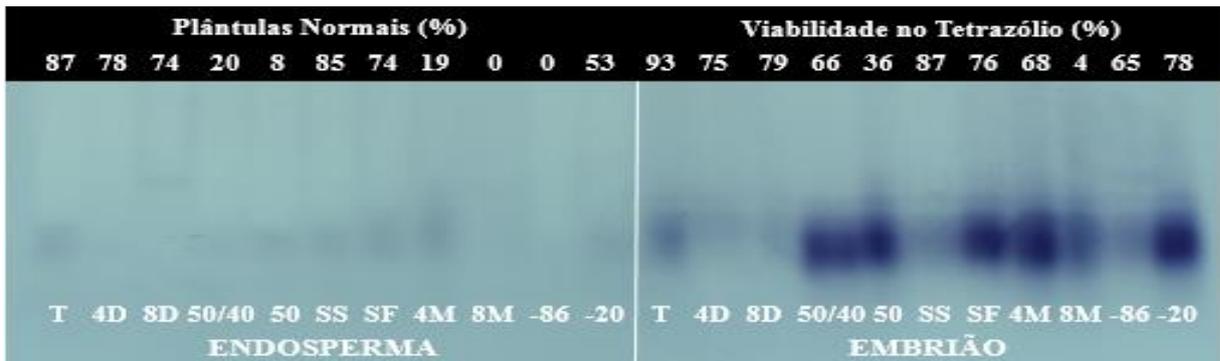


Fonte: Do autor (2018).

A enzima álcool desidrogenase (ADH) (FIGURA 4) exerce importante função no metabolismo anaeróbico de plantas, promovendo a redução do acetaldeído a etanol (TAIZ; ZEIGER, 2013). Ao comparar os endospermas e os embriões das sementes submetidas aos diferentes tipos de estresses, nota-se que os endospermas apresentaram baixa ou nenhuma atividade dessa enzima em todos os tratamentos estudados. Segundo Zhang et al. (1994), o acetaldeído acelera a deterioração das sementes, portanto, com a baixa atividade da ADH as sementes ficam menos protegidas contra a ação deletéria deste composto. Nesse sentido, Alves et al. (1997) destacam que os produtos finais do metabolismo fermentativo são tóxicos para as células, acumulam rapidamente e provocam distúrbios na organização celular, podendo levar a célula à morte, além da solubilização de lipídeos das membranas citoplasmáticas e das organelas pela ação do etanol.

Em relação aos embriões, foi possível observar que, independentemente do tratamento, houve maior atividade da enzima álcool desidrogenase em relação aos endospermas, sendo essa atividade mais intensa nos tratamentos (50/40; 50; SF; 4M; 8M e -20), porém, não houve correlação clara com a qualidade fisiológica. Camargo e Carvalho (2008), também verificaram que os perfis isoenzimáticos para a álcool desidrogenase (ADH) mostraram que não houve alteração no número e na intensidade de bandas que pudesse estar associada à qualidade fisiológica de sementes de milho doce.

Figura 4 - Atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH) em endospermas e embriões de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes condições de estresse: Envelhecimento artificial por 4 dias (4D) ou por 8 dias (8D); Secagem sob alta temperatura em 50°C até 30% bu seguida de 40°C até 12% bu (50/40) ou em 50°C até 12% bu (50); Secagem das sementes em 35°C até 12% bu (SS) ou Secagem das sementes nos frutos em 35°C até 12% bu (SF); Sementes armazenadas em 25°C por 4 meses (4M) ou por 8 meses (8M); Sementes com 17% bu expostas à -86°C (-86) ou sementes com 15% bu expostas à -20°C (-20). (T) Testemunha - semente secada até 12% bu. (G) Porcentagem de plântulas normais no teste de germinação. (TZ) Porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio.



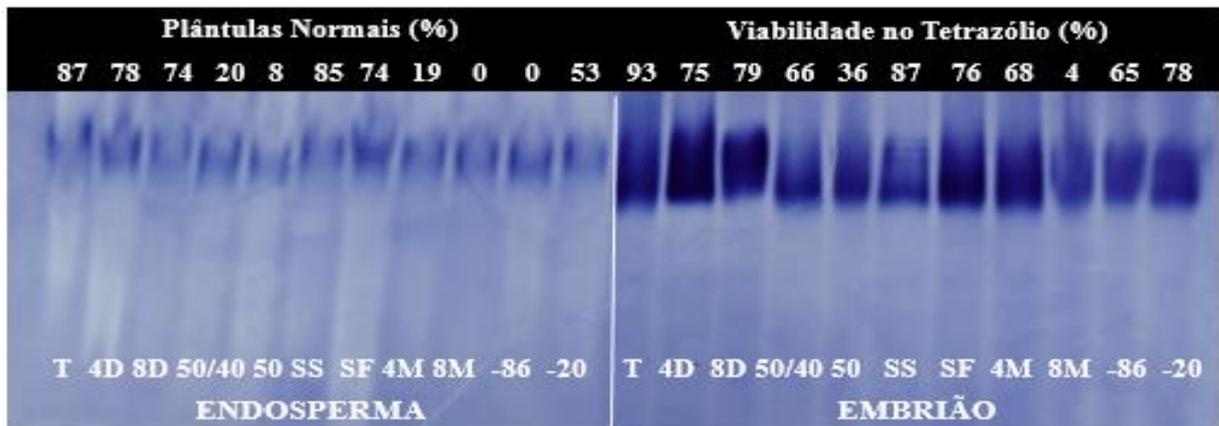
Fonte: Do autor (2018).

Pelo perfil eletroforético da enzima glutamato desidrogenase (FIGURA 5), observa-se maior atividade nos embriões quando comparados aos endospermas, independentemente do tratamento. Essa enzima atua na oxidação de aminoácidos (proteínas de reserva), fornecendo energia para as células (ciclo de Krebs), produção de NADPH e/ou na redução do α -cetoglutarato para a síntese de aminoácidos. Assim, a mesma pode ter importante papel na germinação de sementes fornecendo energia para o processo, ou aminoácidos para o desenvolvimento do embrião (SANTOS et al., 2004).

Para os endospermas, não houve variação na intensidade das bandas em nenhum dos tratamentos. Santos et al. (2005), analisando a atividade da enzima glutamato desidrogenase em diferentes cultivares de feijão, verificaram que estas se mantiveram estáveis durante o armazenamento.

Para os embriões, maior atividade da GTDH foi observada nos tratamentos (T) testemunha, (4D; 8D) sementes envelhecidas por 4 e 8 dias, (SF) secagem das sementes nos frutos em 35°C e (4M) sementes armazenadas em condição não controlada por 4 meses. Estes resultados estão relacionados com a alta viabilidade dos embriões, como pode ser constatado pelos resultados do teste de tetrazólio (FIGURA 1).

Figura 5 - Atividade da enzima glutamato desidrogenase (GTDH) em endospermas e embriões de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes condições de estresse: Envelhecimento artificial por 4 dias (4D) ou por 8 dias (8D); Secagem sob alta temperatura em 50°C até 30% bu seguida de 40°C até 12% bu (50/40) ou em 50°C até 12% bu (50); Secagem das sementes em 35°C até 12% bu (SS) ou Secagem das sementes nos frutos em 35°C até 12% bu (SF); Sementes armazenadas em 25°C por 4 meses (4M) ou por 8 meses (8M); Sementes com 17% bu expostas à -86°C (-86) ou sementes com 15% bu expostas à -20°C (-20). (T) Testemunha - semente secada até 12% bu. (G) Porcentagem de plântulas normais no teste de germinação. (TZ) Porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio.



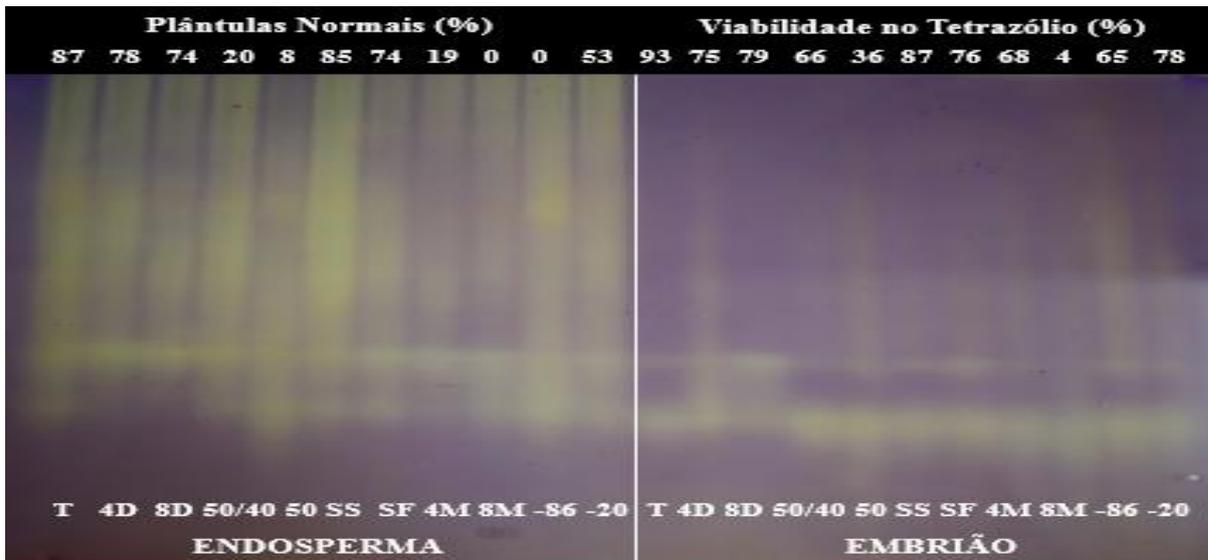
Fonte: Do autor (2018).

