



**MARCADORES DA TOLERÂNCIA À
DESSECAÇÃO DE SEMENTES DE
CAFEIRO**

DELACYR DA SILVA BRANDÃO JUNIOR

2000

DELACYR DA SILVA BRANDÃO JUNIOR

**MARCADORES DA TOLERÂNCIA À
DESSECAÇÃO DE SEMENTES DE CAFEIEIRO**

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

Orientadora

Prof.^a Maria das Graças G. C. Vieira

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2000**

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

Brandão Junior, Delacyr da Silva

Marcadores da tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro / Delacyr da
Silva Brandão Junior. -- Lavras : UFLA, 2000.

144 p. : il.

Orientadora: Maria das Graças G.C. Vieira.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Café. 2. Semente. 3. Secagem. 4. Armazenamento. 5. Tolerância à
dessecação. 6. Qualidade. 7. Marcador. 8. Isoenzima. 9. Açúcares. 10.
Ultraestrutura. I. Célula. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.7386

DELACYR DA SILVA BRANDÃO JUNIOR

**MARCADORES DA TOLERÂNCIA À
DESSECAÇÃO DE SEMENTES DE CAFEIEIRO**

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

APROVADA em 10 de novembro de 2.000

Prof. Henk W. M. Hilhorst

WUR

Dr^a. Mirian T. S. Eira

CENARGEN-EMBRAPA

Prof^a. Maria Laene Moreira de Carvalho

UFLA

Prof. Renato Mendes Guimarães

UFLA


Prof^a. Maria das Graças G. C. Vieira
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,

“o Pai do nosso Senhor Jesus Cristo, a fonte de toda a misericórdia, e aquele que tão maravilhosamente nos conforta e fortalece nas dificuldades e provações.”

(2 Coríntios 1: 3-4)

Aos meus pais, Delacyr e Célia
e às minhas irmãs, Adriana e Monica, pelo
amor, amizade e apoio constante,

OFEREÇO.

À minha amada esposa, Adriana e ao nosso Bebê,
tão desejado, que se desenvolve em seu ventre,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e a Wageningen University and Research Centre (WUR), pela oportunidade de realização do curso;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

À Professora, Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira, pela excelente orientação, apoio, sugestões e amizade;

Aos Professores Henk W. M. Hilhorst, José da Cruz Machado, Maria Laene Moreira de Carvalho, Édila Vilela de Resende Von Pinho e Renato Mendes Guimarães, pelo apoio incentivo, amizade e colaboração;

À pesquisadora da EMBRAPA-CENARGEN, Mirian T. S. Eira, pelas valiosas contribuições;

Aos amigos do Laboratório de Análise de Sementes (DAG-UFLA), Elsa, Andréia, Ana Lúcia, Maria de Lourdes, Dinara e Anderson, pela amizade e ajuda na realização deste trabalho;

Aos amigos do curso de Pós-graduação, Amaral, Renatinha, Sebastião, Mary Cleide, Stella, Robério, João Almir, Antônio Vieira, Kalinka, Elisa, Solange, Rômulo, Welligton, Luís, Gilma, Paulo Melo e Jorge, pelo incentivo e amizade;

Ao bolsista de iniciação científica José Roberto Bernardino Filho, pela ajuda e amizade;

Ao colega Adriann van Aelst, pela colaboração nas análises ultraestruturais;

Ao colega Peter Toorop, pela cooperação durante a execução dos trabalhos na Wageningen University;

Ao Sr. Romário, proprietário da Fazenda Cachoeiro do Norte, pelo fornecimento das sementes de *Coffea canephora*;

Aos irmãos da II-Igreja Presbiteriana de Lavras, pelas orações e convivência;

Aos meus sogros, Antônio Mariano e Raimunda e à família Reis pelo precioso apoio e comunhão;

À Rosinha e às crianças do bairro Aqueça Sol, pela ajuda, carinho e amizade;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPITULO 1	1
1 Introdução Geral.....	1
2 Referencial Teórico.....	4
2.1. Longevidade e Deterioração de Sementes.....	4
2.2. Aquisição da Tolerância à Dessecação nos Diferentes Estádios de Maturação.....	11
2.3. Taxa de Secagem	13
2.4. Ultraestrutura.....	15
2.5. Acumulação de Açúcares.....	16
2.6. Alterações Enzimáticas Relacionadas à Danos de Secagem e de Deterioração de Sementes.....	19
3 Referências Bibliográficas.....	28
CAPITULO 2: Aquisição da Tolerância à Dessecação nos Diferentes Estádios de Maturação de Sementes de Cafeeiro (Coffea arabica L.).....	45
1 Resumo	45
2 Abstract.....	46
3 Introdução.....	47
4 Material e Métodos.....	50
4.1. Determinação do grau de umidade.....	50
4.2. Qualidade fisiológica das sementes.....	51

4.3. Análise eletroforética	52
4.4. Procedimento estatístico	53
5 Resultados e Discussão.....	54
6 Conclusões.....	79
6 Referências Bibliográficas.....	80
CAPITULO 3: Marcadores da Tolerância à Dessecação de Sementes de Cafeeiro.....	85
1 Resumo	85
2 Abstract.....	87
3 Introdução	89
4 Material e Métodos	92
4.1. Determinação do grau de umidade	93
4.2. Qualidade fisiológica das sementes	93
4.3. Análise eletroforética	94
4.4. Extração e análise de carboidratos solúveis	94
4.5. Análise de ultraestrutura	95
4.6. Procedimento estatístico	96
5 Resultado e Discussão	97
6 Conclusões.....	135
7 Referências Bibliográficas	137
ANEXO.....	144

RESUMO

BRANDÃO JUNIOR, Delacyr da Silva. **Marcadores da tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro**. Lavras: UFLA, 2000. 144 p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia)*

A sensibilidade à dessecação em sementes é um grande obstáculo para conservação da biodiversidade das espécies. A presente pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal de Lavras (UFLA) e na Wageningen University and Research Centre (WUR), Laboratory of Plant Physiology, com o objetivo de detectar modificações fisiológicas, celulares e moleculares em sementes de cafeeiro colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento e secadas a diferentes teores de água. Foram colhidas sementes de *Coffea arabica* em três estádios de desenvolvimento e de *C. canephora* no estádio cereja. Parte das sementes não foi submetida a secagem e parte foi secada a 30, 15, 10 e 8% de umidade. Posteriormente, as sementes foram armazenadas sob condição controlada (10°C e 50% UR) em embalagens impermeáveis. Em diferentes períodos do armazenamento, as sementes foram submetidas a determinação fisiológicas, celulares por microscopia eletrônica de varredura à baixa temperatura, determinação de açúcares específicos e moleculares por meio dos sistemas enzimáticos álcool desidrogenase (ADH), fosfatase alcalina (AKP), esterase (EST) e catalase (CAT). Foram observados diferentes tipos de danos nos diferentes estádios de maturação. Um grau de umidade crítico das sementes foi estabelecido abaixo do qual os danos passam a ser severos. A tolerância à dessecação em sementes de *C. arabica* está em função do estádio de desenvolvimento das sementes, sendo que estas colhidas no estádio verde apresentam maior sensibilidade à perda de seu teor de água. Sementes de *C. canephora* apresentam-se intolerantes à dessecação. Para ambas as espécies de cafeeiro, após o armazenamento, as sementes secadas a 30% de umidade apresentam maior germinação e vigor e reduzidos danos causados pela perda do teor de água das sementes. Padrões eletroforéticos das enzimas esterase e catalase variam em função do estádio de desenvolvimento das sementes de cafeeiro e do nível de tolerância à dessecação. Acréscimo no conteúdo de glicose e sacarose está associado com proteção de sementes de cafeeiro contra danos de secagem e a aquisição da tolerância à dessecação. Análise ultraestrutural apresenta coalescência de corpos de lipídios, presenças de cristais nos espaços intercelulares, ruptura dos sistemas de membranas associadas a danos de secagem.

* Comitê Orientador: Prof^ª. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira – UFLA (Orientadora), Dr. Henk W.M. Hilhorst - WUR, Prof^ª. Édila Vilela de Resende Von Pinho, Prof^ª. Maria Laene Moreira de Carvalho, Prof. Renato Mendes Guimarães, Prof. José da Cruz Machado.

ABSTRACT

BRANDÃO JUNIOR, Delacyr da Silva. **Markers of the coffee seeds desiccation tolerance.** Lavras: UFLA, 2000. 144 p. (Thesis – Doctorate in Plant Science)*

The sensibility to desiccation in seeds is a big obstacle in the preservation of the biodiversity of species. The present research was performed at the Universidade Federal de Lavras (UFLA) and at the Wageningen University and Research Centre (WUR), Laboratory of Plant Physiology, aiming to detect physiological, cell and molecular changes in coffee seeds harvested in different stages of development and dried at different moisture contents. *Coffea arabica* seeds were harvested in tree different stages of development and seeds of *C. canephora*. at the redish stage. Part of the seeds was dried to 30, 15, 10 and 8% moisture contents. Subsequently seeds were stored under controlled conditions (10°C an 50% RH) in sealed container. Seeds were undertaken in different storage periods to the following determinations: physiologic, cellular at scanning microscopy under low temperature and molecular by looking at specific sugars and enzyme eletrophoertic (alcohol desidrogenase (ADH), alkaline phosphatase (AKP), esterase (EST) and catalase (CAT)). Different types of damages were observed in the different stage of seed development. A minimum critical level of moisture content of seed was established below which damages are severe. The desiccation tolerance in *Coffea arabica* seeds depends on the seed development stage; seeds harvested at green stage present the highest sensibility in terms of water loss. Seeds of *Coffea canephora* present intolerance to desiccation. For both species of coffee following storage, the seeds dried at 30°C present the highest germination and vigour values and reduced damages caused by water losses. Electrophoretic patterns of esterase and catalase vary according with stage of seed development and to the level of desiccation tolerance. Increases in glucose and sucrose contents are associated with protection mechanisms in coffee seeds against damages by drying and acquisition of desiccation tolerance. Ultrastrutural analysis revealed coalescence of lipids bodies, presence of crystals at intercellular spaces, membrane breakdown associated with to drying damages.

*Guidance Committee: Prof. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira – UFLA (Major Professor), Dr. Henk W.M. Hilhorst - WUR, Prof. Édila Vilela de Resende Von Pinho, Prof. Maria Laene Moreira de Carvalho, Prof. Renato Mendes Guimarães, Prof. José da Cruz Machado.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O café é o produto agrícola de maior valor de exportação. Ele contribui com aproximadamente 10 bilhões de libras anuais para a economia de mais de 50 países da América Latina, África e Ásia (Orozco-Castilho et al., 1994). O café comercial é oriundo de duas espécies: *Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre. A melhor qualidade de bebida está associada com *C. arabica*, que foi desenvolvida nas regiões montanhosas no sudoeste da Etiópia, nas altitudes de 600- 1800 m e este representa 73% da produção mundial e quase a totalidade da produção da América Latina. O *C. canephora*, que é encontrado no centro e oeste equatorial da África, em regiões entre o nível do mar e 600m de altitude, compreende 80% da produção africana (Wilson e Shannon, 1995; Downey e BouSSION, 1996).

O Brasil é atualmente o maior produtor mundial de *C. arabica* e o segundo maior de *C. canephora*, perdendo apenas para a Indonésia. A importância sócio-econômica dessa cultura tem sido historicamente destacada no cenário nacional. Entretanto, a despeito de sua importância econômica e agrícola o café não tem sido extensivamente beneficiado pelo mesmo desenvolvimento tecnológico que tem sido aplicado em outras espécies, principalmente no tocante à tecnologia de sementes de cafeeiro.

A semente vem sendo o principal mecanismo de estabelecimento, expansão, diversificação e melhoramento da produção agrícola; o banco de reposição de caracteres hereditários e de variabilidade das espécies; o mecanismo de transporte das inovações e da revolução que a biotecnologia está propiciando. Sementes de cafeeiro são particularmente propensas à uma rápida

deterioração, principalmente quando armazenadas em ambientes de alta temperatura e umidade relativa do ar, o que dificulta a sua utilização na produção de mudas para formação e/ou renovação de lavouras ou como fonte de material genético para uso em melhoramento.

A fisiologia das sementes de cafeeiro é complexa e o conhecimento nessa área é incipiente. Existem consideráveis diferenças na fisiologia das sementes das diferentes espécies do gênero *Coffea*, que afetam a longevidade destas sementes, entre elas a habilidade ou não para tolerar à dessecação. O principal entrave para o armazenamento de sementes de cafeeiro é o conhecimento limitado de como as sementes podem ser secadas e a interação entre temperatura e conteúdo de umidade na sobrevivência da semente, sendo que aplicações de técnicas de secagem poderão permanecer no campo de “acertos e erros” se o conhecimento das causas da baixa longevidade das sementes de cafeeiro não for elucidado (Eira et al., 1999).

Existem diferenças marcantes no nível de tolerância à dessecação entre as duas espécies comerciais de café *C. arabica* e *C. canephora*. As espécies podem fornecer um ótimo sistema comparativo, proporcionando uma oportunidade para estudar a base da tolerância à dessecação em *Coffea* e associadas ao uso de técnicas moleculares, citológicas, fisiológicas, dentre outras, podem contribuir para a melhoria do conhecimento da longevidade das sementes de cafeeiro.

Esta pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de detectar modificações fisiológicas, celulares e moleculares em sementes de cafeeiro, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento, secadas a diferentes graus de umidade e armazenadas.

Em uma primeira etapa, foi avaliada a aquisição de tolerância à dessecação nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de cafeeiro. Em uma etapa final, procurou-se detectar mudanças fisiológicas, celulares e

moleculares em sementes de *C. arabica*, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento e de *C. canephora*, colhidas no estágio cereja, secadas a diferentes teores de água e armazenadas por seis meses.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Longevidade e Deterioração de Sementes

O fruto do café é uma drupa, normalmente contendo dois lóculos e duas sementes. O exocarpo do fruto maduro pode ser vermelho ou amarelo, com um mesocarpo pectino gelatinoso (polpa) de 0,5-2 mm de espessura, rico em açúcares e água; e o endocarpo, pergaminho que envolve cada semente, que é constituída pelo embrião, pelo endosperma e por uma membrana prateada, que é a espermodermis. As sementes podem variar em tamanho, forma e densidade, de acordo com as condições de desenvolvimento e genótipo (Illy e Viani, 1995; Rena e Maestri, 1986).

Algumas espécies do gênero *Coffea* possuem sementes que são excepcionalmente de curta viabilidade, particularmente quando armazenadas em ambientes naturais. O termo ortodoxo e recalcitrante foi proposto por Roberts (1973) para distinguir sementes de alta e baixa longevidade. Sementes ortodoxas são aquelas que sobrevivem por longos períodos; elas podem ser secadas para conteúdos de umidade abaixo de 5%, sem injúria e são hábeis para tolerar temperaturas de congelamento. Sementes recalcitrantes não podem ser secadas para umidades abaixo de 30% sem injúrias e são incapazes de tolerar temperaturas de congelamento. Como resultado, sementes recalcitrantes sobrevivem por curtos períodos e apresentam problemas quanto a armazenabilidade. Sua alta umidade induz a infestação por microrganismos, o que contribui para acelerar o processo de deterioração das sementes, além do mais, o armazenamento sob temperaturas sub zero causa a formação de cristais de gelo e ruptura dos sistemas de membranas celulares, causando injúria por frio. Algumas sementes recalcitrantes, de origem tropical, são susceptíveis à

injúria por resfriamento, à temperaturas bem acima de zero, na faixa de 10 a 15°C (Chin, 1988).

Sementes recalcitrantes e ortodoxas diferem grandemente em sua ecologia e morfologia (Chin et al., 1989). Sementes recalcitrantes são primariamente originadas de árvores perenes dos trópicos úmidos, como algumas espécies do gênero *Coffea*, e o cacau; em alguns casos, de áreas temperadas, como o *Citrus*; enquanto a maioria das sementes ortodoxas vêm de espécies anuais temperadas, adaptadas para campos abertos (Illy e Viani, 1995).

Os mecanismos que envolvem a tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro são complexos e a literatura ainda não apresenta resultados conclusivos. King e Roberts (1979) classificaram as sementes de cafeeiro como recalcitrantes, mas após cinco anos, verificou-se que elas não eram verdadeiramente recalcitrantes e poderiam ser ortodoxas (Roberts, King e Ellis, 1984). Segundo Vossen (1979) as sementes de cafeeiro mantêm a sua viabilidade quando armazenadas com 10% e 40% de umidade. Essas sementes deterioram rapidamente em valores intermediários. Sementes de cafeeiro e alface (ortodoxa) (Ibrahin, Roberts e Murdoch, 1983; Villiers e Edgumbe, 1975) apresentam um padrão semelhante a esse respeito (Ellis, Hong e Roberts, 1990). Chin (1978) inclui as sementes de cafeeiro (*C. canephora*) no grupo das recalcitrantes. Recentemente, uma terceira categoria, intermediária entre ortodoxa e recalcitrante, foi identificada, compreendendo sementes que podem resistir à desidratação até um certo nível, mas tem sua armazenabilidade reduzida. Ellis, Hong e Roberts (1990), observaram que sementes de quatro cultivares de *C. arabica* não apresentaram perdas na germinação, quando foram secadas até cerca de 10% de umidade, mas tiveram a germinação diminuída quando armazenadas às temperaturas de 0° e -20°C, comportamento característico da categoria intermediária.

Devido as sementes de cafeeiro sobreviverem à secagem para conteúdos de umidade inferiores a 0,20 kg/kg, elas não são consideradas recalitrantes (Ellis, Hong e Roberts, 1990; Hong e Ellis, 1992; Vertucci e Farrant, 1995; Eira et al., 1999). Todavia, as sementes não sobrevivem à dessecação completa ou aos efeitos combinados de dessecação e baixa temperatura, motivo pelos quais não são consideradas ortodoxas (Ellis, Hong e Roberts, 1990, 1991; Hong e Ellis, 1992). O principal impedimento, para o armazenamento de sementes com comportamento intermediário é o conhecimento limitado de como estas podem ser secadas e a interação entre temperatura de secagem e conteúdo de umidade na sobrevivência da semente (Eira et al., 1999).

Existe uma considerável variabilidade na fisiologia pós-colheita de sementes recalitrantes, tanto dentro, como entre espécies. Dentro de uma espécie, a variação pode ocorrer de colheita a colheita, ou dentro de uma única colheita (Berjak et al., 1996; Finch-Savage e Blake, 1994). O conteúdo de água e o tamanho do embrião podem variar entre as estações (Finch-Savage, 1996; Berjak et al., 1996). Há também diferentes taxas de perda de água no material recalitrante, as quais variam de espécie para espécie, e com o estágio de desenvolvimento do eixo embrionário da semente (Berjak e Pammenter, 1997). Uma característica adicional das sementes recalitrantes é que elas são metabolicamente ativas, sendo esta uma manifestação do desenvolvimento ou do começo da germinação. Essa atividade pode ser indicada por meio de técnicas de ultraestrutura (Berjak, Farrant e Pammenter, 1989; Berjak et al., 1993), dados bioquímicos (Corbineau et al., 1999) ou pela medida direta da respiração (Farrant et al., 1999).

Existem diferenças marcantes nos níveis de sensibilidade à dessecação entre as espécies de *Coffea* spp. Essas diferenças podem ser atribuídas às relações filogenéticas, habitat de origem e/ou duração do estágio de desenvolvimento.

Coffea arabica e *C. canephora* são espécies da sub-seção Erythrocoffea. (Carvalho et al., 1991). Sementes oriundas de diferentes sub-seções apresentam diferentes níveis de tolerância à dessecação, ainda que a classificação não tenha sido baseada na fisiologia da semente.

King e Roberts (1979) associaram espécies ortodoxas com ambiente exposto à seca sazonalmente e espécies recalcitrantes a ecossistemas úmidos. Essa relação foi confirmada por Hong e Ellis (1992) para *C. arabica* e *C. liberica*.

A tolerância à dessecação também pode ser associada ao ambiente natural. *C. arabica* é originária de altas altitudes do sudeste da Etiópia; uma vegetação de savana; *C. canephora* tem seu centro primário de diversificação na densa floresta equatorial da Guiné e Sudão, região transitória de floresta tropical e savana (Eira et al., 1999).

Sementes recalcitrantes também diferem das ortodoxas na sua morfologia. Na maioria das sementes recalcitrantes maduras, seus frutos são revestidos com polpa ou camada arilóide suculenta e testa (Chin et al., 1989). Na maturidade fisiológica, o conteúdo de umidade das sementes recalcitrantes é geralmente muito mais alto (50-70%) do que o das sementes ortodoxas (30-50%). Algumas vezes elas são maiores que a maioria das sementes ortodoxas, e seus embriões possuem somente 15% do tamanho de um embrião de semente ortodoxa. Acredita-se que sementes recalcitrantes não apresentam dormência, mas seu desenvolvimento continua progressivamente próximo à germinação (Berjak et al., 1990).

Diferenças na tolerância à dessecação podem também ser atribuídas a duração do período de maturação. No Brasil, o período gasto entre o florescimento e o estado dos primeiros frutos maduros, é em torno de 8 meses para *C. arabica* e de 9-10 meses para *C. canephora* (Carvalho et al., 1991). Finch-Savage (1992) levantou a hipótese de que o procedimento recalcitrante é

resultado de um término precoce do desenvolvimento, e dessa forma, a tolerância à dessecação nunca é alcançada pelas sementes. Desde que o tempo gasto para maturação é menor em espécies tolerantes, sugere-se que esta hipótese deva ser modificada para a de que a maturação é particularmente lenta em espécies mais recalcitrantes (Eira et al., 1999).

Geralmente, após o estágio final de maturação fisiológica, a semente está em condições de máximo vigor (Ellis e Pieta Filho, 1992) e deste ponto deterioram, gradativamente, até perder finalmente a viabilidade. Tem sido sugerido que isso é refletido pela diminuição progressiva do potencial das sementes para sintetizar lipídios, proteínas e todas as classes de ácidos ribonucléicos (Osborne e Cheah, 1982). As enzimas envolvidas no reparo do DNA também são prejudicadas com o tempo (Vázquez, Montiel e Vázquez-Ramos, 1991), gerando anormalidades morfológicas e aberrações cromossômicas.

A deterioração ou envelhecimento de sementes envolve uma seqüência de eventos bioquímicos e fisiológicos, que levam a um progressivo declínio na qualidade de sementes e, finalmente, à perda da viabilidade. Sementes são consideradas não viáveis quando elas não germinam sob condições ambientes favoráveis após a quebra da dormência. Os efeitos do envelhecimento podem ser detectados pela análise de amostras de populações, sementes individuais, tecidos ou células (Mattews e Powell, 1986).

Avanços em pesquisas em tecnologia de sementes são requeridos para o desenvolvimento de procedimentos que reduzam a intensidade e a velocidade de deterioração.

Segundo Delouche e Baskin (1973), a deterioração de sementes pode ser caracterizada como um processo inevitável, sendo, no entanto, possível retardar a taxa de deterioração por meio de práticas que conduzam à um ótimo armazenamento. A deterioração de sementes também é considerada um processo

irreversível, porém alguns mecanismos de pré-condicionamento ou tratamento de sementes com fungicidas melhoram a emergência em campo. Deterioração de sementes varia entre populações das mesmas, entre variedades e dentro de uma mesma variedade, sendo que o potencial de armazenabilidade varia entre lotes individuais e dentro de um mesmo lote de sementes.

Condições físicas e fisiológicas de sementes influenciam grandemente o período de sua viabilidade. Sementes que apresentam quebras, trincas ou rachaduras deterioram mais rapidamente que sementes não danificadas (McDonald, 1985; Priestley, 1986; Brandão Jr. et al., 1999). Na ausência de sintomas físicos, sementes fisiologicamente danificadas tornam-se susceptíveis à rápida deterioração. Vários tipos de estresses ambientais durante o desenvolvimento da semente, e, principalmente, na maturação fisiológica, podem reduzir sua longevidade, como por exemplo, deficiência de minerais (Harrington, 1960), água (Haferkamp, Smith e Nilan, 1953), e temperaturas extremas (Justice e Bass, 1978). Sementes imaturas e pequenas dentro de um lote de sementes não apresentam a mesma armazenabilidade que as sementes maduras e grandes (Wien e Kueneunan, 1981; Minor e Paschal, 1982). A dureza do endosperma da semente também aumenta a sua longevidade (Patil e Andrews, 1985).

Entre os muitos eventos que têm sido identificados ou sugeridos como básicos da deterioração de sementes estão: aberrações cromossômicas e danos no DNA (Bewley e Black, 1982; Roberts, 1972; Osborne, 1983; Vázquez, Montiel e Vázquez-Ramos, 1991), alterações ou sínteses de RNA e proteínas (Osborne, 1980; Kosanke et al., 1990), mudanças em enzimas e proteínas de reserva (Basavarajappa, Shetty e Prash, 1991), diferenças na atividade respiratória e produção de ATP (Côme e Corbineau, 1989; Villierse Edgcumbe, 1975) e alterações no sistema de membrana (Bewley, 1986; Priestley, 1986;

Wilson e McDonald, 1986; Smith e Berjak, 1995). Essa separação em eventos não pode ser vista como mutuamente exclusiva.

A perda da viabilidade de sementes é altamente dependente da temperatura de armazenamento e do grau de umidade das mesmas (Roberts, 1972; Priestley, 1986). Os efeitos da umidade relativa e conseqüente umidade da semente e temperatura do ambiente de armazenamento são altamente interdependentes. Ambos os parâmetros influenciam o metabolismo das sementes e podem ser associados as várias mudanças bioquímicas e metabólicas que podem resultar na perda de integridade de membranas, diminuição de RNA e da síntese de proteínas e produção de ATP (Priestley, 1986). Alta umidade relativa aumenta o teor de água das sementes, o que influencia eventos bioquímicos como aumento da atividade de enzimas hidrolíticas, aumento de respiração e aumento de ácidos graxos livres. Altas temperaturas contribuem para aumentar a taxa enzimática e a ocorrência de reações metabólicas, o que leva a uma deterioração mais rápida. Todavia, a umidade da semente é considerada como o fator mais crítico na manutenção da longevidade das sementes (Copeland e McDonald, 1995).

Temperaturas sub zero (temperaturas de congelamento) limitam a longevidade de muitas espécies de sementes. A exposição direta a temperaturas congelantes induzem injúrias letais (Scebba, Sebastiani e Vitagliano, 1999).

Eira et al. (1999) estudaram o efeito do grau de umidade e da temperatura de secagem na sobrevivência de sementes de *Coffea* spp. Esses autores detectaram diferenças em níveis de tolerância à dessecação e sugerem que essas diferenças podem ser atribuídas à variação genética. *C. racemosa* apresentou-se como a espécie mais tolerante, enquanto *C. liberica* foi a mais sensível à desidratação. Conteúdos de umidade críticos foram mais altos quanto menor a temperatura de exposição. Foram ainda reportadas diferenças em

tolerância entre cultivares e espécies similares, o que proporciona uma oportunidade para estudar a base genética da tolerância à dessecação em *Coffea*.

2.2. Aquisição da Tolerância à Dessecação nos Diferentes Estádios de Desenvolvimento

Na maioria das espécies, o crescimento e desenvolvimento das sementes é paralisado no final da maturação. Essa fase é marcada pela queda no conteúdo de água, que, provavelmente, é resultante da desconexão entre a semente e a planta mãe. Nessa fase de amadurecimento, a semente sofre uma adaptação estratégica para torná-la apta a tolerar as severas condições ambientais, garantindo assim melhor sobrevivência das espécies durante o armazenamento e disseminação (Leopold, 1990; Guimarães, 2000). Em outras espécies (recalcitrantes) as sementes não podem resistir à dessecação, devendo seu conteúdo de água permanecer alto durante todo o seu desenvolvimento e maturação.

A aquisição da tolerância à dessecação ocorre durante a maturação, antes que as sementes sofram uma severa queda no seu conteúdo de água. Porém, não se pode afirmar se a tolerância é adquirida antes ou em resposta à perda de água. Algumas sementes apresentam uma rápida transição de uma fase de intolerância à tolerância à dessecação, podendo ou não coincidir com a deposição de reservas. Segundo Sanhew e Ellis (1996), a maturidade fisiológica e a secagem após a maturidade não são pré-requisitos para a germinação, mas a tolerância à rápida secagem é desenvolvida em resposta à perda de água após a maturidade.

Finch - Savage (1992), estudando o desenvolvimento de sementes de *Quercus robur*, uma espécie recalcitrante, verificou uma paralisação prematura do seu desenvolvimento, antes desta ter desenvolvido tolerância à dessecação.

Esse autor levantou a hipótese de que o procedimento recalcitrante é resultado de um término precoce do desenvolvimento, e que nessas circunstâncias, as sementes nunca serão tolerantes à dessecação. Farrant et al. (1997), estudando a organização subcelular e a atividade metabólica durante o desenvolvimento de três espécies de sementes com diferentes níveis de tolerância à dessecação, verificaram que os dados são consistentes com a hipótese de que sementes recalcitrantes apresentam um desenvolvimento truncado. Desde que exista uma correlação inversa entre o tempo de maturação das espécies de *Coffea* quanto a tolerância à dessecação, Eira et al. (1999) sugerem modificar essa hipótese para a de que a maturação é particularmente lenta em espécies mais recalcitrantes.

Carvalho e Alvarenga (1979) observaram que sementes provenientes de frutos em diferentes estádios de desenvolvimento, como “chumbinho” e “verdecana”, germinam em porcentagens muito inferiores do que as sementes de frutos cereja. Osei-Bonsu et al. (1989) verificaram, porém, que sementes de *C. canephora*, oriundas de frutos amarelos e amarelo-esverdeados, apresentam germinação superior às sementes de frutos cereja.

Segundo Ellis, Hong e Roberts (1991), sementes de cultivares de *C. arabica*, oriundas de frutos de maturidade intermediária (amarelos) toleraram uma maior dessecação (4-5% de umidade) quando comparadas com as de frutos maduros (vermelhos) ou imaturos (verdes). A sensibilidade à dessecação nesses estádios foi semelhante àquelas observadas em sementes de espécies ortodoxas após o início da germinação. Conseqüentemente, a possibilidade de existir uma categoria intermediária entre ortodoxa e recalcitrante tem sido levantada (Ellis, Hong e Roberts, 1990, 1991).

Pammenter, Farrant e Berjak (1984) têm sugerido que sementes recalcitrantes exibem sinais de alguns processos germinativos durante o armazenamento.

Durante a germinação, antes da protrusão da radícula, as sementes podem ainda resistir à secagem extrema. Entretanto, após essa etapa, ocorre a perda progressiva da tolerância à dessecação (Leprince et al., 1990).

A aquisição de tolerância à dessecação não é um processo sincronizado entre sementes individuais e nem entre os diferentes tecidos da semente, podendo ocorrer variações no tempo necessário para o início da tolerância à dessecação entre sementes (Ellis, Hong e Roberts, 1987; Leprince, Bronchart e Deltour, 1990). A exemplo de variações entre tecidos embrionários, Leprince (1992) verificou que, em sementes de brassica, os tecidos dos cotilédones apresentaram-se tolerantes antes dos da radícula, que se manteve sensível à dessecação por um período mais longo durante o desenvolvimento. Oishi e Bewley (1990), também observaram que as camadas de aleurona de sementes de milho em desenvolvimento apresentaram tolerância à dessecação anteriormente ao embrião.

2.3. Taxa de Secagem

Um fator adicional que contribui para a variabilidade na resposta das sementes a sensibilidade à dessecação é a taxa de secagem. Geralmente, um menor conteúdo de água na semente pode ser tolerado em taxa de secagem rápida. Ainda há de se considerar que sementes de menor tamanho, a semente não permite uma rápida secagem, o que é particularmente visível quando eixos isolados são secados (Pammenter, Vertucci e Berjak, 1991, 1993). Não é considerado que essa secagem rápida induza a alguma forma de tolerância à dessecação. No entanto, sabe-se que a rápida secagem não permite tempo suficiente para que se processem reações deletéricas que causam a perda da viabilidade (Pammenter, Vertucci e Berjak, 1991; Berjak, Vertucci e Pammenter, 1993; Pammenter et al., 1998).

Quando secado para conteúdos de água na faixa de 0,4-0,2g H₂O/g massa seca (g/g), o eixo isolado que é essencialmente sensível à dessecação não irá sobreviver por longo período nesse estado parcialmente desidratado e sob condições de temperatura ambiente (Eira et al., 1999). O efeito da taxa de secagem tem sido também reportado para sementes inteiras, porém com dano muito menos extenso em sementes inteiras (Farrant, Berjak e Pammenter, 1985), e em alguns casos esse dano não é evidente (Finch-Savage, 1992). A redução do efeito da secagem em sementes inteiras pode ser em função dessas não poderem ser desidratadas tão rapidamente quanto os eixos excissados; apesar de que Finch-Savage (1992) tem levantado a hipótese de que o método utilizado na remoção do eixo pode influenciar a resposta da desidratação de eixos isolados.

Os resultados obtidos por Pammenter et al. (1998), confirmam que a taxa de secagem influencia a sensibilidade à dessecação de sementes inteiras. A resposta diferencial para desidratação a diferentes taxas de secagem, implica que não é possível definir o conteúdo de umidade crítica para a perda da viabilidade para sementes recalcitrantes. Provavelmente, distribuição desigual de água nos tecidos é uma das causas que contribui para a sobrevivência das sementes secadas rapidamente para baixos conteúdos de água. Essas observações sugeriram que a secagem lenta proporciona uma desidratação homogênea e que a secagem rápida proporciona uma secagem desigual através dos tecidos. Conclui-se que a principal causa da menor viabilidade em material secado lentamente foi, provavelmente, consequência, principalmente, de processos primários de degradação de membrana.

2.4. Ultraestrutura

Deficiências na integridade de membrana podem ser medidas pela lixiviação de eletrólitos da célula (De Paula et al., 1994), ou visualizadas por meio de análise ultraestrutural (Castro e Martinez – Hondavilla, 1984).

Estudos ultraestruturais de tecidos, após dessecação, têm revelado que a membrana celular é um dos primeiros pontos de injúria. Células de embriões imaturos de *Phaseolus vulgaris* intolerantes à dessecação apresentaram colapso geral nas membranas, em contraste às de embriões secos, tolerantes, cujas membranas mantiveram sua integridade (Dasgupta, Bewley e Yeung, 1982). Em sementes de milho germinando, cujas radículas eram sensíveis à dessecação, foram detectados danos na membrana plasmática, enquanto em radículas tolerantes, as membranas apresentaram-se intactas (Crevecour, Deltour e Bronchart, 1976; Sargent, Mandi e Osborne, 1981).

Amorim et al. (1977) indicaram que a alteração da estrutura de membranas celulares, ocasionada por temperaturas extremas, altas ou baixas, variações na umidade do ar e injúrias de secagem, induz a perda do poder germinativo de sementes de cafeeiro em decorrência da perda de seletividade e da organização das membranas.

Farrant et al. (1997) estudando a organização subcelular e a atividade metabólica durante o desenvolvimento de 3 espécies de sementes com diferentes níveis de tolerância à dessecação, verificaram que, durante o desenvolvimento das sementes, ocorreram reduções no teor de água, na taxa de respiração, na vacuolização e um aumento na deposição de reservas insolúveis que se correlacionaram diretamente com o aumento da tolerância à dessecação. Esses parâmetros não foram alterados durante o desenvolvimento de sementes de uma espécie intolerante à dessecação (*Avicennia marina*). Segundo os autores, uma importante diferença ultraestrutural que ocorre em sementes em

desenvolvimento de *Phaseolus vulgaris* e *Aesculus hippocastanum* tolerante e semi-tolerante à dessecação, respectivamente, é a maior área proporcional de endomembranas em mitocôndrias de células de meristema de radícula em *A. hippocastanum* e em *P. vulgaris*. Os dados são consistentes com a hipótese de que extensiva vacuolização e grande quantidade de metabólitos contribuem para sensibilidade à dessecação.

Pammenter et al. (1998), verificaram, por observações microscópicas, diferenças ultraestruturais quando os tecidos foram secados a duas diferentes taxas de secagem. Células de eixo de sementes, com conteúdo de água similares, submetidas à secagem lenta, exibiram deterioração de membrana maior do que as daquelas secadas rapidamente. Situação semelhante foi encontrada em células oriundas de eixos de viabilidade similares, porém com diferentes conteúdos de água. Essas observações são consistentes com a hipótese de que diferentes processos degradativos causam perda de viabilidade em função da taxa de secagem, e que as membranas são particularmente susceptíveis a danos durante a secagem lenta. Vale ressaltar que alguns dos danos de ultraestrutura observados foram resultados da reidratação parcial durante a fixação aquosa.

