



**MAYARA HOLANDA DE CARVALHO**

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DE  
SEMENTES DE *Coffea arabica* SUBMETIDAS À SECAGEM**

**LAVRAS - MG  
2017**

**MAYARA HOLANDA DE CARVALHO**

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DE SEMENTES DE *Coffea arabica*  
SUBMETIDAS À SECAGEM**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

Prof (a). Dr(a). Édila Vilela de Resende Von Pinho  
Orientadora

Dr(a). Heloisa Oliveira dos Santos  
Coorientador(a)

Dr(a). Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa  
Coorientador(a)

**LAVRAS - MG  
2017**

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

Carvalho, Mayara Holanda de.

Aspectos fisiológicos e moleculares de sementes de *Coffea arabica* submetidas à secagem / Mayara Holanda de Carvalho. -  
2017.

74 p. : il.

Orientador(a): Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Coorientador(a): Heloisa Oliveira dos Santos, Sttela Dellyzete  
Veiga Franco da Rosa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Tolerância à dessecação. 2. *Coffea arabica*. 3. Expressão  
gênica. I. Pinho, Édila Vilela de Resende Von. II. Santos, Heloisa  
Oliveira dos. III. Rosa, Sttela Dellyzete Veiga Franco da. IV.  
Título.

**MAYARA HOLANDA DE CARVALHO**

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DE SEMENTES DE *Coffea arabica*  
SUBMETIDAS À SECAGEM**

**PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR ASPECTS OF *Coffea arabica* SEEDS  
SUBMITTED TO DRYING**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2017.

Dr. Maria Laene Moreira de Carvalho

UFLA

Dr. Renato Mendes Guimarães

UFLA

Dr. Luciano Vilela Paiva

UFLA

Dr. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa

EMBRAPA

Prof (a). Dr(a). Édila Vilela de Resende Von Pinho  
Orientador(a)

Dr(a). Heloisa Oliveira dos Santos  
Coorientador(a)

Dr(a). Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa  
Coorientador(a)

**LAVRAS - MG  
2017**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal pela oportunidade concedida para realização do doutorado.

À CAPES pela concessão da bolsa.

À Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho pela orientação no desenvolvimento deste trabalho e às Dras. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa e Heloisa Oliveira dos Santos pela colaboração dispensada no decorrer da pesquisa.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular e ao Laboratório de Biotecnologia Florestal pela ajuda no desenvolvimento da tese.

À minha família, em especial meu irmão; Luiz Felipe e a meus pais, Francisco e Isabel, pela dedicação e amor. Aos meus eternos amores, Junior, Marline, Carolina, Érica e Cris por todo suporte, todo carinho, toda paciência e por serem meus irmãos de coração. À minha tia Marlene e à minha linda amiga, Maria da Glória, por me ajudarem a me reerguer. Sem vocês não seria possível alcançar essa nova etapa da minha vida!

Aos meus queridos amigos e companheiros do Laboratório de Biotecnologia Florestal e do Laboratório de Análises de Sementes por todos os momentos inesquecíveis e pela contribuição científica no desenvolvimento do trabalho.

As minhas lindas amigas do apartamento 112, as minhas companheiras de casa e a todos os amigos que esses cinco anos de UFLA me proporcionaram, agradeço pelos ensinamentos, conselhos, apoio e dedicação.

Estendo o meu agradecimento a todos aqueles que estiveram ao meu lado nessa longa, difícil e enaltecadora caminhada, os quais esse curto espaço não me permite citar.

## RESUMO

A baixa longevidade de sementes de café tem sido atribuída à sua sensibilidade à dessecação. Estudos relacionados à expressão gênica e atividade enzimática em sementes de café submetidas à secagem são importantes para o entendimento dos efeitos da secagem sobre a qualidade fisiológica destas sementes. Objetivou-se nessa pesquisa estudar os aspectos moleculares de sementes submetidas a diferentes métodos de secagem e associa-los à qualidade fisiológica. As sementes de café foram secadas de forma lenta e rápida com diferentes teores de água. Foram realizadas análises da atividade enzimática, bem como da expressão dos transcritos das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxirredoxinas, isocitrato liase e endo-beta-mananase. A velocidade de secagem e o teor final de água tiveram efeito significativo na qualidade fisiológica, na atividade enzimática, na expressão dos diferentes genes analisados e no perfil proteômico das sementes analisadas. Em sementes submetidas à secagem rápida houve maior expressão dos transcritos dos genes que codificam as enzimas catalase e endo- $\beta$ -mananase. Maior expressão dos genes *ICYS*, *PRX* e *SOD* e atividades das isoenzimas ICL e ACX foram verificadas em sementes com qualidade fisiológica superior. Por outro lado a maior atividade das enzimas endo- $\beta$ -mananase e CAT ocorreram em sementes com menor desempenho fisiológico. Em sementes de café secadas lentamente até 20 e 10% de teor de água houve maior porcentagem de spots de proteínas nos géis bidimensionais.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica*. Estresse oxidativo. Expressão gênica. Perfil enzimático. Tolerância à dessecação.

## ABSTRACT

The low longevity of coffee seeds has been attributed to their sensitivity to desiccation. Studies related to gene expression and enzymatic activity in coffee seeds submitted to drying are important for the understanding of drying effects on the physiological quality of these seeds. The objective of this research was to study the molecular aspects of seeds submitted to different drying methods and to associate them with the physiological quality. The coffee seeds were dried slowly and rapidly with different water contents. Analysis of the enzymatic activity, as well as the expression of the transcripts of superoxide dismutase enzymes, catalase, peroxiredoxins, isocitrate lyase and endo-beta-mannanase were performed. Drying speed and final water content had a significant effect on the physiological quality, enzymatic activity, expression of the different genes analyzed and on the proteomic profile of the analyzed seeds. In seeds submitted to rapid drying, there was a greater expression of the transcripts of the genes encoding the catalase enzymes and endo- $\beta$ -mannanase. Higher expression of the 1CYS PRX and SOD genes and activities of the ICL and ACX isoenzymes were verified in seeds with higher physiological quality. On the other hand, the greater activity of endo- $\beta$ -mannanase and CAT enzymes occurred in seeds with lower physiological performance. In coffee seeds slowly dried up to 20 and 10% of water content, there was a higher percentage of protein spots in two-dimensional gels.

**Keywords:** *Coffea arabica*. Oxidative stress. Gene expression. Enzymatic profile. Desiccation tolerance.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1	O Café.....	3
2.2	Tolerância à dessecação de sementes de café .....	3
2.2.1	Genes relacionados à qualidade fisiológica de sementes de café.....	6
2.3	Estresse oxidativo em sementes .....	10
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1	Local e materiais .....	16
3.2	Secagem das sementes.....	16
3.3	Determinação do teor de água .....	17
3.4	Análises fisiológicas.....	18
3.4.1	Teste de germinação .....	18
3.4.2	Plântulas normais fortes – 30 dias .....	18
3.4.3	Plântulas com folhas cotiledonares expandidas – 45 dias.....	18
3.4.4	Matéria seca de plântulas .....	18
3.4.5	Teste de tetrazólio .....	19
3.4.6	Índice de velocidade de emergência.....	19
3.5	Análises estatísticas .....	19
3.6	Proteômica.....	20
3.6.1	Análises das enzimas Superóxido Dismutase, Isocitrato-liase e Catalase .....	20
3.6.2	Análises da enzima Endo- $\beta$ -mananase .....	20
3.6.3	Análise de proteínas via Bidimensional – Peroxirredoxinas.....	21
3.7	Transcriptoma - Quantificação relativa da expressão dos genes.....	26
3.7.1	Extração de RNA e quantificação das alíquotas .....	26
3.7.2	Tratamento com DNase.....	26
3.7.3	Transcriptase reversa (RT) .....	26
3.7.4	Expressão dos genes por PCR em tempo real .....	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
4.1	Análises fisiológicas.....	29
4.2	Análises proteômicas e transcriptômicas .....	36
5	CONCLUSÕES .....	53
	REFERÊNCIAS .....	54
	APÊNDICE A .....	65
	APÊNDICE B.....	66

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de sementes de alta qualidade fisiológica é um dos principais fatores responsáveis pela obtenção de mudas de cafeeiro mais vigorosas em condições de campo, resultando em maior produtividade. Por meio de algumas pesquisas tem sido observado que os métodos de secagem e o teor de água destas sementes influenciam diretamente na obtenção de sementes com alta qualidade.

O domínio de técnicas de secagem de sementes visando à conservação com alta qualidade é de grande importância para a cafeicultura. Muitos trabalhos foram conduzidos com o objetivo de estabelecer tecnologias capazes de melhorar a qualidade das sementes e as condições para prolongar a manutenção da viabilidade, no entanto os resultados são ainda contrastantes, não havendo definição das condições ideais de secagem. Em diversos estudos tem sido demonstrado que a principal causa da rápida perda do poder germinativo é a sensibilidade destas sementes à dessecação e que essa perda de viabilidade durante a secagem é acompanhada por um aumento na peroxidação de lipídeos e acúmulo de radicais livres, dentre outros fatores.

Muitos mecanismos estão envolvidos na aquisição e manutenção da tolerância a dessecação, conferindo proteção contra as consequências da perda de água, em diferentes níveis de hidratação. Porém, nenhum mecanismo é por si só, responsável por essa tolerância; cada componente é igualmente crítico, atuando em sinergismo e controlado também em nível genético. A ausência ou inefetiva expressão de um ou mais destes mecanismos determinam o grau relativo de sensibilidade à dessecação. Diante desta complexidade de eventos, estudos das alterações em níveis bioquímicos, fisiológicos e de expressão gênica favorecem o entendimento dos efeitos da secagem sobre a qualidade fisiológica de sementes de café.

Análises de expressão gênica, atividade enzimática e identificação de proteínas relacionadas com os mecanismos de defesa antioxidantes, a exemplo das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxirredoxinas (PRX), bem como de enzimas relacionadas com a  $\beta$ -oxidação de lipídeos, acil coenzima A oxidase (ACX) e isocitrato liase (ICL), e deterioração de sementes (Endo- $\beta$ -mananase) são fundamentais para o entendimento dos efeitos da secagem sobre a qualidade fisiológica de sementes de café.

