



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

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

JULIANA DE FÁTIMA SALES

2002



EMPRÉST
U

52975

37521-MFN

JULIANA DE FÁTIMA SALES

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

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

Orientador

Prof. Dr. Amauri Alves de
Alvarenga

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2002

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

Sales, Juliana de Fátima

Atividade da celulase sobre o processo germinativo de sementes de cafeeiro
(*Coffea arabica* L.) / . Juliana de Fátima Sales. -- Lavras : UFLA, 2002.

38 p. : il.

Orientador: Amauri alves de Alvarenga.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Café. 2. Semente. 3. Germinação. 4. Celulase. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD-583.52 04334
-633.7321

JULIANA DE FÁTIMA SALES

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

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

APROVADA em 15 de fevereiro de 2002

Pesquisador Dr. Francisco Dias Nogueira

EPAMIG/UFLA

Pesquisador Dr. João Almir de Oliveira

UFLA



Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

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

A Deus,

Aos Meus Pais, Moacir e Maria Aparecida,

Por todo amor, dedicação e carinho;

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

OFEREÇO

Ao Fabiano, pelo amor, compreensão;

Aos meus familiares, pelo carinho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Ao amigo Marcelo Murad Magalhães e aos funcionários Izonei, Lena,
Tanhan, Evaristo, Joel e Odorêncio, pela amizade e ajuda.**

À FAPEMIG pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

A região sul do Estado de Minas Gerais, segundo Nechet (1999), destaca-se como sendo a maior produtora do país, contribuindo com cerca de 34% da produção nacional. Anualmente, a participação relativa média do café no valor total das exportações brasileiras, incluindo os produtos básicos e os produtos industrializados, é de aproximadamente 5% (Anuário, 1997). Em 1996, a produção brasileira atingiu 1,16 bilhão de toneladas ($1,69 \times 10^{10}$ kilos), representando 20,36% da produção mundial (FAO, 1996).

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

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

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

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

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Aspectos fisiológicos da germinação

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Enzimas

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

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

a) Efeito da temperatura

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

b) Efeito do pH

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

c) Especificidade

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

d) Inibição

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

Enzimas Celulolíticas e germinação de sementes

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

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

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

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

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

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

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

Muitos pesquisadores têm estudado a produção de celulase por cultura submersa. Vários estudos de produção de celulase determinam apenas C_x celulase, baseados na hidrólise de carboximetilcelulose, sem considerar a C_1 celulase ou outras frações da enzima.

Urieta, Toma e Park (1975) concluíram que a produção de celulase fúngica por cultura semi-sólida de *Trichoderma viride* apresenta mais vantagens, em comparação com a cultura submersa, porque a cultura semi-sólida produz mais C_1 e C_x celulases. Além disso, uma atividade crescente de C_1 celulase por cultura semi-sólida é importante para a degradação da celulose crua. Na produção de celulase por culturas semi-sólidas e submersa de *Aspergillus niger* e de *Pestalotiopsis westerdijkii* há desvantagens, pois ambos os processos não conseguiram produzir C_1 celulase, embora a cultura semi-sólida produza atividade elevada de C_x celulase.

Reese et al. (1950) introduziram o conceito de C_1 e C_x para explicar a atividade do sistema celulase, no qual C_1 seria capaz de degradar a celulose em cadeias lineares curtas e C_x hidrolisaria essas cadeias, bem como seus derivados solúveis.

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

3 MATERIAL E MÉTODOS

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

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

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

Experimento 1:

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

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

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

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

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

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

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

c) Sacarificação enzimática do Pergaminho

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

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

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

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

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

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

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

Onde:

IVG= Índice de Velocidade de Germinação

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

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

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

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

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

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

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

Onde:

IVE= Índice de Velocidade de Emergência

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Experimento 1

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

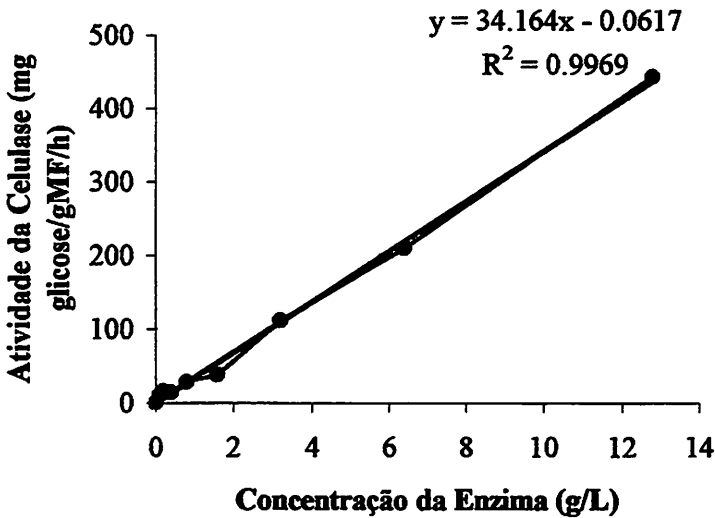


FIGURA 1- Efeito das Concentrações de Enzima sobre a velocidade da reação em pergaminho de sementes de cafeeiro. UFLA, 2002

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

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

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

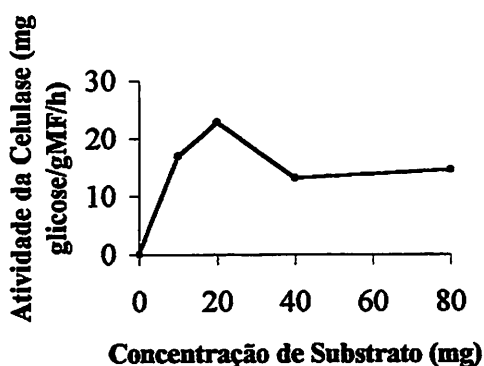


FIGURA 2- Efeito da Concentração do Substrato sobre a velocidade da reação em pergaminho de sementes de cafeeiro. UFLA, 2002.

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

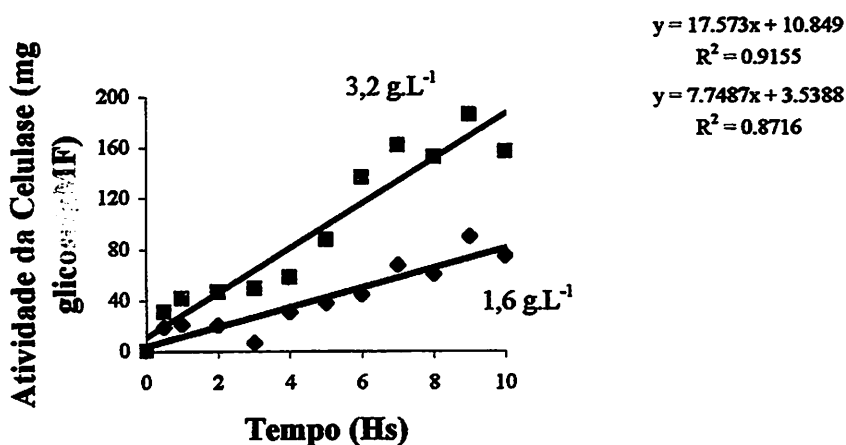
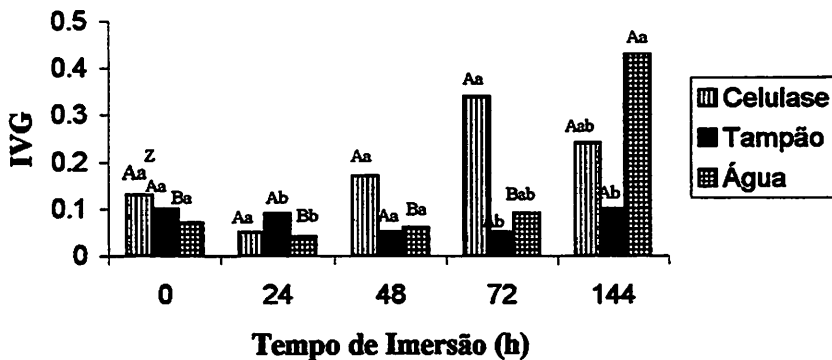


FIGURA 3- Sacarificação enzimática do pergaminho de sementes de cafeeiro em solução de celulase em concentrações de 1,6 e 3,2 g.L⁻¹. UFLA, 2002.