2.5. Acumulação de Açúcares

Além de ser um solvente para reações bioquímicas, a água é um importante estabilizador estrutural para os organismos. Interações hidrofílicas e hidrofóbicas proporcionam estrutura para macromoléculas e organelas dentro da célula. Estruturas de membranas, consideradas como local primário de danos por dessecação, em particular, dependem dessas interações complexas (Crevecoeur, Deltour e Bronchart, 1976; Senaratna e Mckersie, 1983). A hipótese da substituição da água sugere que compostos polihidróxidos podem substituir a água na estabilização de estrutura de membranas no estágio seco (Crowe, 1971;

Santarius, 1973). Neste caso os grupos hidroxil podem ligar hidrogênio com grupos de cabeças polares (Crowe, Crowe e Chapman, 1984), propiciando as interações hidrofílicas necessárias para estabilizar as estruturas de membrana.

Uma característica das sementes ortodoxas é a sua habilidade para resistir à dessecação. Proteínas que ocorrem na maturação, sacarose e oligossacarídeos da série rafinose, têm sido considerados como um dos principais fatores na aquisição de tolerância à dessecação (Horbowicz e Obendorf, 1994; Vertucci e Farrant, 1995).

A acumulação de oligossacarídeos durante a maturação de sementes é associada com a aquisição de tolerância à dessecação. Açúcares são substâncias consideradas eficientes em estabilizar macromoléculas (Colaco et al., 1990; Hottiyer et al., 1994) e estrutura de membranas (Leprince, Hendry e Mckersie, 1993), durante a dessecação. Açúcares redutores, como glicose, frutose, galactose e maltose estão ausentes ou presentes em baixas quantidades, em sementes maduras e secas (Horbowicz e Obendorf, 1994). Açúcares redutores, especialmente monossacarídeos, promovem produtos da reação Maillard (Sun e Leopold, 1995), estimulam respiração (Leprince e Walters-Vertucci, 1995) e aumentam a formação de radicais livres (Finch-Savage et al., 1994, Leprince et al., 1995). Então, tecidos que contêm alta concentrações destes açúcares, como tecidos apicais de sementes germinando, tendem a ser mais sensíveis à dessecação (Koster e Leopold, 1988). Açúcares não redutores, como sacarose e polissacarídeos, são menos reativos e considerados componentes protetores, em associação com tradicionais protetores contra radicais livres, com o ascorbato e glutatona (Kranner e Grill, 1996; Orthen, Popp e Smirnoff, 1994).

A tolerância à dessecação parece ser um processo gradual, e a acumulação de sacarose se correlaciona com estágios iniciais de tolerância à dessecação (Sun e Leopold, 1993), todavia, sacarose sozinha não é suficiente para conferir tolerância à dessecação (Brenac et al., 1997).

Tri- e tetrassacarídeos, assim como rafinose e estaquiase, frequentemente, ocorrem em quantidades consideráveis em sementes secas de muitas espécies (Amuti e Pollard, 1977). Esses açúcares servem muitas vezes como material de reserva ou estão envolvidos na formação do estado vítreo (Bruni e Leopold, 1991; 1992; Koster, 1991). Eles também executam um papel na proteção de membranas e proteínas, de uma forma semelhante à descrita para os dissacarídeos (Crowe et al., 1987; 1988). Em sementes ortodoxas, a menor relação entre sacarose e oligossacarídeos solúveis confere maior armazenabilidade (Horbowicz e Obendorf, 1994). A proporção de oligossacarídeos da família da rafinose e estaquiase é relevante para o mecanismo de tolerância à dessecação de sementes (Chen e Burris, 1990, para milho; Blackman, Obendorf e Leopold, 1992, para soja). Essa hipótese é de que oligossacarídeos da família da rafinose previnem a cristalização da sacarose durante a desidratação (Koster e Leopold, 1988; Koster, 1991; Grases et al., 1994), permitindo a ocorrência de um estado vítreo no citoplasma (Koster e Leopold, 1988). Tem sido proposto que a formação de um estado vítreo estável e a acentuada interação molecular desses açúcares com a água são características cruciais da tolerância à dessecação e armazenabilidade (Koster e Leopold, 1988; Koster, 1991; Bruni, 1993; Sun e Leopold, 1994).

Alguns experimentos indicam que acumulação de oligossacarídeos da série rafinose, durante a formação de sementes, prolonga a sua armazenabilidade (Bernal-Lugo et al., 1993; Horbowicz e Obendorf, 1994). Esse mecanismo pode ser aplicado na armazenabilidade de sementes secas, porém em tecidos intolerantes à dessecação a umidade requerida para a formação do estado vítreo é muito maior (Sun et al., 1994).

Os oligossacarídeos da série rafinose são acumulados tradicionalmente em sementes em desenvolvimento, continuando após a maturidade e dessecação (Saravitz, Pharr e Carter., 1987; Brenac et al., 1997). Os oligossacarídeos da

série rafinose, estão amplamente distribuídos em muitas espécies de sementes e estão localizados em tecidos que permanecem viáveis após a dessecação, incluindo o embrião e a camada de aleurona de cereais, cotilédones e tecidos apicais de legumes e outras dicotiledôneas.

A acumulação de oligossacarídeos, como rafinose e estaquiose, é correlacionada com o mecanismo de tolerância à dessecação de sementes, conferindo maior armazenabilidade. Entretanto, carboidratos sozinhos são provavelmente insuficientes para conferir tolerância à dessecação (Blackman et al., 1991; Leprince, Hendry e Mckersie, 1993).

2.6. Alterações Enzimáticas Relacionadas a Danos de Secagem e Deterioração de Sementes

A exata causa da perda da viabilidade de sementes ainda não está elucidada. Todavia, várias mudanças têm sido largamente associadas à deterioração da semente durante o envelhecimento. Na presença de oxigênio, o envelhecimento de sementes pode levar a mudanças peroxidativas em ácidos graxos polinsaturados (Wilson e McDonald, 1986). Esses radicais livres induzem peroxidação não enzimática e tem grande potencial para danos em membranas, enzimas e ácidos nucleicos e são normalmente uma das principais causas de deterioração de sementes armazenadas (Wilson e McDonald, 1986; Hendry, 1993).

No armazenamento de sementes secas, estresses oxidativos e peroxidação de lipídios, mediados pelos radicais livres são as razões da falta da reorganização da membrana durante a embebição (Pandey, 1992).

Muitas mudanças bioquímicas ocorrem na deterioração das sementes. Essas mudanças incluem alterações em atividades enzimáticas, taxas de respiração e síntese, degradação de ácidos nucleicos e proteínas e mudanças na carga de energia (Priestley, 1986).

Radicais livres e peroxidação de lipídios são considerados como principais contribuintes da deterioração de sementes (Priestley, 1986, Wilson e McDonald, 1986, Hendry, 1993). Eles produzem mudanças em ácidos graxos insaturados que afetam a estrutura e propriedades funcionais das membranas celulares, assim como a inativação de proteínas constituintes de membranas e um aumento na permeabilidade de membrana (Simon, 1974).

A diminuição da atividade respiratória, durante o processo deteriorativo, sugerido por Wilson e McDonald (1986), ocorre pela quebra do gradiente protônico necessário para manter o acoplamento respiratório. Segundo os autores, a membrana da mitocôndria, por ser rica em lipídios insaturados e devido a presença de cristas, está mais sujeita à peroxidação de lipídios, o que, conseqüentemente, interfere nas taxas respiratórias.

Para Murray (1984), o efeito negativo da deterioração de sementes sobre taxas respiratórias resulta em atraso na degradação de reservas, o que prejudica o desenvolvimento do embrião. Esse atraso tem sido atribuído a um escasso desenvolvimento mitocondrial durante as primeiras fases da germinação (Morahashi, Bewley e Yeng, 1981), a falta de hidrólises enzimáticas (Rodríguez, 1991) e/ou a escassez de oxidação de metabólitos derivados de hidrólises de reserva (Woodstock, Furrman e Solomons, 1984).

A glutamato oxaloacetato transaminase participa da reação específica de transferência de aminogrupos de um aminoácido ao ácido α cetoglutarato para formar o ácido glutâmico e produzir o cetoácido. Reage em diferentes velocidades com, aproximadamente, todos os outros aminoácidos, em uma reação reversível. Essas reações ocorrem, sobretudo, no citoplasma e o ácido glutâmico, ao qual a membrana mitocondrial é permeável, entra na matriz, onde pode ser novamente transaminado ou ser desaminado pela glutamato desidrogenase. Essa é, portanto, uma enzima atuante no processo de degradação e síntese de proteínas (Conn e Stumpf, 1980), apresentando um importante papel

na germinação de sementes. Utilizando técnicas eletroforéticas, Chauhan, Gopinathan e Babu (1985) observaram em soja e cevada um aumento do número de bandas da glutamato oxaloacetato transaminase com o envelhecimento das sementes. Segundo os autores, essas mudanças no número de bandas são devidas a um aumento na atividade metabólica que ocorre com a evolução do processo de deterioração.

A respiração aeróbica não é o único fator que afeta a deterioração de sementes. Zhang et al. (1994) verificaram que, no metabolismo anaeróbico, a produção de compostos voláteis pela semente pode ser um importante fator que acelera o processo de deterioração. Segundo os autores, dentre os compostos voláteis, o acetaldeído foi o que proporcionou maiores efeitos danosos, independente da umidade relativa e temperatura do ambiente de armazenamento, enquanto o etanol causou deterioração de sementes somente em condições de umidade relativa alta. Brandão Jr., Carvalho e Vieira (1999) observou uma correlação positiva entre viabilidade de sementes de milho e atividade da enzima álcool desidrogenase. Vantoi, Fausey e McDonald Jr. (1987) afirmam que, no metabolismo anaeróbico o piruvato, primariamente produzido na glicólise, é convertido para acetaldeído pela ação da enzima piruvato descarboxilase e o acetaldeído é, então, reduzido para etanol pela álcool desidrogenase

Ushimaru et al. (1999) observaram que, quando plântulas de arroz, desenvolvidas em condições aeróbicas, foram submersas por mais de 1 dia, as mudanças morfológicas em resposta à hipoxia, a exemplo da alongação do coleóptilo, não foram observadas. Por outro lado, a atividade de ADH, uma reconhecida enzima anaeróbica (Sachs e Ho, 1986; Kenned et al., 1992), aumentou após a submersão por 1 dia, e a atividade foi menor do que naquelas que permaneceram 6 dias submersas. O aumento na atividade de ADH demonstrou que as plântulas que permaneceram submersas por 1 dia, após 6 dias, sob condições aeróbicas, foram aclimatadas para condição de hipoxia.

Entretanto, a baixa sobrevivência e as pequenas mudanças morfológicas indicam que as adaptações foram insuficientes, com relação àquelas ocorridas em plântulas submersas por 6 dias. O moderado aumento na atividade de ADH em plântulas de arroz de 6 dias de desenvolvimento que foram colocadas em condições de hipoxia por 1 dia, sugere falhas em suprir suficientemente ATP, via fermentação alcoólica, o que, provavelmente, foi responsável pela rápida morte das plântulas.

Um indicador inicial de danos de membranas induzidos por dessecação é a lixiviação de várias solutos citoplasmáticos (íons, açúcares e proteínas) que ocorrem quando da reidratação de tecidos de sementes desseçadas (Senaratna e Mckersie, 1983; 1986; Crowe et al., 1989). A quantidade de lixiviados citoplasmáticos correlaciona positivamente com a sensibilidade à dessecação (Senaratna e Mckersie 1983; 1986). Experimentos na cinética de lixiviados e a perda natural de substâncias mostraram que lixiviados refletem uma perda parcial da semi-permeabilidade de membranas, sugerindo que a injúria por dessecação está diretamente associada à disfunção de membrana (Senaratna e Mckersie, 1986). O efeito da dessecação na organização física da bicamada de lipídios, tem sido investigado em muitos sistemas experimentais, incluindo modelo de membrana isolada de tecidos vivos (Crowe et al., 1986; Senaratna e Mckersie, 1986) ou preparado de misturas de lipídios (Crowe et al., 1988; Mckersie, Hoekstra e Krieg, 1990).

Segundo Tyagi (1992), a perda da integridade de membrana está diretamente associada ao mecanismo de envelhecimento de sementes. Desse modo, quando embebida em água, as sementes deterioradas apresentam maior lixiviação de solutos, sendo essa liberação proporcional ao estado de desorganização das membranas.

A peroxidação de lipídios resulta em danos de membranas, fator de grande importância na deterioração de sementes armazenadas e redução na

longevidade de sementes sob condições naturais (Khan et al., 1996). Aumento nos danos de radicais livres e declínio na atividade de sistemas de processamento desses radicais, durante o envelhecimento acelerado, tem sido vinculado à perda de viabilidade de sementes (Bailly et al., 1996; Basavarajappa, Shetty e Prakash, 1991; Lin, 1988).

Espécies de oxigênio ativado, como radicais superóxidos (O_2^-), oxigênio singlete ($-O_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH), são gerados em ambientes estressantes por excitação excessiva do metabolismo (Okuda et al., 1991, Wise e Naylor, 1987). Espécies de oxigênio ativados são supostamente responsáveis pela injúria induzida pelo congelamento, por serem produzidos em altas concentrações durante o estresse por frio (Kendall e Mckersie, 1989) e podem iniciar reações degradativas, causando peroxidação de lipídios e danos às membranas, degradação de proteínas e extinção de clorofila (Bowler, Montagu e Inzé, 1992; Rice-Evans, Deplock e Symors, 1991).

Fosfatases representam um extenso grupo de enzimas no reino vegetal. Enquanto fosfatase ácida em cereais tem sido extensivamente estudada, existem poucas informações sobre fosfatase alcalina. A enzima fosfatase ácida (ACP) participa em reações de hidrólise de esteres podendo atuar sobre fosfolipídios de membrana, provocando a peroxidação de lipídios. Rajagopal e Sen-Mandi (1992) observaram maior atividade dessa enzima em embriões de sementes de arroz envelhecidas artificialmente em relação a embriões de sementes envelhecidas naturalmente e não envelhecidas. Outra enzima que também participa da hidrólise de esteres, é a esterase (EST). Shatters et al. (1994), trabalhando com sementes de soja, observaram perda de 77% da atividade de duas esterases após 48 h de envelhecimento e o aumento da atividade total dessa enzima com o envelhecimento. Já a lipoxigenase (LOX) é uma classe de enzimas que contribui na peroxidação de lipídios (Tappel, 1962). Essa enzima catalisa a introdução de oxigênio molecular em ácidos graxos polinsaturados e

seus derivados com um sistema cis, cis-1,4-pentadieno. Sua ação pode gerar quantidades significantes de hidroperóxidos. Estes, juntamente com catalisadores metálicos, podem servir como iniciadores de diferentes radicais livres, os quais, subseqüentemente, proliferam e aceleram a oxidação de lipídios (German e Kinsella, 1985). Além disso, segundo Lagocki et al., 1976 os hidroperóxidos parecem ativar a lipoxigenase.

Para neutralizar estes eventos tóxicos, sistemas anti-oxidativos estão presentes nos tecidos das plantas. Esses sistemas protetores são compostos de constituintes enzimáticos e não enzimáticos, sendo um dos mais eficientes mecanismos de desintoxicação, no qual o peróxido de hidrogênio é removido (Foyer, Descourvieres e Kunert, 1992). Os danos celulares causados pela peroxidação de lipídios podem ser reduzidos ou prevenidos por mecanismos protetores, envolvendo enzimas removedoras de radicais livres e de peróxidos como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (PO) (Basavarajappa, Shetty e Prakash, 1991; Jeng e Sung, 1994; Bailly et al., 1996).

As superóxido dismutase são um grupo de metaloenzimas as quais catalizam a desproporcionalização de radicais superóxidos livres (O_2^-), produzidos em diferentes locais na célula, para oxigênio molecular e H_2O_2 (Rabinowitch e Fridovich, 1983). Existem essencialmente 3 tipos de SOD contendo Mn, Fe, ou Cu mais Zn como metais prostéticos. SOD exerce um importante papel em proteger a célula contra os efeitos deletérios de radicais superóxidos livres (Halliwell e Gutteridge, 1989). A SOD é geralmente considerada como chave na regulações de concentrações intracelulares de radicais superóxidos (O_2^-) e peróxidos, os quais podem reagir nas reações de Haber-Weiss para formar radicais hidroxil (Bowler, Montagu e Inzé, 1992) levando a peroxidação de lipídios (Gutteridge e Halliwell 1990).

Em células vegetais plastídeos, mitocôndrias e microcorpos inevitavelmente produzem oxigênio ativo. O radical superóxido (O_2^-) é gerado

pelo sistema de transporte de elétron em plastídeos e mitocôndrias. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido por intermédio de processos da β -oxidação em glioxissomos e da fotorespiração nos peroxissomos. Peróxidos (O_2^-) são dismutados pela superóxido dismutase (SOD) para H_2O_2 e H_2O . Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerado em microcorpos, é desintoxicado principalmente pela catalase, enquanto em outros compartimentos subcelulares, este é removido pela ascorbato peroxidase (APX) (Asada e Takahashi, 1987).

Com a reação catalizada pela APX, ascorbato é oxidado para radicais monodehidroascorbato. Para reciclagem do ascorbato, monodehidroascorbato redutase (MDAR), dehidroascorbato redutase (DHAR) e glutatona redutase (GR) são necessárias. Essas sete enzimas antioxidativas estão envolvidas no sistema desintoxicativo em plantas (Asada e Takahashi, 1987).

Bailly et al. (1996) verificaram que a perda da viabilidade de sementes de girassol está associada ao decréscimo na atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona redutase (GR).

A catalase está envolvida na remoção de peróxido de hidrogênio (Fridovich, 1986; Smith, 1989). A redução na atividade dessa enzima provavelmente resulta de um decréscimo no nível de glutatona reduzido, reconhecido com um importante fator na prevenção de injúrias oxidativas.

As peroxidases desempenham um papel crítico no metabolismo das plantas e na oxidação por peróxidos, como um acceptor de hidrogênio. As peroxidases desempenham papel importante nos mecanismos de defesa, e sua atividade é estimulada no local de injúria, quando da introdução de patógenos (Gaspar, Pennel e Gresppin, 1986). São encontradas na maioria dos tecidos das plantas em múltiplas formas. Devido a estabilidade das peroxidases e de suas habilidades para catalisar uma variedade de reações, tem sido especulado que elas podem contribuir para a prevenção de degeneração na qualidade de produtos de plantas. (Weng et al., 1991). Em sementes, a perda da atividade

dessa enzima pode tornar a semente mais sensível aos efeitos de O₂ e radicais livres sobre ácidos graxos insaturados de membranas. Essa enzima previne a formação de peróxido nas células, o que provocaria danos as mesmas e tornaria as sementes mais sujeitas a perdas de viabilidade.

Muitos estudos têm focalizado alterações de enzimas antioxidativas em relação a tratamentos de baixa temperatura. (Pinheiro et al., 1997; Saruyama e Tanida, 1995). Alguns autores (Scebba, Sebastiani e Vitagliano, 1998; Schoner e Krause, 1990) têm verificado um rápido e transitório aumento nos níveis de superóxido dismutase, catalase e peroxidase (Okuda et al., 1991) correlacionado a maior tolerância ao estresse oxidativo (Bridger et al., 1994). Um decréscimo de proteção enzimática contra ataque oxidativo também foi associado à perda de viabilidade em sementes durante a secagem (Hendry et al., 1992).

Assim, a incapacidade dos tecidos das sementes sensíveis à dessecação de efetuarem adequada proteção contra eventos oxidativos, consequente do metabolismo desorganizado durante a desidratação, pode ser considerada como uma das principais causas da sensibilidade à dessecação.

As sementes recalcitrantes parecem possuir mecanismos antioxidantes (Hendry et al, 1992; Finch-Savage, Hendry e Atherton, 1994), no entanto, esses mecanismos protetores podem se prejudicar sob condições de estresse hídrico (Smith e Berjak, 1995); sendo, portanto, ineficientes em termos de proteção contra danos por dessecação. Hendry et al. (1992) e Finch-Savage et al. (1993) verificaram um aumento de radicais livres e uma diminuição da atividades das enzimas removedoras desses radicais durante a desidratação dos eixos de sementes não tolerantes à dessecação (*Quercus robur*). Leprince et al. (1990) e Leprince (1992), verificaram uma drástica redução da atividades da enzima superóxido dismutase e da peroxidase em radículas de milho intolerantes à dessecação.

Alguns autores observaram que o declínio da atividade da catalase (Bailly et al., 1996; Sung, 1996; Sung e Chin, 1995), da esterase (Shatters et al., 1994), da peroxidase (Sung, 1996; Sung e Chin, 1995; Sung e Jeng, 1994; Basavarajappa, Shetty e Prakash, 1991), e da superóxido dismutase (Bailly et al., 1996, Sung, 1996; Sung e Chin, 1995; Sung e Jeng, 1994; Pukacka, 1992) foi concomitante com o aumento do envelhecimento natural e/ou artificial das sementes. Em contrapartida, Puntarulo e Boveris (1990), observaram um aumento de atividade da catalase e peroxidase em ambos envelhecimentos (natural e artificial) de eixos de soja.

A perda da atividade enzimática pode ser resultado ou ainda induzido por deterioração de proteínas (ex. reação Maillard) Sun e Leopold (1995). Dessa forma, essa aparente redução da atividade enzimática protetora no metabolismo de peróxido, que ocorre com o envelhecimento, pode levar à ineficiência do sistema de proteção das sementes.

Dessa forma, fica evidente a necessidade de se conhecer mais profundamente os mecanismos envolvidos na perda da viabilidade de sementes de café, anteriormente a qualquer programa que visa a estudar condições ideais para o armazenamento das sementes dessas espécies.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM H.V.; CRUZ, A. R.; DIAS, R.M.; GUTIERREZ, S.E.; TEIXEIRA, A.A.; MELLO, M.; OLIVEIRA, G.D. de. Transformações químicas e estruturais durante a deterioração da qualidade de café . In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1977. p.15-18.
- AMUTI, K.S.; POLLARD, C.J. Soluble carbohydrates of dry and developing seeds. **Phytochemistry**, Oxford, v.16, p.529-532, 1977.
- ASADA, K.; TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: KYLE, D.J.; DEMOND, C.B.; ARNTZEN, C.J. (eds.). **Photoinhibition**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p.227-287.
- BAILLY, C.; BENAMAR, A.; COBINEAU, F.; CÔME, D. Changes in malondialdehyde content and in superoxide de dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.97, n.1, p.104-110, May 1996.
- BASAVARAJAPPA, B. S.; SHETTY, H. S.; PRAKASH, H. S. Membrane deterioration an other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.19, n.2, p.279-286, 1991.
- BERJAK, P.; FARRANT, J.M.; MYCOCK, D.J.; PAMMENTER, N.W. Recalcitrant (homoiohydrous) seeds: the enigma of their desiccation sensibility. **Seed Science and Tecnhnology**. Zurich, v. 18, n.2, p. 297-310, 1990.
- BERJAK, P.; FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W. The basis of reclacitrant seed behaviour. In: TAYLORSON, R.B. (ed.). **Recent advances in the development and germination of seeds**. New York: Plenum Press, 1989, p.89-108.
- BERJAK, P.; MYCOCK, D.J.; WESLEY-SMITH, J.; DUMET, D.; WATT, M.P. Strategies for *in vitro* conservation of hydrated germplasm. In: NORMAH, M.N.; NARIMAH, M.K.; CLYDE, M.M. (eds.). **In vitro conservation of plant genetic resources**. Kuala Lumpur, Malaysia: Percetakan Watan Sdn.Bhd, 1996. p.19-52.

- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Progress in the understanding and manipulation of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds. In: ELLIS, R.M.; BLACK, M; MURDOCH, A.J.; HONG, T.D. (eds.). **Basic and applied aspects of seed biology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p.689-703.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; VERTUCCI, C.W. Homoiohydrous (recalcitrant) seeds: developmental status, desiccation sensitivity and the state of water in axes of *Landolphia kirkii* Dyer. **Planta**. Berlim, v.186, n.1, p.249-261, 1992.
- BERJAK, P.; VERTUCCI, C.W.; PAMMENTER, N.W. Desiccation sensitive (recalcitrant) seeds: effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation - sensitivity in *Camellia sinensis*. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.2, p.155-166, June 1993.
- BERNAL-LUGO, I.; DIAS DE LEON, F.; CASTILLO, A.; LEOPOLD, A.C. Embryo sugar composition and seed storage performance. In CÔME, D; CORBINEAU, F. (eds.). **Proceedings of the Fourth International Workshop on Seeds: basic and Applied Aspects of Seed Biology**. Angers, France: ASFIS, 1993. p. 20-24.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. New York: Springer-Verlag, 1982.
- BEWLEY, J.D. Membrane changes in seeds as related to germination and the perturbations resulting from deterioration in storage. In: MCDONALD, M.B.; NELSON, C.J. (eds.). **Physiology of seed deterioration**. Madison: Crop Science Society of America, 1986. p. 27-47.
- BLACKMAN, S.A.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, n.1, p.225-230, Sept. 1992.
- BLACKMAN, S.A.; WETTLAUFER, S.H.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, n.3, p.868-874, July 1991.
- BOWLER, C.; MONTAGU, M. van; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.43, p.83-116, 1992.

- BRANDÃO JUNIOR, D. da S.; CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.21, n.1, p.114-121, 1999.
- BRANDÃO JUNIOR, D. da S.; DINIZ, A.R.; CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C.; OLIVEIRA, M.; OLIVEIRA, J.A. Avaliação de danos mecânicos e seus efeitos na qualidade de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.21, n.2, p.53-58, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 1992. 365p.
- BRENAÇ, P.; HORBOWICZ, M.; DOWNER, S.M.; DICKER-MAN, A.M.; SMITH, M.E.; OBENDORF, R.L. Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L.) seed development and maturation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, 1997. (in press)
- BRIDGR, G. M.; YANG, W.; FALK, D.E.; MCKERSIE, B.D. Cold acclimation increase tolerance of activated oxygen in winter cereals. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.144, p.235-240, 1994.
- BRUNI, F. Cytoplasmic glass formation in plant seeds. In: CÔME, D.; CORBINEAU, F. (eds.). **Fourth International Workshop on Seeds: basic and applied aspects of seed biology**. Angers, France: ASFIS, 1993. p. 747-754.
- BRUNI, F.; LEOPOLD, A.C. Cytoplasmic glass formation in maize embryos. **Seed Science Research**, Wallingford, v.2, n.2, p.251-253, 1992.
- BRUNI, F.; LEOPOLD, A.C. Glass transitions in soybean seed. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, n.2, p.660-663, June 1991
- CARVALHO, A.; MEDINA FILHO, H.P.; FAZUOLI, L.C.; GUERREIRO FILHO, O.; LIMA, M.M.A. Aspectos genéticos do cafeeiro. **Revista Brasileira de Genética**, Brasília, v.14, n.1, p.135-183, 1991.
- CARVALHO, M.M. de; ALVARENGA, G. Determinação do estágio de desenvolvimento mínimo do fruto do cafeeiro (*Coffea arabica* L.), para germinação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 7. 1979, Araxá. **Resumos...** Rio de Janeiro: I.B.C./GERCA, 1979, p.118-119.

- CHAURAN, K.P.S., GOPINATHAN, M.C.; BABU, C.R. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**. Zurich, v.13, n.3, p.629-41, 1985.
- CHEN, Y.; BURRIS, J.S. Role of carbohydrates in desiccation tolerance and membrane behavior in maturing maize seed. **Crop Science**, Madison, v.30, n.4, p.971-975, July/Aug. 1990.
- CHIN, H.F.; KRISHNA PILLAY, B.; STANWOOD, B.; STANWOOD, P.C. Seed moisture: recalcitrant vs. orthodox seeds. In: MCDONALD, M.B.; NELSON, C.J. (eds.). **Physiology of seed deterioration**. Madison: Crop Science Society of America, 1989. p.15-22.
- CHIN, H.F. Production and storage of recalcitrant seeds in the tropics. **Acta Horticultural**, The Hague, v.83, p.17-21, Apr. 1978.
- CHIN, H. F., **Recalcitrant seeds: a status report**. Rome. International Board for Plant Genetic Resources, 1988.
- COLACO, C.; SEN, S.; THANGAVELU, M; PINDER S.; ROSER, B. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. **Biotechnology**. v.10, p.1007-1010, 1990.
- CÔME, D.; CORBINEAU, F. Some aspects of metabolic regulation of seed germination and dormancy. In: RAYLORSON, R.B. (eds.). **Recent advances in the development and germination of seeds**, New York: Plenum Press, 1989, p.165-179.
- CONN, E.C.; STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Bliicher, 1980. 451p.
- COPELAND, LO.; MCDONALD, M.B. **Principles of seed science and technology**. 3. ed. Boston: KAP, 1995. 409p.
- CORBINEAU, F.; SALMEN-ESPINDOLA, L.; VINEL, D.; CÔME, D. Cellular and metabolic events associated with dehydration of recalcitrant *Arancia angustifolia* embryos. In: ELLIS, R.M.; BLACK, M.; MURDOCH, A.J.; HONG, T.D. (eds.). **Basic and applied aspects of seed biology: proceedings of the fifth international workshop on seeds**, Kluwer: Academic Publishers, 1999. p.715- 721.

- CREVECOEUR, M.; DELTOUR, R.; BRONCHART, R. Cytological study on water stress during germination of *Zea mays*. **Planta**, Berlin, v.132, p.31-41, 1976.
- CROWE J.H. Anhydrobiosis: an unsolved problem. **American Nature**, v.105, p.563-564, 1971.
- CROWE. J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; AURELL WISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemical Journal**, London, v.242, n.1, p.1-10, Feb. 1987.
- CROWE. J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; RUDOLPH, A.S.; AURELL WISTROM, C.; SPARGO, B.J.; ANCHORDOGUY, T.J. Interactions of sugars with membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.947, p.367-384, 1988.
- CROWE. J.H.; CROWE, L.M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. **Science**, New York, v.223, n.4637, p.701-703, Feb. 1984.
- CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; HOESKSTRA, F.A.; AURELL WISTROM, C. Effects of water on the stability of phospholipid bilayers: the problem of imbibition damage *in* dry organisms. In: STANWOOD. P.C.; MCDONALD, M.B. (eds.). **Seed moisture**. Madison: Crop Science Society of America, 1989. p.1-22 (CSSA Special Publication, 14).
- CROWE, L. M.; WOMERSLEY, C.; CROWE, J.H.; RED, D.; APPEL, L., RUDOLPHI, A.S. Prevention of fusion and leakage in freeze-dried liposomes by carbohydrates. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.861, p.131-140, 1986.
- DASGUPTA, J.; BEWLEY, J.D.; YEUNG, E.C. Desiccation-tolerant and desiccation-intolerant stages during the development and germination of *Phaseolus vulgaris* seeds. **Journal of Experimental Botany**, London, v.33, p.1045-1057, Oct 1982.
- DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. Accelerated ageing techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.2, p.427-452, 1973.

- DE PAULA, M.; DARDER, M.; TORRES, M.; MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C.J. Electrical conductivity changes in deteriorated sunflower seeds. *Acta Horticulture, Wageningen*, v.362, p.273-279, 1994.
- DOWNEY, G.; BOUSSION, J. Authentication of coffee bean variety by Near-infrared reflectance spectrons-copy of Dried Extract. *Journal Science Food Agricultural*. v.71, p.41-49, 1996.
- EIRA, M.T.S.; WALTERS, C.; CALDAS, L.; FAZUOLI, L.C.; SAMPAIO, J.B.; DIAS, M.C. Tolerance of *Coffea spp.* seeds to desiccation and jow temperature. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. v.11, n.2, p.97-105, 1999.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour?: I. Coffee. *Journal of Experimental Botany*, Oxfort. v.41, n.230, p.1167-1174, Sept. 1990.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour?: II. Effects of provenance. *Journal of Experimental Botany*, Oxfort, v.42, n.238, p.653-657, May 1991.
- ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. The development of desiccation-tolerance and maximum seed quality during seed maturation in six grain legumes. *Annals of Botany*, New York, v.59, n.1, p.23-29, Jan. 1987.
- ELLIS, R.H.; PIETA FILHO, C. The development of seed quality in spring and winter cultivars of Barly and wheat. *Seed Science Research*, Wallingford, v.2, p. 9-15, 1992.
- FARRANT, J.M.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. The effect of drying rate on viability retention of recalcitrant progagules of *Avicennia marina*. *South African Journal of Botany*, Pretoria, v.51, p.432-438, 1985.
- FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P.; WALTERS, C. Sub cellular organisation and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. *Seed Science Research*, Wallingford, v.7, n.2, p.135-144, Jun. 1997.
- FINCH-SAVAGE, W.E.; BLAKE, P.S. Indeterminate development in desiccation-sensitive seeds of *Quercus robus* L. *Seed Science Research*, Wallingford, v. 4, 127-133. 1994.

- FINCH-SAVAGE, W.E.; GRANGE, R.I.; HENDRY, G.A.F.; ATHERTON, N.M. Embryo water status and loss of viability during desiccation in the recalcitrant seed species *Quercus robur* L. In: CÔME, D.; CORBINEAU, F.(eds.). **Fourth international workshop on seeds: basic and applied aspects of seed biology**. Paris: ASFIS, 1993. p.723-730.
- FINCH-SAVAGE, W.E.; HENDRY, G.A.F.; ATHERTON, N.M. Free radical activity and loss of viability during drying of desiccation-sensitive tree seeds. **Proceeding of the Royal Society of Edimburgh**, Edimburgh, v.102B, p.257-260, 1994.
- FINCH-SAVAGE, W.E. Seed development in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: development of germinability and desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 2, p.17-22, 1992.
- FINCH-SAVAGE, W.E. Seed water status and survival in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: evidence for a critical moisture content. **Journal of Experimental Botany**, London, v.43, p.671-679, 1992.
- FINCH-SAVAGE, W.E. The role of developmental studies in research on recalcitrant and intermediate seeds. In: OUÉDRAOGO, A.S.; POULSEN, K.; STUBSGAARD, F. (eds.). **Intermediate/recalcitrant tropical forest tree seeds**. Rome: IPGRI, 1996. p.83-97.
- FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Archives Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v.147, p.1-11, 1986.
- ePÓYER, C.H.; DESCOURVIERES, P.; KUNERT, K.J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. **Plant Cell Environment**. v. 17, p..507-523, 1992.
- GASPAR, T.H.; PENEL, C.; GREPPIN, H. Peroxidase: structures and catalytic reactions biosynthesis, transport and location, physiological roles. **Bull Groupe Polyphenols**, v.13, p.159-176, 1986.
- GRASES, F.; COSTA-BAUZÁ, A.; GARCIA-RASO, A.; MARCH, J.G. Kinetic – turbidimetric determination of stachyose based on its inhibitory action on sucrose crystallization. **Analytical Letters**, v. 27, p. 819-829, 1994.

- GUIMARÃES, R.M. **Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro** (*Coffea arabica*, L.). Lavras: UFLA, 2000. 180p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. The moisturement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends Biochemical Science**, v.15, p. 129-135, 1990.
- HAFERKAMP, M.E.; SMITH, L.; NILAN, R.A. Studies of aged seeds: I. relation of age of seed to germination and longevity. **Agronomy Journal**, Madison, v.45, n.9, p.434-437, Sept. 1953.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Protection against oxidants in Biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. (eds) **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989. p. 86-123.
- HARRINGTON, J.F. Drying, storing, and packaging seed to maintain germination and vigour. **Seedsmen's Digest**, v. 11, n.1, p.16, 1960.
- HENDRY, G.A.F.; FINCH-SAVAGE, W.E.; THORPE, P.C.; ATHERTON N.M.; BUCKLAND, S.H.; NILSSON, K.A.; SEEL, W.E. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytologist**, London, v.122, n.2, p.273-279, Oct. 1992.
- HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seeds longevity. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 3, p. 141-153, Sept. 1993.
- HONG, T. D.; ELLIS, R.H. Optimum air-dry seed storage environments for arabica coffee. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.20, n.3, p.547-560, 1992.
- HORBOWICZ, M.; OBENDORF, R.L. Seed desiccation tolerance and storability: Dependence on flatulence producing oligosaccharides and cyclitols - review and survey. **Seed Science Research**, Wallingford, v.4. p.385-405, 1994.