A pesquisa foi proposta a fim de estudar os aspectos moleculares de sementes submetidas a diferentes métodos de secagem e associa-los à qualidade fisiológica.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 O Café**

O café é um dos mais importantes produtos agrícolas comercializado no mundo e no Brasil, sendo o segundo item em importância do comércio internacional de commodities, perdendo apenas para o petróleo. O café arábica é produzido em mais de sessenta países e é classificado como um dos cinco produtos de exportação agrícola mais valorizado dos países em desenvolvimento (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2011).

Por ser o gênero *Coffea spp.* de grande interesse social e econômico, existe uma significativa valorização no agronegócio do café. Muitas pesquisas têm promovido o desenvolvimento de cultivares cafeeiras de alta qualidade, bem como novas tecnologias de mecanização, irrigação, armazenamento, correção de solo, rotação de culturas, adubação, produção e distribuição de sementes. Um exemplo dessas pesquisas é o Projeto Genoma Café, que tem como objetivo ampliar os conhecimentos moleculares relacionados com esta cultura, fornecendo subsídios para o estudo genético dessa espécie (VIEIRA, 2006).

Das 103 espécies de cafeeiros descritas até hoje (DAVIS, 2006), a espécie mais cultivada em todo mundo, *C. arabica*, é também a espécie mais estudada quando se diz respeito ao nível de sensibilidade a dessecação de suas sementes. De acordo com a maioria desses estudos sementes de *C. arabica* podem ser parcialmente desidratadas sem perda da viabilidade (ELLIS et al., 1991a; DUSSERT et al., 2001; DUSSERT et al., 2003; DUSSERT et al., 2006; DUSSERT et al., 2012). No entanto, o método de secagem empregado influencia na qualidade fisiológica destas sementes. Esta sensibilidade à dessecação pode comprometer à conservação das sementes de café, uma vez que um armazenamento eficiente requer baixos teores de água e baixas temperaturas.

### **2.2 Tolerância à dessecação de sementes de café**

Tolerância à dessecação (DT) pode ser definida como a capacidade de sobreviver, por cessamento reversível do metabolismo, a eliminação de quase toda água livre celular e

retomar o funcionamento metabólico normal, sem danos permanentes, após o processo de reidratação (PHILLIPS et al., 2002; OLIVER et al., 2000).

De acordo com a resposta a dessecação, as sementes podem ser divididas em dois grupos: ortodoxas e recalcitrantes. As sementes ortodoxas toleram a dessecação a conteúdos de água inferiores a 7%, com pouco efeito na viabilidade (ROBERT, 1973), enquanto as sementes recalcitrantes não toleram a dessecação a um conteúdo hídrico inferior a 20-30% (PRITCHARD et al., 2004). Vale salientar que, dentre os critérios para classificar as sementes como ortodoxas ou recalcitrantes está inclusa a longevidade destas no armazenamento, especialmente sob baixas temperaturas (BEWLEY and BLACK, 1994).

As sementes ortodoxas adquirem DT durante o seu desenvolvimento, como parte do processo de maturação (JIA et al., 2013; VERDIER et al., 2013). Esta é baseada em uma série de mecanismos de proteção, relativamente complexos, que acompanham a desidratação (ILLING et al., 2005), embora os modos de operação e a interação entre eles não estejam ainda bem elucidados (BERJAK, 2006). Em suma, estes mecanismos podem ser divididos em três grupos: 1) mecanismos de sinalização, regulação gênica e proteômica funcionais, 2) ajuste metabólico e sistemas antioxidantes, e 3) estabilidade macromolecular e mecânica (MOORE et al., 2009).

Muitos estudos têm relacionado o acúmulo de algumas substâncias durante a dessecação como determinantes da proteção da integridade celular, tais como a acumulação de proteínas LEA e desidrinas, açúcares não redutores, sacarose e a ampliação do sistema antioxidante (BUITINK and LEPRINCE, 2008, BERJAK, 2006, MOORE et al., 2009, BUITINK et al., 2006).

Sementes de *C. arabica* são classificadas como sementes intermediárias (ELLIS et al., 1991a), ou seja, são capazes de tolerarem níveis de dessecação consideravelmente mais baixos em comparação com sementes recalcitrantes, porém não toleram a perda de água extrema como as sementes ortodoxas.

A realização de pesquisas é importante para ampliar o conhecimento sobre os eventos metabólicos responsáveis pela tolerância/sensibilidade à dessecação de sementes de café, em função dos diferentes métodos de secagem e teores de água, uma vez que a biologia da dessecação destas sementes não é bem elucidada. Um melhor entendimento dos mecanismos que regem a tolerância/sensibilidade à dessecação é pré-requisito para o desenvolvimento de

técnicas que permitam a manipulação dessa característica em sementes. Métodos de secagem, assim como os teores de água das sementes podem influenciar na qualidade fisiológica e no potencial de armazenabilidade destas.

Um processo de secagem eficiente é aquele que, além de reduzir o teor de água do produto, aumenta seu potencial de conservação pós-colheita e preserva suas características físicas e propriedades tecnológicas, atribuindo-lhe valor comercial (REINATO, 2006; CORRÊA et al., 2002).

O processamento pós-colheita é sem dúvida uma operação de fundamental importância dentre as várias etapas de produção de sementes de café. A obtenção de sementes com elevada qualidade genética, física, fisiológica e sanitária é de extrema importância para implementação de uma lavoura com alta produtividade.

Diante disso, o aprimoramento da conservação de sementes de café tem sido o objetivo de várias pesquisas, sendo que nos resultados obtidos nestes estudos tem sido observada uma grande sensibilidade das sementes à desidratação, o que tem acarretado, na maioria dos casos, rápida perda de viabilidade (BACCHI, 1956; VIEIRA et al., 2007; COELHO et al., 2015).

Em revisão dos trabalhos desenvolvidos com tal finalidade pode-se perceber que os conhecimentos acumulados ainda não são conclusivos. Em alguns trabalhos tem sido observado que sementes de café toleram dessecação até 10% de umidade (menor grau de umidade de segurança), sem prejuízos à viabilidade; o grau crítico de umidade situou-se entre 5,6% e 10%, iniciando a redução da viabilidade; a dessecação até 4% de umidade (grau de umidade letal) reduz o poder germinativo das sementes à zero (BACCHI, 1955, 1956; ELLIS et al., 1991a, 1991b; HONG and ELLIS, 1992).

Bacchi (1956) relatou que sementes de café arábica suportam sem desvantagem alguma à sua vitalidade, um teor mínimo de água variando de 8 a 9%. Já Silva and Dias (1985) relataram que o intervalo entre 36% e 40% foi o mais favorável à manutenção da qualidade fisiológica de sementes de *C. arabica*. Em outros estudos foram observados resultados satisfatórios com graus de umidade de 35% (VASCONCELOS et al., 1992; BRACCINI et al., 1998).

Miglioranza (1982) observou que sementes de *C. arabica* com alto grau de umidade perderam a viabilidade após seis meses de armazenamento, e aquelas com grau de umidade

entre 8 e 10% apresentaram 90% de germinação no final de doze meses de armazenamento. Ellis et al. (1991a) obteve sobrevivência de sementes de *C. arabica* secadas até aproximadamente 10% de teor de água e armazenadas por 12 meses a 15°C. Vossen (1979), Miranda (1987), Hong e Ellis (1992) e Gentil (1999) também admitiram como vantajosos os graus de umidade entre 9% e 11%.

Vieira (2007) concluiu que a secagem rápida prejudica o vigor e a viabilidade das sementes de *C. arabica*, independentemente do local de armazenamento. Rosa (2005) estudou o efeito de três taxas de secagem (lenta, intermediária e rápida) e observou que todas as velocidades influenciaram negativamente na germinação e no vigor de sementes de *C. canephora*, entretanto, a maior redução na qualidade foi observada quando as sementes foram submetidas à secagem rápida. Neste estudo também foi concluído que a redução do teor de água das sementes resultou em redução nos valores de germinação e de vigor. Santos (2013) estudando o efeito da secagem e dos níveis de umidade em sementes de *C. arabica* observou maior vigor de plântulas oriundas de sementes com 30% de grau de umidade submetida à secagem lenta, e na secagem rápida até 20% de grau de umidade das sementes.

A definição do grau de umidade ideal de conservação, assim como a tecnologia de armazenagem adequada à manutenção dessa umidade, como demonstrado acima, tem constituído fonte de divergências entre as pesquisas até então realizadas. O entendimento da interferência das causas de variação é dificultado pelo excessivo número de fatores analisados em um mesmo experimento. Assim, estudar a expressão de genes relacionados à qualidade fisiológica de sementes de café, submetidas a condições específicas após a colheita, torna-se importante para a determinação de tecnologias pós-colheita.

### **2.2.1 Genes relacionados à qualidade fisiológica de sementes de café**

A maior parte dos trabalhos sobre expressão gênica em sementes e frutos de café se concentram em temas relacionados à qualidade da bebida (MARRACCINI et al., 2001; GEROMEL et al., 2006), desenvolvimento da semente e do grão (PEREIRA et al., 2005; SALMONA et al., 2008), maturação dos frutos (BUDZINSKI et al., 2011; SALMONA et al., 2008) e via biosintética da cafeína (PERROIS et al., 2015) e dos ácidos clorogênicos (ASHIHARA and CROZIER, 1999; MIZZUNO et al., 2003). No entanto, poucos estudos têm

sido desenvolvidos visando à identificação e caracterização funcional de genes relacionados à qualidade fisiológica e sensibilidade à dessecação durante o processo de secagem de sementes de café.

Na maioria das sementes a emergência da radícula caracteriza o término da germinação e marca o início do desenvolvimento da plântula (BEWLEY, 1997). A germinação mais lenta de sementes pode estar relacionada, entre outros fatores, com a composição química da parede celular dos tecidos destas sementes. Em algumas espécies, como *C. arabica*, *Phoenix dactylifera*, *Annona crassiflora* e *Arabidopsis thaliana*, o endosperma apresenta paredes celulares espessas, contendo hidratos de carbono insolúveis na forma de galactomananas, que agem como uma barreira física, restringindo o crescimento do embrião e dificultando a protrusão da radícula. No caso da germinação limitada pelo endosperma, a protrusão radicular nesse tecido é precedida pela hidrólise de galactomananas na região micropilar. Durante a germinação, as galactomananas são hidrolisadas pelas enzimas: endo- $\beta$ -1,4-mananase (EC 3.2.1.78),  $\beta$ -manosidase (EC 3.2.1.25) e  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.22).