2. Experimento 2

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

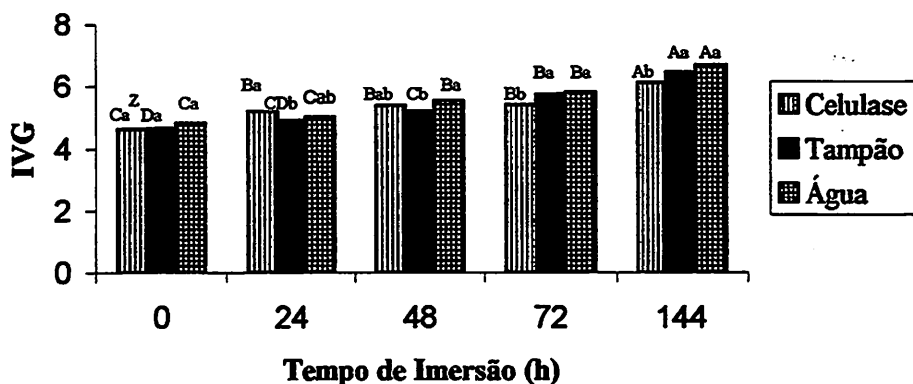
Figura 4- Índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de cafeeiro com endocarpo após a imersão por diferentes períodos em solução de celulase, tampão citrato de potássio $0,05 \text{ M}$ e água.



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

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

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



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

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

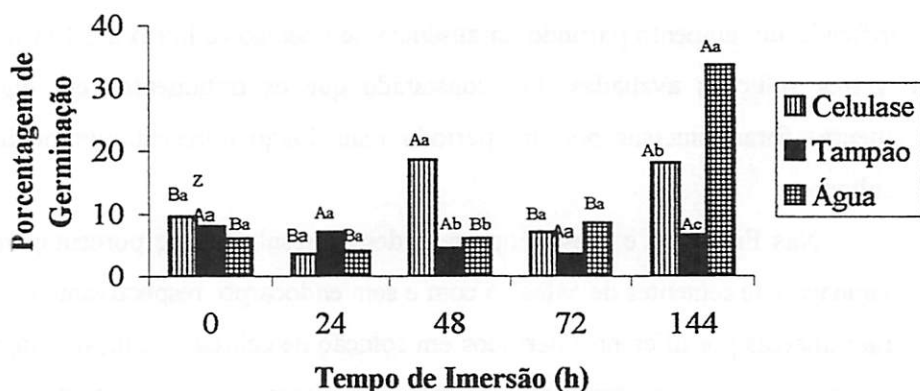
Os maiores índices de velocidade de germinação em sementes sem endocarpo ocorreram em sementes imersas por 144 horas (Figura 5),

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

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

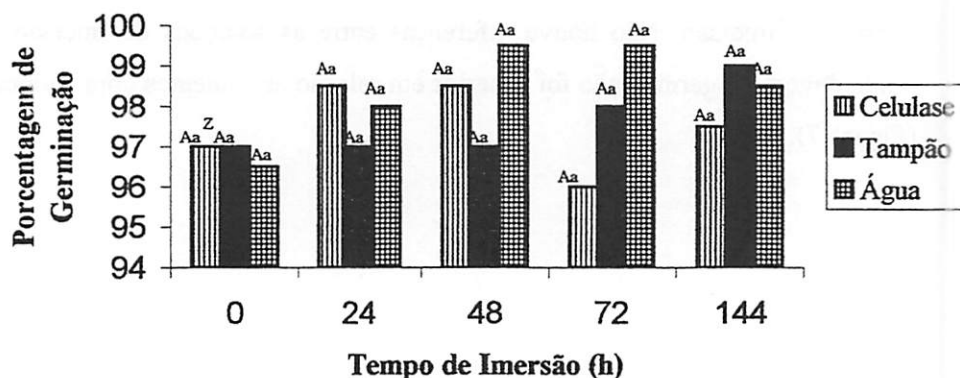
Em sementes sem endocarpo, não foram verificadas diferenças entre os tempos de imersão. Não houve diferenças entre as soluções de imersão, e a porcentagem de germinação foi superior em relação às sementes com endocarpo (Figura 7).