- HOTTIYER, T.; DE VIRGILIO, C.; HALL, M.N.; BOLLER T.; WIEMKEN, A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast: II physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *in vitro*. **European Journal of Biochemistry**, v.219, p.187-193, 1994.
- IBRAHIM, A. E., ROBERTS, E. H., MURDOCH, A. J. Viability of lettuce seeds: II. survival and oxygen uptake in osmotically controlled storage. **Journal of Experimental Botany**, London, v.34, p.631-40, 1983.
- ILLY, A; VIANI. R. **Espresso coffee: the chemistry of quality**. London: Academic Press, 1995. 253p.
- JENG, T.L.; SUNG, J.M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.22, n.3, p.531-539, 1994.
- JUSTICE, O.L.; BASS, L.N. **Principles e practices of seed storage**. USDA Agricultural Handbook, 1978. 506p.
- KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E.; FOX, T.C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, n.1, p.1-6, 1992.
- KHAN, M.M.; HENDRY, G.A.F., ATHERTON, N.M.; VERTUCCI-WALTERS C.W. Free radical accumulation and lipid peroxidation in testa of rapidly aged soybean seeds: a light - promoted process. **Seed Science Research**. Wallingford, v.6, n.3, p.101-107, Sept. 1996.
- KRANNER, I.; GRILL, D. Significance of thiol-disulfide exchange in resting stages of plant development. **Botanica Acta**, v.109, p.8-14, 1996.
- KING, M.W.; ROBERTS, E.H., **The storage of recalcitrant seeds: achievements and possible approaches**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1979.
- KOSANKE, R.; BERNNARDT, D.; KOHLER, K.H.; VOIGT, B.; HECKER, M. The transfer of RNA from the nucleus into the cytoplasm in imbibing embryos of *Agrostemma githago* L. seeds of different age. **Acta Physiological Plantarum**, v.12, p. 131-138, 1990.
- KOSTER, K.L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, p.302-304, 1991.

- KOSTER, K; LEOPOLD, A.C. Sugar and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.88, p.829-832, 1988.
- LEOPOLD, A.C. Coping with desiccation. In: ALSCHER, R.G.; CUMMING, J.R. (eds.). **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York: Wiley-Liss, 1990. p.57-86.
- LEPRINCE, O.; BRONCHART, R.; DELTOUR, R. Changes in starch and soluble sugars ins relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. **Plant Cell and Environment**, Madison, v.13, p.539-546, 1990.
- LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; HENDRY, G.A.F. The role of free radicals and radical processing systems in loss desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, London, v.116, n.4, p.573-580, Dec. 1990.
- LEPRINCE, O.; HENDRY, G.A.F.; MCKERSIE, B.D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.3, p.231-246, Sept. 1993.
- LEPRINCE, O.; WERF, A. van der.; DELTOUR, R.; LAMBERS, H. Respiratory pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.84, n.4, p.581-588, Apr. 1992.
- LEPRINCE, O.; WALTERS-VERTUCCI, C. A calorimetric study of the glass transition behaviors in axes of bean seeds with relevance to storage stability. **Plant Physiology**, Rockville, v.109, p.1471- 1481, 1995.
- LIN, S.S. Efeito do período de armazenamento na lixiviação eletrolítica dos solutos celulares e qualidade fisiológica da semente de milho (*Zea mays* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.10, n.3, p.59-67, 1988.
- MATTHEWS, S.; POWELL, A.A. Environmental and physiological constraints on field performance of seeds. **HortScience**, Alexandria, v.21, n.10, p.1125-1128, Oct. 1986.
- MCKERSIE, B.D.; HOEKSTRA, F.A.; KRIEG, L.C. Differences in the susceptibility of plant membrane lipids to peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1030, p.119-126, 1990.

- MINOR, H.C.; PASCHAL, E.H. Variation in storability of soybeans under simulated tropical conditions. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.10, p.131-139, 1982.
- MCDONALD, M.B. Physical seed quality of soybean. **Seed Science and Technology**, v.13, p.601-628. 1985.
- MORAHASHI, Y.; BEWLE, J.D.; YENG, E.C. Biogenesis of mitochondria in peanut cotyledons: influence of the axis. **Journal of Experimental Botany**, London, v.32, n.127, p.605-613, 1981.
- MURRAY, D.R. Axis – Cotyledon relationships during reserve mobilization. In: MURRAY, D.R. (ed.). **Seed Physiology**. New York: Academic Press, 1984. 295p.
- OISHI, M.Y.; BEWLEY, J.D. Distinction between the responses of developing maize kernels to fluridone and desiccation in relation to germinability, α amylase activity, and abscisic acid content. **Plant Physiology**, Rockville, v.94, p.592-598, 1990.
- OKUDA, T., MATSUDA, A. YAMAMAKA, S. SAGISAKA: Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of wheat is caused by cold treatment. **Plant Physiology**, Rockville, v.97, p.1265-1267, 1991.
- OROZCO-CASTILLO, O.; CHALMERS, K.J.; WAUGH, R.; POWELL, W. Detection of diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. **Theor Appl Genet**, v.87, p.934-940, 1994.
- ORTHEN, B.; POPP, M.; SMIRNOFF, N. Hydroxyl radical scavenging properties of cyclitols. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh**. Edinburgh, v.102, p.269-272, 1994.
- OSBORNE, D.J. Biochemical control systems operating in the early hours of germination. **Canadian Journal of Botany**, v.61, p.3568-3577. 1983.
- OSBORNE, D.J.; CHEAH, K.S.E. Hormones and foliar senescence. In: JACKSON, M.B.; GROUT, B.; MACKENSIE, I.A. (eds.). **British plant regulator group**. London: Butterworths, 1982. p. 57-83 (Monograph 8).

- OSEI-BONSU, K.; OPOKU-AMEYAW, K.; AMOAH, F. M.; ACHEAMPONG, K. Effect of ripening and processing on coffee (*Coffea canephora*) seed germination. *Café Cacao Thé*, Paris, v.33, n.4, p.219-222, Oct./Dec. 1989.
- PAMMENTER, N.W.; FARRANT, J.M.; BERJAK, P. Recalcitrant seeds: short-term storage effects in *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. may be germination-associated. *Annals of Botany*, New York, v.54, p.843-846, 1984.
- PAMMENTER, N.W.; GREGGAINS, V.; KIOKO, J.I.; WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P.; FINCH-SAVAGE, W.E. Effects a differential drying rates on viability retention of recalcitrant seeds of *ekeberger capensis*. *Seed Science Research*, Wallingford, v.8, p.463-471, 1998.
- PAMMENTER, N.W.; VERTUCCI, C.W.; BERJAK, P. Homeohydrous (recalcitrant) seeds: dehydration, the state of water and viability characteristics in *Landolphia kirkii*. *Plant Physiology*, Rockville, v.96, p.1093-1098, 1991.
- PAMMENTER, N.W.; VERTUCCI, C.W. ; BERJAK, P. Responses of dehydration in relation to non-freezable water in desiccation-sensitive and tolerant seeds. In: CÔME, D.; CORBINEAU, F. (eds.). **Fourth International Workshop on Seeds: basic and applied aspects of seed biology** . Paris: ASFIS, 1993. p. 867-872.
- PATIL, V.N.; ANDREWS, C.H. Cotton seeds resistant to water absorption and seed deterioration. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.13, p. 193-199, 1985.
- PAULINO, A.J.; MATIELLO, J.B.; PAULINI, A.E.; BRAGANÇA, J.B. **Cultura do Café Conilon: instruções técnicas sobre a cultura de café no Brasil**. Rio de Janeiro, I.B.C., 1987. 43p.
- PINHEIRO, R.G.; RAO, M.V.; PALIYAT, G.; MURR, D.P.; FLETCHER, R.A. Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and pacloburrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiology*, Rockville, v.114, p. 695-704, 1997.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da Semente**. 2. ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

- ④ PRIESTLEY, D.A. **Seed Aging: implications of seed storage and persistence in the soil.** Ithaca: Cornell University Press, 1986.
- PUKACKA, S. Antioxidant status of *Acer platanoides* seeds during accelerated ageing. **Arboretum Kornickie**, v. 37, p. 43-49, 1992.
- PUNTARULO, S.; BOVERIS, A. Effect of natural and accelerated aging on the hydroperoxide metabolism of soybean embryonic axes. **Plant Science**, Amsterdam, v.68, p.27-32, 1990.
- ④ RAJAGOPAL, A.S.M.; SEN-MANDI, S. Studies on acid and alkaline phosphatases in aged rice embryos. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.20, n.2, p.21-222, 1992.
- RENA, A.B; MAESTRI, M. Fisiologia do Cafeeiro. In: RENA, A.B.; MALAVOLTA, E.; ROCWA, M.; YAMADA, T. **Cultura do Cafeeiro: fatores que afetam a produtividade.** Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e Fosfato, 1986. p.13-85.
- RICE-EVANS, C.A.; DIPLOCK, A.T.; SYMONS, M.C.R. Mechanisms of radical production. In: BURDON, R.H.; KNIPPENBERG, P.H. van (eds.). **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: techniques in free radical research.** Amsterdam: Elsevier, 1991. v.22, p.19-50.
- ROBERTS, E.H.; KING, M.W.; ELLIS, R.H. Recalcitrant seeds: their recognition and storage. In: HOLDEN, J.H.W.; WILLIAMS, J. T. (eds.). **Crop Genetic Resources: conservation and evolution.** London: George Allen and Unwin, 1984. p.38-52.
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**. Zurich, v.1, n.3, p.499-514, 1973.
- ROBERTS, E.H. Storage environment and the control of viability. In: ROBERTS, E.H. (ed.). **Viability of seeds.** London: Chapman and Hall Ltd. 1972. p.14-58.
- RODRÍQUEZ, P.M. **Actividad de α -amilase en aleuomas de semillas de trigo deterioradas.** México: UNAM, 1991. 87p. (Tesis – Maestría em Ciências).

- SACHS, M.M.; HO, T.D. Alteration of gene expression during environmental stress in plants. **Annual Review Plant Physiology**, v.37, p.363-376, 1986.
- SANTARIUS KA. The protective effect of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relationship to frost, desiccation and heat resistance. **Planta**, Berlim, v.113, p.105-114, 1973.
- SARGENT, J.A., MANDI, S.S.; OSBORNE, D. The loss of desiccation tolerance during germination; an ultrastructural and biochemical approach. **Protoplasma**, v.105, p.225-229, 1981.
- SARAVITZ, D.M.; PHARR, D.M.; CARTER, T.E. Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. **Plant Physiology**, Rockville, v.83, p.185-189, 1987.
- SARUYAMA, H.; TANIDA, M. Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, Amsterdam, v.109, p.105-113, 1995.
- SIMON, E.W. Phospholipids na plant membrane permeability. **New Phytologist**, London, v.73, p.377-420, 1974.
- SCEBBA, F.; SEBASTIANI L.; VITAGLIANO, C. Changes in activity of antioxidant enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.104, p.747-752, 1998.
- SCEBBA, F.; SEBASTIANI, L.; VITAGLIANO, C. Protective enzymes against activated oxygen species in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings: responses to cold acclimation. **Journal of Plant Physiology**, v.155, n.6. p.762-768. Dec. 1999.
- SCHONER, S.; KRAUSE, G.H. Protective system against active oxygen species in spinach: response to cold acclimation in excess light. **Planta**, Berlim, v.180, p.383-389, 1990.
- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D. Characterisation of solute efflux from dehydration injured soybean (*Glycine max* L. Merr) seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.72, p.991-914, 1983.

- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D. Loss of desiccation tolerance during seed germination: a free radical mechanism of injury. In: LEOPOLD, A.C. (ed.). **Membranes, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Cornell University Press, 1986. p.85-101.
- SHATTERS, R.G.; ABDELGHANY, A.; ELBAGOURY, O.; WEST, S.H. Soybean seed deterioration and response to osmotic priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germination seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.4, n.1, p.33-41, Marc. 1994.
- SMITH, M.T. ; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and sensitive seeds. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (eds.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker Inc. 1995.
- SMITH, M.T. The ultrastructures of physiological necrosis in cotyledons of lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.). **Seed Science and Technology**, Zurich, v.17, p.453-462, 1989.
- SUNG, J.M.; CHIN, C.C. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. **Plant Science**, Amsterdam, v.110, p.45-52, 1995.
- SUNG, J.M.; JENG, T.L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated ageing of peanut seed. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.91, n.1, p.51-55, May 1994.
- SUNG, J.M. Lipid peroxidation and peroxide scavenging in soybean seeds during ageing. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.97, n.1, p.85-89, May 1996.
- SUN, W.Q.; IRVING, T.C.; LEOPOLD, A.C. The role of sugar, vitrification and membrane transition in seed desiccation-tolerance. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.90, n.4, p. 621-628. Apr. 1994.
- SUN, W.Q.; LEOPOLD, A.C. Acquisition of desiccation tolerance in soybeans. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.87, p.403-409, 1993.
- SUN, W.Q.; LEOPOLD, A.C. Glassy state and seeds storage stability: a viability equation analysis. **Annals of Botany**, New York, v.74, p.601-604, 1994.

- SUN, W.Q.; LEOPOLD, A.C. The glassy state and accelerated ageing of soybeans. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.87, n.5, p.767-774, 1993.
- SUN, W.Q.; LEOPOLD, A.C. The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.94, n.1, p.94-104, 1995.
- TYAGI, C.S. Evaluating viability and vigour in soybean seed with automatic seed analyzer. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.20, n.3, p.687-694, 1992.
- USHIMARU, T.; KANEMATSU, S.; SHIBASAKA, M.; TSUJI, H. Effect of hypoxia on the antioxidative enzymes in aerobically grown rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.107, n.1, p.181-187, 1999.
- WANTOAI, T.T.; FAUSEY, N.R.; MCDONALD JUNIOR, M.B. Anaerobic metabolism enzymes as markers of flooding stress in maize seeds. *Plant and Soil*, New York, v.102, n.1, p.33-39, 1987.
- VAZQUEZ, E.; MONTIEL, F.; VAZQUEZ-RAMOS, J.M. DNA ligase activity in deteriorated maize embryo axes during germination: a model relating defects in DNA metabolism in seeds to loss of germinability. *Seed Science Research*, Wallingford, v.1, p.269-273, 1991.
- VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (eds.). *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, 1995. p.237-271.
- VILLIERS, T.A.; EDGCUMBE, D.J. On the cause of seed deterioration in dry storage. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.3, n.3, p. 761-774, 1975.
- VOSSEN, H.A.M. Methods of preserving the viability of coffee seed in storage. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.7, n.1, p.65-74, 1979.
- WENG, Z.; HENDRICKX, M.; MAESMANS, G.; GEBRUERS, K.; TOBBACK, P. Thermostability of soluble and immobilized horseradish peroxidase. *Journal of Food Science*. v.56, p.574-578, 1991.
- WIEN, H.C.; KUENEMAN, E.A. Soybean seed deterioration in the tropics. II. Varietal differences and techniques for screening. *Field Crops Research*, v.4, p.123-132, 1981.

- WISE, R.R.; NAYLOR, A.W. Chilling-enhanced photo-oxidation: evidence for the role of singler oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. **Plant Physiology**, Rockville, v.83, p.278-282, 1987.
- WILSON, D. O.; MCDONALD, M. B. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.14, n.2, p.269-300, 1986.
- WILSON, C.; SHANNON, M.C. Salt-included Na^+/H^+ antiport in root plasma membrane of a glycophytic and halophytic especies of tomato. **Plant Science**, Amsterdam, v.107, p.147-157, 1995.
- WOODSTOCK, L.W.; FURRMAN, K.; SOLOMONS, T. Changes in respiratory metabolism during ageing in seeds an isolated axes of soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v.25, n.1, p.15-26, May 1984.
- ZHANG, M.; MAEDA, Y.; FURIHATA, Y.; NAKAMAR, Y.; ESASHI, Y. A mechanism of seed deterioration in relation to the compounds envolved by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, Wallingford, v.4, n.1, p.49-56, Mar. 1994.

CAPÍTULO 2

Aquisição da Tolerância à Dessecação nos Diferentes Estádios de Desenvolvimento de Sementes de Cafeeiro (*Coffea arabica* L.)

1 RESUMO

BRANDÃO JUNIOR, Delacyr da Silva. **Aquisição da Tolerância à Dessecação nos Diferentes Estádios de Desenvolvimento de Sementes de Cafeeiro (*Coffea arabica* L.).** Lavras: UFLA, 2000. 144 p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia)*

A aquisição da tolerância à dessecação pode ocorrer durante o desenvolvimento das sementes de diversas espécies, entretanto para sementes de cafeeiro, os resultados apresentados pela literatura ainda não são conclusivos. A presente pesquisa foi desenvolvida com os objetivos de verificar em que estágio de desenvolvimento sementes de *Coffea arabica* adquirem tolerância à dessecação e o efeito imediato e ao longo do armazenamento, da secagem sobre a viabilidade e vigor dessas sementes. Foram utilizadas sementes de cafeeiro da cultivar Acaia Cerrado colhidas nos estádios verde (chumbão), verde cana e cereja. Parte das sementes não foi submetida à secagem (controle) e parte foi secada em estufa de circulação forçada, regulada à temperatura constante de 30°C, até atingirem o grau de umidade de 15%. Posteriormente, as sementes foram acondicionadas em recipientes de vidro de 200 ml hermeticamente fechados e mantidos em câmara à temperatura de 10°C e 50% UR. As avaliações foram efetuadas aos zero, 3, 6 e 9 meses de armazenamento, sendo avaliado o grau de umidade, a condição fisiológica, por meio dos testes de germinação, protrusão radicular, percentagem de raízes secundárias, emergência em câmara de crescimento e índice de velocidade de emergência e da condição bioquímica pela análise eletroforética de isoenzimas. Para análise eletroforética foram utilizados os sistemas isoenzimáticos álcool desidrogenase (ADH), fosfatase ácida (ACP), fosfatase alcalina (AKP), esterase (EST), catalase (CAT), peroxidase (PO) e glutamato-oxiloacetato transaminase (GOT). Pelos resultados pode-se observar que sementes de cafeeiro apresentam um aumento do nível de tolerância à dessecação com o aumento do desenvolvimento. Sementes secadas a 15% de umidade mantêm a qualidade fisiológica ao longo de nove meses de armazenamento sob condição de 10°C e 50% de UR. Sementes não secadas (50% de umidade) apresentam queda linear ao longo do armazenamento sob condição de 10°C, 50% UR e embalagem hermética.

* Comitê Orientador: Prof.^ª Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira – UFLA (Orientadora), Dr. Henk W.M. Hilhorst - WUR, Prof.^ª Édila Vilela de Resende Von Pinho, Prof.^ª Maria Laene Moreira de Carvalho, Prof. Renato Mendes Guimarães, Prof. José da Cruz Machado.

2 ABSTRACT

BRANDÃO JUNIOR, Delacyr da Silva. **Acquisition of desiccation tolerance in coffee seeds at different developmental stages:** UFLA, 2000. 144 p. (Thesis – Doctorate in Plant Science)*

Acquisition of desiccation tolerance is a phenomenon which may occur during the development of seeds of several species, being little investigated for coffee seeds. The present research was carried out with the objective of verify in which stage of development of coffee seeds tolerance to desiccation is acquired. Seeds of *Coffea arabica* cultivar Acaiá Cerrado harvested at three maturation stages, green, yellow and redish were used. Part of the seeds was dried in forced air, under constant temperature of 30°C until the seed moisture content reached 15%. Then seeds were stored in hermetic containers in cool chamber at 10°C of temperature and 50% of relative humidity. The evaluation was made after zero, 3, 6 and 9 months of storage, looking at moisture content, physiological conditions through germination test, radical protrusion, percentage of secondary roots, emergence in growth room, emergence speed index, and biochemical condition by electrophoretic analysis of isoenzymes. For the electroforetic analysis the following isoenzymatic systems were used: alcohol desidrogenase (ADH), acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), esterase (EST), catalase (CAT), peroxidase (PO) and glutamate oxiloacethate transaminase (GOT). According to the results it was possible to conclude that coffee seeds present an increased desiccation tolerance as they reach later stage of development. Seeds harvested at the green and yellow stages presented a decline in the production of secondary roots and percentage of seedling emergence. Drying seeds to 15% moisture content provided conditions to keep physiological quality throughout 9 months storage under 10°C and 50% relative humidity. Non dried seeds (50% moisture content) present a linear reduction in the physiological quality when stored at 10°C, 50% relative humidity in hermetic container.

*Guidance Committee: Prof. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira – UFLA (Major Professor), Dr. Henk W.M. Hilhorst - WUR, Prof. Édila Vilela de Resende Von Pinho, Prof. Maria Laene Moreira de Carvalho, Prof. Renato Mendes Guimarães, Prof. José da Cruz Machado.

3 INTRODUÇÃO

A armazenabilidade das sementes ortodoxas é aumentada por decréscimo de temperatura no armazenamento e teor de água da semente (Roberts, 1973). Sementes ortodoxas são, conseqüentemente, tolerantes à dessecação. Já as sementes recalcitrantes não obedecem essas regras, desde que elas perdem a viabilidade, quando o seu grau de umidade é reduzido para alguns valores relativamente baixos (Roberts, 1973). Além disso, algumas sementes recalcitrantes, de origem tropical, também são susceptíveis à injúria por resfriamento, ocorrendo morte de sementes, na faixa de temperatura de 10 a 15°C (Chin, 1988).

Alguns autores classificaram as sementes de cafeeiro (*C. arabica*) como recalcitrante (Roberts, 1973; King, 1979), mas, após alguns anos, foi sugerido que as sementes de cafeeiro não eram verdadeiramente recalcitrantes e poderiam ser ortodoxas (Roberts King e Ellis, 1984). Ellis, Hong e Roberts (1990), sugeriram uma categoria intermediária para sementes de cafeeiro, onde estas possam resistir à desidratação até um certo grau de umidade, mas têm sua armazenabilidade reduzida.

A aquisição da tolerância à dessecação ocorre durante o desenvolvimento das sementes de diversas espécies, entretanto para sementes de cafeeiro, os resultados apresentados pela literatura variam em função das diferentes espécies do gênero *Coffea*. Ellis, Hong e Robert (1991), verificaram que sementes oriundas de frutos de maturidade intermediária (verde cana) foram mais tolerantes à dessecação do que as colhidas no estágio cereja (frutos maduros) ou no estágio verde (imaturos). Já Carvalho e Alvarenga (1979) observaram que a germinação de sementes oriundas de frutos maduros foi muito superior a de frutos imaturos ou de maturidade intermediária. Guimarães (2000)

detectou que o vigor das sementes de cafeeiro aumentou sensivelmente na fase de desenvolvimento entre os estádios verde e verde cana.

A incapacidade dos tecidos das sementes sensíveis à dessecação efetuarem adequada proteção contra eventos oxidativos, conseqüentes do metabolismo desorganizado durante a desidratação e armazenamento, pode ser considerada como uma das principais causas da sensibilidade à dessecação e baixa longevidade das sementes (Leprince, Hendry e Mckersie, 1993). Dessa forma, o balanço entre geração e remoção de radicais, mantido durante a secagem e armazenamento das sementes, se relacionará com a longevidade das mesmas.

Danos celulares causados pela peroxidação de lipídios podem ser reduzidos ou prevenidos por mecanismos protetores, dentre as quais pode-se citar: enzimas removedoras de radicais livres e de peróxidos como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (PO) (Basavarajappa, Shetty e Prakash, 1991; Jeng e Sung, 1994; Bailly et al., 1996; Brandão Jr., Carvalho e Vieira, 1999, Brandão Jr. 1996; Vieira, 1996). Todavia, enzimas como fosfatase ácida (ACP) e fosfatase alcalina (AKP), podem atuar sobre fosfolipídios de membrana, provocando a peroxidação desses lipídios (Rajagopal e Sen-Mandi, 1992; Vieira, 1996; Brandão Jr., Carvalho e Vieira, 1999; Brandão Jr., 1996).

Além da importância das enzimas associadas ao processo de peroxidação, a alteração na atividade de enzimas ligadas ao processo respiratório pode contribuir para a perda da viabilidade da semente. Segundo Wilson e McDonald (1986) a membrana da mitocôndria, por ser rica em lipídios insaturados e devido à presença de cristas, apresenta mais intensamente a peroxidação desses lipídios, o que acaba por interferir com a taxa respiratória. Enzimas, como álcool desidrogenase (respiração anaeróbica) e glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT) (ciclo de Krebs), têm sido investigadas para

correlação com viabilidade (Brandão Jr. 1996; Throuneberry e Smith, 1955; Chauran, Gopinathan e Babu, 1985).

Torna-se evidente a necessidade de se conhecer mais profundamente os mecanismos envolvidos na perda da viabilidade de sementes de cafeeiro, anteriormente a qualquer programa que visa a estudar condições ideais para o armazenamento das sementes dessa espécie.

A presente pesquisa foi realizada com os objetivos de verificar em que estágio de desenvolvimento sementes de *Coffea arabica* adquirem tolerância à dessecação, e o efeito imediato e ao longo do armazenamento, da secagem sobre a viabilidade e vigor das sementes de cafeeiro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Análise e Biotecnologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras (MG). Foram utilizadas sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.), cultivar Acaia Cerrado, colhidas em campos de produção de sementes da universidade.

A colheita e despoldamento dos frutos nos estádios verde (chumbão), verde cana e cereja, foram efetuados manualmente. Após despoldados, os frutos foram degomados por submersão em água à temperatura constante de 30°C durante o período de 24 horas. Em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente e colocadas sobre papel toalha para retirada do excesso de água. Parte das sementes não foi submetida à secagem (controle) e parte foi secada em estufa de circulação forçada, regulada à temperatura constante de 30°C, até as sementes atingirem o grau de umidade de 15% (base úmida). Posteriormente, as sementes foram acondicionadas em recipientes de vidro de 200 ml com tampa, lacradas e armazenadas em câmara fria à temperatura de 10°C e 50% UR.

As avaliações foram efetuadas antes (zero) e após 3, 6 e 9 meses de armazenamento, quanto ao grau de umidade, à condição fisiológica, por meio dos testes de germinação, protrusão radicular, percentagem de raízes secundárias, emergência em câmara de crescimento e índice de velocidade de emergência e da condição bioquímica pela análise eletroforética de isoenzimas.

4.1. Determinação do grau de umidade

Foi determinado pelo método da estufa $105^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, utilizando duas repetições para cada espécie, conforme prescrições das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em percentagem.

4.2. Qualidade fisiológica das sementes

.. Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado com quatro subamostras de 50 sementes para cada uma das quatro repetições dos tratamentos. O endocarpo da semente foi removido antes da semeadura, que foi realizada em papel toalha no sistema rolo, umedecido com água na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel. Os rolos, contendo as sementes, foram mantidos em germinador regulado à temperatura constante de 30°C. As avaliações foram feitas após 15 dias (protrusão de radícula) e 30 dias do início do teste, computando-se as plântulas normais. Foram consideradas plântulas normais aquelas que apresentavam radícula e hipocótilo com comprimento superior a 2 cm e se encontravam aparentemente sadias.

.. Protrusão radicular

A porcentagem de protrusão de radículas foi avaliada aos 15 dias após semeadura.

.. Percentagem de raízes secundárias

Foi efetuada, conjuntamente com o teste de germinação, onde foram computadas, aos 30 dias após a semeadura, as plântulas que apresentavam raízes secundárias. Os resultados foram expressos em porcentagem.

..Emergência sob condições de câmara de crescimento

Esse teste foi conduzido em bandejas, contendo uma mistura de areia+terra na proporção de 2:1. Foram utilizadas 4 repetições de 50 sementes/amostras semeadas a uma profundidade de 3 cm. As bandejas foram dispostas inteiramente casualizadas em câmara de crescimento regulada à

temperatura constante de 30°C em regime alternado de luz e escuro de 12 horas. No decorrer do teste foram realizadas regas quando necessárias. A emergência foi determinada com contagem única das plântulas emergidas, aos 60 dias após semeadura. Foram consideradas emergidas plântulas que apresentavam os cotilédones acima do substrato. Os resultados foram expressos em porcentagem.

.. Índice de velocidade de emergência

O índice de velocidade de emergência foi conduzido conjuntamente com o de emergência. A velocidade de emergência foi determinada anotando-se diariamente o número de plântulas com mais de 2 cm de comprimento, até a completa estabilização do estande. O índice de velocidade de emergência foi estabelecido segundo critérios de Maguirre (1962).

4.3. Análise eletroforética

Para análise eletroforética de isoenzimas foram utilizadas amostras de 100 sementes de cafeeiro liofilizadas e trituradas a frio em moinho refrigerado. O triturado foi armazenado em deep freezer a -85°C.

A extração das enzimas foi efetuada adicionando a 100 mg do pó da semente 200µl do tampão de extração (0,2M Tris, pH 8,0, 0,1% β mercaptoetanol, 0,4% PVP, 0,4% PEG, 1mM EDTA). O homogeneizado foi incubado em gelo por 2 horas e centrifugado a 16000 xg a 4°C por 60 minutos. Posteriormente 30µl do sobrenadante de cada tratamento foram aplicados nos géis de poliacrilamida a 4,5% (gel concentrador) e 7,5% (gel separador). As corridas eletroforéticas foram desenvolvidas a 12 mA no gel concentrador e 24 mA no gel separador. Os géis foram revelados para: álcool desidrogenase (ADH), esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), fosfatase alcalina (AKP), catalase (CAT), peroxidase (PO) e glutamato-oxalacetato transaminase (GOT), de acordo com metodologia descrita por Alfenas (1998), sendo que a peroxidase

foi revelada apenas para os períodos de armazenamento de zero e três meses e a alcalina para os períodos de seis e nove meses.

4.4. Procedimento estatístico

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3x2x4) com 4 repetições, sendo 3 estádios de desenvolvimento (verde, verde cana e cereja), 2 teores de água (sementes não secadas e secadas a 15% de umidade) e 4 épocas de avaliação (zero, 3, 6 e 9 meses). Os dados percentuais foram transformados em $\text{arc. sen } \sqrt{x/100}$, sendo realizada análise de variância para todos os parâmetros analisados, excetuando para a análise eletroforética.

Para comparação das médias de estádio de desenvolvimento e dos efeitos da secagem sobre as sementes foi utilizado o teste de Tukey, a 5% de probabilidade, enquanto que, para comparação das épocas de avaliação, foi empregado o estudo de regressão polinomial.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados contidos na Tabela 1, observa-se que as sementes de cafeeiro, colhidas em diferentes estádios de maturação, mantiveram seus teores de água praticamente inalterados durante o armazenamento, o que demonstra que os recipientes utilizados se mostraram eficientes em manter a umidade das sementes.

Tabela 1. Valores médios de umidade das sementes de cafeeiro, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento, antes e após a secagem, ao longo do armazenamento em câmara fria (10^o C e 50% UR). UFLA, Lavras, MG, 2000.

Estádio de Maturação	Umidade (%)			
	0 Meses	3 Meses	6 Meses	9 Meses
Verde úmida	53,0	52,3	53,2	52,8
Verde cana úmida	50,0	49,7	50,3	50,5
Cereja úmida	49,7	51,1	49,3	50,3
Verde seca	15,7	16,4	16,5	16,3
Verde cana seca	14,4	15,7	14,3	14,7
Cereja seca	13,2	13,3	13,2	13,3

Pelos resultados da análise de variância (Tabela 1A), observa-se que, durante a primeira época de avaliação, houve efeito significativo para os fatores: estágio de desenvolvimento; secagem e interação entre estes fatores para todos os parâmetros avaliados. Os valores médios e os coeficientes de variação das avaliações de protrusão radicular, germinação, percentagem de raízes

secundárias, emergência em câmara e índice de velocidade de emergência estão presentes na Tabela 2.

Pelos resultados dos testes determinantes da condição fisiológica, conduzidos anteriormente ao armazenamento, pode ser verificado que a qualidade fisiológica das sementes colhidas no estádio verde e não secadas (controle) foi inferior a daquelas colhidas no estádio verde cana e cereja, que por sua vez não diferiram significativamente entre si (Tabela 2). Esses resultados contrastam com os obtidos por Carvalho e Alvarenga (1979) que detectaram valores percentuais de germinação inferiores nas sementes de cafeeiro colhidas no estádio verde (chumbinho) e verde cana, em relação as colhidas no estádio cereja.

Os testes determinantes da condição fisiológica detectaram reduções percentuais significativas quando as sementes, colhidas no estádio verde, foram secadas para 15% de umidade. Por outro lado, os testes de emissão de raízes secundárias e emergência em câmara de crescimento, detectaram diferenças significativas do efeito da secagem sobre a condição fisiológica das sementes, colhidas no estádio verde cana, e não foi detectada nenhuma diferença significativa para efeito de secagem nas sementes colhidas no estádio cereja (Tabela 2). Esses resultados sugerem que sementes de *C. arabica* colhidas no estádio verde não toleram à dessecação e que, entre o estádio verde e verde cana, adquirem certa tolerância à dessecação, tornando-se, no entanto, mais tolerante no estádio cereja. Diversos autores (Bohicchio et al., 1993, 1994, 1996; Brenac et al., 1997) verificaram que embriões frescos de sementes de milho germinam mesmo em estádio precoces de desenvolvimento, quando eles ainda são intolerantes à dessecação, e que a secagem induz a um desvio do programa de desenvolvimento para o programa de germinação, no caso de sementes ortodoxas.

Tabela 2. Resultados médios de protrusão radicular, germinação, percentagem de raízes secundárias, emergência e índice de velocidade de emergência de sementes de cafeeiro colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento, antes (controle) e após a secagem. UFLA, Lavras, MG, 2000.

Maturação	Protrusão radicular (%)		Germinação (%)		Raiz secundária (%)	
	Secadas	Controle	Secadas	Controle	Secadas	Controle
Cereja	85,1 a A	84,5 a A	96,3 a A	96,3 a A	85,8 a A	88,5 a A
Verde cana	80,1 a A	86,5 a A	94,9 a A	92,1 ab A	54,6 b B	83,5 a A
Verde	50,0 b B	73,2 b A	63,1 b B	86,0 b A	23,4 c B	50,5 b A
C. v.	6,749		5,719		5,655	
Média	61,635		71,516		54,326	

Maturação	Emergência (%)		Velocidade de Emergência (Índice)	
	Secadas	Controle	Secadas	Controle
Cereja	95,1 a A	98,2 a A	1,115 a A	1,115 a A
Verde cana	94,3 a B	99,3 a A	1,082 a A	1,132 a A
Verde	43,9 b B	76,3 b A	0,508 b B	0,845 b A
C. v.	6,666		8,169	
Média	70,546		0,972	

-Médias seguidas de uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, relativo a cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

De uma maneira geral, pode ser observado que sementes colhidas nos estádios verde cana e cereja, apresentaram uma melhor condição fisiológica que aquelas colhidas no estágio verde, sendo que os testes de percentagem de raízes secundárias e emergência em câmara de crescimento detectaram ser a semente colhida no estágio cereja, significativamente, mais tolerante à dessecação que as colhidas no estágio verde cana, seguidas das colhidas no estágio verde (Figura 1 e 2). Araújo, Corrêa e Pereira (1989), não verificaram efeito imediato da secagem nas temperaturas de 30 e 40°C sobre a qualidade das sementes oriundas de frutos cereja. O efeito deletério da secagem só foi verificado após o período de seis meses de armazenamento sob condições de ambiente de laboratório. Guimarães (2000) detectou que o vigor das sementes de cafeeiro aumentou sensivelmente na fase de desenvolvimento entre os estádios verde e verde cana. Entretanto, Ellis, Hong e Roberts (1991), verificaram que sementes de cultivares de *C. arabica*, oriundas de frutos de maturidade intermediária, apresentaram-se mais tolerantes a uma dessecação até 4-5% de umidade do que as de frutos maduros ou imaturos. Ellis, Hong e Roberts (1991), utilizaram lotes de sementes de diferentes procedências com diferentes estádios de maturação, podendo ter ocorrido efeito do lote, além da maturação.