A atividade da endo- $\beta$ -1,4-mananase é necessária no estágio inicial da germinação induzindo a degradação do endosperma e conseqüentemente conduzindo à protrusão da radícula (BEWLEY et. al., 2012; SILVA et. al., 2004). A atuação dessa enzima é regulada pela presença de fitormônios, como o ácido abscísico (ABA), o qual atua inibindo a ação da enzima e da giberilina. A atividade de  $\beta$ -galactosidase e da  $\beta$ -manosidase também foi detectada na “pré-emergência”, mas aparentemente são dependentes da atividade da endo- $\beta$ -1,4-mananase que libera oligomananos, substratos para essas enzimas (GROOT et al., 1988). A endo- $\beta$ -1,4-mananase é a principal enzima deste processo, atuando especificamente na hidrólise da ligação  $\beta^{(1\rightarrow4)}$  do galactomanano presente na parede celular. A síntese dessa enzima ocorre durante a germinação ou senescência da semente e está relacionada com a degradação das paredes celulares do endosperma, associada ao enfraquecimento do tecido e mobilização de reservas. No entanto, existe pouca informação sobre a atividade dessa enzima em relação ao mecanismo de germinação e sua regulação.

Em sementes de *Lycopersion esculentum* e de *Lactuca sativa*, a endo- $\beta$ -1,4-mananase têm sido apontada como elemento importante em eventos germinativos, antes da protrusão radicular, tendo em vista que em outras espécies esta está envolvida em eventos pós-

germinativos, exercendo função de mobilização de reservas em paredes celulares do endosperma, a exemplo das espécies *Lactuca sativa* e *Trigonella foenumgraecum* (DIRK et al., 1995).

Giorgini e Comoli (1996) observaram que durante a germinação de sementes de *Coffea arabica*, a enzima endo- $\beta$ -1,4-mananase não foi detectada no período de pré-emergência, porém no período subsequente à emergência e pós-emergência há uma alta atividade dessa enzima. Os autores concluíram que a atividade da endo- $\beta$ -1,4-mananase e, portanto, a mobilização de reservas para o crescimento da plântula, são fenômenos essencialmente pós-germinativos e podem estar sobre estrito controle do embrião.

A expressão do gene endo- $\beta$ -mananase foi avaliada por meio da técnica Northern blotting em grãos de *C. arabica*. Neste estudo foram identificados dois genes que codificam essa enzima (*ManA* e *ManB*), sendo que dentro do gene *ManB* foram encontradas oito isoformas (MARRACCINI et al, 2001). Os dois genes apresentam o mesmo padrão de expressão (temporal e espacial), porém há maior expressão de *ManA* exclusivamente no endosperma e embrião durante a germinação de sementes de café (MARRACCINI et al, 2001).

Estudando a regulação da germinação em sementes de café, Silva et al. (2004) identificaram quatro isoformas diferentes de endo- $\beta$ -1,4-mananase, por meio da técnica de focalização isoeletrica, sendo três destas expressas no endosperma cap e duas delas inibidas por ABA. Sugerindo que há isoformas que são controladas por ABA e isoformas que não são. As isoformas inibidas pelo ABA não parecem contribuir para o enfraquecimento do endosperma durante a primeira fase. Estes resultados sugerem que as diferentes isoformas de endo- $\beta$ -mananase podem ter funções distintas durante a germinação de café. Sementes de tomate também possuem diferentes isoformas desta enzima durante a germinação. Dois genes de tomateiro, que codificam a enzima endo- $\beta$ -mananase, foram clonados, dos quais um, *LeMan 2*, foi expresso especificamente no endosperma cap, antes da protrusão radicular, enquanto que o outro gene, *LeMan 1*, foi expresso no endosperma lateral, após a protrusão radicular (NONOGAKI et al., 2000).

Não está claro por que as plantas precisam de múltiplas formas de *Mans*, mas pode-se inferir que as isoenzimas evoluíram para manifestar atividades diferentes para os vários substratos de mananas existentes nas plantas (SILVA et al., 2004).

O endosperma, na maioria das sementes oleaginosas, é o tecido especializado na reserva de nutrientes e metabólitos, utilizado durante a germinação e desenvolvimento pós-germinativo da plântula (EASTMOND e GRAHAM, 2001). Neste tecido, os lipídios são a principal fonte energética das sementes, onde são armazenados durante a sua maturação (GRAHAM, 2008). Quando necessário são rapidamente convertidos a metabólitos solúveis, que podem ser transportados para a plântula e utilizados para o crescimento desta, permitindo que o sistema fotossintético se estabeleça antes do esgotamento das reservas (Quettier e Eastmond, 2009).

A mobilização dos óleos durante a germinação envolve uma regulação coordenada de uma complexa rede metabólica de genes, enzimas e proteínas associadas, integrada com vários outros aspectos do metabolismo celular (GRAHAM, 2008). Após a mobilização proveniente da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos, há a formação de moléculas de acetil-CoA, que são posteriormente metabolizadas via ciclo do glioxilato, situado no glioxissomo, formas especializadas dos peroxissomas em plantas, localizados em órgãos de armazenamento (GRAHAM, 2008; NELSON et. al, 2011). Este ciclo é mobilizado essencialmente durante o início da germinação até a protrusão radicular e estabelecimento do sistema fotossintético. Esse apresenta sua atividade mais evidente nos tecidos de reserva, não sendo ausente sua expressão relacionada a outras funções no vegetal (NELSON et. al., 2011).

A etapa inicial na conversão de lipídeos a carboidratos é a quebra dos triglicerídeos armazenados nos corpos lipídicos pela enzima lipase. A lipase hidrolisa triacilgliceróis a três moléculas de ácidos graxos e glicerol. Após a hidrólise dos triacilgliceróis, os ácidos graxos resultantes entram no glioxissomo, onde são catabolizados por  $\beta$ -oxidação por meio da enzima acil-CoA oxidase (ACX) para gerar acetil-CoA que é, eventualmente, convertido em açúcar pelo ciclo do glioxilato. A ACX é uma enzima que pertence à família das oxidoreductases. Esta catalisa a oxidação de acil-CoA com oxigênio molecular, produzindo trans-2,3-desidroacil-CoA e  $H_2O_2$ . Seis isoformas de ACX foram identificadas em *A. thaliana*, sendo que quatro destas já possuem os substratos específicos caracterizados bioquimicamente “*in vitro*” (KHAN et al., 2012). O gene ACX1 catalisa a oxidação de ácidos graxos de C6:0 à C20:0, tendo alta atividade em C12:0 à C16:0, enquanto que a ACX2 tem como substrato ácidos graxos de C14:0 a C20:0 (HOOKS et al., 1999). A ACX3 atua sobre

ácidos graxos de C8:0 à C14:0 (EASTMOND et al., 2000). Enquanto que ACX4 catalisa a oxidação de pequenas cadeias de ácidos graxos C4:0 à C6:0 (HAYASHI et al., 1999).

Isocitrato liase (ICL) e malato sintase (MLS), duas enzimas-chave no glioxissomos, funcionam exclusivamente no ciclo glioxilato. Devido serem exclusivas do ciclo do glioxilato, as enzimas MLS e ICL são comumente utilizadas como marcadores para a mensuração do fluxo nesta rota metabólica (GRAHAM, 2008). Em muitas sementes oleaginosas, existe uma forte correlação entre a quebra e mobilização dos lipídeos e a expressão da ICL e da MLS durante o crescimento pós-germinativo (EASTMOND et al., 2001).

Embora esta via aparentemente não seja um requerimento essencial a germinação e ao crescimento inicial (EASTMOND et al., 2000), a conversão líquida de lipídeos a carboidratos é extremamente necessária para o melhor desenvolvimento destas plântulas (GRAHAM, 2008), propiciando uma vantagem evolutiva e por consequência levando a uma maior taxa de sucesso reprodutivo.

### **2.3 Estresse oxidativo em sementes**

As sementes estão sujeitas a perda da qualidade fisiológica desde a maturidade até o instante da sua utilização na sementeira, devido a mudanças fisiológicas e bioquímicas (GARCIA et al., 2004). A deterioração é um processo que tem início desde a fertilização do óvulo e, envolve complexas alterações, interferindo no potencial fisiológico da semente. A velocidade com que isso ocorre é determinada principalmente pela interação entre o genótipo, o teor de água da semente e condições do ambiente (DELOUCHE, 2002).

Muitos desses processos deletérios são mediados por espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas em diferentes compartimentos celulares como consequência tanto do funcionamento defeituoso de vias metabólicas como dos processos fisiológicos normais (WANG et al., 2012).

A produção de EROs pode ocorrer durante a dessecação, germinação e envelhecimento de sementes, podendo ocasionar estresse oxidativo e dano celular, resultando em deterioração (WANG et al., 2012).

Essas espécies reativas são formas parcialmente reduzidas de oxigênio ( $O_2$ ). Entre estas moléculas, cabe destacar o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical ânion superóxido

( $O_2^-$ ) e o radical hidroxila ( $OH^-$ ). Ao contrário do oxigênio atmosférico, EROs são capazes de oxidar vários componentes celulares (VANDENABEELE, 2000), ocasionando dano oxidativo em biomoléculas, como o ácido desoxirribonucléico (DNA), carboidratos, lipídeos e proteínas (CORBINEAU, 2012). Estes danos podem resultar na peroxidação de lípidos da membrana, seguido da desintegração desta levando a morte celular (PUKACKA, 1989; HENDRY et al., 1992; LEPRINCE et al., 1999).

O ânion superóxido ( $O_2^-$ ) é uma molécula com um elétron desacoplado que pode reagir com outras moléculas para estabilizar sua energia (BAILLY, 2004). Esse radical é considerado uma espécie pouco reativa porque não se difunde por distâncias consideráveis a partir do seu sítio de produção, porém é possível a combinação com outras espécies, formando assim uma espécie mais reativa (FANG et al., 2002).