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



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

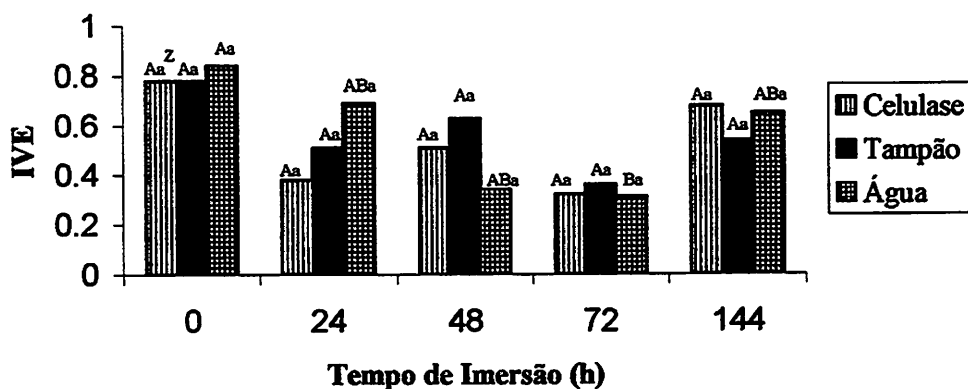
Figura 7- Percentagem de germinação de sementes de cafeeiro sem endocarpo após a imersão por diferentes períodos em solução de celulase, tampão citrato de potássio 0,05 M e água.



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

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

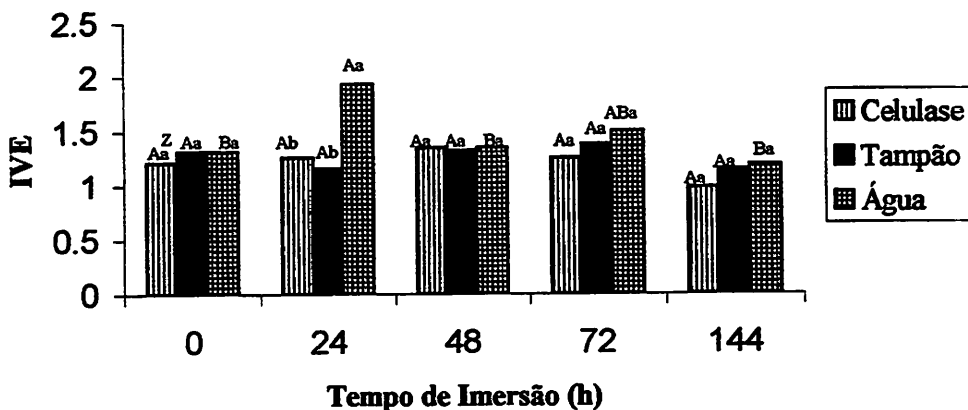
Figura 8- IVE de sementes de cafeeiro com endocarpo após a imersão por diferentes períodos em solução de celulase, tampão citrato de potássio $0,05 \text{ M}$ e água.



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

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

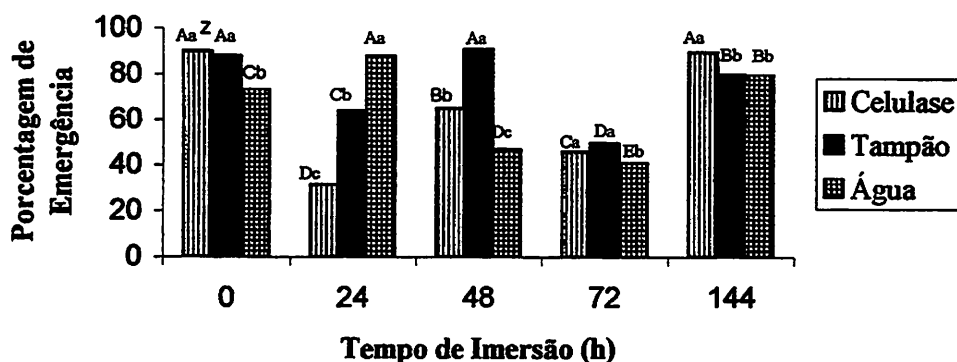
Figura 9- IVE de sementes de cafeeiro sem endocarpo após a imersão por diferentes períodos em solução de celulase, tampão citrato de potássio 0,05 M e água.