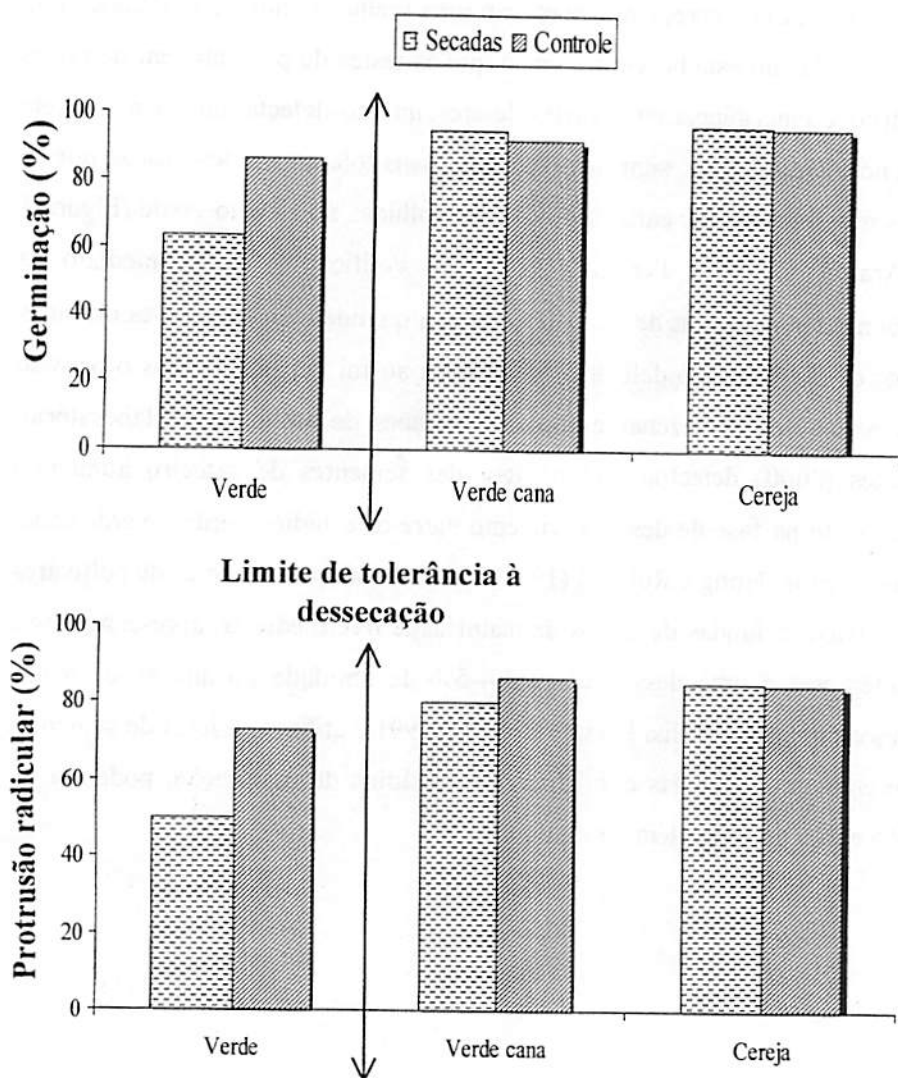


Figura 1. Efeito da secagem sobre a germinação e protrusão radicular de sementes de cafeeiro colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento. UFLA, Lavras-MG, 2000.

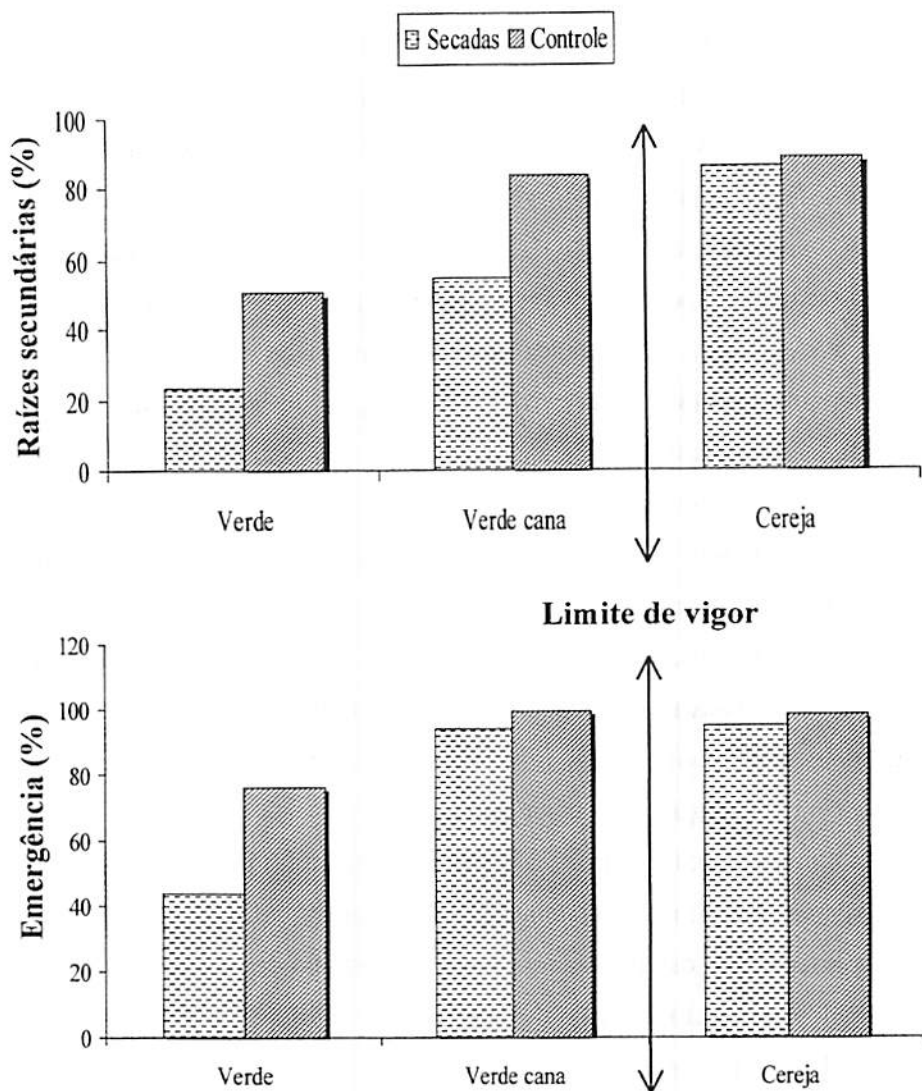


Figura 2. Efeito da secagem sobre a emissão de raízes secundárias de sementes de cafeeiro colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Análise eletroforética

Pelas Figuras 3 e 4 podem ser observados os padrões eletroforéticos da fosfatase ácida (ACP), esterase (EST), álcool desidrogenase (ADH), catalase (CAT), peroxidase (PO), e glutamato-oxilacetato transaminase (GOT) das sementes de cafeeiro colhidas em diferentes estádios de maturação e submetidas à secagem. Nota-se que, em função da secagem e do estádio de maturação das sementes de cafeeiro, ocorreram alterações nos padrões eletroforéticos das enzimas, com exceção da ACP que não apresentou atividade.

A enzima fosfatase ácida participa em reações de hidrólise de ésteres, podendo atuar sobre fosfolipídios de membrana, provocando a peroxidação desses lipídios. Autores como Brandão Jr. (1996) e Vieira (1996) só verificaram atividade da fosfatase ácida naquelas sementes de milho e algodão, respectivamente, que se apresentavam em avançado processo de deterioração. Vieira (1996), observou ainda grande incidência de microrganismos naquelas sementes que apresentavam atividade da ACP e levantou a hipótese de que a atividade detectada poderia ser proveniente dos microrganismos que se encontravam em associação com as sementes.

As enzimas álcool desidrogenase (ADH) e catalase (CAT) apresentaram atividade apenas em sementes submetidas à secagem e foi observado um aumento da intensidade das bandas, em função do estádio de desenvolvimento. Esses resultados se relacionam com os detectados pelo teste de percentagem de raízes secundárias, em que foram obtidos valores percentuais menores em sementes secadas, quando colhidas no estádio verde e verde cana (Figura 2), fato esse que sugere uma menor tolerância à dessecação nesses estádios. Provavelmente, os danos ocasionados às sementes pela retirada da água tenham contribuído para uma mudança da via molmal de suprimento de AATP, podendo a atividade da ADH resultar em um suprimento imediato de ATP, via

fermentação alcoólica Dessa forma, a via fermentativa torna-se fundamental para a manutenção da viabilidade da semente na condição seca. A ADH é uma enzima que atua no metabolismo anaeróbico, no entanto o metabolismo de sementes secadas e armazenadas à baixa temperatura e umidade relativa (10°C e 50% UR), é reduzido e a maior atividade da ADH pode resultar de imediato em maior suprimento de ATP, via fermentação alcoólica.

As funções metabólicas da enzima catalase (CAT) e os resultados de atividade dessa enzima, também sugere, a exemplo do já detectado por outras determinações, um aumento da tolerância à dessecação com o aumento do estágio de desenvolvimento das sementes. A catalase, enzima envolvida na remoção de peróxido de hidrogênio (Fridovich, 1986), pode desempenhar um controle desses peróxidos endógenos, através de um ciclo de óxido-redução, envolvendo glutadione e ascorbato (Smith et al., 1989). A menor atividade desta enzima, provavelmente, resulta na diminuição da prevenção de danos oxidativos. Esses danos ocorrem, principalmente, em tecidos de sementes sensíveis à desidratação. A maior atividade dessa enzima em sementes colhidas no estágio cereja e a menor em sementes do estágio verde, e ausência da atividade em sementes não secadas, pode estar relacionada a tolerância à dessecação, pois, segundo Leprince, Hendry e Mckersie (1993), a incapacidade dos tecidos das sementes sensíveis à dessecação efetuarem adequada proteção contra eventos oxidativos, conseqüentes do metabolismo desorganizado durante a desidratação e armazenamento, pode ser considerada como uma das principais causas da sensibilidade à dessecação e baixa longevidade das sementes. Esses resultados são concordantes com os obtidos por Bailly et al. (1996), Sung e Chin (1995) e Sung (1996), que verificaram um decréscimo da atividade da catalase com a perda da viabilidade das sementes.

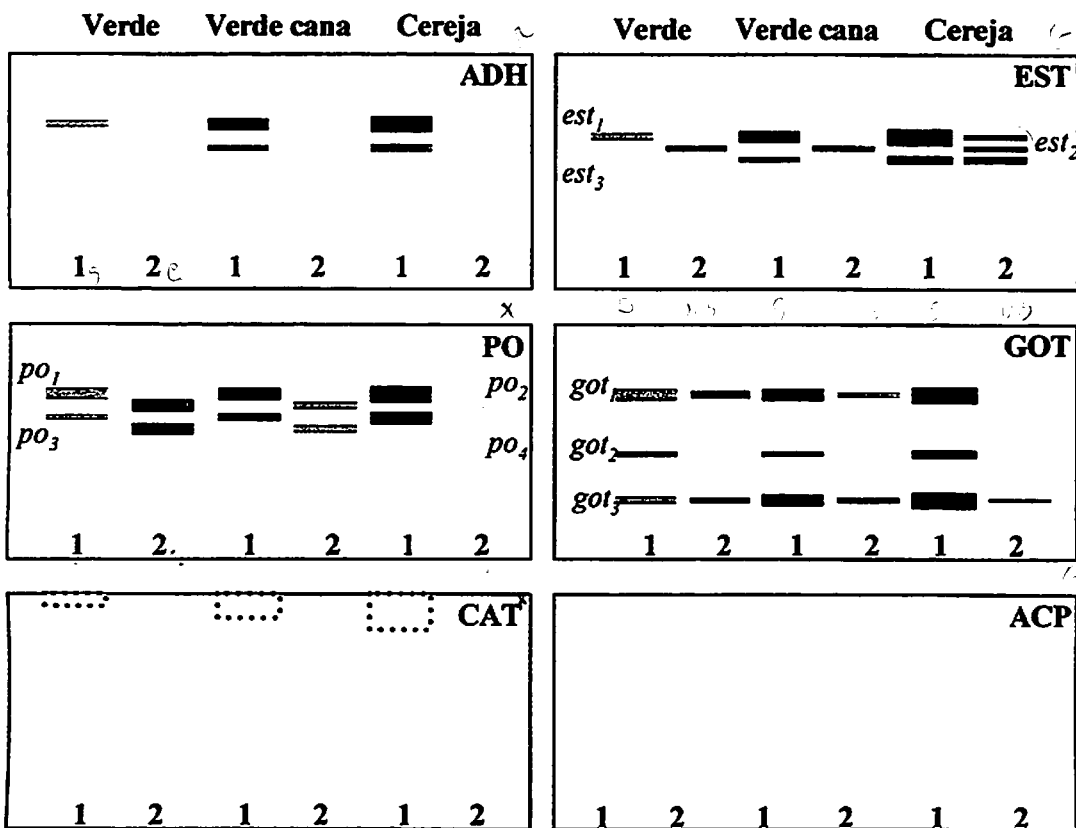


Figura 3. Efeito da secagem (1- secadas; 2- controle) sobre os padrões eletroforéticos das isoenzimas álcool desidrogenase (ADH), esterase (EST), peroxidase (PO), glutamato oxilacetato desidrogenase (GOT), catalase (CAT) e fosfatase ácida (ACP) de sementes de cafeeiro colhidas em diferentes estádios de maturação. UFLA, Lavras-MG, 2000.

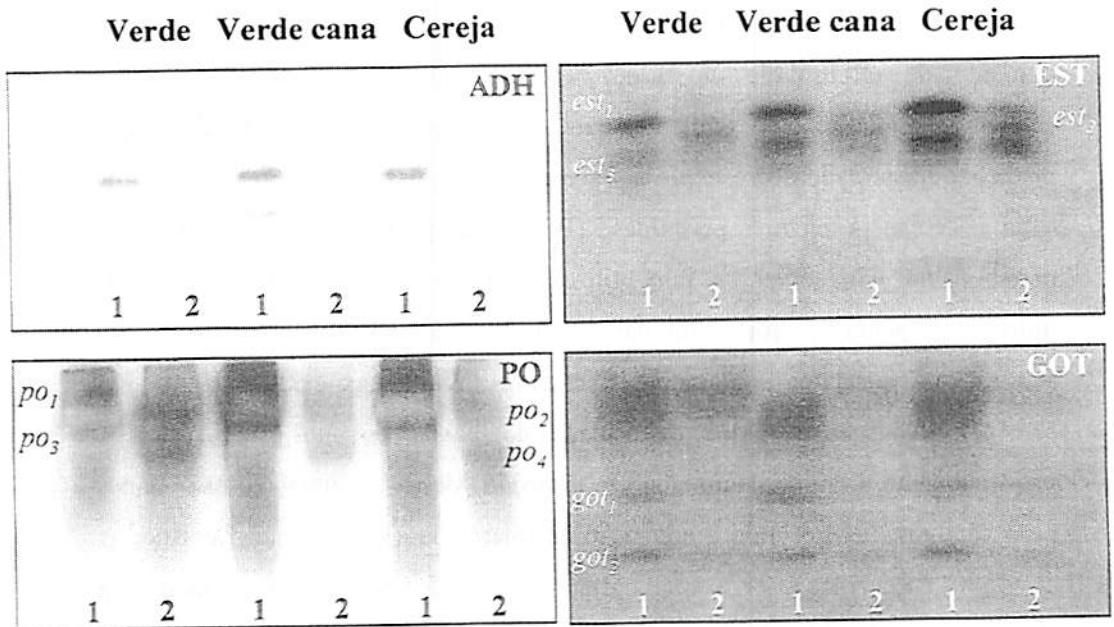


Figura 4. Efeito da secagem (1- secadas; 2- controle) sobre os padrões eletroforéticos das isoenzimas álcool desidrogenase (ADH), esterase (EST), peroxidase (PO) e glutamato oxilacetato desidrogenase (GOT) de sementes de cafeeiro colhidas em diferentes estádios de maturação. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Pelo zimograma da peroxidase (Figuras 3 e 4), pode ser observado padrões de bandas diferenciados para sementes secadas (1) e não secadas (2). Nota-se que as bandas po_1 e po_3 , presentes nas sementes secadas, apresentaram aumento de intensidade em função do estágio de desenvolvimento das sementes. Por outro lado, sementes não secadas apresentaram as bandas po_2 e po_4 , com intensidade decrescente nas sementes colhidas no estágio verde, verde cana e cereja. A enzima peroxidase (PO) desempenha um papel crítico no metabolismo das sementes por utilização de peróxidos como acceptor de hidrogênio, podendo contribuir para o aumento dos mecanismos de defesa e prevenção de perda na qualidade das sementes (Wang, Lee e Rhee, 1999). Em sementes secadas, a maior intensidade da banda po_3 no estágio cereja, provavelmente, está relacionada à proteção dessa enzima contra danos peroxidativos, favorecendo a aquisição da tolerância à dessecação. Leprince et al. (1990) e Leprince (1992), verificaram uma drástica redução da atividades da enzima peroxidase em radículas de milho intolerantes à dessecação. Já em sementes não secadas, a presença de maior intensidade (atividade) das bandas po_2 e po_4 no estágio verde pode ser sustentada pela provável indução da atividade dessas enzimas na presença dos produtos deletérios, ou seja, maior necessidade de remoção de radicais livres e peróxidos em sementes colhidas no estágio verde (Figuras 3 e 4). Hendry et al. (1992) e Finch-Savage et al. (1993) verificaram que, mesmo sementes sensíveis à dessecação, apresentam mecanismos protetores que podem remover produtos de peroxidação. Entretanto, esses mecanismos protetores podem tornar-se inefectivos sob condições de estresse (Smith e Berjak, 1995); o que pode suportar os resultados obtidos neste trabalho.

A menor intensidade e/ou número de bandas das enzimas catalase e peroxidase, ligadas à remoção de produtos de peroxidação, em sementes mais sensíveis à dessecação (verde e verde cana), sob condições de secagem,

corroboram com os resultados obtidos por Hendry et al. (1992) e Finch-Savage et al. (1993), que verificaram um aumento de radicais livres e uma diminuição das atividades de enzimas removedoras desses radicais, durante a desidratação dos eixos embrionários de sementes sensíveis à dessecação (*Quercus rubur*). Portanto, a maior atividade dessas enzimas (número e intensidade de bandas) das sementes no estágio cereja (Figuras 3 e 4), pode contribuir para a preservação de sua qualidade fisiológica (Figuras 1e 2), sob condições de estresse hídrico. Alguns autores, (Scebba e Vitagliano, 1998; Schoner e Krause, 1990) têm verificado um rápido e transitório aumento nos níveis de superóxido dismutase, catalase e peroxidase (Okuda et al., 1991) correlacionado a maior tolerância ao estresse oxidativo (Bridger et al., 1994). Um decréscimo de proteção enzimática contra ataque oxidativo também foi associado à perda de viabilidade em sementes durante a secagem (Hendry et al., 1992).

Pode ser observado, no zimograma da esterase (EST), que as amostras provenientes de sementes secadas apresentaram um aumento da intensidade das bandas com o desenvolvimento do estágio de maturação. Já as amostras provenientes de sementes não secadas (controle), apresentaram somente a banda *est₂* para sementes colhidas no estágio verde e *est₁*, *est₂* e *est₃* para as colhidas no estágio verde cana e cereja, mostrando também um aumento do número e da intensidade das bandas com o aumento do estágio de maturação. Essa enzima está envolvida tanto na hidrólise de esterases, quanto no metabolismo de lipídios. Vale ressaltar que, nas sementes secadas, independente do estágio de maturação, não foi detectada a banda *est₂*. Brandão Jr. et al. (1998) observou a diminuição do número e intensidade de bandas de esterase com a perda da viabilidade dos lotes de sementes dentro de cada cultivar, confirmando os resultados obtidos neste trabalho.

Para glutamato-oxiloacetato transaminase (GOT), pode-se observar, pelos padrões eletroforéticos, a presença das bandas *got₁*, *got₂* e *got₃* nas

sementes secadas e a intensidade dessas bandas apresentaram uma relação positiva com estágio de desenvolvimento das sementes, reforçando os resultados obtidos pelos testes determinantes da condição fisiológica das sementes (Figura 1 e 2). Esses resultados são concordantes com os obtidos por Brandão Jr., Carvalho e Vieira (1999). A GOT apresenta um importante papel na germinação de sementes, podendo fornecer proteínas e aminoácidos, assim como energia durante o processo. Por outro lado, danos nas células (mitocôndria) ou mesmo na taxa de respiração podem comprometer a atividade da GOT. Portanto, quanto maior a tolerância à dessecação, maior intensidade das bandas *got₁*, *got₂* e *got₃*.

Para sementes não secadas, pode-se verificar o desaparecimento da *got₂* e diminuição da intensidade das bandas *got₁* e *got₃* com o estágio de desenvolvimento das sementes. A GOT é uma enzima importante no processo de desorganização e síntese de proteínas (Conn e Stumpf, 1980). A diminuição do número e intensidade das bandas, com o estágio de desenvolvimento das sementes não secadas, apresentam uma relação inversa com os testes determinantes da qualidade fisiológica (Tabela 2). Esse resultado está de acordo com os obtidos por Chauran, Gopinathan e Babu (1985), que observaram, em sementes de soja e cevada, um aumento do número das bandas da GOT com o declínio de viabilidade das sementes no envelhecimento artificial. Provavelmente, esse aumento do número e intensidade de bandas estão relacionados a um aumento da atividade metabólica nas sementes imaturas.

De um modo geral, sementes submetidas à secagem apresentaram maior atividade enzimática do que aquelas não secadas (controle). Observou-se também, maior atividade das enzimas (intensidade e/ou número de bandas) nas sementes colhidas no estágio cereja, seguidas das colhidas no estágio verde cana e verde, o que sugere que essa maior atividade enzimática está relacionada a estágio de desenvolvimento das sementes e tolerância à dessecação, uma vez que essa atividade enzimática se relaciona, na maioria das vezes, com os resultados

detectados pelos testes determinantes da condição fisiológica das sementes de cafeeiro (Figuras 1 a 4).

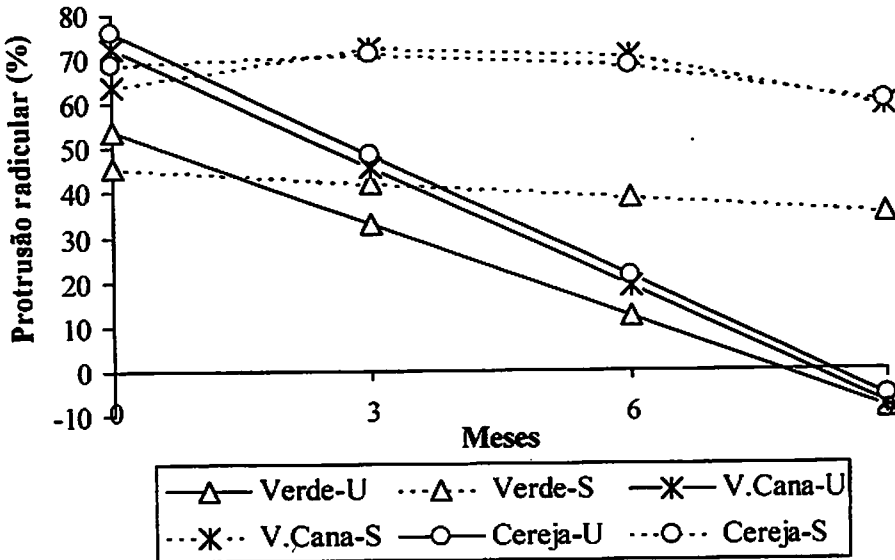
Sobrevivência no armazenamento

Pelos resultados dos testes determinantes da condição fisiológica (Figuras 5 e 6) pode-se verificar que, apesar das sementes não secadas apresentarem, inicialmente, valores de germinação, protrusão radicular e percentagem de raízes secundárias superiores aos das sementes secadas, independente do estágio de desenvolvimento, estas apresentaram tendência de queda linear ao longo do armazenamento, ao passo que sementes secadas a 15% de umidade não apresentaram essa tendência. Provavelmente, isso foi devido ao alto metabolismo das sementes armazenadas com 50% de umidade (não secadas), em recipiente impermeável, o que pode resultar em várias mudanças bioquímicas e metabólicas que levam à deterioração das sementes (Copeland e McDonald, 1995; Priestley, 1986). Sementes colhidas no estágio verde apresentaram qualidade fisiológica inferior as colhidas no estágio verde cana e cereja ao longo dos nove meses de armazenamento. Esses resultados são reforçados pelos padrões eletroforéticos das enzimas ADH, EST, GOT e CAT (Figuras 3 e 4).

Pode-se ainda observar, pelas Figuras 5 e 6, que sementes secadas para teores de água próximo a 15%, tiveram sua qualidade fisiológica preservada ao longo dos nove meses de armazenamento sob condição de 10°C e 50% UR, independente do estágio de desenvolvimento das sementes. Araújo, Corrêa e Pereira (1989), verificaram efeito deletério sobre a germinação e o vigor de sementes secadas a 30°C para um teor de água de 11,90%, após seis meses de armazenamento sob condições de ambiente de laboratório. Para as sementes colhidas no estágio verde cana e secadas, verifica-se, pelas Figuras 5 e 6, que,

após três meses de armazenamento, ocorreu um incremento da protrusão radicular, germinação, percentagem de raízes secundária. Isso pode ter ocorrido em função de apresentação de dormência pelas sementes não armazenadas. Pode-se ainda verificar, pela Figuras 5, tendência de superioridade em termos de percentagem de protrusão radicular e germinação das sementes colhidas no estágio verde cana a partir de três meses de armazenamento. Quanto a emissão de raízes secundárias, verifica-se, pela Tabela 2, que as sementes colhidas nos estádios verde e verde cana apresentaram quedas significativas, logo após a secagem das sementes, sendo que, para aquelas colhidas no estágio verde cana, a redução foi em torno de 30% logo após a secagem, mostrando-se intolerantes à dessecação. No entanto, sementes colhidas no estágio verde cana observou-se um incremento nesse parâmetro ao longo do armazenamento (Figura 6), chegando, após os seis meses de armazenamento, a superar as sementes colhidas no estágio cereja. Provavelmente, com a secagem, as sementes colhidas no estágio verde cana foram induzidas a um estado de dormência; possivelmente, pela presença de inibidores à germinação (ex: ácido abscísicos) (Leprince Hendry e Mckersie, 1993) ou resistência de tecidos que circundam o embrião (Bewley, Kermode e Misra, 1989; Berry e Bewley, 1991) que podem inibir a germinação e, por isso, confundir os efeitos degenerativos da secagem (Guimarães, 2000). Ellis, Hong e Roberts (1991), que verificaram que sementes de cultivares de café arábica, colhidas no estágio verde cana (maturidade intermediária) apresentaram-se mais tolerantes a uma dessecação até 4-5% de umidade do que as de frutos maduros ou imaturos.

$$\begin{aligned}
 yvu &= 53,6215 - 6,91848x \quad r^2 = 0,8956 & yvcs &= 63,6537 + 4,50678x - 0,55498x^2 \quad r^2 = 0,9951 \\
 yvs &= 45,7385 - 1,16747x \quad r^2 = 0,9000 & ycu &= 75,8890 - 9,10921x \quad r^2 = 0,7638 \\
 yvcu &= 72,1794 - 8,86537x \quad r^2 = 0,8423 & ycs &= 68,7511 + 1,68223x - 0,29149x^2 \quad r^2 = 0,6055
 \end{aligned}$$



$$\begin{aligned}
 yvu &= 62,7277 - 8,06282x \quad r^2 = 0,8982 & yvcs &= 77,2471 + 1,53054x - 0,36966x^2 \quad r^2 = 0,9895 \\
 yvs &= 51,5066 - 1,62255x \quad r^2 = 0,7926 & ycu &= 86,3894 - 10,48435x \quad r^2 = 0,8043 \\
 yvcu &= 79,0223 - 9,65711x \quad r^2 = 0,8273 & ycs &= 79,4108 - 1,79898x \quad r^2 = 0,9571
 \end{aligned}$$

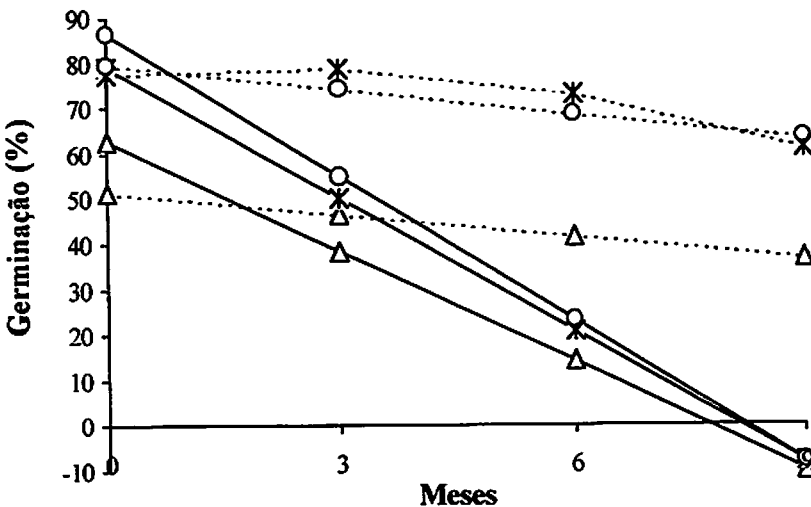


FIGURA 5. Efeito da secagem na protrusão de radículas (15 dias) e percentagem de germinação (30 dias) de sementes de cafeeiro, colhidas nos estádios verde, verde cana e cereja, armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses). UFLA, Lavras-MG, 2000.

$$y_{vu} = 40,2415 - 5624057x \quad r^2 = 0,8848$$

$$y_{vs} = 28,1466 + 1,73761x - 0,21693x^2 \quad r^2 = 0,5913$$

$$y_{vcu} = 61,8141 - 7,90369x \quad r^2 = 0,8999$$

$$y_{vcs} = 46,9947 + 5,33568x - 0,37041x^2 \quad r^2 = 0,9687$$

$$y_{cu} = 71,3839 - 8,87459x \quad r^2 = 0,8722$$

$$y_{cs} = 67,3931 - 1,94219x + 0,20988x^2 \quad r^2 = 0,7636$$

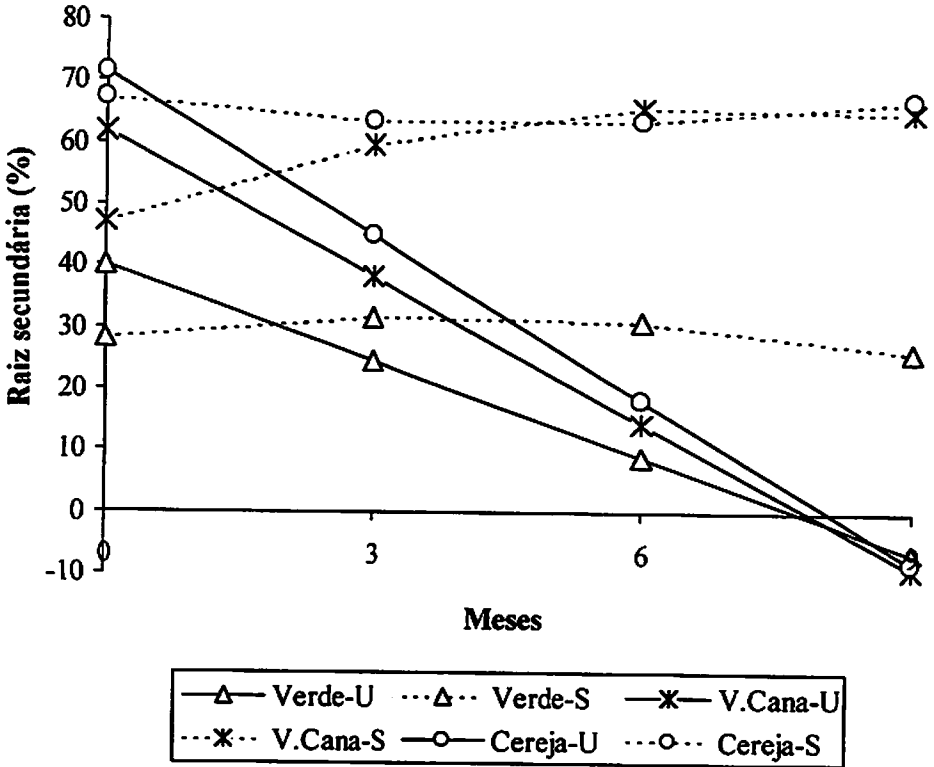


FIGURA 6. Efeito da secagem na emissão de raízes secundária (30 dias) de sementes de cafeeiro, colhidas nos estádios verde, verde cana e cereja, armazenadas por diferentes períodos (0, 3, 6 e 9 meses). UFLA, Lavras-MG, 2000.

Análise eletroforética

Os zimogramas das alterações dos padrões eletroforéticos de álcool desidrogenase (ADH), catalase (CAT), peroxidase (PO), esterase (EST), fosfatase alcalina (AKP) e glutamato-oxilacetato transaminase (GOT) com a secagem e armazenamento de sementes de cafeeiro, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento, estão presentes nas Figuras 7 a 9. Os perfis isoenzimáticos dessas enzimas variaram com o estágio de desenvolvimento, secagem e período de armazenamento das sementes de cafeeiro.

Os padrões eletroforéticos da peroxidase para amostras provenientes de semente secadas permaneceram praticamente inalterados daqueles observados antes do armazenamento, havendo, no entanto, um aumento da intensidade dessas bandas com o estágio de desenvolvimento das sementes. Já as sementes não secadas, que apresentavam diminuição da intensidade das bandas po_2 e po_4 , com o estágio de desenvolvimento, antes do armazenamento, passaram a mostrar um aumento da intensidade dessas bandas após três meses de armazenamento.

A enzima catalase, após três meses de armazenamento, apresentou atividade para os tratamentos provenientes de sementes não secadas (controle), que, anteriormente ao armazenamento, não tinham apresentado. Pode-se observar também, pelos zimogramas, que o número e a intensidade das bandas foi similar para os diferentes estádios de desenvolvimento, diferindo, no entanto, para sementes secadas e não secadas. Provavelmente, a atividade da enzima catalase, após três meses de armazenamento, em sementes não secadas, tenha sido devido a ocorrência de danos peroxidativos nas sementes armazenadas em recipientes lacrados com alto teor de água, o que exigiria uma maior atividade das enzimas removedoras de peróxidos, visando a controlar os componentes deletérios. Para neutralizar esses eventos tóxicos, sistemas anti-oxidativos estão presentes nos tecidos das sementes, uma vez que essas rotas removedoras são

particularmente relevantes sobre diversos estresses que levam a danos oxidativos (Foyer et al., 1992). Os danos celulares causados pela peroxidação de lipídios podem ser reduzidos ou prevenidos por mecanismos protetores envolvendo enzimas removedoras de radicais livres e de peróxidos como a catalase (CAT) (Basavarajappa, Shetty e Prakash, 1991; Jeng e Sung, 1994; Bailly et al., 1996). Entretanto, após seis e nove meses de armazenamento, pode-se verificar (Figura 9) o desaparecimento das bandas dessa enzima (perda da atividade) nos tratamentos provenientes de sementes não secadas (controle), independente do estágio de desenvolvimento, o que sugere uma possível perda dos mecanismos protetores de peroxidação, e a ocorrência do processo deteriorativo. Esses resultados estão de acordo com os obtidos com os testes determinantes da condição fisiológica (Figuras 5 e 6), em que as sementes não secadas, independente do estágio de desenvolvimento, apresentaram tendência de queda linear em sua germinação, protrusão radicular e percentagem de raízes secundárias ao longo do armazenamento. Brandão Jr. et al. (1998), Sung e Chiu (1995), Bailly et al. (1996) e Sung (1996) verificaram uma perda da atividade da enzima catalase com o envelhecimento de sementes. Nos tratamentos em que as sementes foram secadas, pode ser observado aumento na intensidade de bandas, em função de estágio de desenvolvimento das sementes, o que sugere uma maior proteção contra a peroxidação, uma vez que se trata de enzima removedora de peróxidos. Esses resultados reforçam os obtidos pelos testes determinantes da qualidade fisiológica (Figuras 5 e 6). Entretanto, pode ser observado pelos zimograms desta enzima (Figuras 3 a 4 e 7 a 9), a diminuição do número e da intensidade de bandas com o aumento do período de armazenamento. A perda da atividade da catalase, enzima removedora de peróxido, pode tornar as membranas das células das sementes mais sensíveis aos efeitos deletérios de O_2 e radicais livres, o que provoca a degeneração destas e o comprometimento do vigor.