Analisando-se o perfil eletroforético da enzima xantina desidrogenase (FIGURA 6) foi possível observar a presença de duas isoformas nos endospermas e nos embriões das sementes submetidas aos diferentes tipos de estresse, com alteração no número e intensidade de bandas. A primeira isoforma está presente em todos os tratamentos dos endospermas e embriões, exceto para os embriões das sementes que foram armazenadas por 8 meses (8M), os quais não apresentaram atividade dessa enzima. Essa ausência de atividade pode ser explicada pela morte dos embriões durante o armazenamento dessas sementes, já que pelo teste de tetrazólio somente 4% dos embriões apresentaram-se viáveis. Pela análise da primeira isoforma pode-se observar também maior intensidade de bandas nos endospermas em relação aos embriões.

A segunda isoforma apresentou comportamento diverso ao da primeira, em relação à intensidade das bandas. Maior intensidade foi observada nos embriões. Pode-se observar, também, que não houve atividade da enzima xantina desidrogenase nos endospermas quando as sementes foram envelhecidas por 4 e 8 dias (4D; 8D).

A enzima XDH catalisa a oxidação da xantina na presença de NAD⁺ para a formação de ácido úrico e NADH, concomitantemente à formação de O₂⁻. Além disso, tem ação sobre uma variedade de purinas e aldeídos (CANTU-MEDELLIN; KELLEY, 2013).

Figura 6 - Atividade da xantina desidrogenase (XDH) em endospermas e embriões de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes condições de estresse: Envelhecimento artificial por 4 dias (4D) ou por 8 dias (8D); Secagem sob alta temperatura em 50°C até 30% bu seguida de 40°C até 12% bu (50/40) ou em 50°C até 12% bu (50); Secagem das sementes em 35°C até 12% bu (SS) ou Secagem das sementes nos frutos em 35°C até 12% bu (SF); Sementes armazenadas em 25°C por 4 meses (4M) ou por 8 meses (8M); Sementes com 17% bu expostas à -86°C (-86) ou sementes com 15% bu expostas à -20°C (-20). (T) Testemunha - semente secada até 12% bu. (G) Porcentagem de plântulas normais no teste de germinação. (TZ) Porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio.

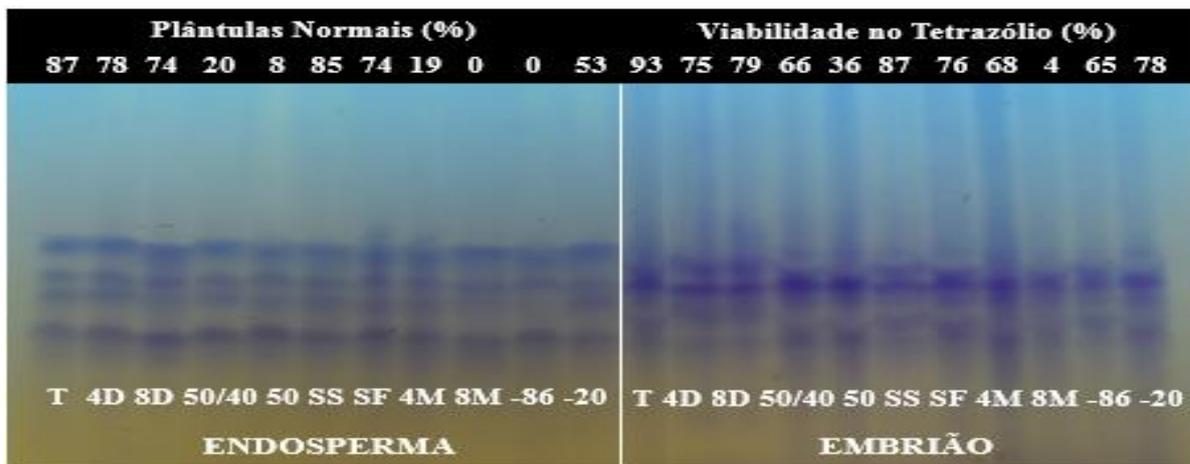


Fonte: Do autor (2018).

A enzima Diaforase catalisa a redução de vários corantes que atuam como aceitadores de hidrogênio a partir da forma reduzida de nucleotídeos de difosfopiridina e trifosfopiridina, isto é, NADH, NADPH (STRAUB, 1939). Pela análise do seu zimograma (FIGURA 7) foram observadas quatro isoformas nos endospermas e três isoformas nos embriões das sementes de café. A primeira isoforma está presente em todos os tratamentos dos endospermas e ausente nos embriões. A segunda e a terceira isoformas estão presentes em ambas as estruturas (endospermas e embriões) porém, com maior intensidade de bandas nos embriões. Na quarta isoforma, a intensidade das bandas foi constante nos endospermas e variou nos embriões.

De acordo com Tanksley e Orton (1983), a diaforase é codificada por quatro locos com um número variável de alelos, sendo seu zimograma bastante completo e de difícil interpretação. Segundo Yu e Kiang (1993), em sementes de soja, a diaforase é codificada por três locos, cada um possuindo de um a três alelos.

Figura 7 - Atividade da enzima diaforase (DIA) em endospermas e embriões de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes condições de estresse: Envelhecimento artificial por 4 dias (4D) ou por 8 dias (8D); Secagem sob alta temperatura em 50°C até 30% bu seguida de 40°C até 12% bu (50/40) ou em 50°C até 12% bu (50); Secagem das sementes em 35°C até 12% bu (SS) ou Secagem das sementes nos frutos em 35°C até 12% bu (SF); Sementes armazenadas em 25°C por 4 meses (4M) ou por 8 meses (8M); Sementes com 17% bu expostas à -86°C (-86) ou sementes com 15% bu expostas à -20°C (-20). (T) Testemunha - semente secada até 12% bu. (G) Porcentagem de plântulas normais no teste de germinação. (TZ) Porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio.



Fonte: Do autor (2018).

4 CONCLUSÕES

A qualidade fisiológica das sementes de café apresenta resultados distintos entre os testes de germinação, de tetrazólio e a atividade respiratória, variando de acordo com o tipo de estresse.

O teste de tetrazólio superestima a germinação das sementes de baixa qualidade, principalmente quando as sementes são submetidas aos estresses de secagem em alta temperatura, exposição à temperatura subzero e armazenamento em ambiente não controlado.

A atividade respiratória classificou as sementes em três níveis de qualidade para aquelas que foram armazenadas em condição não controlada.

As enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase, álcool desidrogenase e glutamato desidrogenase apresentam maior atividade em embriões do que em endospermas de sementes de café.

Ocorrem variações na atividade das isoformas das enzimas xantina desidrogenase e diaforase nos embriões e endospermas das sementes de café.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, K. S. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* K.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 249-258, set. 2009.
- ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627 p.
- ALVES, J. D. et al. **Fisiologia vegetal**. Lavras: UFLA, 1997. 131 p.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seed: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 36. Aprova a tabela anexa, que fixa os valores dos serviços públicos de que trata a Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 dez. 2004, Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 399 p.
- CAIXETA, F. et al. Physiological and biochemical alterations during germination and storage of habanero pepper seeds. **African Journal of Agricultural Research**, Nigéria, v. 9, n. 6, p. 627-635, Feb. 2014.
- CAMARGO, R.; CARVALHO, M. L. M. Armazenamento a vácuo de sementes de milho doce. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 30, n. 1, p. 131-139, dez. 2008.
- CANTU-MEDELLIN, N.; KELLEY, E. E. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: insights regarding where, when and how. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 34, n. 1, p. 19-26, Nov. 2013.
- CLEMENTE, A. C. S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, jul. 2011.
- COELHO, S. V. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, jun. 2015.
- DEMIRKAYA, M.; DIETZ, K. J.; SIVRITEPE, O. Changes in antioxidant enzymes during ageing of onion seeds. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, Cluj-Napoca, v. 38, n. 1, p. 49-52, June 2010.
- DEMIRKAYA, M. et al. Relationships between antioxidant enzymes and physiological variations occur during ageing of pepper seeds. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, Korea, v. 54, n. 2, p. 97-102, May 2013.

- DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. New determinants for tolerance of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. **CryoLetters**, Cambridge, v. 27, n. 3, p. 169-178, May/June 2006.
- DUSSERT, S. Quantitative estimation of seed desiccation sensitivity using a quantal response model: application to nine species of the genus *Coffea* L. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 9, n. 2, p. 135-144, Feb. 1999.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./Dec. 2011.
- FIGUEIREDO, M. A. **Secagem e resfriamento de sementes de Coffea arabica L. visando à criopreservação**. 2016. 45 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- FOGAÇA, C. A. et al. Teste de tetrazólio em sementes de *Copaifera langsdorffii* e *Schizolobium parahyba*. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 41, n. 4, p. 895-904, jun. 2011.
- ISQUIERDO, E. P. et al. Drying kinetics and quality of natural coffee. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, St. Joseph, v. 56, n. 3, p. 1003-1010, May 2013.
- KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, Cambridge, v. 188, n. 3, p. 655-673, Nov. 2010.
- LIU, Y. et al. Glucose-6-Phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in nitric oxide-involved defense against oxidative stress under salt stress in red kidney bean roots. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 48, n. 3, p. 511-522, Mar. 2007.
- MUNIZ, F. R. et al. Qualidade fisiológica de sementes de milho, feijão, soja e alface na presença de extrato de tiririca. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 2, p.195-204, jun. 2007.
- PEREIRA, C. C. **Cultura de embriões e germinação de sementes de diferentes níveis de qualidade para a produção de mudas de café**. 2017. 58 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.
- PEREIRA, D. S. **Tecnologias de pós-colheita em sementes de braquiária híbrida cv. Mulato II**. 2016. 67 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- PESKE, S. T.; ROSENTHAL, M. D.; MEDEIROS ROTA, G. R. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas: Rua Pelotas, 2003.
- SANTOS, C. M. R. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 110-119, jan. 2004.

SANTOS, C. M. R. et al. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 104-114, out. 2005.

SANTOS, H. O. et al. Physiological quality of hybrid maize seeds through respiratory and enzymatic activities. **African Journal of Agricultural Research**, Nigéria, v. 11, n. 20, p. 1879-1886, May 2016.

SHAN-ZHI, L. et al. Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in freezing induced freezing resistance of *Populus suaveolens*. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 31, p. 34-40, Feb. 2005.

SHATTERS JÚNIOR, R. G. et al. Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 4, p. 33-41, Sept. 1994.

STRAUB, F. Isolamento e propriedades de uma flavoproteína do tecido do músculo cardíaco. **Biochemical Journal**, New Delhi, v. 33 p. 787, 1939.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. Isoenzymes in plant genetics and breeding. **Developments in Plant Genetics and Breeding I**. Amsterdam: Elsevier Science, 1983. 197 p.

TAVEIRA, J. H. S. et al. Perfis proteicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 10, p. 1511-1517, out. 2012.

WAKKO, S. et al. Functional analyses of cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenases and their contribution to seed oil accumulation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Washington, v. 146, p. 277-288, Jan. 2008.

YU, H.; KIANG, Y. T. Genetic variation in South Korean natural populations of wild soybean (*Glycine soja*). **Euphytica**, Wageningen, v. 68, n. 3, p. 213-221, Jan. 1993.

ZHANG, M. et al. A mechanism of seed deterioration in relation to the volatile compounds evolved by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, p. 49-56, Mar. 1994.

CAPÍTULO 5

RELEVÂNCIA DO SISTEMA ENZIMÁTICO ANTIOXIDANTE EM ENDOSPERMAS E EMBRIÕES DE CAFÉ NA ESTIMAÇÃO DA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

RESUMO

Tendo em vista as discrepâncias existentes entre os resultados do teste de germinação e do teste de tetrazólio em sementes de café, objetivou-se, nesta pesquisa, avaliar as alterações fisiológicas e do sistema enzimático antioxidante em endospermas e em embriões de café, após estes serem submetidos a diferentes condições de estresse. Sementes recém-colhidas de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo IAC 62 foram submetidas aos seguintes tratamentos: diferentes tipos de processamento, envelhecimento artificial, secagem em alta temperatura, exposição à temperatura subzero e armazenamento em condição não controlada. A determinação da qualidade fisiológica das sementes foi realizada por meio do teste de germinação, avaliando-se a porcentagem de plântulas normais e a viabilidade dos embriões no teste de tetrazólio. Para as alterações bioquímicas nos endospermas e embriões, foram analisados os sistemas enzimáticos: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), peroxidase (PO) e isocitrato liase (ICL), por meio de perfil eletroforético de isoenzimas. Ocorrem discrepâncias entre os resultados do teste de germinação em sementes de café e os resultados do teste de tetrazólio nos embriões, sendo que a viabilidade é superestimada, principalmente em sementes com baixa qualidade fisiológica. Em sementes submetidas a diferentes tipos de estresses, embriões e endospermas isolados apresentam diferentes perfis eletroforéticos de isoenzimas do sistema antioxidante e da isocitrato liase. As enzimas catalase e isocitrato liase apresentam maior atividade em endospermas do que em embriões de sementes de café, sendo esta atividade associada à maior deterioração. Ocorrem variações na atividade das isoformas das enzimas superóxido dismutase e glutamato oxaloacetato transaminase nos embriões e endospermas das sementes de café. A enzima peroxidase não apresenta atividade em embriões de café.

Palavras-chave: Teste de germinação. Teste de tetrazólio. Estresse oxidativo. Isoenzimas.

ABSTRACT

Considering the discrepancies between the results of the germination test and the tetrazolium test in coffee seeds, the objective of this research was to evaluate the physiological and antioxidant enzyme system alterations in endosperms and coffee embryos after being submitted to different stress conditions. Freshly harvested seeds of *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo IAC 62 were submitted to the following treatments: different types of processing, artificial aging, drying at high temperature, exposure to sub-zero temperature and storage under uncontrolled conditions. The determination of the physiological quality of the seeds was carried out using the germination test, evaluating the percentage of normal seedlings and the viability of the embryos in the tetrazolium test. For the biochemical alterations in endosperms and embryos, the enzymatic systems: catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), peroxidase (PO) and isocitrate lyase (ICL) were analyzed by electrophoretic profile isoenzymes. There are discrepancies between the results of the germination test in coffee seeds and the results of the tetrazolium test in the embryos, and the viability is overestimated, especially in seeds with low physiological quality. In seeds submitted to different types of stresses, isolated embryos and endosperms present different electrophoretic profiles of isoenzymes of the antioxidant system and isocitrate lyase. The enzymes catalase and isocitrate lyase present higher activity in endosperms than in coffee seed embryos, and this activity is associated with greater deterioration. There are variations in the activity of the isoforms of the enzymes superoxide dismutase and glutamate oxaloacetate transaminase in the embryos and endosperms of the coffee seeds. The enzyme peroxidase has no activity in coffee embryos.

Keywords: Germination test. Tetrazolium test. Oxidative stress. Isoenzymes.

1 INTRODUÇÃO

Em muitas pesquisas tem sido demonstrado que a qualidade de sementes de café é influenciada pelas operações pós-colheita, tais como, secagem (COELHO et al., 2015; DUSSERT et al., 2006; ROSA et al., 2005), armazenamento (COELHO et al., 2015; DUSSERT et al., 2006; VIEIRA et al., 2007), envelhecimento artificial (PEREIRA, 2017), secagem em alta temperatura (TAVEIRA et al., 2012) e armazenamento em temperatura sub-zero (COELHO et al., 2015). Dessa forma, os eventos que ocorrem nessa fase podem interferir negativamente na qualidade fisiológica das sementes e devem ser rapidamente detectados para a prevenção.

A qualidade fisiológica de sementes de café é avaliada principalmente pelos testes de germinação e de tetrazólio e no Sistema Nacional de Produção de Mudas (SNSM) (BRASIL, 2003) o teste de germinação e a emissão do boletim de análise são atividades obrigatórias para a comercialização das sementes aos produtores. De acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), o período para a realização do teste de germinação de sementes de café é de 30 dias. No entanto, este período de trinta dias é considerado longo, o que dificulta a rápida avaliação da qualidade de lotes comerciais, podendo não refletir o verdadeiro estado fisiológico das sementes, devido à sua lenta germinação associada com a rápida perda de viabilidade.

Nesse contexto, o teste de tetrazólio, tem sido legalmente utilizado como alternativa para a determinação da viabilidade de sementes de café, com resultados em aproximadamente 48 horas (CLEMENTE; CARVALHO; GUIMARÃES, 2012; DIAS; SILVA, 1986; VIEIRA et al., 1998). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o teste de tetrazólio pode ser utilizado para a comercialização das sementes de café, porém, ainda existem dúvidas sobre a aplicabilidade do teste para estimar o potencial germinativo das sementes com diferentes níveis de qualidade. Em pesquisas recentes, tem sido confirmado que existem divergências entre os resultados do teste de tetrazólio e de germinação em sementes de café, principalmente em sementes de baixa qualidade, provavelmente pela maior sensibilidade dos endospermas à deterioração e a estresses do que os embriões (COELHO et al., 2015; DUSSERT et al., 2006; FIGUEIREDO, 2016), sendo que estes podem germinar e gerar plântulas normais, mesmo quando isolados de sementes deterioradas (PEREIRA, 2017).

De acordo com Silva et al. (2008) a germinação das sementes de café é mecanicamente limitada pelo endosperma, sendo necessário o amolecimento deste na região

micropilar ou endosperma *cap*, por meio da degradação dos polissacarídeos mananas e galacto-mananas, para que ocorra a protrusão e emergência da radícula. Em estudos da caracterização das fases da germinação das sementes e do crescimento das plântulas de café, Rosa et al. (2010) observaram que em sementes que apresentam alta porcentagem de germinação após sete dias da sementeira ocorre a protrusão da radícula através do endosperma, ou seja, a germinação *stricto sensu*, e aproximadamente aos quinze dias, é possível avaliar as raízes e hipocótilos. Possíveis diferenças na sensibilidade a estresses e no processo de deterioração de endospermas e embriões de café podem elucidar as discrepâncias entre os resultados do teste de germinação e de tetrazólio.