O oxigênio singlet ( $^1O_2$ ) é um importante reativo no estresse oxidativo, pelo fato de reagir em duplas ligações, como por exemplo, as ligações dos ácidos graxos poliinsaturados ou nas guaninas em bases de DNA e é formado pela oxidação de outros intermediários reativos de oxigênio (DIPLOCK et al., 1998).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é gerado pelas mesmas fontes que produzem o ânion superóxido. As enzimas peroxissomais associadas com o metabolismo de ácidos graxos e as enzimas citoplasmáticas responsáveis pela oxidação de metabólitos celulares, também são responsáveis pela sua formação. É considerado pouco reativo, pois não ataca diretamente os vários componentes celulares, mas pode atravessar facilmente as membranas biológicas e se difundir por distâncias consideráveis (THOMAS, 2003).

O radical hidroxil é considerado a espécie mais reativa de EROs, pois é capaz de reagir com várias biomoléculas produzindo derivados que não podem ser regenerados pelo metabolismo celular. A taxa de reação deste radical é controlada por difusão limitada e, portanto, a vida média deste é muito curta, reagindo no seu próprio sítio de formação (DIPLOCK et al., 1998; THOMAS, 2003).

Muitas fontes de EROs já foram identificadas em plantas e algumas estão envolvidas no metabolismo normal, como respiração e a fotossíntese. Outras estão envolvidas com os estresses bióticos e abióticos (AALEN et al., 1994).

Dentre os estresses abióticos destaca-se a desidratação. A dessecação diminui o sistema metabólico das sementes, culminando em uma maior geração de EROs (PARKHEY

et al., 2012), perda de vigor e viabilidade durante o armazenamento (BAILLY, 2004; YI LI et al., 2010).

Os mecanismos de controle das EROs têm sido estudados por meio de técnicas avançadas. Organismos aeróbicos possuem um sistema de defesa antioxidante que combate o estresse oxidativo produzido por EROs, o qual possui substâncias que mesmo presentes em baixas concentrações quando comparadas à do substrato oxidável, atrasam ou inibem a oxidação desse substrato de maneira eficaz, protegendo as células contra a ação dos oxidantes (HALLIWELL and GUTTERIDGE, 1989; SIES, 1993).

Em plantas existem três vias de limpeza das EROs, sendo elas o ciclo água-água, que ocorre nos cloroplastos, o ciclo ascorbato-glutationa que ocorre nos cloroplastos, no citosol, na mitocôndria, no apoplasto e nos peroxissomos e a ação da catalase nos peroxissomos (GOMES, 2006).

A eliminação das EROs é feita por meio de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (HORLIN, 2002). As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxirredoxina (PRX) fazem parte do sistema enzimático de defesa antioxidante em plantas (KAYIHAN et al., 2012; BHATT and TRIPATHI, 2011). Juntamente com os antioxidantes ácido ascórbico e glutatona essas enzimas constituem uma maquinaria eficiente na desintoxicação de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ .

O balanço entre SODs e as diferentes enzimas “scavengers” é considerado um determinante crucial na regulação de concentrações intracelulares de radicais superóxidos e peróxidos. A Superóxido dismutase é a primeira enzima de defesa contra danos provocados por EROs, elas estão responsáveis pela dismutação de radicais livres ( $O_2^-$ ) produzidos em diferentes locais na célula, para oxigênio molecular ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Esta enzima é uma metaloproteína que apresenta três formas distintas, classificadas pelo seu co-fator: SOD-ferro (FeSOD) (cloroplasto), SOD-manganês (MnSOD) (mitocôndria e peroxissomo) e SOD-cobre e zinco (Cu-ZnSOD) (cloroplasto e citosol) (ALSCHER et al., 2002; BOWLER et al., 1992; SCANDALIOS, 2005).

A enzima CAT possui a função de eliminar o  $H_2O_2$  produzido na fotorrespiração e na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. Possui como sítio ativo um grupo heme ( $Fe^{+2}$ ) que catalisa a reação onde o peróxido de hidrogênio é detoxificado sendo convertido em  $H_2O$  e  $O_2$  (MITTLER, 2002). Em plantas, esta enzima apresenta três isoformas, presentes nos

peroxissomas e glioxissomas. CAT1 é responsável pela remoção do  $H_2O_2$  produzido durante a fotorrespiração em tecidos fotossintéticos; CAT2 são produzidas em tecidos vasculares e podem exercer uma função de lignificação, mas sua exata função biológica permanece desconhecida; e CAT3 está presente em sementes e plantas jovens, cuja atividade está relacionada à remoção do  $H_2O_2$  produzido durante a degradação dos ácidos graxos no glioxissoma (BREUSEGEM et al., 2001).

As peroxirredoxinas constituem uma família de tiol-proteínas, que reduzem peróxido de hidrogênio, peróxidos orgânicos e peroxinitrito a água, álcool e nitrito, respectivamente, utilizando equivalentes redutores fornecidos pela tiorredoxina, tiorredoxina redutase e NADPH. As peroxirredoxinas são enzimas abundantes e foram identificadas em diversas espécies de animais, plantas e bactérias, porém seu papel fisiológico ainda é discutido (BHATT and TRIPATHI, 2011).

Apesar do conhecimento detalhado de várias enzimas antioxidantes como catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e superóxido dismutase, a rede completa de enzimas antioxidantes ainda não é totalmente compreendida (BAIER and DIETZ, 1999; DIETZ et al., 2002).

As peroxirredoxinas são codificadas por vários genes, possuindo uma grande diversidade nas sequências de aminoácidos, mas com estrutura conservada. Prxs apresentam atividade peroxidásica centrada em um resíduo de cisteína, altamente reativo, denominado cisteína peroxidásica (RHEE et al., 2005; TRUJILLO et al., 2007). São caracterizadas por não possuírem nenhum grupo prostético como heme e pela necessidade de um doador externo de elétrons, que geralmente são as tiorredoxinas (Trx) (KANG et al., 1998; RHEE et al., 2005), mas em alguns casos pode ser a glutarredoxina (Grx) (ROUHIER et al., 2001; ROUHIER et al., 2002) ou a glutathione (HOFMANN, 2002; DIETZ, 2003) ou ainda a ciclofilina (DIETZ et al., 2006).

As peroxirredoxinas são divididas em quatro subclasses, sendo elas 1-Cys Prx, 2-Cys Prx, PrxII e PrxQ. Recentemente um homólogo em animais, dependente de selênio, tem sido observado em plantas e designada para ser a 5<sup>o</sup> subclasse de Prx (BHATT, 2011).

De acordo com o mecanismo de catálise envolvido, Prxs podem ser divididas em três diferentes grupos. A característica comum entre estes grupos é a existência de uma cisteína na região N-terminal que está diretamente envolvida na redução de hidroperóxidos, sendo por

isso denominada cisteína peroxidásica (Cys-S<sub>p</sub>). A oxidação da sulfidril da Cys-S<sub>p</sub> gera um ácido sulfênico (Cys-S<sub>p</sub>OH), com a liberação do álcool correspondente ao hidroperóxido reduzido, ou água no caso de peróxido de hidrogênio. O mecanismo de redução do ácido sulfênico nas diferentes subclasses de peroxirredoxinas é distinto. Nas subclasses que apresentam duas cisteínas conservadas um segundo resíduo chamado cisteína resolução (Cys-S<sub>r</sub>), se condensa com o ácido sulfênico para formar uma ligação dissulfeto (intermolecular ou intramolecular) com a Cys-S<sub>p</sub>. Esse dissulfeto é reduzido pelo sistema tiorredoxina (RHEE et al., 2001). Em contraste, para 1-Cys Prx, o ácido sulfênico é diretamente reduzido por um agente redutor. Tiorredoxina, glutathiona e ascorbato têm sido propostos como possíveis redutores biológicos (RHEE et al., 2005; NETTO et al., 2007; MONTEIRO et al., 2007).

A primeira Prx caracterizada em plantas foi PER1, uma 1-Cys Prx específica de sementes que se localiza no núcleo das células do embrião e na capa de aleurona de sementes de cevada (STACY et al., 1996; STACY et al., 1999). Em plantas, a 1-Cys Prx é codificada por gene de cópia única em dicotiledôneas e monocotiledôneas, com exceção do arroz que até o momento é o único caso conhecido com dois genes para esta enzima, estando os genes arranjados *in tandem* (PULIDO et al., 2009). Estas proteínas costumam apresentar 216 a 220 aminoácidos, massa molecular de aproximadamente 24 kDa e um ponto isoelétrico ao redor de 6,0 (STACY et al., 1999). Na região C-terminal são encontrados vários resíduos conservados correspondentes a um sinal de localização nuclear (BHATT, 2011).

O gene da 1-Cys Prx é expresso somente em sementes e pertence a uma família monogênica (STACY et al., 1996; HASLEKAS et al., 1998), tendo sua expressão regulada espacial e temporalmente. Sugere-se que essas Prxs possuem um papel no controle da dormência das sementes, uma vez que os transcritos aumentam exclusivamente na camada de aleurona e nos embriões embebidos das sementes dormentes (STACY et al., 1996).

A dessecação e a embebição estão relacionados com a formação de EROs. Existe uma hipótese que 1-Cys Prx protege os tecidos que sobrevivem depois da dessecação por apresentarem atividade peroxidásica *in vitro* (HASLEKAS et al., 1998).

Plantas transgênicas de tabaco (LEE et al., 2000) e de *Arabidopsis* (HASLEKAS et al., 2003) superexpressando 1-Cys Prx de arroz e cevada, respectivamente, foram geradas para investigar a função desta enzima. A germinação de sementes transgênicas de tabaco foi similar às plantas selvagens, porém as linhagens transgênicas apresentaram uma resistência

maior ao estresse oxidativo, sugerindo que a proteção contra agentes oxidantes é função essencial da enzima 1-Cys Prx (LEE et al., 2000). Também foram obtidas plantas transgênicas de *Arabidopsis* com níveis reduzidos de 1-Cys Prx. Essas plantas não apresentaram nenhuma diferença tanto no desenvolvimento quanto na germinação das sementes quando comparadas com as linhagens não transgênicas. Já nas linhagens de *Arabidopsis* que superexpressavam 1-Cys Prx foi observada uma germinação mais lenta na presença de agentes estressantes do que nas plantas selvagens, sugerindo que 1-Cys Prx desempenha um papel importante no processo de embebição da germinação em condições desfavoráveis.