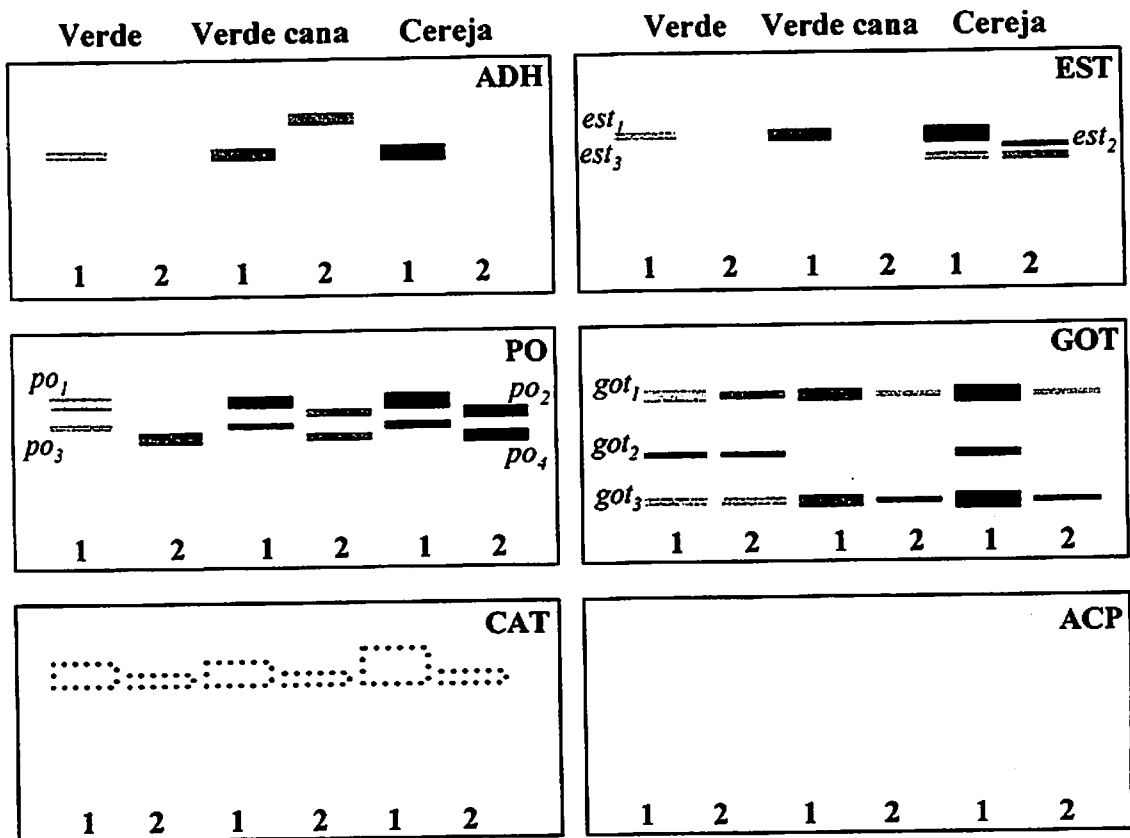


Figura 7. Efeito da secagem (1- secadas; 2- controle) sobre os padrões eletroforéticos das isoenzimas álcool desidrogenase (ADH), esterase (EST), peroxidase (PO), glutamato oxilacetato desidrogenase (GOT), catalase (CAT) e fosfatase ácida (ACP) de sementes de cafeeiro, colhidas em diferentes estádios de maturação, após três meses de armazenamento. UFLA, Lavras-MG, 2000.

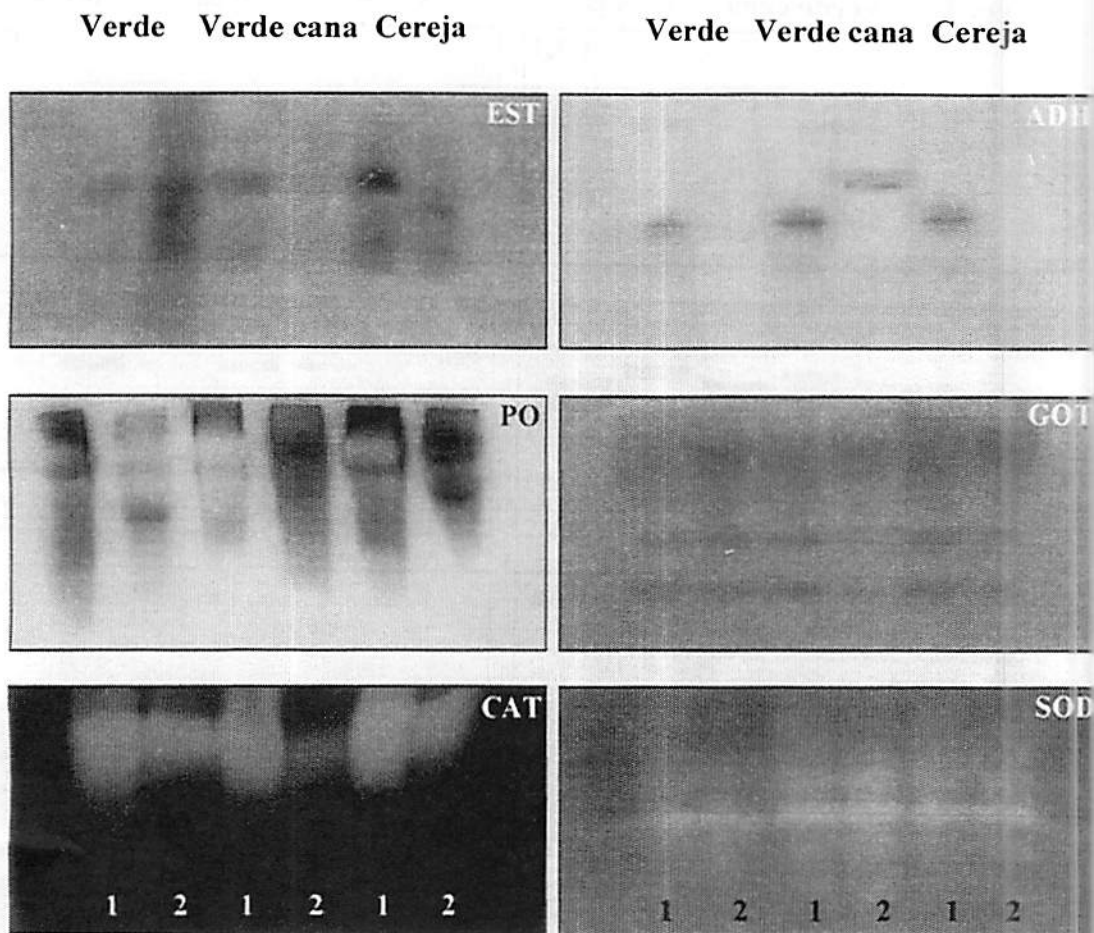


Figura 8. Efeito da secagem (1- secadas; 2- controle) sobre os padrões eletroforéticos das isoenzimas álcool desidrogenase (ADH), esterase (EST), peroxidase (PO), glutamato oxilacetato desidrogenase (GOT), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) de sementes de cafeeiro, colhidas em diferentes estádios de maturação, após três meses de armazenamento. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Pelo zimograma da EST, pode-se observar, para sementes secadas, a presença da banda *est*₁ para aquelas colhidas no estádio verde e baixa atividade da banda *est*₃ para aquelas colhidas no estádio verde cana e cereja. Sementes colhidas no estádio cereja apresentaram as bandas *est*₁ e *est*₃ em maior intensidade. Verifica-se, então, um aumento do número e da intensidade dessas bandas com o estádio de desenvolvimento das sementes. Quanto aos tratamentos provenientes de sementes não secadas (controle), a esterase não apresentou atividade para aquelas sementes colhidas no estádio verde e verde cana. No entanto, para as colhidas no estádio cereja, foram detectadas as bandas *est*₂ e *est*₃. Apesar do aumento do número e da intensidade das bandas com o aumento do estádio de desenvolvimento das sementes, tanto para sementes secadas, como para as do controle, houve uma redução do número e da intensidade dessas bandas em relação àquelas antes do armazenamento. Após seis e nove meses de armazenamento (Figura 9), apenas as sementes colhidas no estádio verde cana e cereja e secadas a 15% de umidade apresentaram atividade dessa enzima (bandas *est*₁ e *est*₃). Resultados semelhantes foram observados por Chauran, Gopinathan e Babu (1985), trabalhando com sementes de soja e cevada, Brandão Jr. et al. (1997) com sementes de girassol, Brandão Jr., Carvalho e Vieira (1999) com sementes de milho e Brandão Jr. et al. (1998) com sementes de cafeeiro que verificaram o decréscimo da atividade da esterase com o envelhecimento das sementes. Shatters et al. (1994), trabalhando com sementes de soja, observaram perda de 77% da atividade de duas esterases após 48 h de envelhecimento.

A enzima fosfatase alcalina (AKP) participa em reações de hidrólise de ésteres, podendo atuar sobre fosfolípidios de membrana, provocando a peroxidação de lípidios. Nesta pesquisa, após o armazenamento, por seis e nove meses, foram observadas presença de atividade de AKP para todos os tratamentos, com exceção daquele proveniente de sementes colhidas no estádio

cereja e secadas a 15% de umidade (Figura 9), sendo que esse tratamento e o verde cana foram os que não apresentaram tendência de queda na qualidade fisiológica, durante os nove meses de armazenamento (Figuras 5 e 6). Rajagopal e Sen-Mandi (1992) observaram maior atividade dessa enzima em embriões de sementes de arroz, envelhecidas artificialmente, em relação a embriões de sementes envelhecidas naturalmente e não envelhecidas. O aumento da atividade dessa enzima com o envelhecimento pode gerar quantidades significantes de radicais livres, os quais, subsequentemente, proliferam e aceleram a oxidação de lipídios (German e Kinsella, 1985).

De uma maneira geral, pode ser observado nas sementes submetidas à secagem, maior atividade (intensidade e/ou número de bandas) das enzimas removedoras de peróxidos naquelas colhidas no estágio cereja, seguidas das colhidas no estágio verde cana e verde, além de diminuição dessa atividade enzimática com o aumento do período de armazenamento. Isso sugere que essa maior atividade enzimática está relacionada à ocorrência de danos peroxidativos durante a secagem e armazenamento associada a estágio de desenvolvimento das sementes e tolerância à dessecação, uma vez que essa atividade enzimática corresponde aos resultados detectados pelos testes determinantes da condição fisiológica das sementes de cafeeiro ao longo do armazenamento (Figuras 5 e 6). Por outro lado, pode-se verificar que, apesar das sementes não secadas apresentarem inicialmente atividades inferiores aos das sementes secadas, ou não apresentarem atividades das enzimas associadas a danos peroxidativos, houve uma tendência de aumento da atividade dessas enzimas ao longo do armazenamento, o que não ocorreu para sementes secadas a 15%. Provavelmente, essa variação do padrão eletroforético foi devido a mudanças bioquímicas e metabólicas que levam à deterioração das sementes (Copeland e McDonald, 1995; Priestley, 1986). Esses resultados apresentam relação com os obtidos pelos testes de condição fisiológica (Figuras 5 e 6). Comparações de

sobrevivência ao longo dos 9 meses de armazenamento sob condições controladas (10°C e 55% UR), indicam que as sementes colhidas no estádio verde perderam a viabilidade mais rapidamente do que aquelas colhidas nos estádios verde cana e cereja. Alguns autores observaram que o declínio da atividade da catalase (Bailly et al., 1996; Sung, 1996; Sung e Chin, 1995), da esterase (Shatters et al., 1994), da peroxidase (Sung, 1996; Sung e Chin, 1995; Sung e Jeng, 1994; Basavarajappa Shetty e Prakash, 1991), e da superóxido dismutase (Bailly et al., 1996, Sung, 1996; Sung e Chin, 1995; Sung e Jeng, 1994; Pukacka, 1992) foi concomitante com o aumento do envelhecimento natural e/ou artificial das sementes.

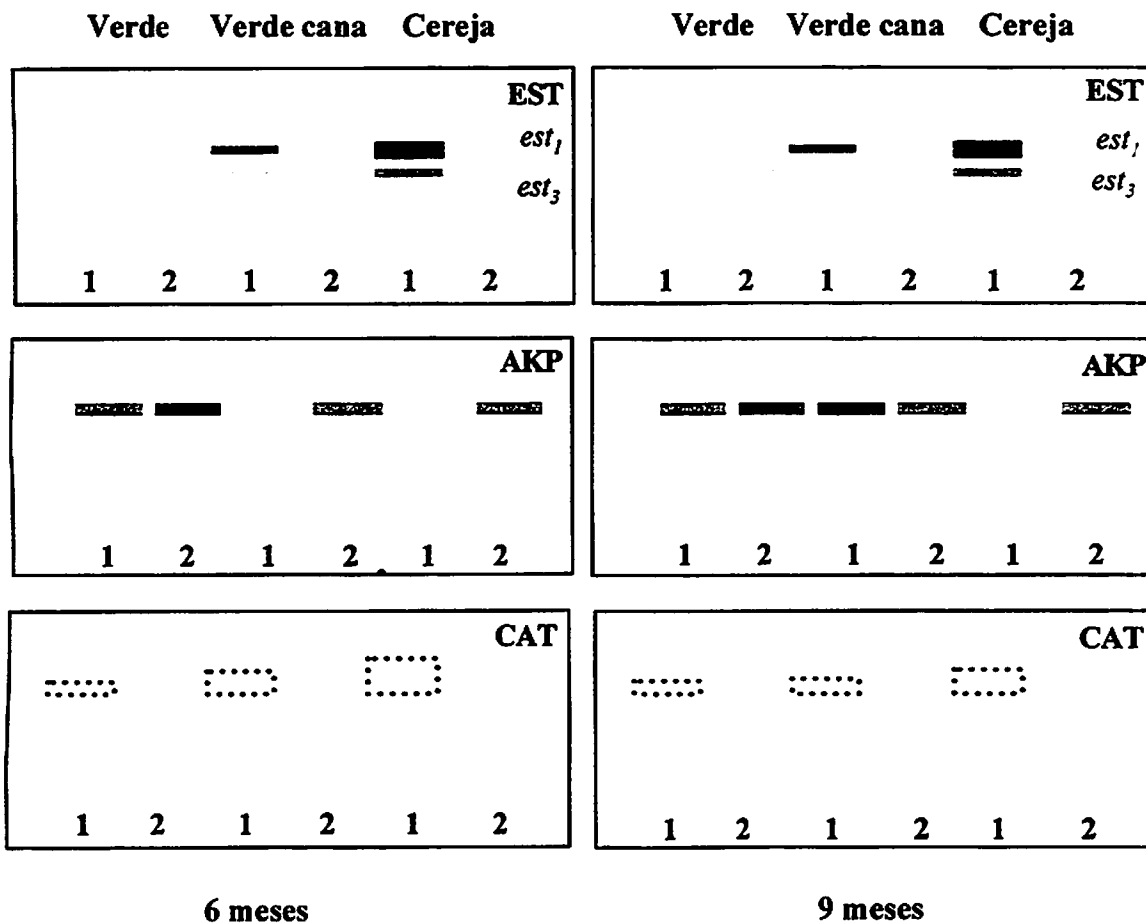


Figura 9. Efeito da secagem (1- secadas; 2- controle) sobre os padrões eletroforéticos das isoenzimas esterase (EST), fosfatase alcalina (AKP) e catalase (CAT) de sementes de cafeeiro colhidas em diferentes estádios de maturação, após seis e nove meses de armazenamento. UFLA, Lavras-MG, 2000.

6 CONCLUSÕES

Sementes de cafeeiro apresentam um aumento do nível de tolerância à dessecação com a evolução do desenvolvimento, e sementes colhidas no estágio verde apresentam maior sensibilidade à dessecação.

Sementes de cafeeiro, secadas a 15% de umidade, a 30°C, têm sua viabilidade e vigor reduzidos.

Sementes secadas a 15% de umidade mantêm a qualidade fisiológica ao longo de nove meses de armazenamento sob condição de 10°C e 50% de UR.

Sementes não secadas (50% de umidade) apresentam queda linear na qualidade fisiológica ao longo do armazenamento sob condição de 10°C, 50% UR e embalagem hermética.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de Isoenzimas e Proteínas Afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- ARAÚJO, E.F.; CORRÊA, P.C.; PEREIRA, O.A. Influência da temperatura de secagem na germinação de sementes de café. **Revista Brasileira de Sementes, Brasília, v.11, n.1,2,3, p.69-75, 1989.**
- BAILLY, C; BENAMAR, A.; COBINEAU, F.; CÔME, D. Changes in malondialdehyde content and in superoxide de dismutase, Catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum, Copenhagen, v.97, n.1, p.104-110, May 1996.**
- BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration an other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology, Zurich, v.19, n.2, p.279-286, 1991.**
- BERRY, T.; BEWLEY, J.D. Seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) which develop in a fully hydrated environment in the fruit switch from a developmental to a germinative mode without a requirement for desiccation. **Planta, Berlin, v.186, n.1, p.27-34, Jan. 1991.**
- BEWLEY, J.D.; KERMODE, A.R.; MISRA, S. Desiccation and minimal drying treatments of seeds of castor bean and *Phaseolus vulgaris* which terminate development and promote germination cause changes in protein and messenger RNA synthesis. **Annals of Botany, New York, v.63, n.1, p.3-17, Jan. 1989.**
- BOCHICCHIO A.; VERNIERI, P.; PULIGA, S. BALDUCCI, F.; VAZZANA, C. Acquisition of desiccation tolerance by isolated maize embryos exposed to different conditions: the questionable role of endogenous abscisic acid. **Physiologia Plantarum, Copenhagen, v.91, n.4, p.615-622, Aug. 1994.**
- BOCHICCHIO, A.; VERNIERI, P.; PULIGA, S.; MURELLI, C.; VAZZANA, C. Desiccation Tolerance in Immature Embryos of Maize: Sucrose, Raffinose and the ABA-Sucrose Relation. In: **INTERNATIONAL WORKSHOP ON SEEDS: basic and applied aspects of seed biology, 5., 1995, Reading. Proceedings...** Reading, U.K: University of Reading, 1996. p.13-22.

- BOCHICCHIO, A.; VERNIERI, P.; PULIGA, S.; VELASCO, R.; VAZZANA, C.; COME, D.; CORBINEAU, F. Desiccation tolerance in immature embryos of maize: possible implication of ABA. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON SEEDS: basic and applied aspects of seed biology, 4., 1992, Angers, France, **Proceedings...** Angeres, France, 1993, v.1, p.115-120.
- BRANDÃO JUNIOR, D. da S.; CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.21, n.1, p.114-121, 1999.
- BRANDÃO JUNIOR, D. da S. **Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho**. Lavras: UFLA, 1996. 100p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- BRANDÃO JUNIOR, D. da S.; VIEIRA, M.G.G.C.; BERNARDINO FILHO, J.; HILHORST, H.; GUIMARÃES, R.J. Uso de padrões eletroforéticos na identificação de cultivares e do nível de deterioração de sementes de *Coffea arabica*. In: **Congresso Brasileiro de Cafeicultura**, 24. 1998, Poços de Caldas. Anais... Poços de Caldas: 1998. p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 1992. 365p.
- BRENAC, P.; HORBOWICZ, M.; DOWNER, S.M.; DICKER-MAN, A.M.; SMITH, M.E.; OBENDORF, R.L. Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays L.*) seed development and maturation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, 1997. (in press)
- CARVALHO, M. M. de; ALVARENGA, G. Determinação do estágio de desenvolvimento mínimo do fruto do cafeeiro (*coffea arabica L.*), para germinação. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS**, 7, 1979, Araxá. **Resumos...** Rio de Janeiro: I.B.C./GERCA, 1979. p.118-119.
- CHAURAN, K.P.S.; GOPINATHAN, M.C.; BABU, C.R. Eletrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.13, n.1, p.629-641, 1985.
- CHIN, H. F., **Recalcitrant seeds: a status report**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1988.

- COON, E.C.; STUMPF, P.K. **Introdução à bioquímica**. São Paulo: Edgard Bliicher, 1980. 451p.
- COPELAND, LO.; MCDONALD, M.B. **Principles of seed science and technology**. 3. ed. Boston: KAP. 1995. 409p.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour?: I. coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.41, n.230, p.1167-1174, Sept. 1990.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour?: II. effects of provenance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.42, n.238, p.653-657, May 1991.
- FINCH-SAVAGE, W.E.; GRANGE, R.I.; HENDRY, G.A.F.; ATHERTON, N.M. Embryo water status and loss of viability during desiccation in the recalcitrant seed species. *Quercus robur* L. In; CÔME, D.; CORBINEAU, F.(eds.). **Fourth international workshop on seeds: basic and applied aspects of seed biology**. Paris: ASFIS, 1993. p.723-730.
- FOYER, C.H.; DESCOURVIERES, P.; KUNERT, K.J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. **Plant Cell Environment**. v. 17, p.507-523, 1992.
- FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Archives Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v.147, p.1-11, 1986.
- GUIMARÃES, R.M. **Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*, L.)**. Lavras: UFLA, 2000. 180p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- HENDRY, G.A.F.; FINCH-SAVAGE, W.E.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; BUCKLAND, S.H.; NILSSON, K.A.; SEEL, W.E. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New phytologist**, London, v.122, n.2, p.273-279, Oct. 1992.
- JENG, T.L.; SUNG, J.M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.22, n.3, p.531-539, 1994.

- KING, M.W.; ROBERTS, E.H. **The storage of recalcitrant seeds: achievements and possible approaches.** Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1979.
- LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; HENDRY, G.A.F. The role of free radicals and radical processing systems in loss desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, London, v.116, n.4, p.573-580, Dec. 1990.
- LEPRINCE, O. **Etude des mécanismes de la résistance à la déshydratation dans les embryos des plantes supérieures.** Liège: University of Liège, 1992. (PhD Thesis).
- LEPRINCE, O.; HENDRY, G.A.F.; MCKERSIE, B.D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, p.231-246. 1993.
- MAGUIRRE, J.D. Speed of germination - aid seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, p.176-177, Mar./Apr. 1962.
- OKUDA, T.; MATSUDA, A.; YAMAMAKA, S.; SAGISAKA, S. Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of wheat is caused by cold treatment. **Plant Physiology**, Rockville, v.97, p.1265-1267. 1991.
- PRIESTLEY, D. A. **Seed Ageing: implications of seed storage and persistence in the soil.** Ithaca: Cornell University Press, 1986.
- PUKACKA, S. Antioxidant status of *Acer platanoides* seeds during accelerated ageing. **Arboretum Kornickie**, v.37, p.43-49, 1992.
- RAJAGOPAL, A.S.M.; SEN-MANDI, S. Studies on acid and alkaline phosphatases in aged rice embryos. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.20, n.2, p.21-222, 1992.
- ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1,n.3, p.499-514, 1973.
- SCEBBA, F.; SEBASTIANI L.; VITAGLIANO, C. Changes in activity of antioxidant enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. **Physiology Plant**. v.104, p.747-752, 1998.

- SCHONER, S.; KRAUSE, G.H. Protective system against active oxygen species in spinach: response to cold acclimation in excess light. *Planta*, Berlim, v.180, p.383-389, 1990.
- SHATTERS, R.G.; ABDELGHANY, A.; ELBAGOURY, O.; WEST, S.H. Soybean seed deterioration and response to osmotic priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germination seeds. *Seed Science Research*, Wallingford, v.4, n.1, p.33-41, Marc. 1994.
- SMITH, M.T.; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and -sensitive seeds. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (eds.). *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker Inc, 1995. p.701-746.
- SUNG, J.M.; CHIN, C.C. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. *Plant Science*. v.110, p.45-52, 1995.
- SUNG, J.M.; JENG, T.L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated ageing of peanut seed. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.91, p.51-55, 1994.
- SUNG, J.M. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.91, p.51-55, 1996.
- THROUNEBERRY, G.O.; SMITH, F.G. Relation of respiratory and enzymatic activity to corn seed viability. *Plant Physiology*, New York, v.30, n.4, p.337, July 1955.
- VIEIRA, M.G.C.G. *Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (Gossypium hirsutum L.)*. Lavras: UFLA, 1996. 127p. (Tese-Doutorado em Fitotecnia).
- WILSON, D.O.; MCDONALD, M.B. The lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.14, n.2, p.269-300, 1986.

CAPÍTULO 3

Marcadores da Tolerância à Dessecação de Sementes de Cafeeiro

1 RESUMO

BRANDÃO JUNIOR, Delacyr da Silva. **Marcadores da tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro**. Lavras: UFLA, 2000. 144 p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia)*

Existem diferenças óbvias no nível de tolerância à dessecação entre as duas espécies comerciais de café, *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, podendo, as marcantes diferenças no nível de tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro fornecerem um ótimo sistema comparativo de estudos sobre esse enfoque. A presente pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal de Lavras (UFLA) e na Wageningen University and Research Centre (WUR), Laboratory of Plant Physiology, objetivando estabelecer relações entre mudanças na germinabilidade, nos padrões eletroforéticos de enzimas, nos teores de açúcares, nos padrões ultraestruturais com os estádios de desenvolvimento e teores de água das sementes de *C. arabica* e com os teores de água das sementes de *C. canephora*, ao longo do armazenamento. Para tanto, foram utilizadas sementes de cafeeiro das espécies *C. arabica* L., cultivar Acaia cerrado e *C. canephora* Pierre coletadas no campus experimental da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG e do jardim clonal da Fazenda Cachoeira do Norte - Muriae, MG, Brasil, respectivamente. Os tratamentos constaram dos diferentes estádios de maturação (verde, verde cana e cereja) e diferentes teores de água (sementes não secadas, secadas a 30, 10 e 8%). Posteriormente, as sementes foram embaladas em sacos de polietileno e armazenadas em câmara fria à temperatura de 10°C e 50% de U.R. As avaliações foram efetuadas aos zero, 3 e 6 meses de armazenamento, quanto ao grau de umidade, condição fisiológica (teste de germinação, protrusão radicular, índice de velocidade de germinação), análise eletroforética de isoenzimas, determinação de açúcares e análise ultraestrutural. As sementes de cafeeiro da espécie *C. arabica* apresentam redução na percentagem de protrusão radicular e germinação quando submetidas à secagem a teores de água inferiores a 30%, independente do seu estádios de maturação, sendo que as sementes colhidas no

* Comitê Orientador: Profª. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira – UFLA (Orientadora), Dr. Henk W.M. Hilhorst - WUR, Profª. Édila Vilela de Resende Von Pinho, Profª. Maria Laene Moreira de Carvalho, Prof. Renato Mendes Guimarães, Prof. José da Cruz Machado.

estádios verde apresentam maiores perdas de germinabilidade. Sementes colhidas no estágio verde cana e cereja apresentam uma relativa tolerância à dessecação, mas não resistem à redução do seu teor de água para níveis mais baixos (10 e 8 %), apresentando-se com comportamento intermediário. A tolerância à dessecação em sementes de *C. arabica* está em função do estágio de desenvolvimento das sementes; as sementes colhidas no estágio verde apresentam a maior sensibilidade à perda no seu teor de água. Sementes de *C. canephora* apresentam-se intolerantes à dessecação. Para ambas as espécies de café, após o armazenamento, as sementes secadas a 30% de umidade apresentam a maior germinação e vigor e reduzidos danos causados pela perda do teor de água das sementes (atividade das enzimas esterase e catalase, coalescência de corpos de lipídios e ruptura do sistema de membranas). Padrões eletroforéticos das enzimas esterase e catalase variam em função do estágio de desenvolvimento das sementes de café e do nível de tolerância à dessecação. Acréscimo no conteúdo de glicose e sacarose estão associados com proteção de sementes de café contra danos de secagem e a aquisição da tolerância à dessecação. Análise ultraestrutural detectou coalescência de corpos de lipídios, presenças de cristais nos espaços intercelulares, ruptura dos sistemas de membranas associadas a danos de secagem (intolerância à dessecação).

2 ABSTRACT

BRANDÃO JUNIOR, Delacyr da Silva. **Markers of the coffee seeds desiccation tolerance.** Lavras: UFLA, 2000. 144 p. (Thesis – Doctorate in Plant Science)

Coffee seeds consists an optimum system to study desiccation tolerance, considering that the two commercial species of coffee, *Coffea arabica* and *C. canephora*, present major differences in levels of tolerance to desiccation. The present study was developed at the Universidade Federal de Lavras (UFLA), Brazil, and at the Laboratory of Plant Physiology of the Wageningen University and Research Centre (WUR), The Netherlands, aiming to verify the relationship among changes in germination, enzyme electrophoretic patterns, sugar levels and ultrastructure patterns in relation to moisture content and different developmental stages of *C. arabica* seeds and moisture content of *C. canephora* seeds during storage. Seeds of *C. arabica* L. cv. Acaiá Cerrado were harvested from an experimental field from the Universidade Federal de Lavras (UFLA), located in Lavras, while seeds of *C. canephora* Pierre were harvested from a clonal field from the 'Cachoeira do Norte' farm, located in Muriaé, both counties of the state of Minas Gerais, Brazil. The treatments consisted of seeds in different stages of development (from green, yellow and red fruits) with different moisture contents (fresh seeds and seeds dried to 30, 10 and 8% moisture content). Seeds were all packed in polythene bag and stored at 10°C and 50% RH. Seeds were evaluated before storage (time zero) and after 3 and 6 months of storage. Seeds of *C. arabica* showed a reduction in percentage of radicle protrusion and germination when dried to levels below 30% moisture content, independently of their developmental stage, whereas seeds from the green stage fruits showed a greater loss in germinability. Seeds from yellow and red stage *C. arabica* fruits were relatively tolerant to desiccation, but did not resist being dried to moisture contents below 10%, showing an intermediate behaviour. Desiccation tolerance in *C. arabica* seeds showed to be dependent on the developmental stage, in which green fruit seeds were more sensitive to dehydration. Seeds of *C. canephora* were intolerant to desiccation. Seeds of both coffee species showed highest germination and vigour and presented lower levels of dehydration damages (enzyme activity coalesce of

*Guidance Committee: Prof. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira – UFLA (Major Professor), Dr. Henk W.M. Hilhorst - WUR, Prof. Édila Vilela de Resende Von Pinho, Prof. Maria Laene Moreira de Carvalho, Prof. Renato Mendes Guimarães, Prof. José da Cruz Machado.

lipid bodies and probable rupture of membranes system) after storage when dried to 30% moisture content. Changes in the electrophoretic patterns of esterase and catalase were dependent on the developmental stage and level of desiccation tolerance. The increase in the contents of glucose and sucrose were associated with seed protection against drying damages and acquisition of desiccation tolerance. The ultrastructural analysis allowed the detection of coalescent lipid bodies, crystals in intercellular spaces and membrane damage related do drying, indicating intolerance to desiccation.

3 INTRODUÇÃO

A sensibilidade à dessecação em sementes é um grande obstáculo para a conservação da biodiversidade de espécies, uma vez que pode impedir a prática de operações convencionais como rápida dessecação, seguida por armazenamento a temperaturas baixas (subzero), métodos tradicionais para conservação de germoplasma.

A tolerância à dessecação parece ser um processo gradual e eventos bioquímicos/fisiológicos durante a maturação de sementes podem ser associados à aquisição de tolerância à dessecação (Leprince et al., 1998). Para sementes de cafeeiro, fatores como, temperatura e taxa de secagem, estágio de desenvolvimento das sementes podem influenciar na aquisição da tolerância à dessecação (Ellis, Hong e Roberts, 1991).

Existem diferenças marcantes no nível de tolerância à dessecação entre as duas espécies comerciais de café, *C. arabica* e *C. canephora*, podendo essas espécies fornecer um ótimo sistema comparativo de estudo da tolerância à dessecação do gênero *Coffea*.

A exata causa da rápida perda da viabilidade de sementes de cafeeiro ainda não está bem definida, todavia, várias mudanças têm sido largamente associadas à deterioração da semente durante a secagem e armazenamento.

Na presença de oxigênio, o estresse hídrico e o envelhecimento de sementes podem levar a mudanças peroxidativas em ácidos graxos polinsaturados (Wilson e McDonald, 1986), em enzimas e ácidos nucleicos, e são, normalmente, uma das principais causas de deterioração de sementes armazenadas (Wilson e McDonald, 1986; Hendry, 1993). Mecanismos protetores, que podem remover os produtos de peroxidação, radicais livres e peróxido, estão presentes nas sementes, controlando esses componentes deletérios. Dentre os mecanismos protetores, pode-se citar várias enzimas

removedoras de radicais livres e peróxidos, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (PO). (Bowler, Montagu e Inzé, 1992). Dessa forma, o balanço entre produção e remoção de radicais livres e peróxidos pode ser mantido durante a secagem e armazenamento de sementes, evitando perdas na sua armazenabilidade (Leprince, Hendry e Mckersie, 1993; Sung e Jeng, 1994).

Apesar das sementes recalcitrantes possuírem mecanismos antioxidantes (Hendry et al, 1992; Finch-Savage, Hendry e Atherton, 1994), esses podem tornar-se inefetivos sob condições de estresse hídrico (Smith e Berjak, 1995); perdendo sua ação em termos de proteção contra danos de dessecação.

Hendry et al. (1992) e Finch-Savage et al. (1993); Brandão Jr. et al. (1999) verificaram um aumento de radicais livres e/ou uma diminuição da atividade das enzimas removedoras desses radicais durante a desidratação dos eixos de sementes e de sementes não tolerantes à dessecação.

O acúmulo de oligossacarídeos, durante a maturação de sementes, é associado com a aquisição de tolerância à dessecação. São atribuídos aos açúcares, propriedades de estabilizar macromoléculas e estrutura de membranas, durante a dessecação (Colaco et al., 1992; Leprince et al., 1993; Hottiyer et al., 1994). A hipótese é que oligossacarídeos da série da rafinose previnem a cristalização da sacarose durante a desidratação (Koster e Leopold, 1988; Koster, 1991; Grases et al., 1994), permitindo a ocorrência de um estado vítreo no citoplasma (Koster e Leopold, 1988). Açúcares redutores, especialmente monossacarídeos, contribuem para a ocorrência de reações Maillard (Sun e Leopold, 1995), estimulam respiração (Leprince et al., 1995) e aumentam a formação de radicais livres (Finch-Savage, Hendry e Atherton, 1994; Leprince et al., 1995). Dessa forma, tecidos que contêm altas concentrações desses açúcares, como tecidos apicais de sementes, durante o processo de germinação, tendem a ser mais sensíveis à dessecação (Koster e Leopold, 1988).

Tem sido proposto que a formação de um estado vítreo estável é dependente da interação molecular com a água, e é característica crucial da tolerância à dessecação e armazenabilidade (Koster e Leopold, 1988; Koster, 1991; Bruni 1993; Sun e Leopold, 1994). Entretanto, carboidratos solúveis sozinhos são, provavelmente, insuficientes para conferir tolerância à dessecação (Blackman et al., 1991; Leprince, Hendry e Mckersie, 1993).

Deficiências na integridade de membrana que podem ser manifestadas pelo aumento da permeabilidade celular, que resulta num aumento da lixiviação de eletrólitos (De Paula et al., 1994), são também visualizadas em nível ultraestrutural (Castro e Martinez – Hondavilla, 1984). Estudos ultraestruturais de tecidos, após dessecação, têm revelado que a membrana celular é um dos primeiros pontos de injúria. Células de embriões intolerantes à dessecação apresentam colapso geral nas membranas, em contraste às de embriões secos, tolerantes, cujas membranas mantêm sua integridade (Dasgupta, Bewley e Yeung, 1982). Em radículas sensíveis à dessecação, foram detectados danos na membrana plasmática, enquanto em radículas tolerantes, as membranas apresentaram-se intactas (Crevecour et al., 1976; Sargent , Mandi e Osborne, 1981).

O comportamento das sementes no armazenamento é normalmente classificado por comparações de sobrevivência a diferentes taxas de secagem (King e Roberts, 1979; Probert e Longley, 1989).

A presente pesquisa foi desenvolvida objetivando estabelecer relações entre mudanças na germinabilidade, nos padrões eletroforéticos de enzimas, nos teores de açúcares, nos padrões ultraestruturais com os estádios de desenvolvimento e com os teores de água das sementes de *C. arabica* e os teores de água das sementes de *C. canephora*, ao longo do armazenamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Análise e Biotecnologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras (MG) e de Fisiologia Vegetal da Universidade de Wageningen - Holanda. Foram utilizadas sementes de café das espécies *Coffea arabica* L., cultivar Acaia cerrado e *C. canephora* Pierre do grupo Conilon, coletadas no campus experimental da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG e no jardim clonal da Fazenda Cachoeira do Norte - Muriaé, MG, Brasil, respectivamente.

A colheita e despulpamento dos frutos nos estádios verde (chumbão), verde cana e cereja foram efetuados manualmente, sendo que, para espécie *C. canephora*, foram utilizadas sementes apenas colhidas no estádio cereja. Após despulpados, os frutos foram degomados em bandejas com água dentro de câmara BOD regulada a temperatura constante de 30°C durante o período de 24 horas.

A secagem foi efetuada em caixas de polietileno (higrostat), contendo solução saturada de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), nitrato de cálcio ($Ca(NO_3)_2$) e cloreto de potássio (KCl), os quais propiciaram o equilíbrio higroscópico das sementes em 8, 10 e 30% de umidade, respectivamente, em sala refrigerada a 20°C. As sementes que não foram secadas apresentaram 50% de umidade. Os tratamentos constaram dos diferentes estádios de maturação (verde, verde cana e cereja) e diferentes teores de água (sementes não secadas, secadas a 30, 10 e 8%). Posteriormente, as sementes foram embaladas em sacos plásticos de polietileno lacrados e armazenadas em câmara fria e seca à temperatura de 10°C e 50% de U.R. As avaliações foram efetuadas antes e após seis meses de armazenamento para sementes de *C. arabica* e aos zero, três e seis meses de armazenamento para sementes de *C. canephora*, quanto ao grau de umidade, condição fisiológica (teste de germinação, protrusão radicular, índice de

velocidade de germinação), análise eletroforética de isoenzimas, determinação de açúcares e análise ultraestrutural. Para a análise eletroforética, foram utilizados os sistemas fosfatase alcalina (AKP), fosfatase ácida (ACP), esterase (EST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), escolhidos em função de suas participações no metabolismo da semente.