Desde o processo de maturação até as fases da pós-colheita, as sementes de café estão sujeitas a ocorrência de estresses, os quais podem resultar na peroxidação de compostos, reduzindo a viabilidade e acelerando a deterioração (CORBINEAU, 2012; HENDRY, 1993; OLIVEIRA et al., 2012; PARK et al., 2011), devido à formação de radicais livres, capazes de reagir com ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos, enzimas e outras macromoléculas, resultando na diminuição da composição lipídica, degradação e inativação de enzimas, redução da atividade respiratória, perda da integridade das membranas celulares e aumento na produção de compostos voláteis como aldeídos (COPELAND; MCDONALD, 2001; SHARMA et al., 2012; VIDIGAL et al., 2009).

O avanço do processo deteriorativo pode ser detectado pelas alterações na expressão de sistemas enzimáticos em endospermas e embriões de sementes de café quando submetidas às condições de estresses (DUSSERT et al., 2006; SHARMA et al., 2012). Essas ações deteriorativas devem ser identificadas e, se possível, erradicadas do processo produtivo para garantir a conservação da qualidade das sementes de café.

A reparação dos danos de membrana causados pela peroxidação oxidativa depende da atuação de um sistema enzimático composto principalmente pelas enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (PO). Estas atuam na remoção de radicais livres presentes nas células, neutralizando o oxigênio singlete e outros radicais livres, formados em condições de estresses (BERJAK, 2006; DUSSERT; ENGELMANN, 2006). Sistemas enzimáticos removedores de radicais livres têm sido utilizados como marcadores da deterioração e sua relação com o desempenho fisiológico permite um melhor entendimento da perda de qualidade de sementes.

Diante disso, objetivou-se nessa pesquisa avaliar as alterações fisiológicas e enzimáticas em endospermas e embriões de café, após as sementes serem submetidas a diferentes condições adversas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Colheita dos frutos e obtenção das sementes

A pesquisa foi conduzida no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, utilizando sementes da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo IAC 62, colhidas em lavouras da Fazenda Experimental de Varginha - Fundação Procafé (Programa Integrado de Apoio à Tecnologia Cafeeira).

Os frutos em estágio de maturação cereja foram seletivamente colhidos nos ramos médios das plantas e nas partes medianas dos ramos. Após a colheita dos frutos, esses foram novamente selecionados para uniformização do estágio de maturação e descascados mecanicamente. Após o descascamento, as sementes foram desmuciladas por fermentação em água por período de 24 horas a 25°C e posteriormente mantidas à sombra, durante a pré-secagem, para a retirada da umidade superficial. O teor de água inicial foi determinado e a qualidade fisiológica inicial avaliada por meio dos testes de germinação e teste de viabilidade em solução de tetrazólio (BRASIL, 2009).

2.2 Obtenção de sementes com diferentes níveis de qualidade

Após avaliação inicial, as sementes recém-colhidas foram submetidas a diferentes tipos de condições adversas, para a obtenção de sementes com diferentes níveis de qualidade. Para isso, foram utilizadas metodologias distintas, visando obter diferenças na qualidade das sementes de café. Para o melhor nível de qualidade, foram utilizadas sementes secadas à sombra até atingirem 12% (bu).

2.2.1 Estresse por diferentes tipos de processamento

Foram utilizados dois métodos de processamento e secagem das sementes de café. Parte das sementes recém-colhidas foi desmucilada e secada em secador sob temperatura de

35°C até atingirem 12% (bu). A outra parte foi submetida à secagem nos próprios frutos (café natural), em secador a 35°C, até atingirem 12% (bu) com posterior retirada da polpa, conforme Isquierdo et al. (2013).

2.2.2 Estresse por envelhecimento artificial

As sementes recém-colhidas e secadas à sombra até atingirem 12% (bu), foram submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial, definidos de acordo com resultados de experimentos preliminares realizados com sementes de café. Maiores diferenças fisiológicas foram encontradas quando as sementes de café permaneceram por quatro e oito dias em câmara de crescimento do tipo B.O.D a 42°C e 100% de UR.

As sementes foram dispostas sobre uma tela de alumínio fixada em caixa gerbox contendo 40 mL de água destilada, as quais foram tampadas para se obter 100% de umidade relativa em seu interior e mantidos em câmara de crescimento do tipo B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) a 42°C nos tempos pré-estabelecidos.

2.2.3 Estresse por secagem em alta temperatura

As sementes recém-colhidas foram submetidas a dois diferentes tratamentos de secagem.

Parte das sementes foi secada em secadores de camada fixa com ar aquecido a 50°C até atingir 30% (bu), após atingir 30% (bu), prosseguiu-se à secagem com ar aquecido a 40°C até as sementes atingirem 12% (bu), realizando assim o estresse por alta temperatura intermitente. A outra parte foi secada a 50°C até atingir 12% (bu), provocando dessa maneira o estresse por alta temperatura contínua, adaptado de Taveira et al. (2012).

2.2.4 Estresse por exposição à temperatura subzero

As sementes foram submetidas à temperatura subzero, de acordo com metodologias utilizadas por Coelho et al. (2015). Parte das sementes com 17% (bu), obtida após secagem em secador a 35°C, foi acondicionada em embalagens impermeáveis e mantidas no freezer (-20°C) por 24 horas. A outra parte das sementes com 15% (bu), obtidas após secagem natural a

sombra, foi acondicionada em embalagens impermeáveis e colocadas no deep-freezer (-86°C) por 24 horas.

Após o período de 24 horas, as sementes foram retiradas das embalagens e descongeladas rapidamente, por imersão em banho-maria a temperatura de 40°C, durante 2 minutos, segundo metodologia proposta por Dussert (1999). Após o descongelamento e repouso para estabilização da temperatura de equilíbrio procedeu-se a retirada dos pergaminhos.

2.2.5 Estresse por armazenamento em condição não controlada

Sementes recém-colhidas e secadas à sombra até atingirem 12% (bu), foram submetidas a diferentes períodos de armazenamento em condição não controlada.

As sementes de café foram acondicionadas em sacos de papel trifoliado e armazenadas em condição não controlada por períodos de quatro e oito meses.

Após a obtenção de cada tipo e nível de estresse, as sementes foram submetidas à determinação de umidade e ao teste de germinação, conforme Brasil (2009), bem como ao teste de tetrazólio, para avaliação da qualidade fisiológica. Determinações bioquímicas foram realizadas separadamente em endospermas e em embriões das sementes, por meio de eletroforese de isoenzimas.

2.3 Determinação do teor de água das sementes

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105°C durante 24 horas (BRASIL, 2009), utilizando duas subamostras de 10 sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem média (base seca).

2.4 Análises fisiológicas

- **Teste de germinação:**

Realizado com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, semeadas em papel de germinação umedecidos com água destilada na quantidade de duas vezes e meia o peso do papel seco. Os rolos de papel contendo as sementes foram acondicionados em

germinador, regulado a 30°C, na presença de luz (BRASIL, 2009). Foram determinadas as porcentagens de plântulas normais aos 30 dias após a semeadura, sendo computadas como plântulas normais aquelas que apresentaram raiz principal e pelo menos duas raízes laterais.

- **Teste de tetrazólio:**

Sementes de café provenientes dos tratamentos de envelhecimento artificial permaneceram em água por 24 horas e para os demais tratamentos por 36 horas para a extração dos embriões. Os embriões extraídos foram mantidos em solução antioxidante de polivinilpirrolidona (PVP), lavados em água corrente e imersos em solução de tetrazólio a 0,5%, utilizando-se frascos escuros, sendo acondicionados em temperatura de 30°C por 3 horas (BRASIL, 2009; CLEMENTE et al., 2011). A análise da viabilidade dos embriões foi realizada com auxílio de uma lupa estereoscópica com aumento de 10 vezes para visualização do aspecto externo e interno após corte longitudinal, os quais foram classificados em viáveis ou inviáveis de acordo com a localização e extensão dos danos (BRASIL, 2009).

2.5 Análises bioquímicas

- **Eletroforese de isoenzimas:**

Amostras de 50 endospermas, e de 1500 embriões, de cada tratamento, foram acondicionadas, identificadas e armazenadas em deep-freezer a -86°C, para as análises de isoenzimas por meio da técnica de eletroforese. Os materiais foram macerados separadamente na presença de nitrogênio e PVP (polivinilpirrolidona) e armazenados em temperatura de -86°C até o momento das análises. Para a extração, foi utilizado o tampão adequado para cada enzima, na proporção de 320µL por 100mg de pó do material macerado. A solução foi homogeneizada em vórtex e mantida em geladeira por uma hora, seguido de centrifugação a 14.000 RPM por 60 minutos, a 4°C. Foram aplicados 50 µL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética ocorreu em um sistema descontínuo de géis de poliácridamida (4,5% gel de concentração e 7,5% gel de separação) a 150V durante 6 horas. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o tris-glicina pH 8,9. Ao término da corrida, os géis foram revelados para as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), isocitrato liase

(ICL), peroxidase (PO), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), conforme metodologia descrita por Alfenas, (2006).