Segundo Haslekas et al. (2003), o nível de expressão de 1-Cys Prxs aumenta significativamente durante o desenvolvimento tardio das sementes, sendo mantido durante o armazenamento, impedindo que as sementes germinem em condições adversas e que suportem estas condições quando estão germinando.

Estudos relacionados a esta subclasse de peroxirredoxina em sementes de café são escassos e por isso devem ser realizados, principalmente em função da sensibilidade de sementes desta espécie à dessecação.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local e materiais

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras, na cidade de Lavras. Foram utilizadas sementes de *C. arabica* da cultivar Catuaí Amarelo. Os frutos no estágio de maturação cereja foram seletivamente colhidos nos ramos médios das plantas e nas partes medianas dos ramos. Estes foram colhidos em lavoura da Fundação Procafé, em Varginha-MG, localizada a aproximadamente 110 Km de Lavras. Varginha apresenta como características geográficas uma altitude de 980 m, sendo o clima classificado como Tropical de altitude Cwb. Após a colheita os frutos foram novamente selecionados para uniformização do estágio de maturação, descascados mecanicamente e as sementes desmuciladas por fermentação em água e pré-secadas à sombra para a retirada da água superficial.

#### 3.2 Secagem das sementes

As sementes de café foram secadas em ambientes com temperatura e umidades relativas controladas até atingirem diferentes teores de água. Foram realizados dois tipos de secagem, rápida e lenta, utilizando-se caixas de acrílico do tipo gerbox, devidamente lacradas.

Para a secagem rápida as sementes foram acondicionadas em recipiente hermético, contendo 80 gramas de sílica gel ativada. Na secagem lenta foram usadas soluções salinas saturadas capazes de manter a umidade relativa interna estável. Para isso utilizou-se cloreto de lítio a 5%, sendo que após 105 horas, e consequente estabilização do teor de água, a mesma foi trocada pelo cloreto de magnésio. Os recipientes foram acondicionados em câmaras do tipo B.O.D, sob temperatura de 25°C (TABELA 1).

**Tabela 1** - Soluções salinas utilizadas na secagem lenta de sementes de *Coffea arabica* L.

Sal para Solução salina	Concentração	Umidade relativa de equilíbrio a 25°C
LiCl	50g/1000 mL H <sub>2</sub> O	95%
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	Solução saturada	35%

Fonte: Do autor (2017).

Os recipientes contendo as soluções salinas, a sílica gel e as sementes foram mantidos em câmaras do tipo B.O.D., sob temperatura constante de 25°C. A perda de água durante a secagem foi monitorada por pesagens contínuas em balança de precisão de 0,001 g e determinação do teor de água pelo método de estufa, até que as sementes atingissem os teores de água de interesse (30, 20, 10 e 5%). O teor de água inicial das sementes era de 38%. Estas atingiram 5% de teor de água depois de aproximadamente 100 horas de secagem rápida. Já na secagem lenta, o mesmo teor de água (5%) foi obtido após, aproximadamente, o dobro deste tempo (190 horas).

O cálculo da perda de peso foi realizado por meio da equação descrita por Cromarty et al. (1985):

$$M_f = M_i (100 - U_i) / (100 - U_f) \quad (1)$$

Onde:

$M_f$  = Massa da amostra(g) após a secagem;

$M_i$  = Massa da amostra (g) antes da secagem;

$U_i$  = Grau de umidade (%) antes da secagem;

$U_f$  = Grau de umidade (%) desejado após a secagem.

Os tratamentos utilizados para as análises moleculares e fisiológicas foram: sementes não submetidas à secagem com 38% de teor de água (Controle), sementes submetidas à secagem rápida com 30, 20, 10 e 5% de teor de água e sementes secadas lentamente com 30, 20, 10 e 5% de teor de água.

### **3.3 Determinação do teor de água**

A determinação do teor de água foi realizada pelo método de estufa a 105°C, durante 24 horas, utilizando duas amostras de 10 sementes por repetição. Os resultados foram expressos em porcentagens com base no peso úmido das sementes, de acordo com as Regras para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009).

### **3.4 Análises fisiológicas**

Para avaliar a qualidade fisiológica das sementes, foram realizados os testes de germinação, porcentagem de plântulas normais fortes, de folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias, matéria seca de plântulas, viabilidade pelo teste de tetrazólio e índice de velocidade de emergência de plântulas.

#### **3.4.1 Teste de germinação**

Foi realizado com quatro repetições de 25 sementes sem o pergaminho. As sementes foram colocadas para germinar em folhas de papel do tipo germitest, umedecidas com água em quantidade igual a 2,5 vezes o peso do papel seco. As sementes foram mantidas em germinador, regulado à temperatura de 30°C e a porcentagem de plântulas normais foi avaliada após 30 dias, segundo as prescrições da RAS (BRASIL, 2009).

#### **3.4.2 Plântulas normais fortes – 30 dias**

No teste de germinação, foi também avaliada a porcentagem de plântulas normais fortes, de acordo com o comprimento do eixo hipocótilo. Foram consideradas como normais fortes as plântulas com eixo hipocótilo de comprimento igual ou superior a três centímetros.

#### **3.4.3 Plântulas com folhas cotiledonares expandidas – 45 dias**

Aos 45 dias do início do teste de germinação, foram computadas as plântulas que apresentaram as folhas cotiledonares totalmente expandidas (estádio orelha de onça) e os resultados foram expressos em porcentagem.

#### **3.4.4 Matéria seca de plântulas**

Aos 45 dias do início do teste de germinação, os eixos hipocótilo-radículas das plântulas normais foram isolados, acondicionados em sacos de papel e colocados em estufa de

circulação de ar a 60°C, até cinco dias, ou até massa constante. Após esse período foi determinada a matéria seca de raízes e de partes aéreas das plântulas, e os resultados foram expressos em miligramas por plântula.

#### **3.4.5 Teste de tetrazólio**

Foi realizado com quatro repetições de 25 sementes sem pergaminhos. As sementes foram colocadas em recipiente contendo água destilada para embebição por período de 48 horas, a 30°C (CLEMENTE et al., 2011). Após esse período, o embrião foi removido. Estes foram mergulhados em solução de tetrazólio a 0,5%, na ausência de luz, por período de 3 horas, a 30°C, para coloração. Após a avaliação da viabilidade, os resultados foram expressos em porcentagem de embriões viáveis (BRASIL, 2009).

#### **3.4.6 Índice de velocidade de emergência**

Foi realizado com quatro repetições de 25 sementes sem pergaminhos. As sementes foram semeadas em substrato de areia e solo na proporção volumétrica de 2:1. As bandejas com as sementes foram mantidas em câmara de crescimento, regulada à temperatura de 30°C. Foram realizadas leituras diárias da emergência sendo consideradas como emersas as plântulas que apresentaram o endosperma totalmente exposto. O cálculo foi realizado como descrito por Maguirre, (1962).

### **3.5 Análises estatísticas**

Para a análise dos resultados das avaliações da qualidade fisiológica foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial [(2x4) + controle] sendo, dois métodos de secagem (lenta e rápida), quatro teores de água (30%, 20% , 10% e 5%) e o controle (Adicional) com 38% de teor de água. Utilizou-se o *software Assistat* Versão 7.7 Beta (FERREIRA, 2003) e as médias foram comparadas pelo teste de *Tukey*, a 1% de probabilidade. Por meio do mesmo *software*, utilizou-se o teste de *Dunnent* para a comparação da interação das médias entre cada fator com a média das testemunhas a 5% de probabilidade.

## **3.6 Proteômica**

### **3.6.1 Análises das enzimas Superóxido Dismutase, Isocitrato-liase e Catalase**

Para estas análises foi utilizada a técnica de eletroforese. Amostras de 50 sementes de café de cada tratamento, foram maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em “deep freezer” à -85°C. A extração da fração protéica foi efetuada, adicionando, a 100 mg do macerado de sementes, 200µl do tampão de extração pH 8,0 (0,2M Tris, 0,1% βmercaptoetanol, 0,4% PVP, 0,4% PEG, 1mM EDTA). O homogeneizado foi incubado em gelo por 1h e, posteriormente, centrifugado a 16000xg a 4°C por 60 minutos. Foram aplicados 40µl do sobrenadante de cada tratamento em géis de poliacrilamida a 4,5% (gel concentrador) e 7,5% (gel separador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi tris-glicina pH 8,9. A eletroforese foi realizada a 150V durante 6 horas e os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos: Superóxido Dismutase, Isocitrato-liase e Catalase conforme metodologia descrita por Alfenas (2006).

### **3.6.2 Análises da enzima Endo-β-mananase**

Foram utilizados 300 µL do tampão de extração (0,1 M HEPES; 0,5 M de NaCl pH 8,0; ácido ascórbico na proporção de 5 mg do ácido para cada mL de tampão) em cada microtubo com 100 mg do macerado de cada amostra. Em seguida, os microtubos contendo as amostras foram agitados em agitador tipo vortex por 1 minuto e centrifugados, a 14.000 rpm por 30 min. a 4 °C. O sobrenadante foi aplicado em gel contendo 6 mL de locust bean gum, ou LBG (Sigma), 0,24 g de agarose (Qbiogene) e 24 mL de tampão pH 5,0 (11 mL de ácido cítrico 1M, 50 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 149 mL de água destilada). As alíquotas foram aplicadas em furos de 2 mm feitos no gel com auxílio de um furador. O gel foi incubado por 21h e revelado segundo metodologia proposta de Silva et al. (2004). A atividade da enzima endo-β-mananase foi calculada de acordo com Downie (1994).

### **3.6.3 Análise de proteínas via Bidimensional – Peroxirredoxinas**

#### **3.6.3.1 Extração de proteínas totais**

Foram utilizadas 10 sementes de café de cada tratamento, maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em “deep freezer” à -85°C. Para cada amostra foram realizadas três repetições biológicas. A extração da fração proteica foi efetuada, adicionando, a 100 mg do macerado de cada tratamento, 660µL do tampão de extração (Trizma HCl: 0,018M, Trizma base: 0,014M, Triton X-100: 0,2%, Thiouréia: 2M, CHAPS: 0,06M, DTT: 0,0175M, Uréia: 45g), 1µL de inibidor de protease, 6 µL de DNase a 1mg/mL e 20 µL de RNase a 1mg/mL. A mistura foi homogeneizada em agitador do tipo vortex e armazenada por 15 minutos no gelo. Após homogeneização, a amostra foi centrifugada por 10 min. a 14000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e uma nova centrifugação (10 min. a 14000 rpm a 4°C) foi realizada. O sobrenadante foi alíquotado em novos tubos.