4.1. Determinação do grau de umidade

Foi determinado mantendo as sementes em estufa previamente regulada a 96°C por 36 horas, utilizando duas repetições para cada espécie, conforme metodologia adotada pelo Laboratório de Fisiologia Vegetal (WUR). Os resultados foram expressos em porcentagem.

4.2. Qualidade fisiológica das sementes

.. Teste de germinação

O teste de geminação foi realizado com quatro repetições de 25 sementes para cada um dos tratamentos. O endocarpo da semente foi removido antes da sementeira, que foi realizada em papel toalha, no sistema de rolo, umedecido com água na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel. Os rolos contendo as sementes foram mantidos em câmara incubadora regulada à temperatura constante de 30°C, no escuro. As avaliações foram feitas diariamente durante os primeiros 15 dias (protrusão de radícula) e, após 30 dias do início do teste, foram computadas as plântulas normais. Foram consideradas plântulas normais aquelas que apresentavam radícula e hipocótilo com comprimento superior a 2 cm e se encontravam aparentemente sadias.

.. Índice de velocidade de protrusão radicular

O índice de velocidade de protrusão radicular foi realizado utilizando-se as contagens diárias do número de radículas protruídas durante o teste de germinação e calculado pela fórmula proposta por Maguirre (1962).

4.3. Análise eletroforética

Foram utilizadas amostras de 15 sementes de cafeeiro de cada tratamento, liofilizadas e maceradas em nitrogênio líquido. O pó obtido foi armazenado em “deep freezer” a -85°C.

A extração da fração protéica foi efetuada, adicionando, a 100 mg do pó da semente, 200µl do tampão de extração (0,2M Tris, 0,1% β mercaptoetanol, 0,4% PVP, 0,4% PEG, 1mM EDTA). O homogeneizado foi incubado em gelo por 1 hora e, posteriormente, centrifugado a 16000 xg a 4°C por 60 minutos. Foram aplicados 30µl do sobrenadante de cada tratamento em géis de poliacrilamida a 4,5% (gel concentrador) e 7,5% (gel separador). As corridas eletroforéticas foram desenvolvidas a 12 mA no gel concentrador e 24 mA no gel separador. Após as corridas eletroforéticas, os géis foram revelados para os sistemas isoenzimáticos: esterase (EST), fosfatase alcalina (AKP), fosfatase ácida (ACP), catalase (CAT), e superóxido dismutase (SOD), de acordo com metodologia descrita por Alfenas (1998).

4.4. Extração e análise de carboidratos solúveis

Vinte mg do pó das sementes liofilizadas e maceradas foram homogeneizados em 1ml de metanol 80% contendo melositolose como padrão. (Horbowicz e Obendorf, 1994). O homogeneizado foi aquecido a 75°C por 15

minutos, vácuo rápido por 45 minutos. Posteriormente foi adicionado 500 µl de água ultra pura e o homogeneizado permaneceu 10 minutos sob agitação a frio e, em seguida, foi centrifugado a 14000 xg a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi injetado em um cromatógrafo líquido (HPLC) e os carboidratos solúveis foram identificados e calculados com base nas áreas de pico de um padrão. As quantidades foram resultado das médias de 2 repetições de cada tratamento.

4.5. Análise ultraestrutural

Para as observações das organizações subcelulares dos embriões, foram utilizadas três sementes por tratamento, as quais tiveram seus endocarpos removidos. Posteriormente, as sementes foram submetidas à embebição por 96h a 30°C no escuro e os embriões foram então extraídos e preparados para serem examinados pelo procedimento de microscopia eletrônica de varredura à baixa temperatura (LTSEM). Os embriões foram colados com cola especial para tecido (Tissue Tek), sobre uma pequena chapa cilíndrica que foi mergulhada em nitrogênio líquido. As amostras foram transferidas para uma pré-câmara de resfriamento, modelo Oxford 1500 HF sistema cryotrans (Instrumentos Oxford, Eynsham, Inglaterra), mantida à temperatura de -160 a -175°C, e posteriormente, foram realizados cortes com auxílio de uma lâmina de escarpelo. Após fatiadas, as amostras foram fixadas por 5 minutos a 90°C e 10^{-4} Pa. Em seguida, as amostras foram cortadas em camadas em uma pré-câmara Oxford e transferidas para o estágio frio que foi montado no campo de emissão Hitachi S-4100 (Instrumentos Científicos Hitachi, Mountain View, Califórnia).

A análise dos embriões de sementes de cafeeiro foi realizada em temperaturas de -160 a -196 °C em microscópio eletrônico de varredura. Seções aleatórias de tecidos meristemático de radícula, hipocótilo e cotilédones foram avaliadas. As contribuições proporcionais de áreas de vacúolos, reservas

insolúveis (óleos e corpos protéicos, grãos de amido) e endomembranas foram avaliadas para cada estágio de desenvolvimento e grau de umidade das sementes.

4.6. Procedimento estatístico

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x4x2 (3 estádios de maturação, 4 teores de água das sementes e 2 épocas de avaliação), com 4 repetições para *C. arabica*. Já para a espécie *C. canephora* foi adotado o esquema 4x3 que corresponde a 4 teores de água das sementes e 3 épocas de avaliação. Os dados percentuais foram transformados em $\text{arc. sen } \sqrt{x/100}$, sendo realizada análise de variância para todos os parâmetros analisados, excetuando para análise eletroforética e ultraestutural.

Para comparação das médias relativas ao parâmetro concentração de sacarose nos diferentes estádios de desenvolvimento das sementes de *C. arabica* e dos efeitos da secagem das sementes foi utilizado o teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para comparação dos efeitos da secagem e época de avaliação para a espécie *C. canephora* foi utilizado o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

(Coffea arabica)

Pela análise de variância dos dados, podem ser observados efeitos significativos dos tratamentos: estágio de maturação, teores de água das sementes, época de avaliação e a interação entre os fatores para todos os parâmetros avaliados.

Pelo resultado do teste de germinação (Figura 1) verifica-se que as sementes de *C. arabica*, no estágio cereja, anteriormente ao armazenamento, não apresentaram reduções significativas nos valores percentuais de germinação, quando foram secadas de 50% para até 8% de umidade. Já sementes colhidas no estágio verde cana apresentaram redução significativa do percentual de germinação, quando secadas a 30% de umidade, enquanto que, aquelas sementes não secadas, secadas a 10 e 8% de umidade não diferiram entre si quanto ao percentual de germinação pelo teste de Tukey. Todavia, sementes provenientes de frutos verde apresentaram uma redução na germinação em torno de 70%, à medida em que foram submetidas à secagem para 8% de umidade. No entanto, após seis meses de armazenamento, as sementes secadas até 30% de umidade foram as que apresentaram os maiores valores percentuais de germinação para os três estágios de maturação considerados. Provavelmente, isso tenha ocorrido devido ao alto metabolismo que as sementes não secadas (alta umidade) apresentaram durante o armazenamento, resultando em perdas na qualidade. Com a secagem das sementes até 30% de umidade, pode ter havido queda no metabolismo das mesmas, sem aparente ocorrência de danos aos sistemas de membranas (Figura 10). Observa-se, ainda, que a secagem das sementes a níveis de 10 e 8% de umidade, apesar de reduzirem o metabolismo (baixa umidade), também provocaram danos durante o processo de secagem, o que pode ser visualizado na Figura 10, onde se verifica a presença de cristais nos

espaços intercelulares das células da região da radícula, presença esta indicativa da perda de integridade de membrana, contribuindo para a redução na porcentagem de germinação (Figura 1). Também os padrões isoenzimáticos das sementes secadas a níveis de 10 e 8% de umidade apresentaram uma maior intensidade de bandas das enzimas esterase e catalase em função dos diferentes estádios de maturação. Enquanto que a enzima esterase pode estar atuando na hidrólise de esteres, favorecendo a peroxidação de lipídios, a maior atividade da enzima catalase pode estar relacionada ao próprio sistema de defesa da sementes contra os danos peroxidativos induzidos pelo processo de secagem e deterioração de sementes no armazenamento.

Sementes colhidas no estágio cereja foram as que apresentaram maior porcentagem de germinação, seguidas pelas colhidas no verde cana e por último, no estágio verde. Esse fato, associado aos resultados de ultraestrutura e atividade enzimática, sugere que sementes de cafeeiro no estágio verde apresentam o maior nível de intolerância à dessecação e que o aumento da tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro ocorre com o avanço do estágio de maturação. Pesquisas em tolerância à dessecação, por meio de secagem rápida até baixos conteúdos de água, têm mostrado que a tolerância à dessecação é adquirida somente nos estádios finais de maturação em muitas sementes ortodoxas (Kermode, 1990; Hong e Ellis, 1992). Esses resultados estão de acordo com os verificados por Guimarães (2000) que observou, em sementes de cafeeiro, uma tendência de aumento da germinação com o seu desenvolvimento, associado à presença de proteínas termo-estáveis (LEA's) que segundo Leprince et al. (1995) estão relacionadas a tolerância à dessecação.

Pela Figura 1, pode-se observar que não houve efeito da secagem sobre a protrusão radicular de sementes, colhidas no estágio cereja, enquanto que, no estágio verde cana, as sementes apresentaram um aumento da protrusão radicular com a redução do teor de água das mesmas. Porém, as sementes

colhidas no estágio verde apresentaram uma redução progressiva da germinação e da protrusão radicular com diminuição do conteúdo de água das sementes. Esse aumento da protrusão radicular com a redução do teor de água das sementes, colhidas no estágio verde cana, pode estar relacionado a uma possível quebra de um estado de dormência, que sementes de cafeeiro poderiam apresentar nessa fase, ou ainda uma mudança no programa de desenvolvimento para o de germinação em função da secagem.

Após seis meses de armazenamento, observa-se (Figura 1) a redução da percentagem de protrusão radicular e germinação das sementes de cafeeiros não secadas e secadas a 10 e 8% de umidade, independente do estágio de desenvolvimento. Copeland e McDonald (1995) e Priestley (1986) concluíram que o alto metabolismo das sementes, armazenadas com 50% de umidade em recipiente impermeável, resulta em várias mudanças bioquímicas e metabólicas que levam à deterioração das sementes. Essas conclusões podem ser confirmadas pelos resultados de análise ultraestrutural (Figura 10) e pela maior atividade das enzimas esterase e catalase (Figura 2 e 3). Por outro lado, a redução da germinação das sementes secadas a 10 e 8%, provavelmente, ocorreu em função dos danos ao sistema de membranas das células do embrião por ocasião da secagem, como pode ser confirmado pelos resultados de ultraestrutura (Figura 7), em que foram observadas as mais intensas alterações, como formações de cristais nos espaços intercelulares (indicativo da perda de integridade de membrana), desaparecimento do vacúolo e de endomembranas, além de coalescência de lipídios.

Para as sementes secadas a 30% de umidade, verifica-se pela Figura 1, que, após o armazenamento, ocorreu um incremento da germinação, principalmente das sementes colhidas no estágio verde cana e cereja, em relação a das sementes antes de serem armazenadas. Isso pode ter ocorrido em função de sementes de cafeeiro recém colhidas apresentarem dormência; possivelmente,

pela presença de inibidores à germinação (ex: ácido abscísicos) (Leprince Hendry e Mckersie, 1993) ou resistência de tecidos que circundam o embrião (Bewley, Kermode e Misra, 1989; Berry e Bewley, 1991) que podem inibir a germinação e, por isso, confundir os efeitos degenerativos da secagem (Guimarães, 2000).

Enquanto as sementes verdes apresentaram um caráter recalcitrante, sementes verde cana e cereja apresentaram uma relativa tolerância à dessecação, mas não resistiram à redução do seu conteúdo de água, para níveis mais baixos (10 e 8%) como as sementes ortodoxas, confirmando o comportamento intermediário dessas sementes, sugerido por Ellis, Hong e Roberts (1990). Esses resultados reforçam ainda os obtidos por diversos autores, Bacchi (1958), Wellman e Toole (1960), Couturon (1980), Reddy (1987) e Dias e Barros (1993) que defendem como condições propícias para o armazenamento de sementes de cafeeiro, baixas temperaturas (próximas de 10°C) e altos conteúdos de água das sementes.

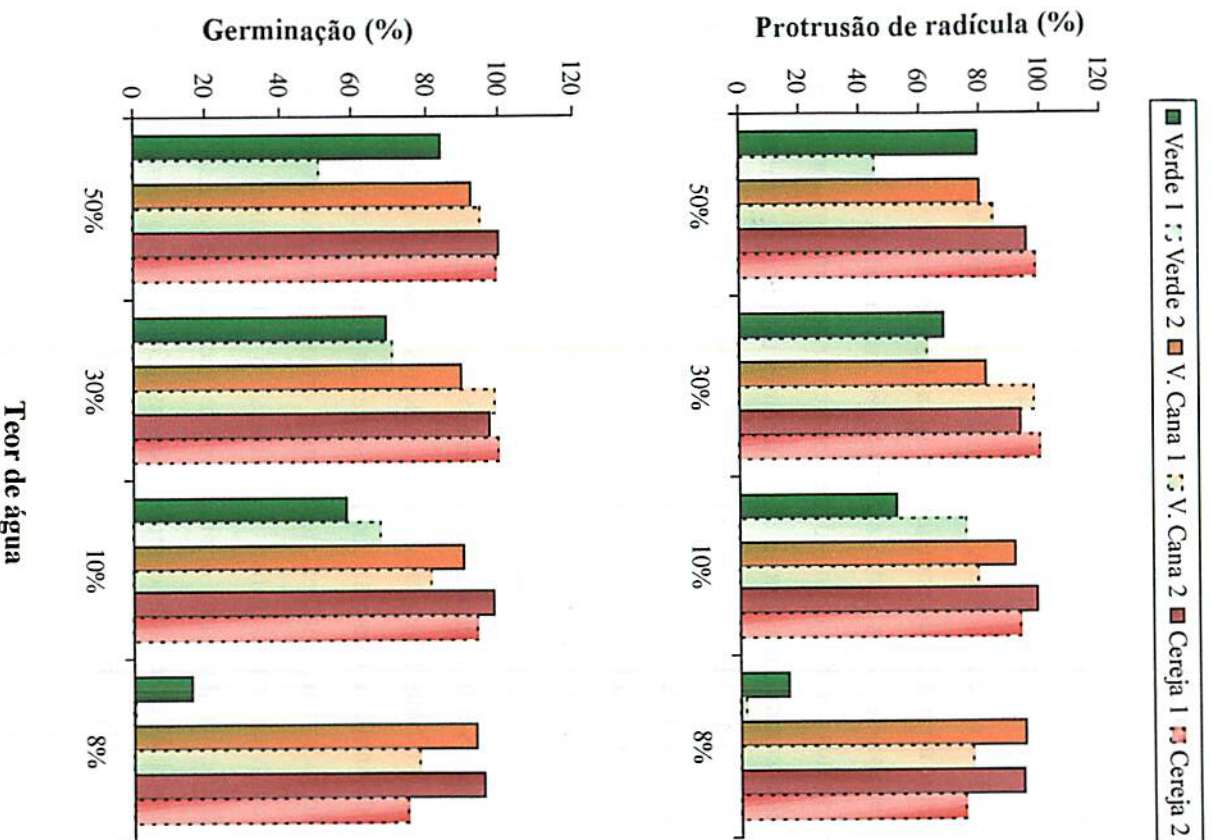


FIGURA 1. Efeito da secagem no percentual de protrusão radicular e de germinação de sementes de *Coffea arabica*, antes (1) e após seis meses de armazenamento (2). WUR, Wageningen-Holanda, 2000.

Análise Eletroforética

Pode ser verificado (Figuras 2 a 4), pelos padrões eletroforéticos de extratos proteicos de sementes de cafeeiro da espécie *C. arabica*, que as enzimas esterase (EST) e catalase (CAT) (Figuras 2 e 3) apresentaram aumento de atividade com a redução do conteúdo de água das sementes.

Observa-se, pelos padrões eletroforéticos da esterase (Figura 2), que as sementes secadas a 8% de umidade apresentaram uma maior intensidade de bandas dessa enzima, em função dos diferentes estádios de maturação. De uma maneira geral, a atividade dessa enzima aumentou em função da redução do teor de água na semente, sendo que, sementes no estádio verde, não secadas, não apresentaram atividade para essa enzima. Sementes colhidas no estádio cereja, secadas a 30% de umidade não apresentaram atividade para essa enzima, mesmo após seis meses de armazenamento, assim como, aquelas colhidas no estádio verde e verde cana e secadas para o mesmo teor de água apresentaram bandas pouco nítidas (baixa atividade). Vale ressaltar que as sementes secadas para 30% de umidade foram as que apresentaram maiores valores de germinação e protrusão radicular, principalmente após armazenamento. A esterase é uma enzima envolvida na hidrólise de ésteres, o que justifica o aumento na intensidade de bandas com o processo de secagem, e a não atividade nas sementes colhidas no estádio cereja e secadas a 30%. Provavelmente, a secagem a níveis de umidade inferiores a 30% tenham contribuído para o aumento de danos peroxidativos, tanto é que, sementes não submetidas à secagem, e armazenadas por seis meses, apresentaram atividade dessa enzima para os diferentes estádios de maturação e baixa atividade nos estádios verde e verde cana e nenhuma atividade para sementes colhidas no estádio cereja, submetidas à secagem a 30%; reforçando os resultados detectados pelos testes de germinação e protrusão radicular. Provavelmente, o estádio cereja é o de maior

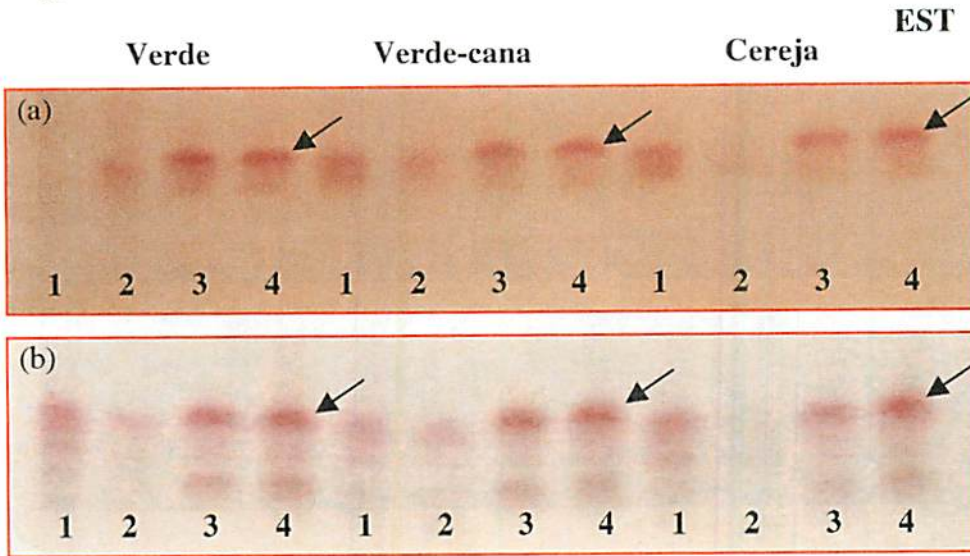
nível de tolerância à dessecação (Brandão Jr. et al., 1999) e a secagem a 30% que proporciona conservação das sementes no armazenamento, por períodos mais longos (germinação das sementes acima de 90% após 6 meses de armazenamento e queda em torno de 20% na germinação para sementes colhidas nesse mesmo estágio de maturação, porém secadas a 10%). A ausência de atividade da enzima esterase pode sugerir a ausência e/ou reduzida ocorrência de danos peroxidativos, induzidos pelo processo de secagem, ou mesmo armazenamento.

Já a enzima catalase desempenha um papel chave na remoção de peróxido de hidrogênio, evitando, com isso, a acumulação de danos peroxidativos. Pode-se observar, por meio dos padrões eletroforéticos da catalase (Figura 3), um aumento da atividade dessa enzima com a secagem da semente, porém uma redução da atividade com o aumento do estágio de maturação, ou seja, maior atividade para sementes colhidas nos estádios verde e verde cana e secadas a 10% e 8% de umidade, e para aquelas colhidas no estágio cereja, secadas a 8% de umidade. Isso, provavelmente, seja devido a maior ocorrência de danos peroxidativos nos tratamentos mais intolerantes à dessecação, o que exigiria uma maior atividade das enzimas removedoras de peróxidos, visando a controlar os componentes deletérios, como já mencionados por Bowler Montagu e Inzé (1992), Leprince, Hendry e Mckersie (1993) e Sung e Jeng (1994). Após 6 meses de armazenamento, observa-se, de uma maneira geral, atividade dessa enzima para sementes colhidas nos diferentes estádios de maturação e secadas a diferentes teores de água. Entretanto, a baixa atividade para sementes colhidas no estágio verde cana e secadas a 30% de umidade e ausência de atividade para sementes colhidas no estágio cereja e secadas a 30% de umidade, reforça os resultados detectados pelos teste de germinação, protrusão radicular e atividade da enzima esterase, pois, enquanto a enzima esterase pode estar atuando na hidrólise de esteres, favorecendo a peroxidação

de lipídios, a maior atividade da enzima catalase pode estar relacionada ao próprio sistema de defesa da semente contra os danos peroxidativos induzidos pelo processo secagem e deterioração de sementes no armazenamento. Como já mencionado por Hendry et al. (1992), Finch-Savage, Hendry e Atherton (1994), apesar das sementes recalcitrantes possuírem mecanismos antioxidantes, esses podem tornar-se inefetivos sob condições de estresse hídricos (Smith e Berjak, 1995); perdendo sua ação em termos de proteção contra danos de dessecação.

Apesar da enzima fosfatase alcalina (AKP) participar em reações de hidrólise de esteres, podendo atuar sobre fosfolipídios de membrana, provocando a peroxidação de lipídios, e a enzima superóxido dismutase (SOD) catalizar a desproporcionalização de radicais superóxidos livres (O_2^-), produzidos em diferentes locais na célula, para oxigênio molecular e H_2O_2 (Rabinowitch e Fridovich, 1983), pelos padrões eletroforéticos dessas enzimas (Figura 4), não foi possível verificar alterações em função dos diferentes estádios de desenvolvimento, teores de água das sementes e período de armazenamento.

Coffea arabica



C. canephora

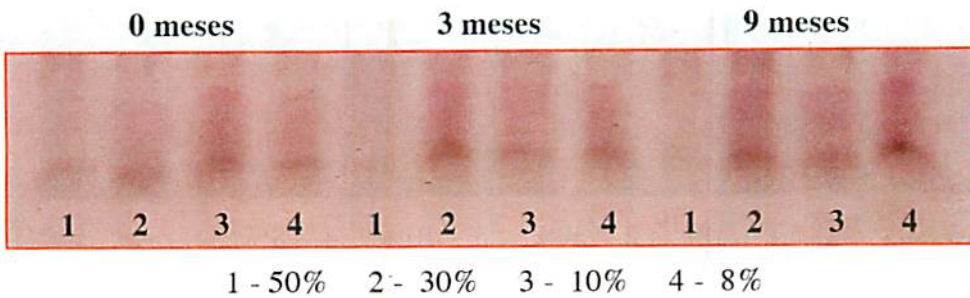
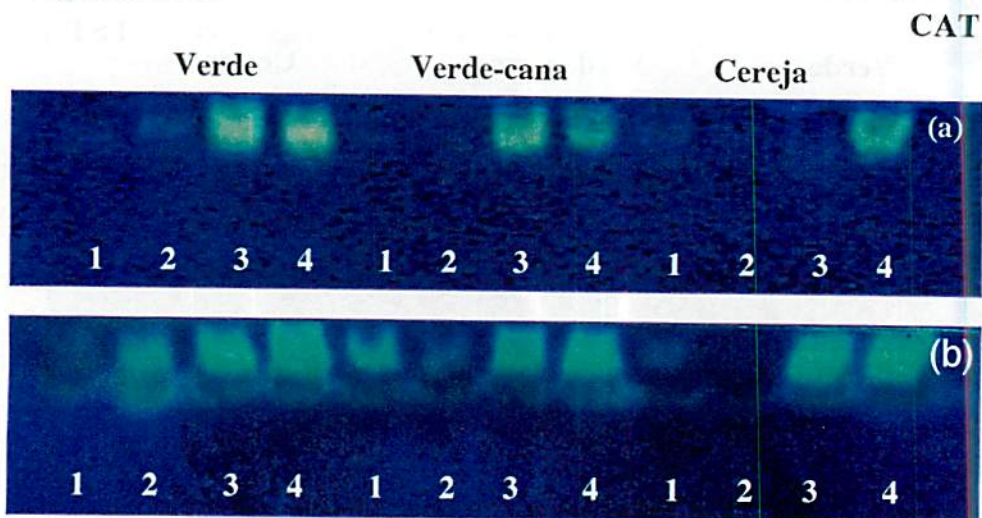


FIGURA 2. Padrões isoenzimáticos de esterase (EST) de sementes de cafeeiro da espécie *C. arabica*, colhidas de frutos em diferentes estádios de maturação, antes (a) e após seis meses de armazenamento (b) e sementes da espécie *C. canephora* colhidas no estágio cereja, submetidas à secagem a diferentes graus de umidade e ao armazenamento (0, 3 e 6 meses). WUR, Wageningen-Holanda, 2000.

Coffea arabica



C. canephora

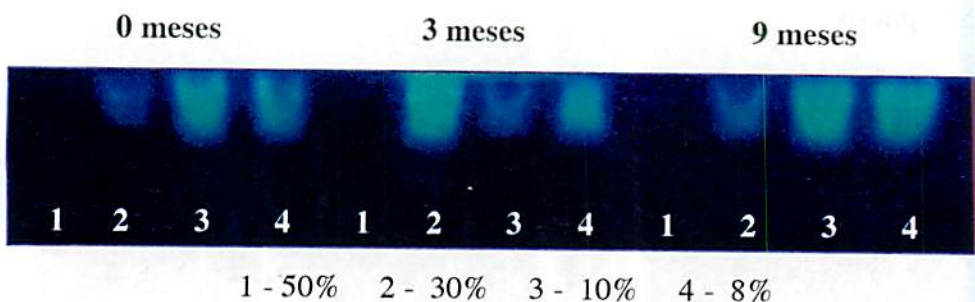


FIGURA 3. Padrões isoenzimáticos de catalase (CAT) de sementes de cafeeiro da espécie arábica, colhidas de frutos em diferentes estádios de maturação, antes (a) e após seis meses de armazenamento (b) e sementes da espécie *C. canephora* colhidas no estágio cereja, submetidas à secagem a diferentes graus de umidade e ao armazenamento (0, 3 e 6 meses). WUR, Wageningen-Holanda, 2000.

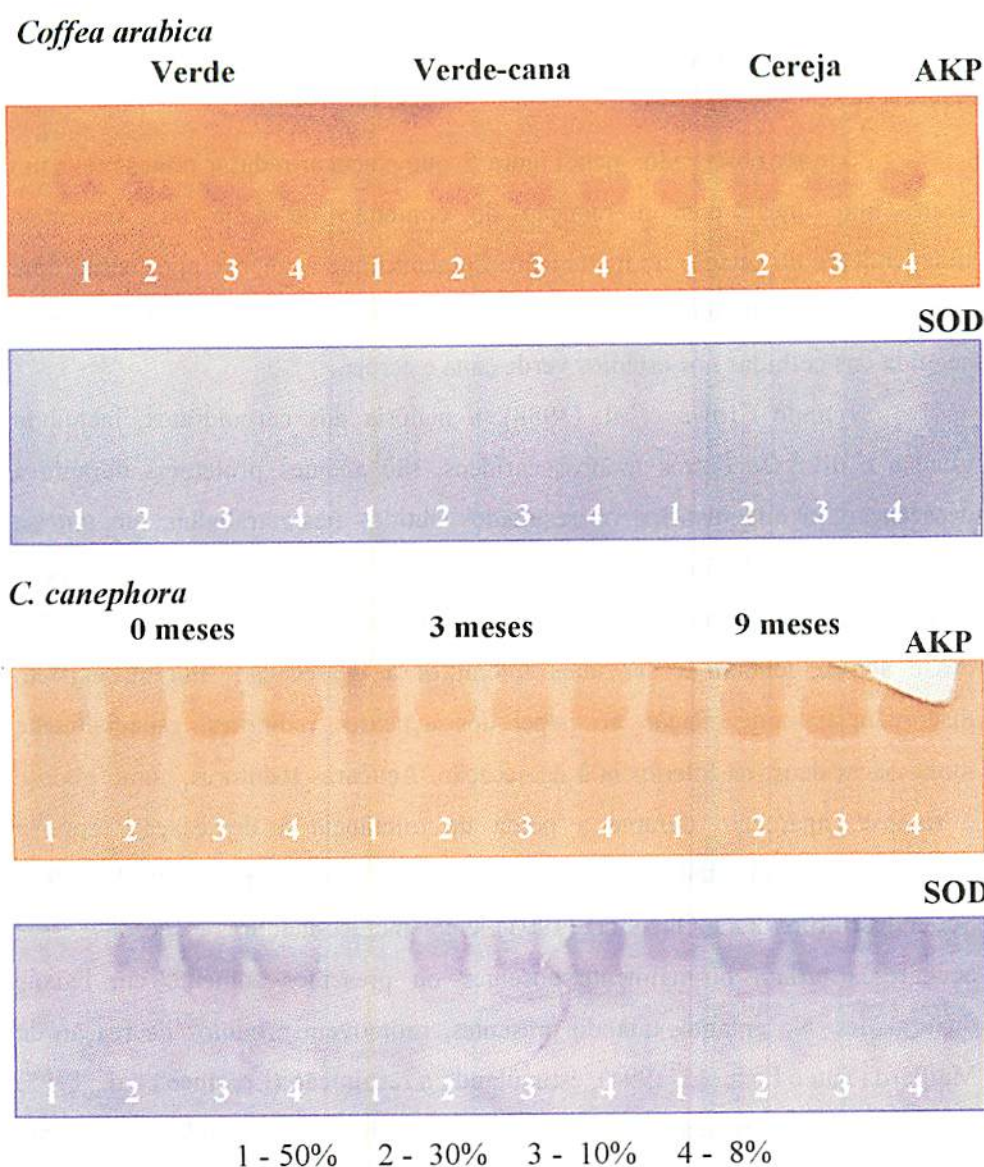


FIGURA 4. Padrões isoenzimáticos de fosfatase alcalina (AKP) e superóxido dismutase (SOD) de sementes de cafeeiro da espécie arábica, colhidas de frutos em diferentes estádios de maturação e de sementes da espécie *C. canephora*, colhidas no estágio cereja, submetidas à secagem a diferentes graus de umidade e ao armazenamento (0, 3 e 6 meses). WUR, Wageningen-Holanda, 2000.

Análise de Carboidratos Solúveis

Pode ser observado, pela Figura 5, que o açúcar redutor ramoso teve um decréscimo linear com a redução do conteúdo de água das sementes, independente do estágio de maturação. Enquanto que a glicose apresentou uma redução mais acentuada dos seus teores nas sementes colhidas no estágio verde, seguida das colhidas nos estádios verde cana e cereja.

Segundo Crowe et al. (1988), a maioria dos carboidratos, incluindo glicose e diversos outros monossacarídeos, são agentes protetores durante a dessecação, o que justifica os resultados obtidos neste trabalho, em que se verifica uma correlação positiva entre acúmulo de glicose, estágio de maturação e tolerância à dessecação. Desta forma, tecidos que contêm altas concentrações desse açúcar tendem a ser mais tolerantes à dessecação. Porém, existem discordâncias com relação ao papel dos açúcares redutores, especialmente monossacarídeos, na tolerância à dessecação. Açúcares redutores, como glicose e ramoso, aparecem durante a perda de tolerância à dessecação, após a germinação ou em estádios intolerantes (Leopold, 1988; Leprince et al., 1992). Segundo Horbowicz e Obendorf (1994), em sementes maduras e secadas, esses açúcares estariam normalmente ausentes ou presentes somente em baixas quantidades. No entanto, quando presentes, promovem produtos da reação de Maillard (Sun e Leopold, 1994), estimulando a respiração (Leprince et al., 1995) e aumentando a formação de radicais livres (Finch-Savage, Hendry e Atherton, 1994, Leprince et al., 1995). Durante os últimos estádios de maturação, em sementes ortodoxas, os níveis de monossacarídeos são reduzidos, possivelmente pela formação preferencial de oligossacarídeos (Vertucci e Farrant, 1995). Dessa forma, segundo esses autores, a redução do conteúdo de monossacarídeos resulta na redução do substrato respirável, o que pode limitar a fonte de radicais livres. Ressalta-se, ainda, nesta pesquisa, uma relação negativa entre presença de

açúcares redutores e atividade da enzima esterase. Essa enzima participa na hidrólise de esteres, favorecendo a peroxidação de lipídios e, consenquente, acúmulo de radicais livres. A redução da concentração da glicose foi verificada nos estádios de colheita mais sensíveis à dessecação (verde, verde cana). Pela Figura 5, pode-se observar um decréscimo de 1 mg/l na concentração de glicose para cada redução de 2% no teor de água das sementes colhidas no estágio verde. Portanto, sementes que apresentaram os mais altos teores de glicose (cereja) foram, provavelmente, as que apresentaram menor susceptibilidade aos danos peroxidativos, sugerindo o efeito protetor desse açúcar durante à dessecação.

Quanto à sacarose, verifica-se, pela Tabela 1, aumento significativo da concentração desse dissacarídeo com o estágio de maturação das sementes, independentemente do conteúdo de água das mesmas. O acúmulo de sacarose tem sido proposto como um fator chave em estabilização de membranas (Sun et al., 1994). Na presente pesquisa, foi observado que os estádios de colheita que apresentaram maiores concentrações de sacarose também foram os que apresentaram maiores percentuais de germinação e de protrusão radicular. O acúmulo de sacarose e oligossacarídeos, durante a maturação de sementes, tem sido associado com a aquisição de tolerância à dessecação, podendo estabilizar macromoléculas (Colaco et al., 1992) e estrutura de membranas (Leprince et al., 1993), durante à dessecação. A sacarose ainda é um açúcar não redutor, portanto menos reativa e considerada componente protetor contra radicais livres (Orthen, Popp e Smirnof, 1994; Kranner e Grill, 1996).

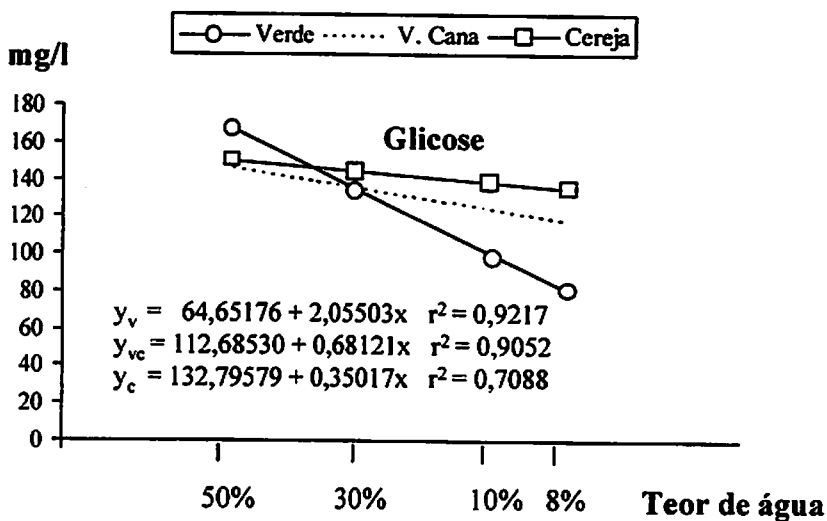
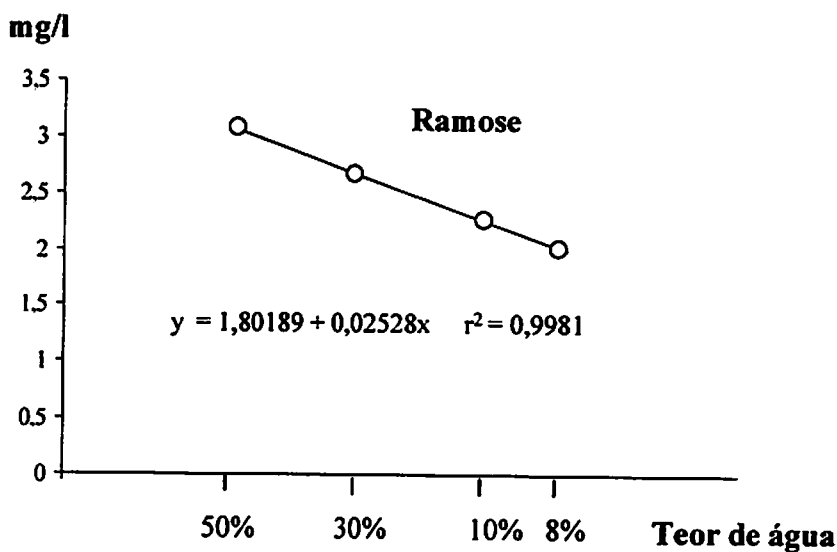


FIGURA 5. Efeito de secagem nos teores de açúcares redutores em sementes de *C. arabica* colhidas em diferentes estádios de maturação. WUR, Wageningen-Holanda, 2000.