2.6 Delineamento experimental

As sementes submetidas às diferentes condições de estresse não apresentaram desempenho fisiológico similares dentro dos níveis de qualidade como foi planejado obter para compor o delineamento em esquema fatorial simples. Para atender aos objetivos do estudo, de analisar a interação entre os efeitos dos tipos de estresse e níveis de qualidade, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial hierárquico, sendo a primeira fonte de variação os cinco tipos de estresse das sementes (diferentes tipos de processamento, envelhecimento artificial, exposição à temperatura subzero, secagem em alta temperatura e armazenamento em condição não controlada) e a segunda fonte os três níveis de qualidade (nível 1 - alto, nível 2 - médio, nível 3 - baixo) correspondentes aos níveis de estresse dentro de cada tipo. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes recém-colhidas submetidas aos diferentes tipos de estresse para a obtenção de diferentes níveis de qualidade foram avaliadas quanto à qualidade fisiológica e atividade enzimática.

Inicialmente, as sementes foram submetidas à avaliação da qualidade fisiológica por meio da porcentagem de plântulas normais e embriões viáveis pelo teste de tetrazólio, cujos resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados médios de plântulas normais (PN) e de embriões viáveis (EV), de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas à diferentes condições de estresse.

| Tipos de Estresse | Variáveis da qualidade | Níveis de qualidade | | | Médias |
|---|------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------|
| | | Nível 1 (Alto) | Nível 2 (Médio) | Nível 3 (Baixo) | |
| Recém-colhidas (sem estresse) | PN | 90 | - | - | - |
| | EV | 100 | - | - | - |
| Tipos de processamento | PN | 87 a | 85 a | 74 b | 82 |
| | EV | 93 a | 87 b | 76 c | 85 |
| Envelhecimento artificial | PN | 87 a | 78 b | 74 b | 80 |
| | EV | 93 a | 75 b | 79 b | 82 |
| Secagem em alta temperatura | PN | 87 a | 20 b | 8 c | 38 |
| | EV | 93 a | 66 b | 36 c | 65 |
| Exposição à temperatura subzero | PN | 87 a | 53 b | 0 c | 47 |
| | EV | 93 a | 78 b | 65 c | 78 |
| Armazenamento em condição não controlada | PN | 87 a | 19 b | 0 c | 35 |
| | EV | 93 a | 68 b | 4 c | 54 |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade

Fonte: Do autor (2018).

De acordo com estes resultados (TABELA 1), pode-se constatar a boa qualidade fisiológica das sementes recém-colhidas, com 90% de plântulas normais e 100% de embriões viáveis. Mas, à medida que as sementes foram submetidas aos diferentes tipos de estresse, por diferentes tipos de processamento, envelhecimento artificial, secagem em alta temperatura, exposição à temperatura subzero e armazenamento em condição não controlada, foi possível observar a classificação das sementes em relação aos níveis de qualidade.

Pelo teste de germinação (TABELA 1) foi possível observar que quando as sementes foram submetidas aos diferentes tipos de processamento, não houve diferença significativa entre os níveis alto e médio de qualidade. Somente as sementes classificadas como de baixo nível apresentaram efeito significativo, com 74% de plântulas normais. Já a porcentagem de embriões viáveis, classificou as sementes em três níveis decrescentes de qualidade (alto, médio e baixo), sendo os níveis médio e baixo prejudiciais às sementes, devido à queda de qualidade das mesmas. Comparando-se os resultados da porcentagem de plântulas normais obtidos no teste de germinação com a porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio,

foram observadas pequenas diferenças entre os dois testes, indicando que o teste de tetrazólio pode ser utilizado para estimar a qualidade das sementes, nos níveis de qualidade estudados.

Os tratamentos de envelhecimento artificial proporcionaram sementes com dois níveis de qualidade, nas variáveis estudadas (TABELA 1). Maiores porcentagens de plântulas normais e embriões viáveis foram observadas em sementes com alto nível de qualidade, (87%) e (93%), respectivamente. Porém, há uma tendência de superestimação da qualidade no teste de tetrazólio no alto e baixo nível de qualidade, e subestimação no nível médio. Mas, de modo geral, estes valores são comparáveis. As sementes envelhecidas artificialmente apresentaram estatisticamente o mesmo resultado para as variáveis porcentagem de germinação e embriões viáveis, indicando sensibilidade tanto dos embriões quanto dos endospermas ao envelhecimento artificial nos níveis médio e mais baixo de qualidade.

As sementes submetidas à secagem em alta temperatura sofreram danos severos, como pode ser observado nos resultados do teste de germinação (TABELA 1), os quais foram reduzidos drasticamente nas sementes de médio e baixo nível de qualidade, apresentando somente 20% e 8% de plântulas normais, respectivamente. Também pelo teste de tetrazólio foi possível observar redução da viabilidade das sementes de médio e mais baixo nível de qualidade, porém, essa redução foi menos intensa quando comparada à porcentagem de plântulas normais no teste de germinação. Nota-se, assim, que o teste de tetrazólio superestima a germinação das sementes de médio e mais baixo nível de qualidade fisiológica, quando submetidas aos estresses por secagem em alta temperatura.

Com relação aos estresses de exposição à temperatura subzero (TABELA 1), pode-se observar que tanto os valores da porcentagem de plântulas normais quanto da porcentagem de embriões viáveis foram reduzidos no nível médio e baixo de qualidade, sendo que no nível mais baixo, a temperatura subzero provocou estresses drásticos nas sementes, impedindo a germinação destas. Apesar dessas sementes não terem desenvolvido plântulas normais no teste de germinação, estas apresentaram 65% de embriões viáveis no teste de tetrazólio, indicando uma superestimação da qualidade das sementes de nível baixo de qualidade.

As sementes que foram armazenadas em condição não controlada (TABELA 1) apresentaram comportamento semelhante àquelas submetidas ao estresse por exposição à temperatura subzero. Maior porcentagem de plântulas normais e embriões viáveis foram observados em sementes com alto nível de qualidade, seguida daquelas com médio e baixo. Pelo teste de germinação foi possível observar que as sementes de nível mais baixo de qualidade apresentaram desempenho fisiológico nulo, indicando morte das sementes e

somente 4% de embriões viáveis pelo teste de tetrazólio, indicando também que houve a morte dos embriões. Comparando os resultados do teste de germinação com os do teste de tetrazólio, observou-se que este superestimou a qualidade das sementes de alto e médio níveis de qualidade.

De modo geral, com base nos estresses de secagem em alta temperatura, exposição à temperatura subzero e armazenamento em condição não controlada (TABELA 1), foi possível classificar as sementes em três níveis de qualidade (alto, médio e baixo), por meio dos valores de plântulas normais e embriões viáveis. As sementes de baixa qualidade foram as que mais sofreram com estes tipos de estresse, principalmente nos tratamentos de exposição à temperatura subzero e armazenamento em condição não controlada. Embora estas sementes tenham sofrido danos drásticos, com desempenho fisiológico nulo no teste de germinação, as mesmas apresentaram 65% de embriões viáveis no teste de tetrazólio após congelamento em temperatura subzero, e 4% após armazenamento natural.

Coelho et al. (2015) e Dussert e Engelmann (2006) também observaram maior sobrevivência de embriões em relação às sementes inteiras, em estudos sobre criopreservação e secagem de sementes de café, indicando que o endosperma foi mais susceptível a danos, em comparação aos embriões das sementes de café.

Resultados semelhantes foram encontrados por Figueiredo (2016) ao comparar os resultados de viabilidade dos embriões com os de plântulas normais em sementes de café criopreservadas. De acordo com os resultados na Tabela 1, o potencial do teste de tetrazólio para estimar a qualidade fisiológica de sementes de café é variável com o tipo de estresse ao qual as sementes foram expostas e com níveis de qualidade dentro destes estresses.

Avaliações bioquímicas

As alterações bioquímicas nos endospermas e nos embriões de sementes de café foram avaliadas por meio da análise de padrões eletroforéticos de isoenzimas.

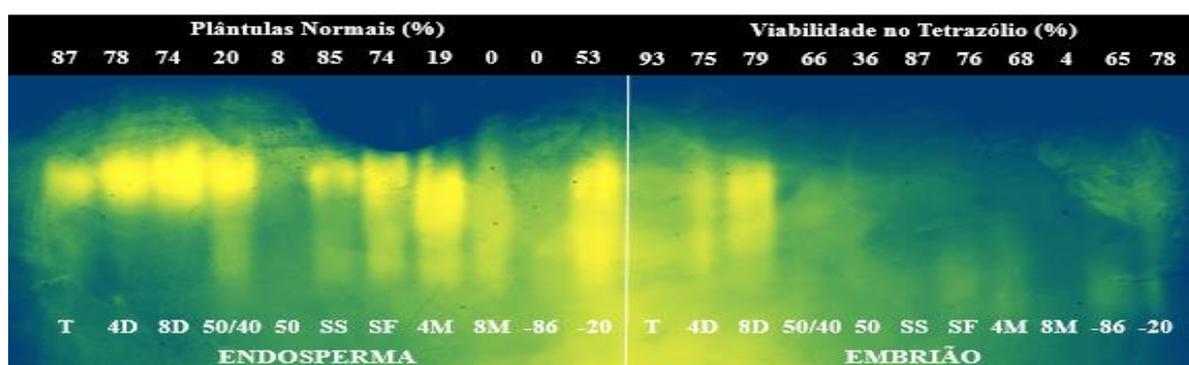
A enzima catalase (FIGURA 1) apresentou maior atividade nos endospermas quando as sementes foram submetidas a diferentes condições de estresse, em relação aos embriões, exceto para os tratamentos de envelhecimento artificial (E4) e (E8). Essa enzima é oxirredutora e atua na remoção de radicais livres, durante estresses oxidativos (BERJAK, 2006), assim a maior atividade pode estar associada à diminuição ou aumento de mecanismos de prevenção contra danos oxidativos.