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

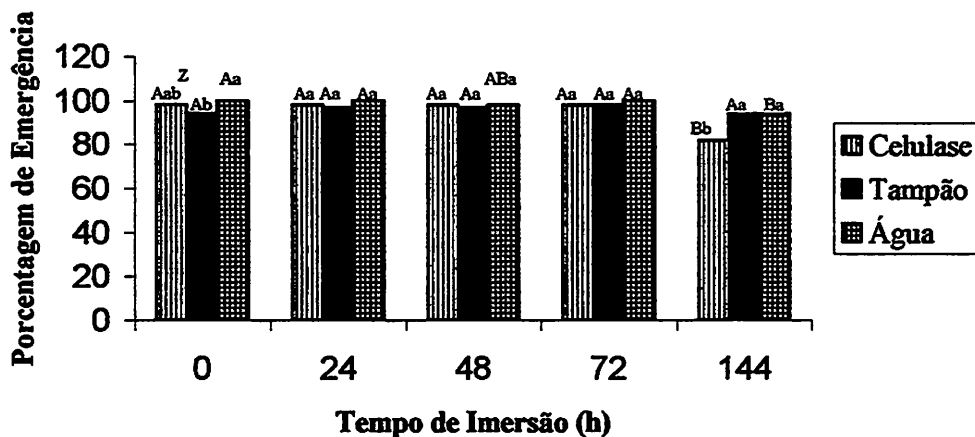
Nas Figuras 10 e 11 estão apresentadas as porcentagens de emergência de sementes de cafeeiro com e sem endocarpo, respectivamente, imersas em celulase ($1,6 \text{ g.L}^{-1}$), tampão e água. Observa-se que houve um comportamento semelhante ao das demais características avaliadas, ou seja, a porcentagem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

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



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

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

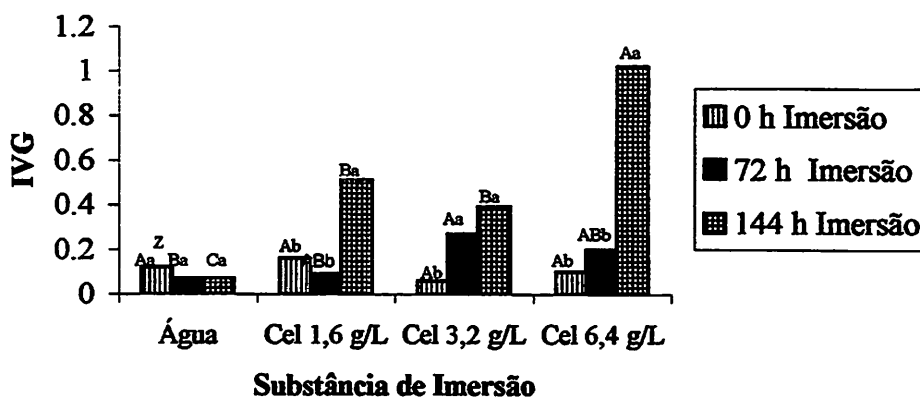


^ZMédias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tempos de imersão dentro de cada substância e minúsculas entre substâncias dentro de cada tempo não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3. Experimento 3

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

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



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

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

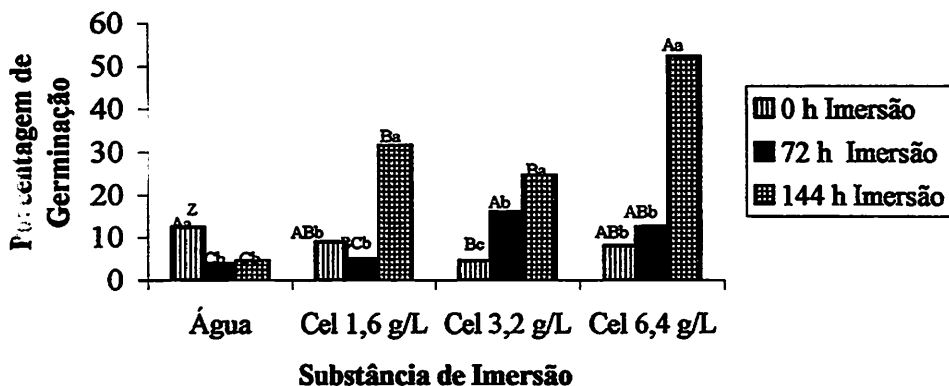
demonstrando ser necessário maior tempo de contato das sementes com a solução enzimática. Melhor IVG foi obtido pelas sementes imersas na maior concentração, ou seja, 6,4 g.L⁻¹.