Tabela 1. Valores médios dos teores de sacarose de sementes de cafeeiro da espécie *C. arabica* colhidas em diferentes estádios de maturação e secadas a diferentes teores de água. WU, Wageningen-Holanda, 2000.

Estádio de Maturação	Sacarose (mg/l)
Cereja	1619,0 a
Verde Cana	1549,1 a
Verde	1413,6 b
Cv	4,95
Média	1527,25

-Médias seguidas de uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Observações Ultraestruturais

Em sementes de *C. arabica*, nas células da radícula, hipocótilo e cotilédones, observa-se, no geral, células túrgidas com o vacúolo ocupando grande parte do volume celular, visualização nítida de pequenos corpos de lipídios no citoplasma, parede celular delgada com o protoplasto aderido à parede, conferindo aspectos ultraestruturais aparentemente normais, tanto para aquelas colhidas no estágio cereja, como para aquelas colhidas no estágio verde cana, independente do teor de água para o qual as sementes foram secadas (Figuras 6 a 8). Já nas sementes colhidas no estágio verde e que foram secadas a 8% de umidade, nota-se modificações ultraestruturais nas células dos embriões (Figura 9). Em células dos cotilédones, hipocótilo e radícula, foram observadas as mais intensas alterações, como formações de cristais nos espaços intercelulares (indicativo da perda de integridade de membrana), desaparecimento do vacúolo e de endomembranas, coalescência de lipídios.

Corpos de lipídios coalesceram e formaram uma grande estrutura compacta, sendo que a extensão dos danos foram maiores na região da radícula, seguida pela do hipocótilo. Após reidratação, as células mostraram ruptura das membranas internas como a do vacúolo (tonoplasto).

Os danos induzidos pela dessecação e posterior reidratação nos embriões de sementes, colhidas no estágio verde, foram severos e aparentemente irreversíveis (Figuras 9 e 10). Em contraste, nas células de embriões de sementes, colhidas no estágio verde cana e cereja, foram observadas pequenas ou nenhuma modificação ultraestrutural devido à dessecação ou reidratação. Não foi verificada coalescência de corpos de lipídios ou sinais de vesiculação e extensiva ruptura de membranas. As células tinham aparência semelhante àquelas em que a membrana do vacúolo permaneceu intacta. Provavelmente, nesse estágio de desenvolvimento, as sementes são tolerantes à dessecação. Essas observações coincidem com os resultados obtidos no teste de germinação, protrusão radicular e análise eletroforética das enzimas esterase e catalase (Figuras 1-4).

A exceção das sementes colhidas no estágio verde e secadas a 8% de umidade, os corpos de lipídios permaneceram estáveis, independente do grau de umidade a que foram secadas (Figura 7). Como já mencionado na literatura (Leprince et al., 1998), também em sementes de cafeeiro, alguns fatores estão envolvidos na prevenção da coalescência de corpos de lipídios durante a maturação e secagem. Provavelmente os dois fatores que estão interagindo são a alta viscosidade do citoplasma em sementes secadas e a taxa de secagem. Durante a secagem natural, com o processo de maturação das sementes, a viscosidade do citoplasma aumenta com a concentração de açúcares solúveis e proteínas citoplasmáticas, consequentemente um estado vítreo é formado, no qual todas as organelas são amparadas e protegidas por um citoplasma extremamente viscoso (Willians e Leopold, 1989; Leprince e Vertucci, 1995;

Wolker e Hoekstra, 1997; Leprince et al., 1998). Em modelos de emulsões, a alta viscosidade, gerada pela alta concentração de polissacarídeos, é um fator chave na estabilização de pequenas gotículas de óleo (Mangino, 1989). Em adição, a propriedade hidrofóbica de proteínas citoplasmáticas pode também promover uma interface entre os lipídios e o citoplasma, atuando, assim, como uma barreira à coalescência, como sugerido por Barford et al. (1989) e Mangino (1989) em estudos de estabilização de sistemas de emulsões. A taxa de secagem também pode influenciar a estabilidade de corpos de lipídios, como observado em cotilédones de coco secados (Leprince, et al., 1998). Segundo esses autores, a taxa de secagem pode influenciar a ocorrência de coalescências de corpos de lipídios. Desde que a taxa de secagem controle indiretamente o aumento na viscosidade, altas viscosidades poderão ser geradas durante a secagem. Portanto, efetivamente, amparando os corpos de lipídios e prevenindo sua coalescência. Dependendo da viscosidade dos citoplasmas, alguns corpos de lipídios poderão se apresentar unidos e, portanto, tendo a oportunidade de se fundirem, fato esse que influencia a sensibilidade à dessecação.

Os resultados da presente pesquisa, reforçam os observados por Dasgupta, Belwey e Yeung (1982), em que o desenvolvimento das sementes de *Coffea arabica* passam de um estágio intolerante a um posterior tolerante. Essa aquisição de tolerância pôde ser detectada pelo teste de germinação, pela atividade das enzimas esterase e catalase, por alterações nos teores de açúcares e modificações ultraestruturais como ruptura de membrana ou coalescência de corpos de lipídios.

Após seis meses de armazenamento a 10°C e 50% de U.R. , as células dos embriões das sementes, colhidas nos estádios verde cana e cereja e submetidas à secagem a diferentes teores de água, permaneceram, aparentemente, túrgidas. Já nas células da radícula e hipocótilo dos embriões das sementes, colhidas no estágio verde e secadas a 10% de umidade (Figura 11),

foram observadas formações de cristais nos espaços intercelulares, que é um indicativo de perda de integridade de membrana e de danos de deterioração. Em células dos cotilédones dos embriões de sementes, não secadas e secadas a 30% de umidade, não foram observados danos aparentes em qualquer dos estádios de desenvolvimento.

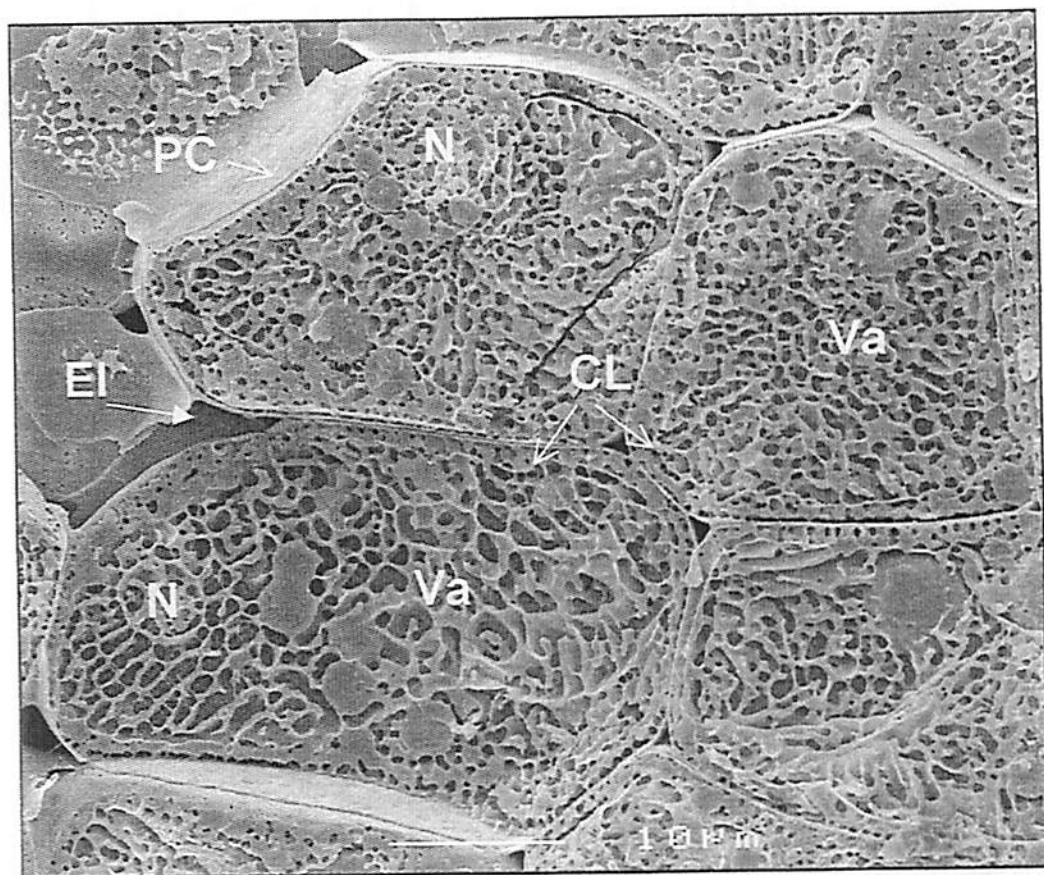


Figura 6. Micrografias “LTSEM” de organizações sub-celulares da região da radícula de embriões de *Coffea arabica*, oriundos de sementes colhidas no estágio verde e secadas a 10% de umidade. PC, parede celular; Va, vacúolo; N, núcleo; EI, espaços intercelulares; CL, corpos de lipídios. WUR, Wageningen - Holanda, 2000.

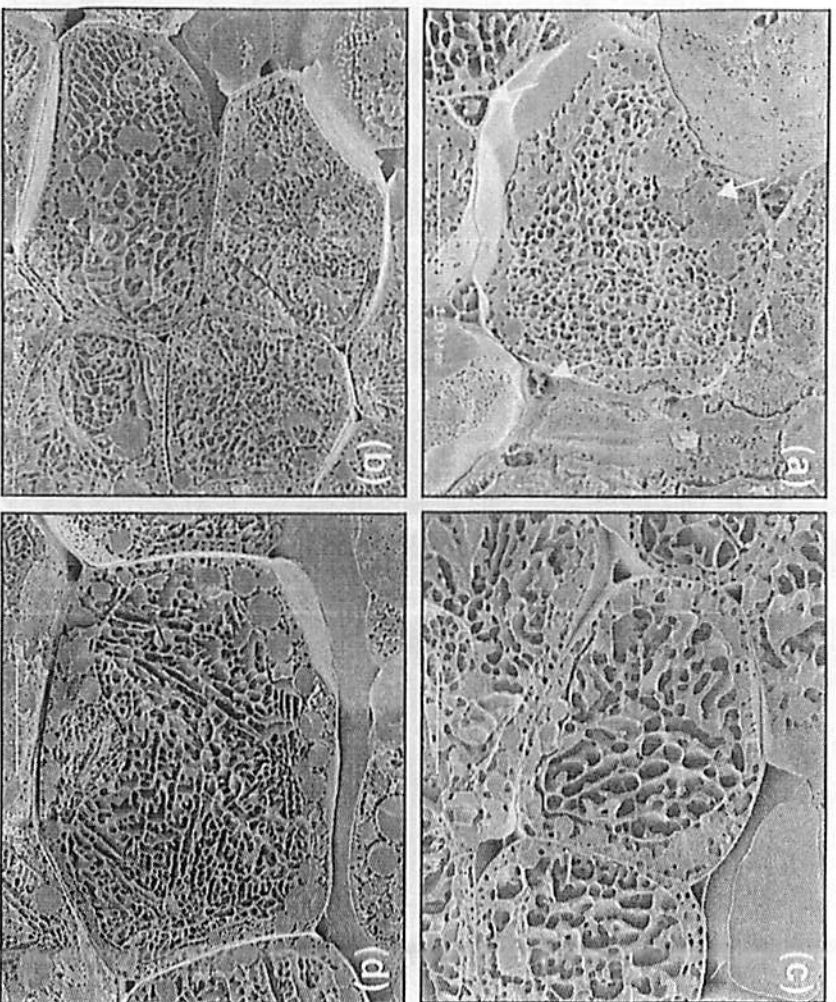


Figura 7. Micrografias LTSEM de organizações sub-celulares da região da radícula de embriões de *Coffea arabica*, oriundos de sementes colhidas no estádio verde, secadas a 8%, apresentando formações de cristais nos espaços intercelulares e fusão de lipídios (a) e secadas a 10% (b), aparentemente normais. Células da região da radícula de embriões, oriundos de sementes colhidas nos estádios verde cana (c) e cereja (d), secadas a 8% apresentando-se aparentemente normais. WUR, Wageningen - Holanda, 2000.

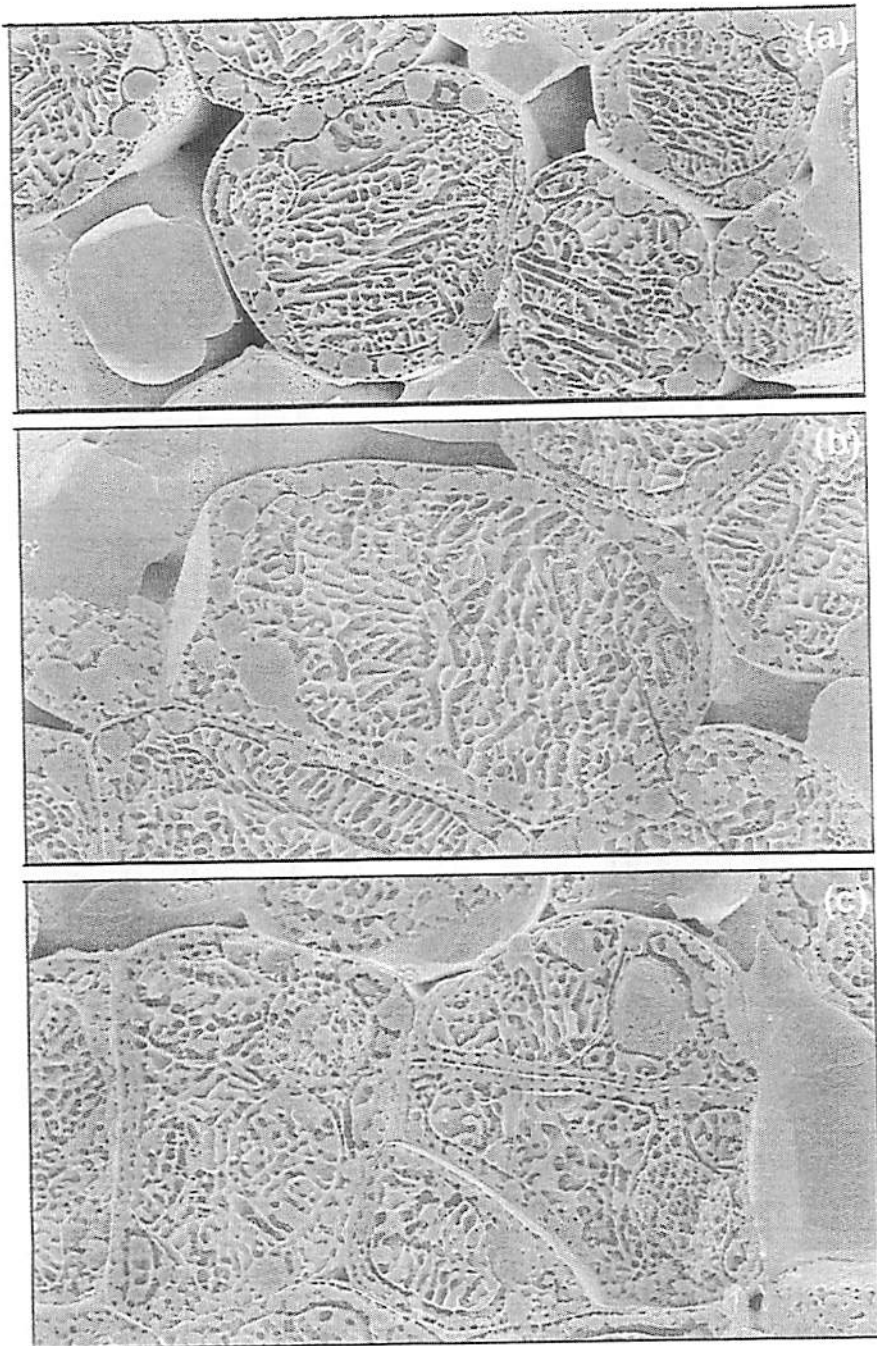


Figura 8. Micrografias LTSEM de organizações sub-celulares de embriões de *Coffea arabica*, oriundos de sementes colhidas no estágio verde, não secadas. Células da região da radícula (a), do hipocotilo (b) e dos cotilédones, aparentemente normais e em boas condições (c). WUR, Wageningen - Holanda, 2000.

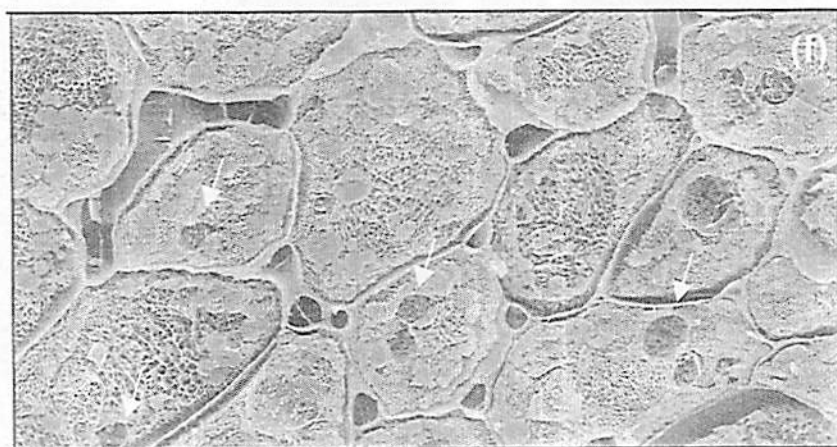
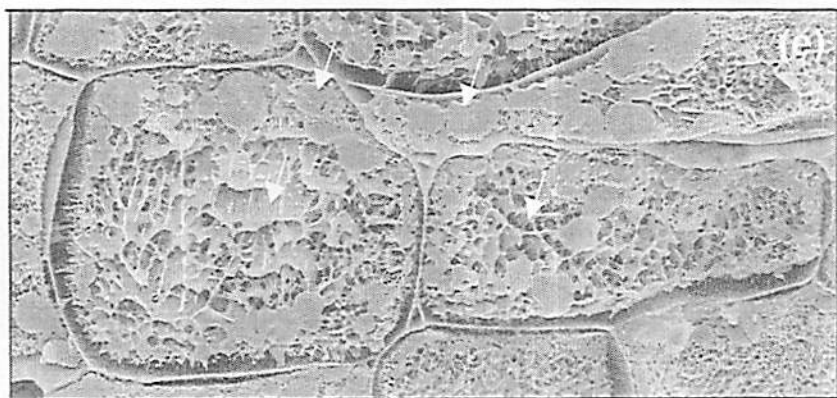


Figura 9. Micrografias LTSEM de organizações sub-celulares de embriões de *Coffea arabica* oriundos de sementes colhidas no estágio verde secadas a 8% de grau de umidade, apresentando uma mistura de protoplasma (d), tonoplasto quase desintegrado e fusão de lipídios (e) e presença de pontuações escuras (f), possível efeito secundário da deterioração das células. WUR, Wageningen - Holanda, 2000.

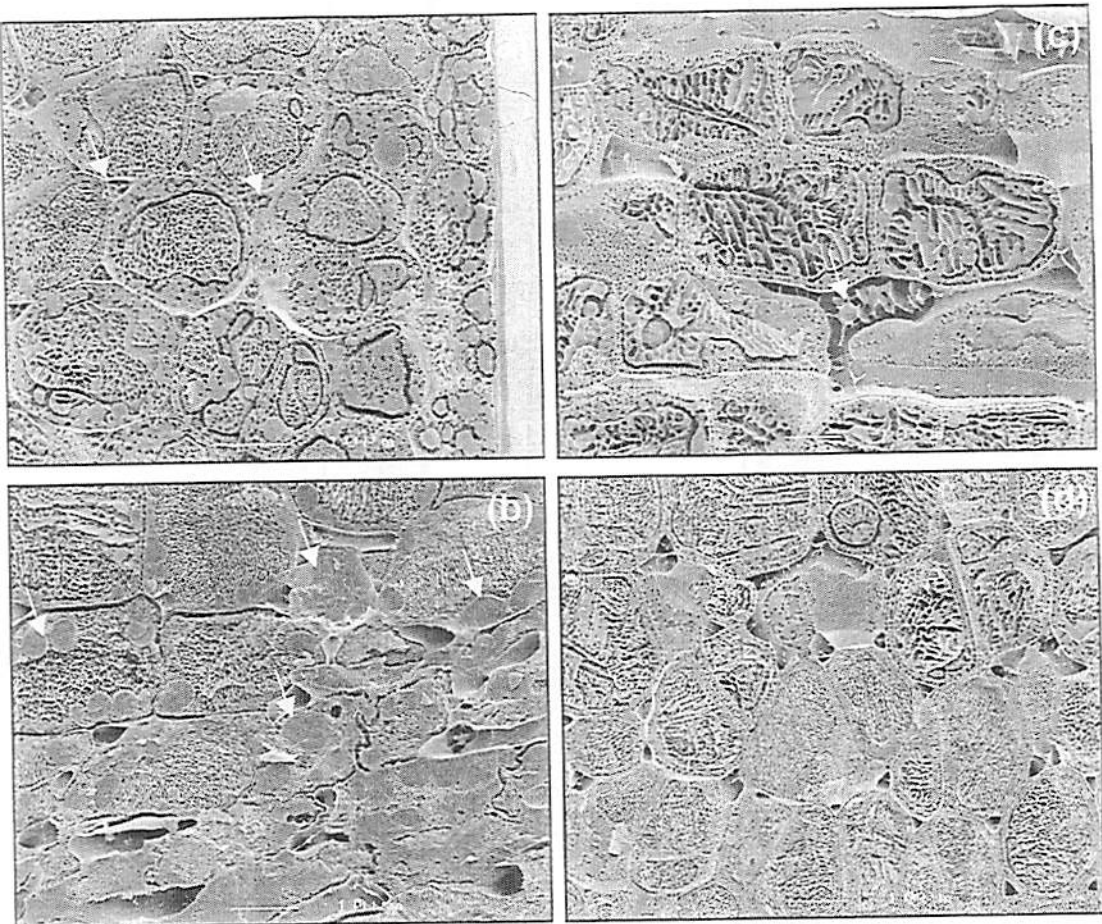


Figura 10. Micrografias LTSEM de organizações sub-celulares de embriões de *Coffea arabica* oriundos de sementes colhidas no estágio verde, secadas a 8% de umidade e reidratada em atmosfera controlada. Células da região da radícula apresentando formações de cristais nos espaços intercelulares (a), fusão de lipídios (b); hipocótilo com formações de cristais nos espaços intercelulares (c) e cotilédones aparentemente normais (d). WUR, Wageningen - Holanda, 2000.

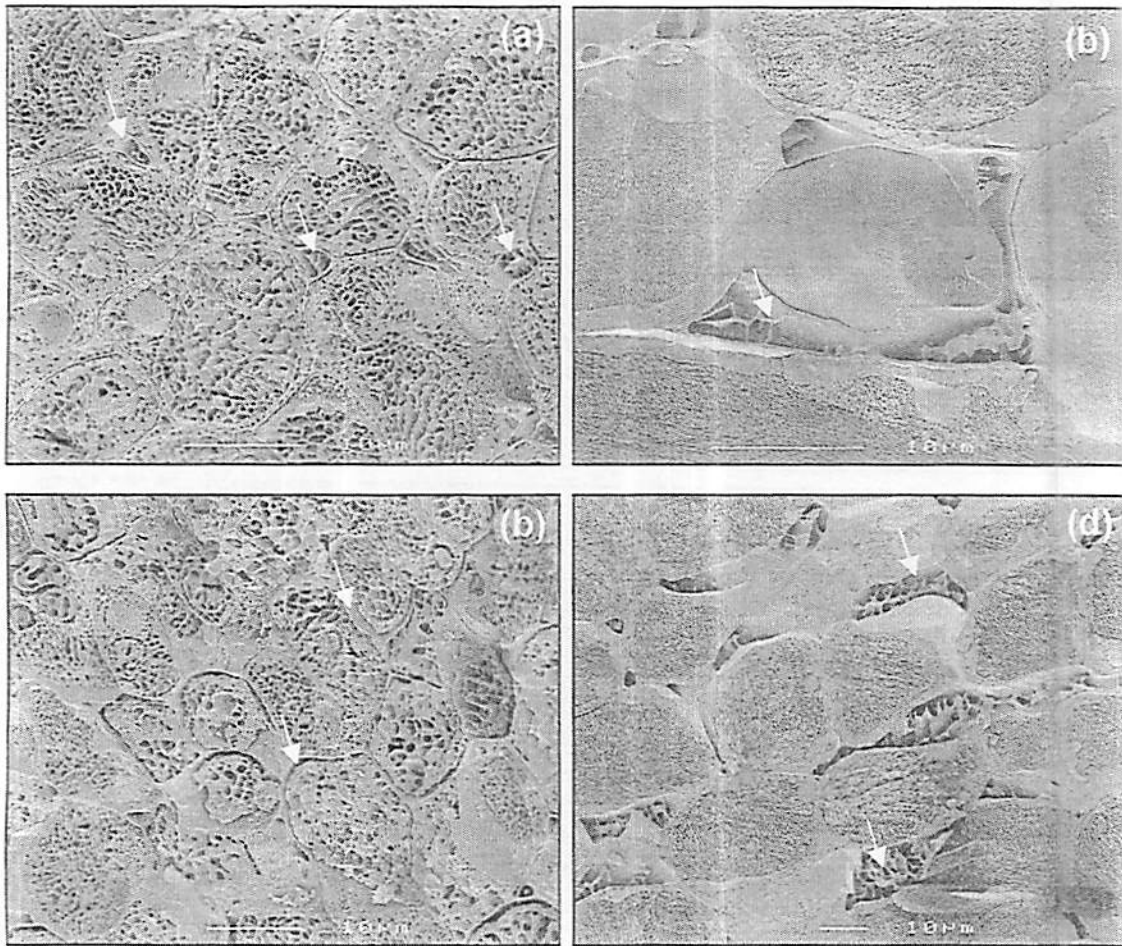


Figura 11. Micrografias LTSEM de organizações sub-celulares de embriões de *Coffea arabica* oriundos de sementes colhidas no estágio verde, secadas a 8% de umidade e armazenadas seis meses a 10°C. Células da região da radícula apresentando formações de cristais nos espaços intercelulares (a), desaparecimento do tonoplasto (b); hipocótilo (c) e cotilédones (d), com formações de cristais nos espaços intercelulares. WUR, Wageningen - Holanda, 2000.

(Coffea canephora)

Pelos resultados das Figuras 12 e 13, pode ser observado que sementes de cafeeiro da espécie de *C. canephora*, colhidas no estágio cereja, apresentaram percentagem de protrusão radicular, germinação e de raízes secundárias próximas de 98% (dados originais), tanto para aquelas sementes que não foram secadas (controle) como para as que foram secadas até 30% de umidade, anteriormente ao armazenamento. Foi verificado que sementes secadas a níveis de 10 e 8% de umidade apresentaram reduções significativas do percentual de protrusão radicular, germinação e porcentagem de raízes secundárias, da ordem de 90% (Figura 12 e 13). Já em relação ao índice de velocidade de protrusão de radícula (Figura 13), foi observada uma redução de aproximadamente 50% nas sementes secadas a 30% de umidade, mesmo antes do armazenamento, quando comparada com aquelas não secadas, atingindo índices próximos de 0 naquelas sementes secadas a 10 e 8% de umidade. Verifica-se, portanto, que, apesar de não ter havido um efeito imediato da secagem no percentual de germinação, quando as sementes foram secadas para teores de água em torno de 30%, foi detectada uma queda acentuada no índice de velocidade de protrusão radicular.

No entanto, sementes armazenadas por três meses, sofreram reduções em torno de 60% na germinação, protrusão radicular, porcentagem de raízes secundárias, bem como redução no índice de protrusão radicular das sementes não secadas e perda total desses parâmetros após seis meses de armazenamento (Figuras 12 e 13). Isso provavelmente ocorreu devido ao metabolismo mais ativo nas sementes com grau de umidade de 50%, o que pode ter favorecido reações deletérias, principalmente estando as sementes armazenadas em recipientes (saco de polietileno) lacrados. O Alto teor de água das sementes influencia eventos bioquímicos, como aumento da atividade de enzimas hidrolíticas, aumento de respiração e aumento de ácidos graxos livres, o que leva

a uma deterioração mais rápida; pois, a umidade da semente é considerada como o fator mais crítico na manutenção da longevidade das sementes (Copeland e McDonald, 1995).

Já as sementes secadas a 30% de umidade apresentaram, tanto após 3 meses de armazenamento, quanto após 6 meses (Figura 12 e 13), queda de aproximadamente 30% na germinação, protrusão radicular e porcentagem de raízes secundárias. Também a redução do índice de velocidade de protrusão radicular foi menor do que nas sementes não secadas e/ou secadas a 10% e 8% de umidade, o que sugere ser esse conteúdo de água das sementes (30%) o que possibilitou a melhor preservação da qualidade fisiológica durante o armazenamento.

De uma maneira geral, os resultados sugerem que as sementes maduras (cereja) de *C. canephora* apresentam intolerância à dessecação, apresentando danos de secagem até em pequenas reduções do conteúdo de umidade das sementes (30%), o que reforça a classificação dessas sementes como recalcitrante por diversos autores (Hong e Ellis, 1995). Em espécies recalcitrantes, as sementes não podem resistir à dessecação, devendo seu conteúdo de água permanecer alto durante todo o seu desenvolvimento e maturação.

A perda da viabilidade de sementes é altamente dependente da temperatura de armazenamento e do grau de umidade das sementes (Roberts, 1972; Priestley, 1986). Os efeitos da umidade relativa e, conseqüente umidade da semente e temperatura do ambiente de armazenamento, são altamente interdependentes. Ambos os parâmetros influenciam o metabolismo das sementes e podem ser associados as várias mudanças bioquímicas e metabólicas (alteração isoenzimática) que podem resultar na perda de integridade de membranas (Priestley, 1986). Alta umidade relativa aumenta o teor de água das sementes, o que influencia eventos bioquímicas, como o aumento da atividade

de enzimas hidrolíticas, respiração e ácidos graxos livres. Altas temperaturas contribuem para aumentar a taxa enzimática e a ocorrência de reações metabólicas, o que leva a uma deterioração mais rápida. Todavia, a umidade da semente é considerada como o fator mais crítico na manutenção da longevidade das sementes (Copeland e McDonald, 1995).

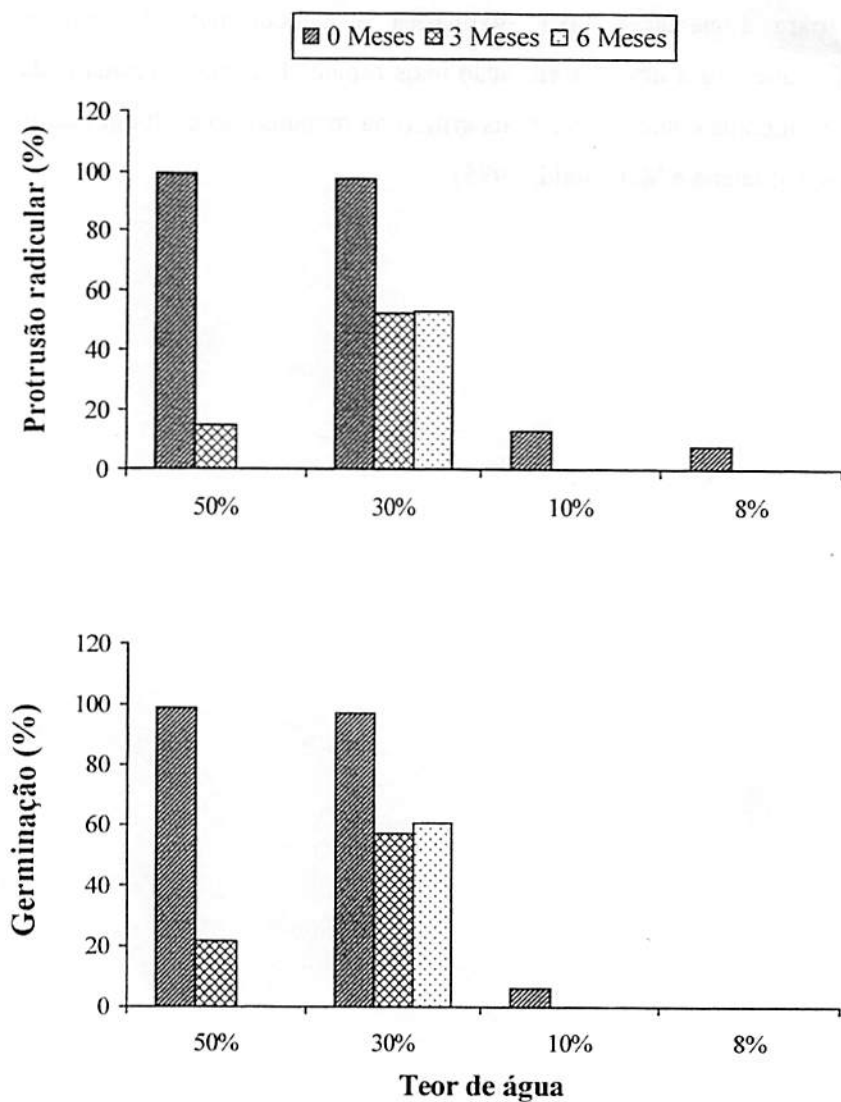


FIGURA 12. Efeito da secagem na percentagem de protrusão radicular e de germinação de sementes de *Coffea canephora*, antes do armazenamento (0 meses) e após três e seis meses de armazenadas. WUR, Wageningen-Holanda, 2000.

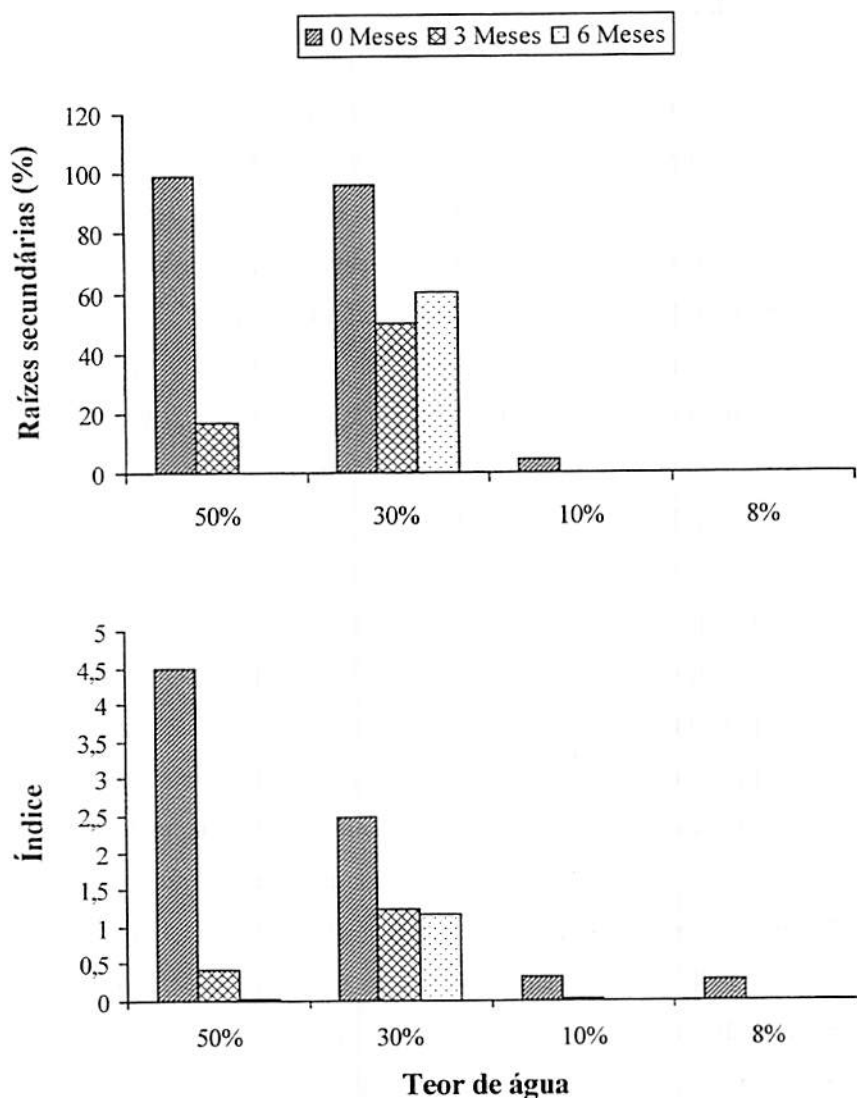


FIGURA 13. Efeito da secagem na percentagem de raízes secundárias e no índice de velocidade de protrusão radicular de sementes de *Coffea canephora*, antes do armazenamento (0 meses) e após três e seis meses de armazenadas. WUR, Wageningen-Holanda, 2000.