#### **3.6.3.2 Determinação da concentração de proteínas totais**

Alíquotas foram retiradas dos extratos de cada tratamento e a determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina bovina (BSA) como padrão. Utilizou-se um espectrofotômetro com leitura a 595 nm, onde primeiramente foi realizada a calibração do aparelho utilizando BSA como padrão em diluições para construção de uma curva de calibração. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 3 min a 14000 rpm a 4°C e foram pipetados 5 µL em cada lacuna da placa, adicionando-se 250 µL do reagente de Bradford e fazendo-se a leitura com o aparelho. Tanto para a curva de calibração como para a leitura das amostras foram utilizadas triplicatas técnicas. Por meio da equação gerada na calibração ( $R^2 = 0,99$ ) pôde-se obter a concentração de proteínas totais em cada tratamento.

### 3.6.3.3 Focalização isoeétrica (1ª dimensão)

As proteínas foram separadas por Focalização Isoelétrica (IEF) usando gel em fita de 7 cm de comprimento com pH imobilizado entre 4 e 7 (Immobiline Drystrips – Amersham Biosciences). As fitas para IEF foram reidratadas no suporte de reidratação individual em canaletas (Reswelling Tray – 30 Amersham Bioscience) por 13 horas em sala climatizada à 20°C, em tampão de reidratação composto por tiuréia/uréia, contendo uréia 8M, tiuréia 2M, 0,2% (v/v) de IPG Buffer (Amersham Bioscience), 2% CHAPS (p/v), DDT (100mM) e 0,01% de azul de bromofenol. O volume final de 125 µL de tampão contendo 250 µg de proteína foi aplicado nas canaletas e após reidratação por 13 horas, as fitas foram levadas ao focalizador isoeétrico Ettan IPGphor3 (GE Healthcare), posicionadas nas canaletas e imersas em óleo mineral para eletroforese (Amersham Biosciences).

A Focalização Isoelétrica foi realizada em cinco fases: a 250V por 1 hora, 250V por 1 hora (linear), 500V por 1 hora (linear), 1000V por 1 hora (linear), 4000V por 1 hora (linear), 4000V (rapid) até alcançar 20000V. Ao final da Focalização Isoelétrica, as fitas foram armazenadas em tubos a -80°C até o início da eletroforese na segunda dimensão. Imediatamente antes da eletroforese na segunda dimensão, as fitas foram equilibradas em duas etapas em solução contendo uréia 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), trizma base 75 mM em pH 8,8. Na primeira etapa as fitas foram colocadas em tubos contendo 2,5 mL da solução de equilíbrio acrescida de 0,025g de DTT e mantidas em agitador oscilante por 15 minutos. Na segunda etapa as fitas foram colocadas em tubo contendo solução de equilíbrio acrescida de 0,0625g de iodoacetamida e mantidas em agitador oscilante por 15 minutos.

### 3.6.3.4 SDS-PAGE (2ª dimensão)

As fitas de gel equilibradas foram colocadas no topo de um gel de poliacrilamida vertical de 12% (v/v) de solução acrilamida/bisacrilamida, 0,3M de Trizma-base pH 8,8, 0,08% (v/v) de persulfato de amônio e 0,04% (v/v) TEMED. As tiras de gel foram seladas com agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (p/v) contendo 0,1% (p/v) de SDS, Trizma base 25 mM, glicina 192 mM e traços de azul de bromofenol. Os géis permaneceram em

repouso por 5 minutos para a solidificação da agarose. A eletroforese foi realizada a 20°C em tampão contendo 0,1% (p/v) de SDS, glicina 192 mM e trizma-base 25 mM, por 20 minutos inicialmente a 15 mA (por gel) e 80V e posteriormente por 3 horas a 25mA (por gel) e 250V, numa cuba SE600 (Hoefer). Para cada tratamento foram corridos três géis carregados com proteínas de extrações independentes.

### **3.6.3.5 Coloração dos géis**

Os géis foram inicialmente colocados por 72 horas na solução de coloração contendo 1,2% (p/v) de Commassie Brilliant Blue G-250, 40% (v/v) metanol, 10% (v/v) de sulfato ácido acético glacial. Ao fim desse período, os géis foram lavados por pelo menos 3 vezes em solução de descoloração (solução de coloração sem o Commassie Brilliant Blue G-250). Posteriormente, foram deixados em água destilada por mais 72 horas. Por fim, os géis foram armazenados em solução contendo 5% (v/v) de ácido acético e mantidos em câmara fria à 5°C, até que suas imagens fossem digitalizadas e os spots excisados.

### **3.6.3.6 Captura das imagens e análise dos géis bidimensionais**

Os géis bidimensionais foram digitalizados utilizando scanner de alta resolução FLA 3000 (FujiFilm), equipado com o programa Image Reader v. 1.8; 532nm e filtro O580. As imagens foram analisadas no programa Image Master 2D Platinum 7.0 (Amersham Bioscience). Os géis foram alinhados e agrupados por tratamento e os pontos de proteínas comparados em função da média do seu volume normalizado (%Vol) entre as repetições. Após esse procedimento, os grupos foram comparados por análise de variância (ANOVA) gerada pelo próprio programa. Pontos de proteína com um resultado significativo na ANOVA ( $p < 0,05$ ) foram considerados como diferencialmente expressos.

### **3.6.3.7 Excisão dos spots**

A análise de proteínas via gel 2D foi realizada com o objetivo de identificar e quantificar a peroxirredoxina *I Cys Prx*. Na literatura pesquisada, observou-se que essa proteína apresenta um padrão quanto à massa molecular (24 kDa). Diante disso, todos os

spots encontrados na faixa entre 23 e 25 KDa foram retirados dos géis com o auxílio de um bisturi, transferidos para tubos eppendorf e levados ao Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da UFLA para a obtenção de peptídeos tripsinolisados, realização da espectrometria de massas e posterior identificação das proteínas.

### **3.6.3.8 Obtenção dos peptídeos tripsinolisados**

Os spots submetidos à espectrometria de massas foram desidratados com acetonitrila 100%, secados em speed vac e, posteriormente, tratados com a enzima tripsina (Promega®), a 58°C, por 30 minutos. Os peptídeos resultantes da tripsinólise da amostra foram ressuspensos em solução contendo acetonitrila 5% com ácido fórmico 0,1% e, posteriormente, analisados por espectrometria de massa.

### **3.6.3.9 Espectrometria de massas**

Foi utilizado um espectrômetro de massa (microTOF Q-II, Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha), equipado com uma interface de ionização por eletrospray, e acoplado a um sistema UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) composto por duas bombas, (LC-20AD) e um degaseificador (DGU-20A3). As injeções foram realizadas por um injetor automático (SIL-20A HT) equipado com um loop de 100 µL, dos quais foram injetados apenas 40 µL. O sistema foi operado por meio do software Hystar (Bruker Daltonik, v. 3.2.44.0). Uma pré-coluna de 5 mm e uma coluna analítica de 150 mm×75 µm preenchida com fase estacionária C18, 2.7 µm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, Estados Unidos) foi utilizada para a separação dos peptídeos. As amostras foram injetadas através de um fluxo de 200 µL.min<sup>-1</sup> em uma solução a 5% (v/v) acetonitrila e 0.1% (v/v) AF em água (Fluka, Buchs, Suíça). A fase móvel (A) utilizada para separação foi um gradiente entre água, contendo 0.1% (v/v) AF LC-MS Chromasolv-Fluka e acetonitrila contendo 0.1% (v/v) AF LC-MS Chromasolv-Fluka (B). O programa utilizado para a eluição foi composto pelas seguintes proporções: 0-5 min isocrático 5% B; 5 – 60 min gradiente linear até 40% B; 60 –70 gradiente linear até 50 % B; 70 – 75 gradiente linear até 90% B; 75–80 min isocrático 90% B; 80 – 80.1 min alteração para 5% B; 80.1 – 90 min isocrático 5% B. O fluxo para separação dos peptídeos foi

de 200  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . As configurações utilizadas na espectrometria de massa foram: intervalo de massa: 50 – 2500 m/z; voltagem do spray: 2000 V; gás de secagem ( $\text{N}_2$ ) temperatura: 180°C; fluxo: 9  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ; funnel 1 RF 300.0 Vpp; funnel 2 RF 400.0 Vpp; Hexapolo RF 400.0 Vpp; energia do quadrupolo 5.0 eV; menor massa do quadrupolo 322.00 m/z; energia de colisão 10.0 eV; RF da colisão 800.0 Vpp; tempo de transferência 150 us; armazenamento pré-pulso 5.0 us. As configurações para o MS/MS foram: número de íons precursores: 3; limite mínimo absoluto:  $2 \times 10^3$ ; limite mínimo absoluto: 0.1 %; smart exclusion após 4x; active exclusion após três espectros e por 1 min; modo de busca de peptídeos ativado, estado de carga preferido 2-4. Os dados cromatográficos obtidos via LC-MS-MS foram analisados com o software Bruker Data Analysis, version 4.0 (Build 253). O espectro de MS/MS que foi obtido no intervalo de 5-30 min foi exportado como um arquivo xml, após a deconvolução do estado de carga e utilizado para busca em banco de dados, utilizando o software Biotoools Version 3.2 (Bruker Daltonik) nas seguintes condições: enzima: tripsina; modificações fixas: carbamidometilação da cisteína; modificações variáveis: oxidação da metionina; tolerância do íon precursor: 0.2 Da; foi aceita na busca uma não clivagem pela tripsina.