Na secagem em alta temperatura, em sementes secadas em 50°C, houve baixa atividade da enzima catalase nos endospermas. Esse resultado foi também encontrado nos testes fisiológicos, em que sementes submetidas à alta temperatura (50°C) apresentaram baixa viabilidade e vigor. Além disso, esses resultados corroboram com os obtidos por Rosa et al. (2005), em que sementes secadas à 50°C possuem baixo desempenho fisiológico e menor atividade da enzima catalase. Segundo Ataíde et al. (2012), o decréscimo na atividade da enzima catalase pode ser atribuído à inativação progressiva ou redução e paralisação de sua síntese, resultando na redução da viabilidade e do vigor das sementes.

Já nos embriões, a atividade da enzima catalase foi maior quando as sementes foram envelhecidas artificialmente por 4 (4D) e 8 (8D) dias, indicando assim, que o envelhecimento artificial causa estresse tanto nos endospermas quanto nos embriões das sementes de café. Os demais tratamentos apresentaram baixa ou nenhuma atividade da enzima catalase, o que confirma que as condições de estresses em que as sementes foram submetidas causam danos muito mais significativos nos endospermas do que nos embriões.

A enzima catalase atua na remoção de H₂O₂ produzido por outras enzimas, sendo que sua função está relacionada com a proteção das células. Garnezarska e Wojtyla (2008) ao estudar a expressão da enzima catalase em sementes de tremoço branco, verificaram sua presença tanto nos eixos embrionários quanto nos cotilédones. Resultados semelhantes foram encontrados por Wojtyla et al. (2006) ao compararem a atividade da enzima catalase no eixo embrionário e cotilédones de sementes de ervilha.

Figura 1 - Atividade da enzima catalase (CAT) em endospermas e embriões de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes condições de estresse: Envelhecimento artificial por 4 dias (4D) ou por 8 dias (8D); Secagem sob alta temperatura em 50°C até 30% bu seguida de 40°C até 12% bu (50/40) ou em 50°C até 12% bu (50); Secagem das sementes em 35°C até 12% bu (SS) ou Secagem das sementes nos frutos em 35°C até 12% bu (SF); Sementes armazenadas em 25°C por 4 meses (4M) ou por 8 meses (8M); Sementes com 17% bu expostas à -86°C (-86) ou sementes com 15% bu expostas à -20°C (-20). (T) Testemunha - semente secada até 12% bu. (G) Porcentagem de plântulas normais no teste de germinação. (TZ) Porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio.



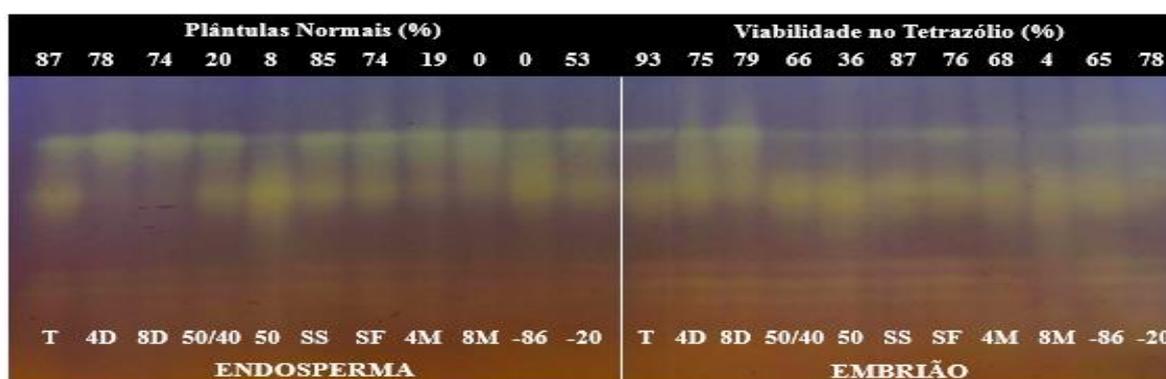
Fonte: Do autor (2018).

Em relação à enzima superóxido dismutase foram observadas três isoformas no perfil eletroforético (FIGURA 2). A primeira isoforma está presente em endospermas e em embriões, em todos os tratamentos analisados; porém, observou-se maior intensidade de bandas nos endospermas, exceto para os tratamentos de envelhecimento artificial (4D) e (8D) que foram semelhantes em ambas as estruturas. Pela análise da segunda isoforma, pode-se observar que não houve atividade da enzima superóxido dismutase nos endospermas quando as sementes foram envelhecidas artificialmente por 4 (4D) e 8 (8D) dias. A terceira isoforma está presente em todos os tratamentos, em ambos os tecidos, sendo a atividade mais intensa nos embriões. A enzima superóxido dismutase está entre as mais importantes enzimas do sistema de defesa, quando acoplada a rotas de eventos necessários à completa eliminação dos radicais livres formados sob condições de estresse (TESSUTTI et al., 2013).

Garnezarska e Wojtyla (2008), ao estudarem a atividade da enzima superóxido dismutase em eixo embrionário e cotilédones de sementes de tremoço branco durante o processo germinativo, observaram maior expressão da enzima no eixo embrionário em relação aos cotilédones. Além disso, observaram cinco isoformas no perfil eletroforético do eixo embrionário e quatro isoformas no perfil eletroforético dos cotilédones.

Segundo Fink e Scandalios (2002) a maior diferença entre as isoformas de superóxido dismutase está nas sequências reguladoras dos genes que codificam estas proteínas e cada proteína responde de modo diferenciado ao estresse oxidativo, em diferentes níveis.

Figura 2 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em endospermas e embriões de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes condições de estresse: Envelhecimento artificial por 4 dias (4D) ou por 8 dias (8D); Secagem sob alta temperatura em 50°C até 30% bu seguida de 40°C até 12% bu (50/40) ou em 50°C até 12% bu (50); Secagem das sementes em 35°C até 12% bu (SS) ou Secagem das sementes nos frutos em 35°C até 12% bu (SF); Sementes armazenadas em 25°C por 4 meses (4M) ou por 8 meses (8M); Sementes com 17% bu expostas à -86°C (-86) ou sementes com 15% bu expostas à -20°C (-20). (T) Testemunha - semente secada até 12% bu. (G) Porcentagem de plântulas normais no teste de germinação. (TZ) Porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio.



Fonte: Do autor (2018).

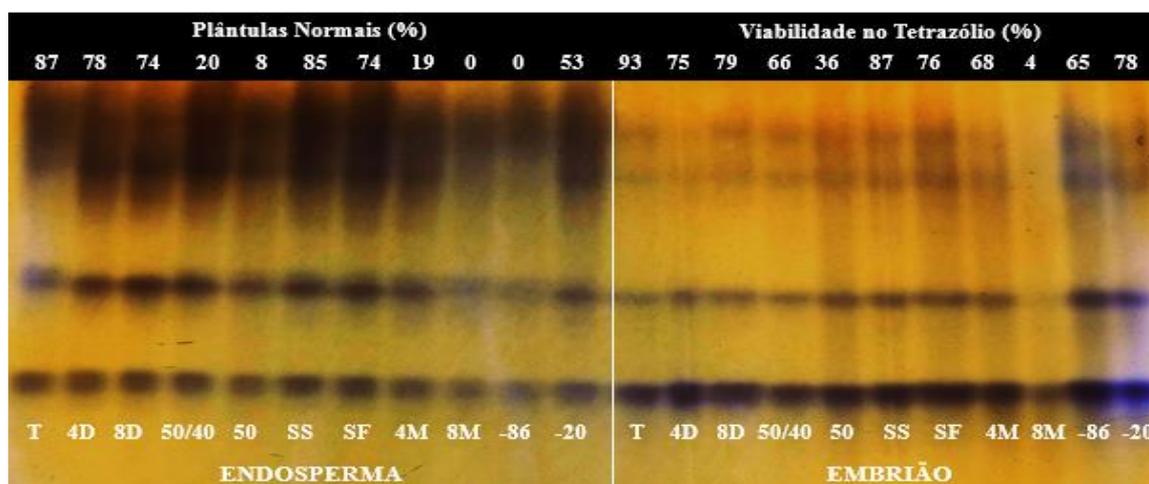
A glutamato oxaloacetato transaminase, por sua vez, é uma enzima que atua na oxidação de aminoácidos fornecendo energia para o ciclo de Krebs ou para a redução do alfa-cetoglutarato, voltada à biossíntese de novos aminoácidos destinados ao crescimento do embrião, estando também relacionada à síntese proteica, apresentando importante papel na germinação de sementes (MALONE et al., 2007; TUNES et al., 2010; VIEIRA et al., 2007).