Análise Eletroforética

Pelo perfil eletroforético da enzima esterase (Figura 4), observa-se atividade enzimática apenas para aquelas sementes secadas a 10 e 8% de umidade, anteriormente ao armazenamento. Esse resultado se assemelha aos obtidos para as sementes de *C. arabica* antes do armazenamento. Vale ressaltar, no entanto, a menor nitidez das bandas (baixa atividade) para *C. canephora*. Como já mencionado, a enzima esterase pode estar atuando na hidrólise de ésteres, favorecendo a peroxidação de lipídios, portanto, a maior atividade dessa enzima pode estar relacionada à ocorrência de danos peroxidativos induzidos pelo processo de secagem. Após o armazenamento das sementes, sob condições de câmara fria (10°C e 50% U.R.), o perfil eletroforético da esterase revelou atividade dessa enzima também para aquelas sementes secadas para teores de água de 30%, e ainda foi verificado um aumento da intensidade das bandas dessa enzima com o aumento do período de armazenamento. Esses resultados, divergem dos obtidos para *C. arabica*, em que não se verificou atividade da enzima esterase nas sementes secadas a 30% de umidade. Para *C. canephora* foi verificado que as sementes secadas a 30% de umidade apresentaram, tanto após 3 meses de armazenamento, quanto após 6 meses (Figura 12 e 13), queda de aproximadamente 30% na germinação, protrusão radicular e porcentagem de raízes secundárias. Portanto, a presença da maior atividade da enzima esterase nas sementes secadas a 30% de umidade pode estar relacionada à ocorrência de danos peroxidativos induzidos pelo processo de deterioração. Assim, a incapacidade dos tecidos das sementes sensíveis à dessecação efetuarem adequada proteção contra a destruição dos eventos oxidativos, consequente do metabolismo desorganizado durante a desidratação, pode ser considerada como uma das principais causas da sensibilidade à dessecação.

O padrão eletroforético da catalase, (Figura 4), enzima envolvida na redução de peróxido de hidrogênio (Fridovich, 1986), apresentou aumento da atividade (intensidade das bandas) com a redução do teor de água das sementes. Mesmo as sementes secadas a 30% de umidade apresentaram atividade para essa enzima, enquanto que sementes não secadas não apresentaram atividade. Como já mencionado para *C. arabica*, isso provavelmente seja devido a maior ocorrência de danos peroxidativos nos tratamentos mais intolerantes à dessecação, o que exigiria uma maior atividade das enzimas removedoras de peróxidos, visando a controlar os componentes deletérios (Bowler, Montagu e Inzé, 1992; Leprince, Hendry e Mckersie, 1993; Sung e Jeng, 1994). Nos diferentes períodos de armazenamento, pode ser observado, de uma maneira geral, atividade dessa enzima apenas para sementes secadas a diferentes teores de água. Sung e Jeng (1994), também não observaram alteração na atividade da catalase durante o envelhecimento de sementes de amendoim. Entretanto, Bailly et al. (1996) verificaram, em sementes de girassol, uma redução drástica da atividade dessa enzima após 48 horas de envelhecimento (45°C e água).

Já as enzimas fosfatase alcalina (AKP) e superóxido dismutase (SOD) (Figura 4), apesar de participarem reações que promovem e removem produtos de peroxidação, respectivamente (Rabinowitch e Fridovich, 1983), pelos padrões eletroforéticos dessas enzimas (Figura 4), não foi possível verificar alterações em função dos teores de água das sementes e período de armazenamento.

Análise de Carboidratos Solúveis

Os açúcares presentes nas sementes maduras de *C. canephora* foram ramosa, glicose e frutose, sendo que os demais (rafinose e estaquiose) foram encontrados em baixíssimas concentrações. Pela Figura 14, pode-se verificar o efeito da secagem nas concentrações de açúcares redutores em sementes de *C.*

canephora avaliado antes do armazenamento e após três e seis meses de armazenamento. Pode ser observado um decréscimo nos teores de ramosse, glicose e frutose com a redução da umidade das sementes. Os teores de ramosse e glicose foram reduzidos para níveis inferiores à metade dos valores iniciais quando as sementes foram secadas de 50 para 30% de umidade. A partir de então, os teores de ramosse permaneceram praticamente inalterados para sementes secadas a 10 e 8% de umidade, enquanto que, os de glicose foram ainda menores nas sementes secadas a 10 e 8% de umidade.

Quanto à frutose, a redução dos teores desse açúcar só foi observada após a secagem das sementes para teores de água de 10 e 8% e houve um aumento nos teores de frutose com o armazenamento das sementes.

Segundo Vertucci e Farrant (1995), durante os últimos estádios de maturação em sementes ortodoxas, os teores de monossacarídeos são reduzidos, provavelmente pela formação de açúcares não redutores. Diversos autores como Koster e Leopold (1988), Chen e Burris (1990) e Blackman, Obendorf e Leopold (1992) sugerem que tecidos tolerantes apresentam baixa quantidade de açúcares redutores, como glicose, frutose e ramosse. No entanto, na presente pesquisa, decréscimo nos teores de ramosse, glicose e frutose, com a redução da umidade das sementes, não foi acompanhada da aquisição da tolerância à dessecação.

A ocorrência de elevadas concentrações de açúcares redutores em grãos secos de cafeeiro comercial é normalmente descrito como sendo resultado da degradação de açúcares maiores durante o armazenamento (Bucheli et al., 1996; Bucheli et al., 1998). Uma vez que a sacarose é o principal carboidrato transportado no floema, o que tem sido também detectado no cafeeiro (Rogers et al., 1999), o aumento dos níveis observados de glicose e frutose na semente com o armazenamento, provavelmente seja devido ao catabolismo de sacarose nesse órgão.

Rogers et al. (1999), estudando mudanças do conteúdo de açúcares no desenvolvimento de grãos de diferentes variedades de *Coffea canephora* e *C. arabica*, verificaram que os oligossacarídeos estaquiose e rafinose encontram-se em baixas concentrações nos grãos. As mais altas concentrações de estaquiose, normalmente estavam em torno de 0,2% e este conteúdo foi constante durante o desenvolvimento do grão, enquanto que rafinose foi encontrada em baixas e constantes concentrações. Baixas concentrações em grãos maduros também foram detectadas nos resultados de Clifford (1985) e Guimarães (2000).

Pela presente pesquisa, pôde-se observar baixos teores de sacarose nas sementes de *C. canephora* em contraste aos altos teores em sementes de *C. arabica*. Correlações entre altas concentrações de sacarose e tolerância à dessecação de sementes tolerantes à dessecação tem levado à sugestão que ela pode representar um importante mecanismo de tolerância à dessecação (Koster e Leopold, 1988; Leprince et al., 1992; Crowe et al., 1997). A sacarose representa quase que a totalidade dos açúcares livres em grãos maduros de cafeeiro, sendo que em *C. arabica* foram encontrados níveis mais altos que em *C. canephora* e esses níveis correlacionam-se diretamente com os níveis de glicose e frutose em tecidos do endosperma das duas espécies. Os baixos níveis de glicose e frutose detectados em grãos maduros foram também observados por Silwar e Lüllmann (1988) e Wolfrom, Plunkett e Laver (1960) em suas pesquisas e os níveis mais altos de sacarose em *C. arabica* do que em *C. canephora* também foram constatados por Clifford (1985) e Silwar e Lüllmann (1988). Todavia, acumulação de sacarose em sementes de cafeeiro pode não ser o único fator na aquisição de tolerância à dessecação em sementes, como já mencionados por Blackman et al. (1991), Ooms, Wilmer e Karssen (1994) e Guimarães (2000).

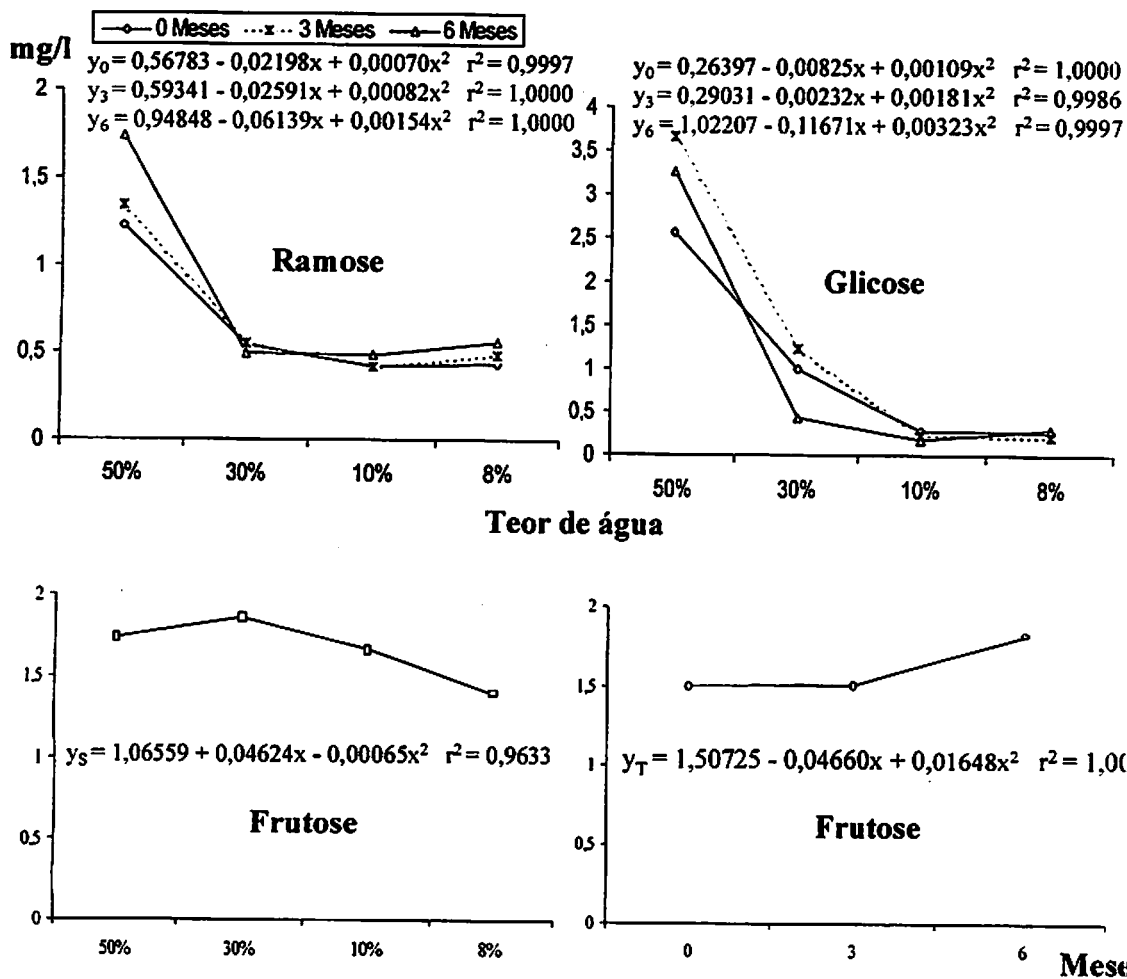


FIGURA 14. Efeito de secagem nos teores de açúcares redutores em sementes de *canephora*, antes do armazenamento (0 meses) e após três e seis meses armazenadas. WUR, Wageningen-Holanda, 2000.

Observações Ultraestruturais

Não foram observados danos aparentes nas células de radículas, hipocótilo e cotilédones de sementes de *C. canephora* não secadas ou secadas até 30% de umidade. Por outro lado, nas secadas a teores de água de 10 e 8%, as células mostraram avançada deterioração nas estruturas de membranas (Figuras 15 e 16). Foram observados os mesmos tipos de danos apresentados nas células dos embriões de sementes de *Arabica* colhidas nos estádio verde e secadas a 8% de umidade. Após o armazenamento, foram observadas, nas células dos embriões de sementes de *Canephora* que não foram secadas, avançada descompartimentalização, grandes corpos de lipídios, estando as células das diferentes regiões do embrião completamente mortas, devido à deterioração dos tecidos das sementes durante o armazenamento. Esses resultados reforçam os detectados pelos testes de germinação, protrusão radicular, porcentagem de raízes secundárias, índice de velocidade de protrusão radicular, determinação de açúcares e dos padrões eletroforéticos das enzimas catalase e esterase. Existe um grande número de alterações ultraestruturais associadas à perda da viabilidade durante a dessecação das sementes. Danos letais, durante a progressiva perda de água em sementes, envolve múltiplos componentes, incluindo acumulação de oligossacarídeos não redutores (Leprince et al., 1990; Blackman, Obendorf e Leopold, 1992), sistemas de proteção à formação de radicais livres (Hendry, 1993; Leprince, Hendry e Mckersie, 1993).

De acordo com os resultados da presente pesquisa, existem diferenças nos níveis de tolerância à dessecação entre as duas espécies, sendo que a espécie *C. canephora* apresentou-se mais sensível à dessecação, mesmo após terem atingido a maturidade. Já as sementes de *C. arabica* adquiriram tolerância à dessecação com o processo de maturação. Diversos autores (Hong e Ellis, 1995, Eira et al., 1999) têm observado diferenças marcantes nos níveis de sensibilidade

à dessecação entre as espécies de *Coffea* spp. Segundo esses autores, essas diferenças podem ser atribuídas às relações filogenéticas, habitat de origem e/ou duração de maturidade. *Coffea arabica* e *C. canephora* são as principais espécies comerciais do gênero, recebendo classificação intermediária e recalcitrante, respectivamente, quanto a tolerância à dessecação.

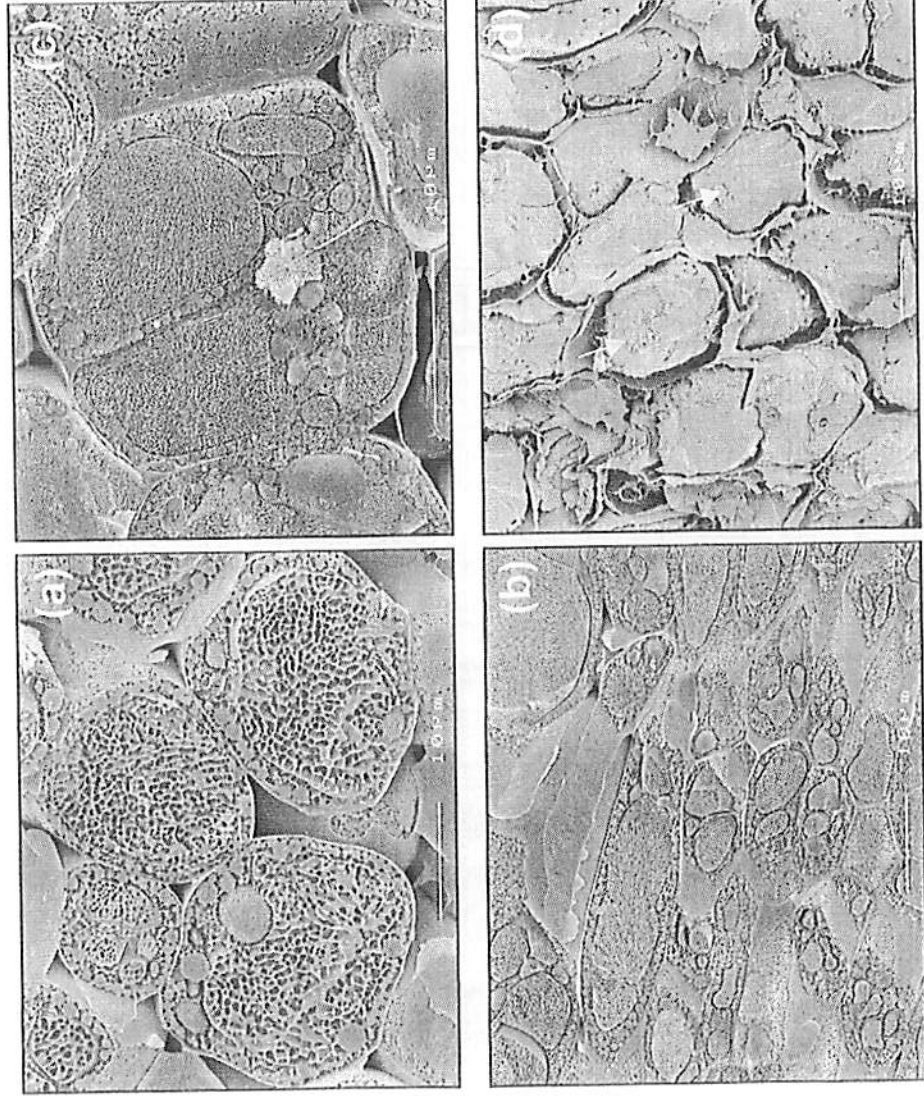


Figura 15. Micrografias LTSEM de organizações sub-celulares de embriões de sementes de *Coffea canephora* colhidas no estado cerejas, não secadas, da região da radícula (a), do hipocotilo (b) e dos cotilédones (c), todas em boas condições e de radículas de sementes armazenadas 6 meses, mortas e apresentando um grande corpo de lipídio. WUR, Wageningen - Holanda, 2000.

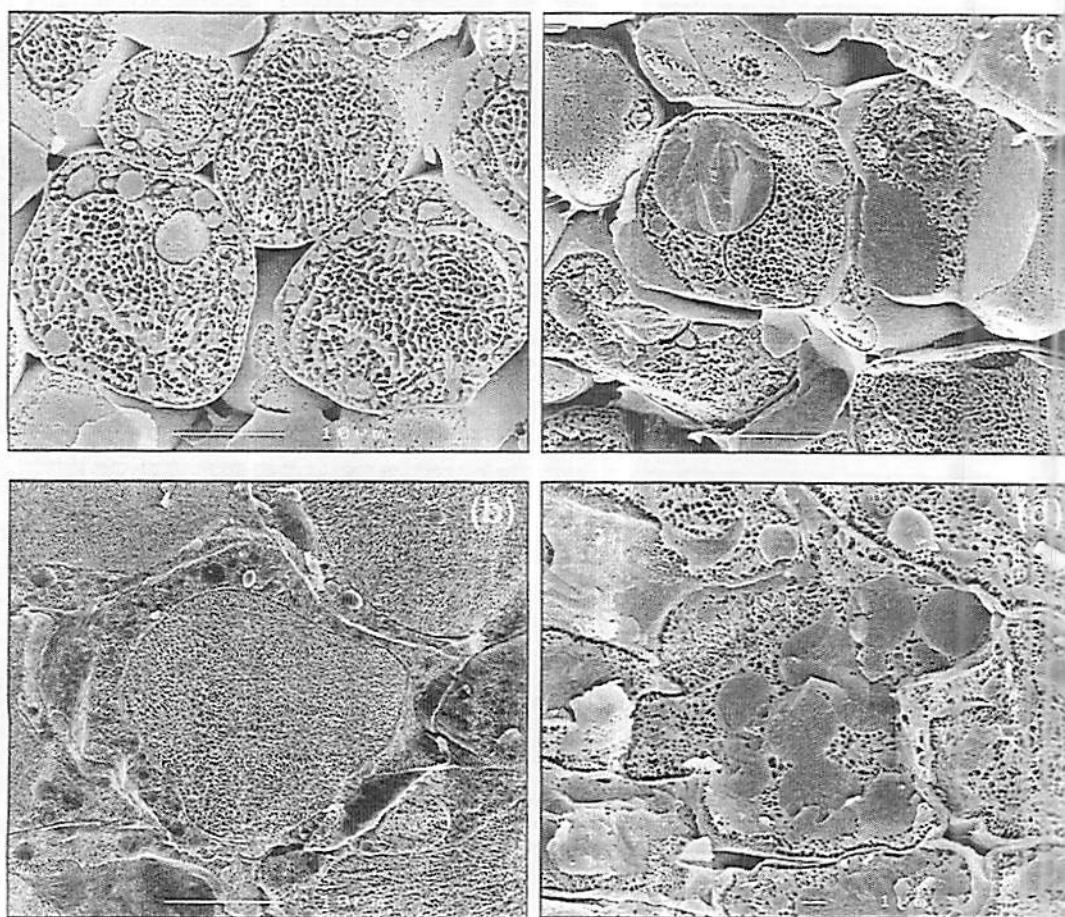


Figura 16. Micrografias LTSEM de organizações sub-celulares de embriões de *Coffea canephora* oriundos de sementes de frutos cerejas, não secadas (a) e secadas a 30 (b), 10 (c) e 8% (d) de graus de umidade. WUR, Wageningen - Holanda, 2000.

6 CONCLUSÕES

As sementes de cafeeiro da espécie *C. arabica* apresentam redução da percentagem de protrusão radicular e germinação quando submetidas à secagem a teores de água inferiores a 30%, independente do seu estágio de desenvolvimento. As sementes colhidas no estágio verde apresentam maiores perdas de germinabilidade, maior atividade enzimática (CAT e EST), menores teores de açúcares e danos ultraestruturais como: coalescência de corpos de lípidios e provável ruptura do sistema de membrana em relação às sementes colhidas nos estádos verde cana e cereja.

Sementes colhidas no estágio verde cana e cereja apresentam uma relativa tolerância à dessecação, mas não resistem à redução do seu teor de água para níveis mais baixos (10 e 8 %), apresentando comportamento intermediário. A tolerância à dessecação em sementes de *C. arabica* está em função do estágio de desenvolvimento das sementes, sendo que as sementes colhidas no estágio verde apresentam a maior sensibilidade à perda de seu teor de água.

Sementes de *C. canephora* apresentam-se intolerantes à dessecação.

Sementes de *C. canephora*, com o processo de secagem, perdem a viabilidade, apresentam maior atividade de CAT e EST, danos ultraestruturais e reduções de açúcares.

Para ambas as espécies de cafeeiro, após o armazenamento, as sementes secadas a 30% de umidade apresentam a maior germinação e vigor e reduzidos danos causados pela perda do teor de água das sementes evidenciados pela atividade das enzimas esterase e catalase e ausência de danos ultraestruturais.

Padrões eletroforéticos das enzimas esterase e catalase variam em função do estágio de desenvolvimento das sementes de cafeeiro e do nível de tolerância à dessecação.

Acréscimo no conteúdo de glicose e sacarose estão associados com proteção de sementes de cafeeiro contra danos de secagem e a aquisição da tolerância à dessecação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de Isoenzimas e Proteínas Afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- BACCHI, O. Estudos sobre a conservação de sementes de café. **Bragantia**, Campinas, v.17, n.20, p.261-270, Dez. 1958.
- BAILLY, C; BENAMAR, A.; COBINEAU, F.; CÔME, D. Changes in malondialdehyde content and in superoxide de dismutase, Catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.97, n.1, p.104-110, May 1996.
- BARFORD, N.M.; KROG, N.; BUCHHEIM, W. Lipid-protein-emulsifier-water interactions in whippable emulsions. In: KINSELLA, J.E.; SOUCIE, W.G. (eds.). **Food proteins.** Champaign: American Oil Chemist society, 1989, p.144-158.
- BLACKMAN, S.A.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing seeds. **Plant Physiology**, Rockville. v.100, n.1, p.225-230, Sept. 1992.
- BLACKMAN, S.A.; WETTLAUFRER, S.H.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, n.3, p.868-874, July 1991.
- BOWLER, C.; MONTAGU, M. van; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.43, p.83-116, 1992.
- BRANDÃO JUNIOR, D. da S.; CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.21, n.1, p.114-121, 1999.
- BRANDÃO JUNIOR D. da S.; VIEIRA, M.G.G.C.; HILHORST, H.; BERNARDINO FILHO., J.R. Aquisição da tolerância à dessecação nos diferentes estádios de maturação de sementes de cafeeiro. In: **III International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agroindustry.** Curitiba, PR . 1999. Anais...

- BRUNI, F. Cytoplasmic glass formation in plant seeds. In: CÔME, D.; CORBINEAU, F. (eds.). **Fourth International Workshop on Seeds: basic and Applied aspects of seed biology**. Angers, France: ASFIS, 1993. p.747-754.
- CHEN, Y.; BURRIS, J.S. Role of carbohydrates in desiccation tolerance and membrane behavior in maturing maiza seed. **Crop Science**, Madison, v.30, n.4, p.971-975, July/Aug. 1990.
- CLIFFORD, M.N. Chemical and physical aspects of green cofee and coffee products. In: CLIFFORD, M.N.; WILLSON, K. C. **Coffee, botany, biochemistry and production of beans and beverage**. London: Croombelm, 1985. p.305-359.
- COLACO, C.; SEN, S.; THANGAVELU, M; PINDER S.; ROSER, B. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. **Biotechnology**. v.10, p.1007-1010, 1990.
- COPELAND, LO.; MCDONALD, M.B. **Principles of seed science and technology**. 3. ed. Boston: KAP, 1995. 409p.
- COUTURON, E. Le maintien de la via bilité des graines de caféiers par le controle de leur teneur em eau et de la température de stockge. **Café Cacao Thé**, Paris, v.24, n.1, p.27-32, Jan./Mar. 1980.
- CREVECOEUR, M.; Deltour, R.; Bronchart, R. Cytological study on water stress during germination of *Zea mays*. **Planta**, Berlim, v.132, p.31-41, 1976.
- CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; RUDOLPH, A.S.; AURELL WISTROM, C.; SPARGO, B.J.; ANCHORDOGUY, T.J. Interactions of sugars with membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.947, p.367-384, 1988.
- CROWE, J.H.; OLIVER, A.E.; HOEKSTRA, F.A. CROWE, L.M. Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification. **Cryobiology**, v.35, p.20-30, 1997.
- DASGUPTA, J., BEWLEY, J.D. YEUNG, E.C. Desiccation-tolerant and desiccation-intolerant stages during the development and germination of *Phaseolus vulgaris* seeds. **Journal of Experimental Botany**, London, v.33, p.1045-1057, Oct. 1982.

- DE PAULA, M.; DARDER, M.; TORRES, M.; MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C.J. Electrical conductivity changes in deteriorated sunflower seeds. *Acta Horticulture*, Wageningen, v.362, p.273-279, 1994.
- DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) em diferentes embalagens. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.15, n.1/2, p.197-202, Jun./Dez. 1993.
- EIRA, M.T.S.; WALTERS, C.; CALDAS, L.; FAZUOLI, L.C.; SAMPAIO, J.B.; DIAS, M.C. Tolerância of *Coffea* spp. Seeds to Desiccation and jow temperature. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.11, n.2, p.97-105, 1999.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I: coffee. *Journal of Experimental Botany*, Oxfort, v.41, n.230, p.1167-1174, Sept. 1990.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? II: effects of provenance. *Journal of Experimental Botany*, Oxfort, v.42, n.238, p.653-657, May 1991.
- FINCH-SAVAGE, W.E.; GRANGE, R.I.; HENDRY, G.A.F.; ATHERTON, N.M. Embryo water status and loss of viability during desiccation in the recalcitrant seed species *Quercus robur* L. In: CÔME, D.; CORBINEAU, F. (eds.). **Fourth international workshop on seeds: Basic and applied aspects of seed biology**. Paris: ASFIS, 1993. p.723-730.
- FINCH-SAVAGE, W.E.; HENDRY, G.A.F.; ATHERTON, N.M. Free radical activity and loss of viability during drying of desiccation-sensitive tree seeds. **Proceeding of the Royal Society of Edimburgh**, Edimburgh, v.102B, p.257-260, 1994.
- FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. *Archeves Biochemic and Biophys*, Orlando, v.147, p.1-11, 1986.
- GRASES, F.; COSTA - BAUZÁ, A.; GARCIA - RASO, A.; MARCH, J.G. Kinetic - turbidimetric determination of stachyose based on its inhibitory action on sucrose crystallization. *Analytical Letters*, v.27, p.819-829, 1994.

- GUIMARÃES, R.M. **Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*, L.).** Lavras: UFLA, 2000. 180p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- HENDRY, G.A.F.; FINCH-SAVAGE, W.E.; THORPE, P.C.; ATHERTON N.M.; BUCKLAND, S.H.; NILSSON, K.A.; SEEL, W.E. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New phytologist**, London, v.122, n.2, p.273-279, Oct. 1992.
- HENDRY, G.A.F. Oxygen, free radical processes and seeds longevity. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 3, p. 141-153, Sept. 1993.
- HONG, T.D.; ELLIS, R.H. Interspecific variation in seed storage behaviour within two genera – *Coffea* and *Citrus*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.23, n. 1, p.165-181, 1995.
- HONG, T.D.; ELLIS, R.H. Optimum air-dry seed storage environments for arabica coffee. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.20, n.3, p.547-560, 1992.
- HORBOWICZ, M.; OBENDORF, R.L. Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence producing oligosaccharides and cyclitols - review and survey. **Seed Science Research**, Wallingford, v.4, p.385-405, 1994.
- HOTTIYER, T.; DE VIRGILIO, C.; HALL, M.N.; BOLLER T.; WIEMKEN, A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast: II physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *in vitro*. **European Journal of Biochemistry**, v.219, p.187-193, 1994.
- KERMODE, A.R. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, v.9, p.155-195, 1990.
- KING, M. W., and ROBERTS, E. H., **The storage of recalcitrant seeds: achievements and possible approaches.** Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1979.
- KOSTER, K.L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, n.1, p.302-304, May 1991.

- KOSTER, K; LEOPOLD, A.C. Sugar and Desiccation tolerance in Seeds. *Planta Physiology*, Rockville, v.88, p. 829-832, 1988.
- KRANNER, I.; GRILL, D. Significance of thiol-disulfide exchange in resting stages of plant development. *Botanica Acta*. v. 109, p. 8-14. 1996.
- LEOPOLD, A.C. Coping with desiccation. In: ALSCHER, R.G.; CUMMING, J.R. (eds.). **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York: Wiley-Liss, 1990. p.57-86.
- LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; HENDRY, G.A.F. The role of free radicals and radical processing systems in loss desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). *New Phytologist*, London, v.116, n.4, p.573-580, Dec. 1990.
- LEPRINCE, O.; AELST, A.C. van; PRITCHARD, H.W.; MURPHY, D.J. Oleosins prevent oil-body coalescence during seed imbibition as suggested by a low-temperature scanning electron microscope study of desiccation-tolerant and - sensitive oilseeds. *Planta*, Berlin, v.204, p.109-119, 1998.
- LEPRINCE, O. **Etude des mécanismes de la résistance à la déshydratation dans les embryos des plantes supérieures**. Liège: University of Liège, 1992. (PhD Thesis).
- LEPRINCE, O.; HENDRY, G.A.F.; MCKERSIE, B.D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research*, Wallingford, v.3, n.3, p.231-246, Sept. 1993.
- LEPRINCE, O.; VERTUCCI, C.W.; HENDRY, G.A.F.; ATHERTON, N.M. The expression of desiccation-induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperature, *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.94, n.2, p.233-240, 1995.
- LEPRINCE, O.; WERF, A. van der; DELTOUR, R.; LAMBERS, H. Respiratory pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.84, n.4, p.581-588, Apr. 1992.
- MAGUIRRE, J.D. Speed of germination: aid seedling emergence and vigor. *Crop Science*, Madison, v.2, p.176-177, Mar./Apr. 1962.

- MANGINO ME (1989) Molecular properties and functionality of proteins in food emulsions: liquid food systems. In Kinsella JE, Soucie WG (eds) Food Proteins. American Oil Chemist Society, Champaign, Ill, pp 159-177.
- OOMS, J.J.J.; WILMER, J.A.; KARSSSEN, C.M. Carbohydrates are not the sole factor determining desiccation tolerance in seeds of *arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.90, p.431-436, 1994.
- ORTHEN, B.; POPP, M.; SMIRNOFF, N. Hydroxyl radical scavenging properties of cyclitols. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B Biological Sciences**. Edimburgh, v.102B p.269-272, 1994.
- PRIESTLEY, D.A. **Seed Ageing: implications of seed storage and persistence in the soil**. Ithaca Cornell University Press, 1986.
- PROBERT, R.J.; LONGLEY, P.L. Recalcitrant seed storage physiology in three aquatic grasses (*Zizana palustris*, *Spartina angelica* and *Porteresia coarctata*). **Annals of Botany**, New York, v.63, p.53-63, Jan.1989.
- REDDY, L.S. Effect of different stages of maturity and posthrvest treatments on the seed viability of *Coffea arabica* L. **Journal of Coffea Research**, Karnataka, v.17, p.14-25, 1987.
- ROBERTS, E.H. Storage environment and the control of viability. In: ROBERTS, E.H. (ed.). **Viability of seeds**. London: Chapman and Hall Ltd. 1972. p.14-58.
- ROGERS, W.J.; MICHAUX, S.; BASTIN, M.; BUCHELI, P. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo- inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. **Plant Science**, v.149, p.115-123, 1999.
- SARGENT, J.A.; MANDI, S.S.; OSBORNE, D. The loss of desiccation tolerance during germination: na ultrastructural and biochemical approach. **Protoplasma**, Vienna, v.105, p.225-229, 1981.
- SMITH, M.T. ; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and sensitive seeds. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (eds.). **Seed development and germination**, New York: Marcel Dekker Inc, 1995.

- SUNG, J.M.; JENG, T.L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated ageing of peanut seed. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.91, p.51-55, 1994.
- SUN, W.Q.; IRVING, T.C.; LEOPOLD, A.C. The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.90, p.621-628, 1994.
- SUN, W.Q.; LEOPOLD, A.C. Glassy state and seeds storage stability: a viability equation analysis. **Annals of Botany**, New York, v.74, p.601-604, 1994.
- SUN, W.Q.; LEOPOLD, A.C. The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.94, p.94-104, 1995.
- VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (eds.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.237-271.
- WELLMAN, F.L.; TOOLE, V.K. Coffea seed gemination as affected by species, diseases and temperature: proceedings of the cari-bbean section, **American Society of Horticultural Sciences**, v.4, p.1-6, 1960.
- WILLIAMS, R.J.; LEOPOLD, A.C. The glassy state in corn embryos. **Plant Physiology**, Rockville, v.89, p.977-981, 1989.
- WILSON, D.O.; McDONALD, M.B. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.14, n.2, p.269-300, 1986.
- WOLKERS, W.F.; HOEKSTRA, F.A. Heat stability of proteins in desiccation-tolerant cattail (*Typha latifolia* L.) pollen: a fourier transform infrared spectroscopic study. **Company Biochemical Physiologic**, v.117, p.349-355, 1997

TABELA 1A. Resumo da análise de variância dos dados obtidos de protrusão radicular, germinação, percentagem de raízes secundárias, emergência e índice de velocidade de emergência de sementes de cafeeiro colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento, antes (controle) e após a secagem. UFLA, Lavras, MG, 2000.

CAUSAS DA VARIÇÃO	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS		
		Protrusão radicular (%)	Germinação (%)	Raízes Secundárias (%)
Maturação	2	571,25698**	776,72199**	2077,68383**
Secagem	1	223,23759**	98,41690*	922,08295**
Mat. X Sec.	2	103,34019**	199,81773**	153,38153**
Resíduo	18	17,30297	16,72626	9,43899
Média Geral		61,634	71,516	54,326
C V (%)		6,749	5,719	5,655

CAUSAS DA VARIÇÃO	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS	
		Emergência em câmara (%)	Velocidade de emergência (índice)
Maturação	2	2330,77164**	0,49393**
Secagem	1	34,32512	0,05217**
Mat. X Sec.	2	431,41111**	0,10869**
Resíduo	18	21,49867	0,00456
Média Geral		70,860	0,97596
C V (%)		6,543	6,917

* Significância ao nível de 5% de probabilidade.

** Significância ao nível de 1% de probabilidade.