O perfil de massa molecular das amostras obtidas por MS e MS/MS foi submetido à análise comparativa, utilizando-se o programa *MASCOT* (<http://www.matrixscience.com>), para a comparação das massas de peptídeos observados com bancos de dados e para a identificação das proteínas mais prováveis. Um “banco de dados” específico para a proteína 1 Cys Prx foi criado no programa *MASCOT*. Para tal, foi realizado um alinhamento das sequências de aminoácidos, desta proteína, pelo software *CLUSTAL 2W*, em sequências proteica deduzida para 1 Cys Prx em seis espécies (*Solanum lycopersicum*, *Vitis vinífera*, *Solanum tuberosum*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* e *Diospyros kaki*), obtidas pelo banco de dados *SOL GENOMICS NETWORK*. Além desse “banco de dados” específico, também foram realizadas buscas pelos bancos: *COFFEE GENOME*, *SWISS-PROT*, *EMBI-EBI* e *NCBI*.

### **3.7 Transcriptoma - Quantificação relativa da expressão dos genes**

#### **3.7.1 Extração de RNA e quantificação das alíquotas**

Os RNAs das sementes foram extraídos utilizando o protocolo de extração de RNA com o reagente Concert, com modificações, de acordo com manual: Concert™ Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen).

Para avaliar a integridade das amostras extraídas, o RNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com Brometo de Etídio (0.5 µg. mL<sup>-1</sup>), posteriormente visualizado sob luz ultravioleta. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e a qualidade avaliada pelo espectro (220-600nm) com a razão OD260/OD280.

#### **3.7.2 Tratamento com DNase**

Todas as amostras foram tratadas com *DNase DNA free* (Ambion), de acordo com o protocolo do fabricante, para retirada dos vestígios de DNA genômico. Para a avaliação da integridade e da qualidade das amostras, o RNA tratado foi submetido à eletroforese em gel de agarose e as amostras foram quantificadas novamente.

#### **3.7.3 Transcriptase reversa (RT)**

Depois de verificada a ausência de gDNA nas amostras, foi realizada a síntese reversa da primeira fita do DNA complementar (cDNA) a partir dos RNAm utilizando o *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Primeiramente, o RNA foi preparado a uma concentração de 1 µg em um volume final de 10 µL. Após essa etapa, foi preparado um *mix* contendo 2 µL do primer *RT Random Primers 10X*, 0,8 µL do *mix* dNTP (100mM), 1 µL *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, e água para um volume de 10 µL/amostra. Para cada solução preparada de 10 µL de RNA a 1 µg desse *mix*. Os tubos foram submetidos ao termociclador, programado com três etapas: 10 min a 25°C para o anelamento dos primers; 2 h a 37°C para ação da enzima e 5 min a 85°C para inativá-la. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

### 3.7.4 Expressão dos genes por PCR em tempo real

Para a análise da expressão dos genes selecionados (TABELA 2) foi utilizado o aparelho ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems), com método de detecção via SYBR Green, utilizando amostras de cDNA obtidas das sementes submetidas à secagem lenta e rápida com diferentes teores de água (30%, 20%, 10% e 5%), em triplicatas biológicas. A eficiência dos primers desenhados foi determinada por meio de curva de diluições por quantificação absoluta.

**Tabela 2** - Primers específicos usados nas reações de PCR em tempo real.

Gene	Primers	
	Foward	Reverse
ICL	attgggacctgcctagaacc	Cacctggacctcactccttc
<i>ENDOBETA</i>	cacaatcatggcatgggaact	Attgactgtccttccggagtaac
<i>CAT 3</i>	tgactgccacacgatcatttc	Cgggaggcagtgaggaaa
<i>SOD</i>	gcatggctcttcgaactctagtc	Gccgcgcagctgttg
<i>1 CYS PRX</i>	ttccgcagggataccagact	Ccggttacacatcgtgaatcgcag
<i>24S</i>	gaccaatcgtcttctttccagaaa	Tcaactcagccttggaacattag
<i>GPDH</i>	ttgaagggcgggtcmeta	Aacatgggtgcatccttgct

Fonte: Do autor (2017).

No ensaio de expressão, em cada reação utilizou-se 1  $\mu$ L de cDNA (diluído 1:5), 0,4  $\mu$ L de primer forward/reverse (10 $\mu$ M) e 5  $\mu$ L de Master MixSYBR green (Applied Biosystems) totalizando um volume final de 10  $\mu$ L. As amostras foram pipetadas em triplicatas técnicas, e um controle sem cDNA (NTC) foi incluído para cada par de primers. Os níveis dos transcritos são representados como uma razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão do gene alvo pelo valor absoluto da expressão dos genes normalizadores *24S* e *GPDH*. Os valores de expressão das sementes submetidas à secagem foram plotados tendo os valores de expressão encontrados em sementes não submetidas à secagem como referência. Os dados são médias de três amostras biológicas. A expressão relativa foi analisada pelo método Pfaffl (2004). As condições térmicas da reação foram: 2 minutos a 50°C e 10 minutos a 95°C para iniciação, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e finalizando-se com 15 minutos a 95°C. Ao fim da ciclagem, uma curva de desnaturação de 60-95°C mostrou a especificidade da reação de PCR. Os dados

foram coletados, exportados pelo programa 7500 Fast Software (Versão 2.1) e analisados em planilha Excel (Microsoft).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análises fisiológicas

Foi constatado que a taxa de secagem é decrescente à medida que as sementes perdem água. Em sementes com umidade inicial de 38% (base úmida) e submetidas à secagem rápida o tempo foi de 100 horas para alcançar 5% de teor de água, tendo uma velocidade média de secagem de 0,099%.h<sup>-1</sup>. Já na secagem lenta, o tempo foi de 190 horas para alcançar o mesmo teor de água, com velocidade média de secagem de 0,065%.h<sup>-1</sup>. Os valores médios dos teores de água das sementes nas duas velocidades de secagem estão representados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Valores médios do teor de água obtidos durante a secagem rápida em sílica gel e secagem lenta em solução salina saturada.

Teores de água de interesse (%)	Teores de água obtidos (%)	
	Lenta	Rápida
30	32,05	32,40
20	20,80	23,23
10	9,92	11,02
5	5,41	3,56

Fonte: Do autor (2017).

A interação entre os fatores velocidade de secagem e teor de água das sementes não foi significativa para as variáveis respostas: plântulas normais aos 30 dias, teste de tetrazólio e plântulas com folhas cotiledonares expandidas. Para esses testes, o comportamento das sementes variou apenas com o grau de umidade. Para as variáveis respostas: porcentagem de plântulas normais fortes aos 30 dias, matéria seca de raiz e matéria seca de hipocótilo aos 45 dias, bem como para o índice de velocidade de emergência, houve interação significativa entre os fatores velocidade de secagem e teor de água das sementes (APÊNDICE A).

Os resultados da porcentagem de plântulas normais aos 30 dias estão apresentados na Tabela 4. Veiga et. al. (2007) também não observaram diferenças estatísticas na germinação de sementes de *Coffea arabica* quando submetidas às secagens lenta e rápida. Na presente pesquisa, pode-se observar redução significativa da germinação em sementes secadas a partir de 10% de teor de água. A germinação das sementes com 5% de teor de água foi quase nula. A secagem de forma geral é prejudicial às sementes de café, independentemente da

velocidade em que essas são secadas, ocorrendo redução da qualidade fisiológica com a perda de água (ROSA et. al., 2005).

**Tabela 4** - Porcentagem média de plântulas normais de *C. arabica* L. aos 30 dias após semeadura, oriundas de sementes com diferentes teores de água.

Teor de água	Germinação
30	90 ab
20	92 a
10	82 b
5	4 c
CV (%)	9,82

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de *Tukey*, a 1% de probabilidade. Fonte: Do autor (2017).

Na Tabela 5 observa-se redução da média de plântulas normais em sementes secadas rapidamente até 10% de teor de água em relação ao controle. Por outro lado na secagem lenta não houve diferença significativa para este mesmo tratamento. Independentemente do método de secagem a média de plântulas normais foi muito baixa quando as sementes foram secadas até 5% de teor de água.

**Tabela 5** - Porcentagem média de plântulas normais de *C. arabica* L. aos 30 dias após semeadura, oriundas de sementes submetidas à secagem lenta, rápida e sem secagem (Controle).

Secagem	Germinação (%)			
	30%	20%	10%	5%
Lenta	89	88	87	3 γ
Rápida	91	96	76 γ	5 γ
Controle	92			
CV (%)	9,82			

γ Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de *Dunnnett*. Fonte: Do autor (2017).

Em relação à variável, plântulas normais fortes aos 30 dias de germinação, pode-se observar diferença significativa entre os fatores secagem e teor de água das sementes (TABELA 6). Quando a secagem foi rápida observou-se maior porcentagem de plântulas normais fortes em sementes secadas até 30 e 20% de teor de água. Porém quando as sementes foram secadas até 10% de teor de água, maior vigor foi verificado na secagem lenta (24%), uma diferença significativa quando comparado com apenas 3% de plântulas normais fortes

observadas na secagem rápida. Os valores de plântulas normais fortes de sementes submetidas à secagem rápida e lenta comparados aos observados em sementes não submetidas à secagem (Controle) variaram muito. Em sementes submetidas à secagem rápida até 30% de teor de água foi observado maior vigor em relação ao observado em sementes não submetidas à secagem (Controle). No entanto, neste mesmo método de secagem menor vigor foi observado em sementes secadas de forma rápida até 10% de teor de água.

**Tabela 6** - Porcentagem média de plântulas normais fortes de *C. arabica* L. aos 30 dias após sementeira, oriundas de sementes submetidas à secagem lenta, rápida e sem secagem (Controle) com diferentes teores de água.

Secagem	Plântulas normais fortes (%)			
	30%	20%	10%	5%
Lenta	31 bA	20 bB $\gamma$	24 aAB	0 aC $\gamma$
Rápida	51 aA $\gamma$	36 aB	3 bC $\gamma$	0 aC $\gamma$
Controle	29			
CV (%)	17,99			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de *Tukey*, a 1% de probabilidade.  $\gamma$  Médias diferem da testemunha no nível de 5% de probabilidade pelo teste de *Dunnnett*.

Fonte: Do autor (2017).

Em relação aos resultados de matéria seca de raiz (TABELA 7), em teor de água mais baixo (10%) verificou-se menores valores quando se utilizou a secagem rápida, tanto em relação à secagem lenta quanto ao tratamento controle. Independentemente do método de secagem utilizado os valores de matéria seca de raiz foram nulos quando as sementes foram secadas a 5% de teor de água.