Pelo perfil de expressão da enzima GOT (FIGURA 3), observou-se três isoformas nos endospermas e embriões das sementes de café. As duas primeiras isoformas apresentaram maior atividade nos endospermas e a atividade da terceira isoforma foi maior nos embriões. Para o tratamento 8M, em que as sementes foram armazenadas por 8 meses em condição não controlada, não houve atividade das duas primeiras isoformas nos embriões e baixa atividade da terceira isoforma. Esse resultado está relacionado com o pior desempenho fisiológico dessas sementes, como pode ser constatado pelos resultados da viabilidade no teste de tetrazólio (TABELA 1). Provavelmente, redução da atividade e a diminuição do número de

bandas da GOT nos embriões, ocorreram em função do aumento da incidência de micro-organismos com o avanço do período de armazenamento das sementes nessas condições. Bonome (2006) relataram redução na intensidade e no número de bandas da GOT em embriões de sementes de seringueira armazenadas por 7 meses em temperatura ambiente. Timóteo (2011) também observou redução na atividade dessa enzima com o decorrer do armazenamento natural em sementes de milho.

Segundo Tunes et al. (2011) as alterações do número e intensidade de isoformas da enzima GOT estão associadas com o processo de deterioração.

Figura 3 - Atividade da enzima glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) em endospermas e embriões de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes condições de estresse: Envelhecimento artificial por 4 dias (4D) ou por 8 dias (8D); Secagem sob alta temperatura em 50°C até 30% bu seguida de 40°C até 12% bu (50/40) ou em 50°C até 12% bu (50); Secagem das sementes em 35°C até 12% bu (SS) ou Secagem das sementes nos frutos em 35°C até 12% bu (SF); Sementes armazenadas em 25°C por 4 meses (4M) ou por 8 meses (8M); Sementes com 17% bu expostas à -86°C (-86) ou sementes com 15% bu expostas à -20°C (-20). (T) Testemunha - semente secada até 12% bu. (G) Porcentagem de plântulas normais no teste de germinação. (TZ) Porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio.



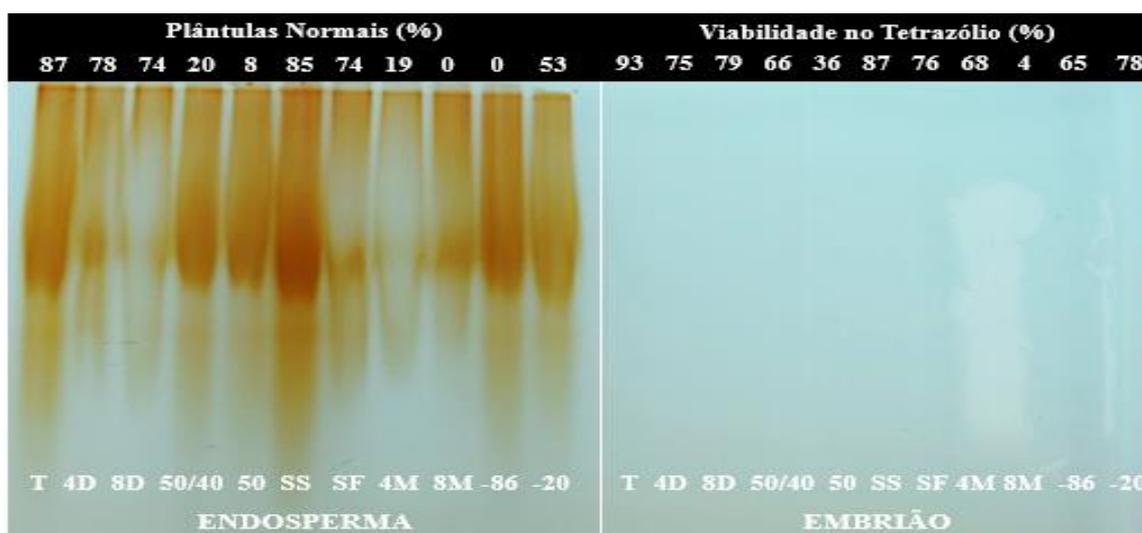
Fonte: Do autor (2018).

As peroxidases desempenham um papel importante no metabolismo das sementes, por utilizar peróxidos como aceptor de hidrogênio, podendo contribuir para o aumento dos mecanismos de defesa e prevenção de perda de qualidade (USHIMARU et al., 2001). Pela Figura 4, observa-se que a enzima peroxidase não apresentou atividade nos embriões em nenhum dos tratamentos estudados. Porém, foram observadas alterações dos perfis da enzima

nos endospermas, com alta atividade para aquelas sementes secadas naturalmente (T), secadas sob alta temperatura (50/40°C; 50°C), para sementes submetidas à temperatura subzero (-86°C e -20°C), e em maior intensidade para aquelas secadas a 35°C no secador (SS). Por outro lado, a secagem das sementes dentro do fruto (SF) proporcionou menor atividade dessa enzima. De acordo com Borém (2008), o café proveniente do processamento via seca (natural), tratamento semelhante ao aplicado às sementes de café neste trabalho, requer exposição mais prolongada ao ar de secagem do que o despulpado, para ser seco. Dessa forma, o perfil eletroforético da PO pode ser um indicador fisiológico da deterioração das sementes de café, causada pela exposição prolongada a elevadas temperaturas. Brandão Júnior et al. (2002) e Taveira et al. (2012) também verificaram redução na atividade dessa enzima em café processado via seca (natural) e secado artificialmente. Portanto, os cafés secados nos frutos (natural) apresentaram menor tolerância à dessecação em comparação aos despolpados. Essa suposição é corroborada pelo melhor desempenho fisiológico observado em sementes secadas à 35°C no secador.

De acordo com Bewley e Black (1994), a redução da atividade dessa enzima proporciona maior exposição dos sistemas de membranas aos efeitos do O₂. Com isso, em decorrência do nível de dano às membranas, o oxigênio atua de forma mais intensa, promovendo a oxidação dos compostos.

Figura 4 - Atividade da enzima peroxidase (PO) em endospermas e embriões de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes condições de estresse: Envelhecimento artificial por 4 dias (4D) ou por 8 dias (8D); Secagem sob alta temperatura em 50°C até 30% bu seguida de 40°C até 12% bu (50/40) ou em 50°C até 12% bu (50); Secagem das sementes em 35°C até 12% bu (SS) ou Secagem das sementes nos frutos em 35°C até 12% bu (SF); Sementes armazenadas em 25°C por 4 meses (4M) ou por 8 meses (8M); Sementes com 17% bu expostas à -86°C (-86) ou sementes com 15% bu expostas à -20°C (-20). (T) Testemunha - semente secada até 12% bu. (G) Porcentagem de plântulas normais no teste de germinação. (TZ) Porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio.



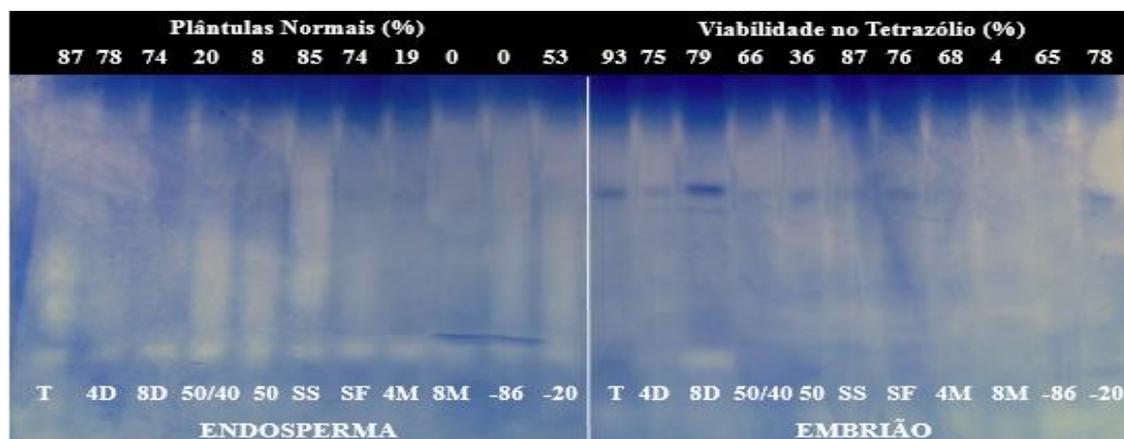
Fonte: Do autor (2018).

Pelo perfil de expressão da enzima isocitrato liase (FIGURA 5), observou maior atividade nos endospermas das sementes quando comparado com os embriões. Ao considerar os endospermas, menor atividade foi verificada em sementes envelhecidas por 4 dias (4D) e naquelas armazenadas por 8 meses (8M). Nos embriões, a isoforma apresentou atividade somente em sementes envelhecidas por 4 e 8 dias (4D; 8D).