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

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

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

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

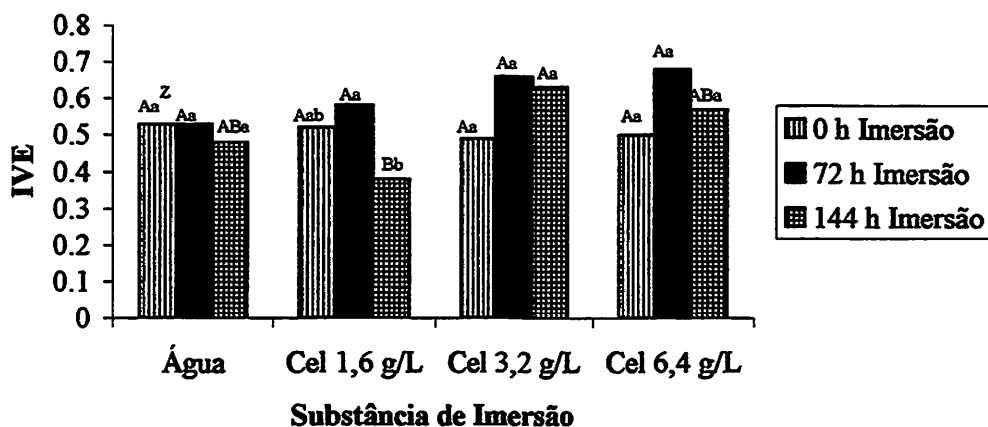


^ZMédias seguidas pela mesma letra maiúscula entre os tempos de imersão dentro de cada substância e minúsculas entre substâncias dentro de cada tempo não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

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

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

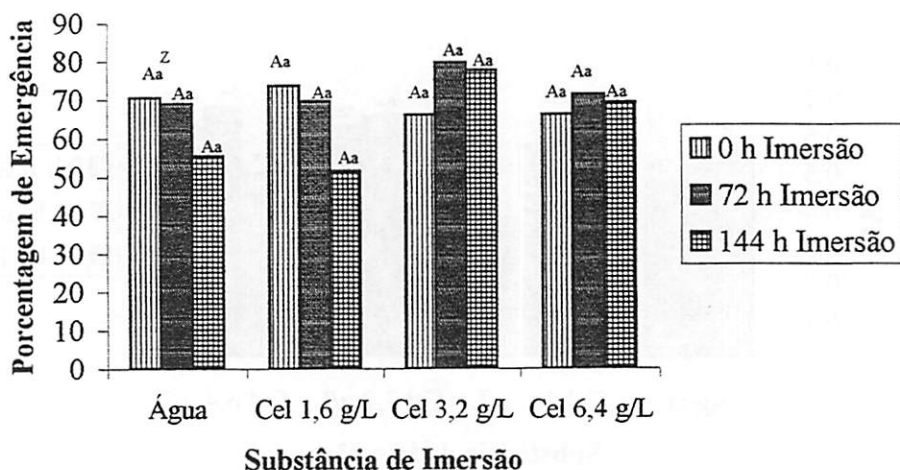
FIGURA 14- Índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de cafeeiro submetidas, por diferentes tempos de imersão, a diferentes concentrações de celulase. LAVRAS, UFLA, 2002.



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

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

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



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

5 CONCLUSÕES

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

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MIRANDA, J. M.; VIEIRA, M. das G. G. C.; CARVALHO, M. M. de. Inativação da germinação de sementes de café após tratamento com etanol, ácido acético e calor. *Ciência e Prática*, Lavras, v. 14, n. 2, p. 202-207, maio/ago. 1990.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXOS A

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

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

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

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

*Significativo a nível de 5% de probabilidade

^{ns}Não significativo

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

Fontes de Variação	GL	Quadrado médio			
		IVG	% GERM	IVE	% EMERG
Total	47				
Total de redução	14	0,2450797 [*]	656,3810 [*]	0,2444180E-01 [*]	220,4642 ^{ns}
Repetição (REPE)	3	0,1051639E-01 ^{ns}	36,22222 ^{ns}	0,9822690E-02 ^{ns}	84,52778 ^{ns}
Solução imersão (SOIM)	3	0,2458216 [*]	590,4445 [*]	0,2955602E-01 ^{ns}	237,6389 ^{ns}
Tempo imersão (TEMP)	2	0,7159199 [*]	1966,583 [*]	0,5220288E-01 [*]	322,5833 ^{ns}
TEMP*SOIM	6	0,2050437 [*]	562,6945 [*]	0,1994057E-01 ^{ns}	245,8056 ^{ns}
Resíduo	33	0,7769614E-02	13,73736	0,1146203E-01	168,1036
Média Geral		0,25425	15,333	0,54623	68,208
Coefficiente Variação		34,669	24,172	19,600	19,009

*Significativo a nível de 5% de probabilidade

^{ns}Não significativo