Martins et al. (2000) verificaram maior atividade da enzima ICL em sementes de soja submetidas às condições de estresse de frio e envelhecimento acelerado. Essa enzima está relacionada com o processo de germinação, atuando no ciclo do glioxilato, atingindo atividade máxima quando ocorre a degradação dos lipídeos em sementes oleaginosas (TAIZ; ZEIGER, 2004; ZORATO et al., 2007), e envolvidas no metabolismo de lipídeos armazenados nas sementes oleaginosas, e no desenvolvimento das atividades no glioxissomos (BEWLEY; BLACK, 1994). Em estudos anteriores, sua atividade tem sido atribuída como indicador de germinação (IGAMBERDIEV; LEA, 2002), podendo também estar ligada à

melhor qualidade fisiológica dessas sementes, como em sementes de soja, em que Carvalho et al. (2014) observaram maior atividade dessa enzima em sementes com melhor qualidade.

Figura 5 - Atividade da enzima isocitrato liase (ICL) em endospermas e embriões de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes condições de estresse: Envelhecimento artificial por 4 dias (4D) ou por 8 dias (8D); Secagem sob alta temperatura em 50°C até 30% bu seguida de 40°C até 12% bu (50/40) ou em 50°C até 12% bu (50); Secagem das sementes em 35°C até 12% bu (SS) ou Secagem das sementes nos frutos em 35°C até 12% bu (SF); Sementes armazenadas em 25°C por 4 meses (4M) ou por 8 meses (8M); Sementes com 17% bu expostas à -86°C (-86) ou sementes com 15% bu expostas à -20°C (-20). (T) Testemunha - semente secada até 12% bu. (G) Porcentagem de plântulas normais no teste de germinação. (TZ) Porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio.



Fonte: Do autor (2018).

Ressalta-se, pela análise do perfil eletroforético das enzimas do processo antioxidante e da isocitrato liase, que o processo de deterioração de endospermas e de embriões de café ocorre de maneira diferenciada quando as sementes são submetidas aos diferentes tipos de estresses, e muitos genes se expressam em sementes em estágios avançados de deterioração, que podem não se expressar em sementes mais vigorosas. Isto explica às discrepâncias encontradas entre os resultados da porcentagem de plântulas normais no teste de germinação e de viabilidade no teste de tetrazólio realizado nos embriões.

4 CONCLUSÕES

Ocorrem discrepâncias entre os resultados do teste de germinação em sementes de café e os resultados de viabilidade pelo teste de tetrazólio nos embriões, sendo que a viabilidade é superestimada, principalmente em sementes com baixa qualidade fisiológica.

Em sementes submetidas a diferentes tipos de estresses, embriões e endospermas isolados apresentam diferentes perfis eletroforéticos de isoenzimas do sistema antioxidante e da isocitrato liase.

As enzimas catalase e isocitrato liase apresentam maior atividade em endospermas do que em embriões de sementes de café, sendo esta atividade associada à maior deterioração.

Ocorrem variações na atividade das isoformas das enzimas superóxido dismutase e glutamato oxaloacetato transaminase nos embriões e endospermas das sementes de café.

A enzima peroxidase não apresenta atividade em embriões de café.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627 p.
- ATAÍDE, G. M. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Pterogynenitens Tull.* durante o envelhecimento artificial. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 1, p. 71-76, jan./mar. 2012.
- BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 16, n. 1, p. 1-15, Mar. 2006.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seed: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.
- BONOME, L. T. S. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. De Juss.) Muell-Arg] durante o armazenamento**. 2006. 57 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- BORÉM, F. M. Qualidade do café natural e despulpado após secagem em terreiro e com altas temperaturas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1609-1615, out. 2008.
- BRANDÃO JÚNIOR, D. S. et al. Aquisição da tolerância à dessecação nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 673-681, jul./ago. 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 36. Aprova a tabela anexa, que fixa os valores dos serviços públicos de que trata a Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 dez. 2004, Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 399 p.
- CARVALHO, E. F. et al. Alterações isoenzimáticas em sementes de cultivares de soja em diferentes condições de armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 12, p. 967-976, dez. 2014.
- CLEMENTE, A. C. S.; CARVALHO, M. L. M.; GUIMARÃES, R. M. Suitability of the tetrazolium test methodology for recently harvested and stored coffee seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 4, p. 415-423, July/Aug. 2012.
- CLEMENTE, A. C. S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, jul. 2011.
- COELHO, S. V. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, jun. 2015.

COPELAND, L. O.; McDONALD, M. B. **Principles of seed science and technology**. 4th ed. New York: Chapman & Hall, 2001. 467 p.

CORBINEAU, F. Markers of seed quality: from present to future. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 22, p. 61-68, Feb. 2012. Suppl.

DIAS, M. C. L. L.; SILVA, W. R. Determinação da viabilidade de sementes de café através do teste de tetrazólio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 11, p. 1139-1145, nov. 1986.

DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. New determinants for tolerance of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. **CryoLetters**, Cambridge, v. 27, n. 3, p. 169-178, May/June 2006.

DUSSERT, S. et al. Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. **Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 127, n. 2, p. 192-204, Apr. 2006.

DUSSERT, S. Quantitative estimation of seed desiccation sensitivity using a quantal response model: application to nine species of the genus *Coffea* L. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 9, n. 2, p. 135-144, Feb. 1999.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./Dec. 2011.

FIGUEIREDO, M. A. **Secagem e resfriamento de sementes de Coffea arabica L. visando à criopreservação**. 2016. 45 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

FINK, R. C.; SCANDALIOS, J. G. Molecular evolution and structure function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. **Archives Biochemistry Biophysics**, New York, v. 399, n. 1, p. 19-36, Mar. 2002.

GARNEZARSKA, M.; WOJTYLA, L. Differential response of antioxidative enzymes in embryonic axes and cotyledons of germinating lupine seeds. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 30, n. 4, p. 427-432, May 2008.

HENDRY, G. A. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 3, n. 3, p. 141-153, Sept. 1993.

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. **Phytochemistry**, London, v. 60, n. 7, p. 651-674, Aug. 2002.

ISQUIERDO, E. P. et al. Drying kinetics and quality of natural coffee. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, St. Joseph, v. 56, n. 3, p. 1003-1010, May 2013.

MALONE, G. et al. Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 61-67, abr. 2007.

MARTINS, C. A. O. et al. Atividade da isocitrato-liase durante a germinação de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 42-46, nov. 2000.

OLIVEIRA, A. B. et al. Seed priming effects on growth, lipid peroxidation, and activity of ROS scavenging enzymes in NaCl-stressed sorghum seedlings from aged seeds. **Journal of Plant Interactions**, Turim, v. 7, n. 2, p. 151-159, June 2012.

PARK, J. J. et al. OsPUB15, an E3 ubiquitin ligase, functions to reduce cellular oxidative stress during seedling establishment, **The Plant Journal**, Oxford, v. 65, n. 2, p. 194-205, Jan. 2011.

PEREIRA, C. C. **Cultura de embriões e germinação de sementes de diferentes níveis de qualidade para a produção de mudas de café**. 2017. 58 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

ROSA, S. D. V. F. et al. Effects of different drying rates on the physiological quality of *Coffea canephora* Pierre seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, n. 2, p. 199-205, Apr./June 2005.

ROSA, S. D. V. F. et al. Staging coffee seedling growth: A rationale for shortening the coffee seed germination test. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 38, n. 2, p. 421-431, Feb. 2010.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 1-26, Dec. 2012

SILVA, E. A. A. et al. ABA Inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* 'Rubi') seed germination. **Annals of Botany**, Wageningen, v. 102, p. 425- 433, April/May 2008.

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

TAVEIRA, J. H. S. et al. Perfis proteicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 10, p. 1511-1517, out. 2012.

TESSUTTI, L. S. et al. Measuring the antioxidante capacity of blood plasma using potentiometry. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 441, n. 2, p. 109-114, Oct. 2013.

TIMÓTEO, T. S. **Condições de armazenamento e conservação do potencial fisiológico de sementes de diferentes genótipos de milho**. 2011. Tese. 60 p. (Doutorado Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

TUNES, L. M. et al. Influência dos diferentes períodos de colheita na expressão de isoenzimas em sementes de cevada. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 58, n. 2, p. 178-184, mar. 2011.

TUNES, L. M. et al. Perfil enzimático em sementes de cevada em resposta a diferentes concentrações salinas. **Interciencia**, Catanduva, v. 35, n. 5, p. 369-373, maio 2010.

USHIMARU, T. et al. Antioxidative enzymes in seedling of *Nelumbo nucifera* germinated under water. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 112, n. 1, p. 39-46, May 2001.

VIDIGAL, D. S. et al. Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 129-136, jun. 2009.

VIEIRA, A. R. et al. Armazenamento de sementes de cafeeiro: ambientes e métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 76-82, abr. 2007.

VIEIRA, M. G. G. C. et al. **Testes rápidos para determinação da viabilidade e da incidência de danos mecânicos em sementes de cafeeiro**. Lavras: UFLA, 1998. 34 p. (Boletim Agropecuário, 26).

WOJTYLA, L. et al. A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 163, n. 12, p. 1207-1220, Dec. 2006.

ZORATO, M. et al. Sementes esverdeadas em soja: testes alternativos para determinar a sua qualidade. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 1-10, jan. 2007.