**Tabela 7** - Matéria seca de raiz (g/plântula) de *C. arabica* L. aos 45 dias após a sementeira, proveniente de sementes submetidas à secagem lenta, rápida e sem secagem (Controle) com diferentes teores de água.

Secagem	Matéria seca - Raiz (g)			
	30%	20%	10%	5%
Lenta	0,16 aA	0,13 aA $\gamma$	0,16 aA	0 aB $\gamma$
Rápida	0,16 aA	0,15 aA	0,08 bB $\gamma$	0,01 aC $\gamma$
Controle	0,17			
CV (%)	15,79			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de *Tukey*, a 1% de probabilidade.  $\gamma$  Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de *Dunnnett*.

Fonte: Do autor (2017).

Quanto à matéria seca da parte aérea (TABELA 8), em sementes com teor de água de 10% submetidas à secagem lenta observou-se melhor desenvolvimento quando comparado às sementes, com o mesmo teor de água, submetidas à secagem rápida. Veiga et. al. (2007) também verificaram uma maior taxa de matéria seca e IVE em sementes submetidas à secagem lenta quando comparadas a secagem rápida em sementes com 12% de teor de água.

**Tabela 8** - Matéria seca da parte aérea (g/plântula) de *C. arabica* L. aos 45 dias após a semeadura, proveniente de sementes submetidas à secagem lenta, rápida e sem secagem (Controle) com diferentes teores de água.

Secagem	Matéria seca – Parte aérea (g)			
	30%	20%	10%	5%
Lenta	0,79 aA	0,79 aA	0,79 aA	0 aB $\gamma$
Rápida	0,88 aA	0,87 aA	0,58 bB $\gamma$	0,02 aC $\gamma$
Controle	0,91			
CV (%)	11,54			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de *Tukey*, a 1% de probabilidade.  $\gamma$  Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de *Dunnnett*

Fonte: Do autor (2017).

Observa-se nos resultados de plântulas com folha cotiledonar expandida aos 45 dias uma redução significativa da porcentagem destas em sementes com 5% de teor de água. (TABELA 9).

**Tabela 9** - Porcentagem média de plântulas com folhas cotiledonares expandidas de *C. arabica* L. aos 45 dias após semeadura, oriundas de sementes com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, 2016.

Teor de água	Folha cotiledonar expandida
30	86 ab
20	89 a
10	78 b
5	2 c
CV (%)	11,17

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de *Tukey*, a 1% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2017).

Foram observados menores valores de plântulas com as folhas cotiledonares expandidas em sementes submetidas à secagem rápida a partir de 10% de teor de água e

secadas de forma lenta e rápida até 5% de teor de água em relação ao tratamento controle (TABELA 10).

**Tabela 10** - Porcentagem média de plântulas com folhas cotiledonares expandidas de *C. arabica* L. aos 45 dias após semeadura em papel germitest, oriundas de sementes submetidas à secagem lenta, rápida e sem secagem (Controle). UFLA, Lavras, 2016.

Secagem	Folha cotiledonar expandida (%)			
	30%	20%	10%	5%
Lenta	85	88	85	0 $\gamma$
Rápida	87	90	71 $\gamma$	3 $\gamma$
Controle	91			
CV (%)	11,17			

$\gamma$  Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de *Dunnnett*  
 Fonte: Do autor (2017).

Avaliando a qualidade fisiológica por meio do índice de velocidade de emergência (TABELA 11), constatou-se diferença estatística significativa para os dois fatores avaliados (teor de água e velocidade de secagem). Pode-se observar em sementes com 30% de teor de água, submetidas à secagem rápida, maior vigor quando comparadas ao observado em sementes com o mesmo teor de água, mas secadas lentamente. Vieira et al. (2007) observaram que sementes de café têm sua emergência e índice de velocidade de emergência linearmente diminuídos ao longo do armazenamento por nove meses, e que a secagem rápida prejudica seu vigor e viabilidade, independentemente do local de armazenamento.

Foi verificado maior vigor das sementes submetidas à secagem lenta em relação ao observado em sementes submetidas à secagem rápida, a partir de 20% até 10% de teor de água. Segundo Illing et al. (2005), existem indicações de que a secagem rápida dificulta a recuperação de sementes sensíveis à dessecação, pelo fato destas necessitarem de maior tempo para serem reparadas durante a reidratação. Em diversas pesquisas, a qualidade fisiológica foi superior em sementes que passaram pelo processo de secagem lenta e, por isso, essa prática tem sido recomendada e utilizada na produção de sementes de café (BRANDÃO JUNIOR et al., 2002; VEIGA et al., 2007; VIEIRA et al., 2007).

Houve diferença do índice de velocidade de emergência das sementes submetidas à secagem lenta com 30%, 10% e 5% de teor de água e das sementes secadas rapidamente com 20%, 10% e 5% em relação a sementes não submetidas à secagem.

**Tabela 11** - Índice de velocidade de emergência (IVE) de plântulas oriundas de sementes de *C. arabica* L. submetidas à secagem lenta, rápida e sem secagem (Controle) com diferentes teores de água.

Secagem	IVE			
	30%	20%	10%	5%
Lenta	0,41 bB $\gamma$	0,63 aA	0,51 aAB $\gamma$	0,03 aC $\gamma$
Rápida	0,55 aA	0,47 bAB $\gamma$	0,39 bB $\gamma$	0,01 aC $\gamma$
Controle	0,68			
CV (%)	18,92			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de *Tukey*, a 1% de probabilidade.  $\gamma$  Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de *Dunnnett*.

Fonte: Do autor (2017).

Após a secagem, em 77% das sementes com 5% de teor de água foi observada viabilidade pelo teste de tetrazólio, mas somente 4% destas germinaram aos 30 dias (TABELA 12).

**Tabela 12** - Viabilidade pelo teste de tetrazólio em sementes de *C. arabica* L. com diferentes teores de água.

Teor de água	Tetrazólio
30	93 a
20	89 a
10	91 a
5	77 b
CV (%)	5,64

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de *Tukey*, a 1% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2017).

A tolerância à dessecação varia entre os tecidos da semente e, geralmente, o eixo embrionário é mais tolerante que a semente inteira. Isto provavelmente se deve à secagem mais rápida do eixo, durante o desenvolvimento, e à menor proporção de água ligada na estrutura deste (MARCOS FILHO, 20015). Diante deste resultado pode-se inferir que o principal ponto de danos, em consequência da secagem, está localizado no endosperma. Resultados semelhantes foram encontrados por Coelho et. al. (2015) ao comparar os

resultados do teste de tetrazólio em embriões de café com os de formação de plântulas normais. O melhor desempenho fisiológico dos embriões, em comparação às sementes inteiras, corrobora com os resultados de Dussert et al. (2006), que mostraram que há maior sensibilidade dos endospermas à secagem e à imersão em nitrogênio líquido, em comparação aos embriões zigóticos.

Pelo teste de tetrazólio, não houve diferenças de viabilidades de sementes submetidas ou não à secagem, com exceção dos valores observados em sementes secadas até 5% de teor de água, independentemente do método de secagem utilizado (TABELA 13).

**Tabela 13** - Viabilidade pelo teste de tetrazólio em sementes de *C. arabica* L. submetidas à secagem lenta, rápida e sem secagem (Controle).

Secagem	Tetrazólio (%)			
	30%	20%	10%	5%
Lenta	93	89	91	75 $\gamma$
Rápida	93	89	90	80 $\gamma$
Controle	98			
CV (%)	5,64			

$\gamma$  Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de *Dunnnett*

Fonte: Do autor (2017).

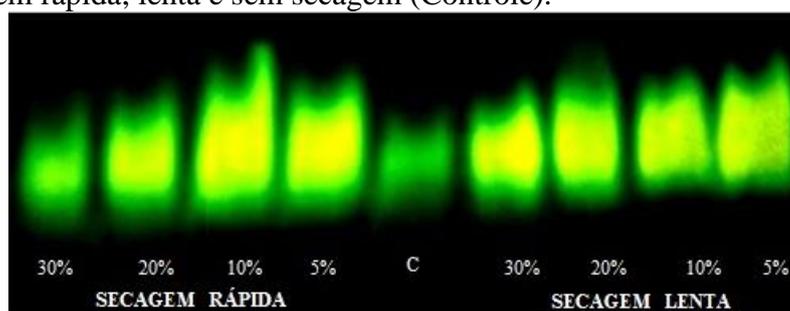
Um processo de secagem eficiente é aquele que, além de reduzir o teor de água da semente, aumenta seu potencial de conservação pós-colheita e preserva suas características físicas e propriedades tecnológicas, atribuindo-lhe valor comercial.

Para alcançar resultados satisfatórios, se fazem necessários investimentos em pesquisas que visem o máximo do controle de qualidade das sementes, onde análises pontuais no que concerne à germinação e o vigor sejam consideradas com o intuito de garantir alta qualidade dessas. Na presente pesquisa observou-se que há diferença entre os métodos de secagem e os teores de água quando relacionados à qualidade fisiológica das sementes. Sendo que, maior qualidade fisiológica foi observada em sementes com os maiores teores de água. Sementes secadas lentamente até 10% de teor de água mantiveram qualidade fisiológica superior na maioria das avaliações quando comparadas com sementes com o mesmo teor de água mas secadas rapidamente.

## 4.2 Análises proteômicas e transcriptômicas

Pode-se observar na Figura 1 maior atividade da enzima catalase nas sementes submetidas à secagem, independente da velocidade que estas foram secas, do que em sementes úmidas. Sendo que sementes secadas lentamente apresentaram uma atividade enzimática mais estável. Houve maior atividade em sementes submetidas à secagem rápida, com teor de água de 10%, comparada com a observada em sementes secadas lentamente até 10% de teor de água. Esses resultados corroboram com os obtidos por Santos et al. (2013), em que menor atividade desta enzima foi observada em sementes não submetidas ao processo de secagem (controle), independentemente do método de secagem. Estes resultados também foram observados por Veiga et al. (2010) e Coelho et al. (2015).

**Figura 1** - Atividade enzimática da catalase em sementes de *C. arabica* submetidas à secagem rápida; lenta e sem secagem (Controle).



Fonte: Do autor (2017).

Brandão Junior et al. (2002) verificaram atividade enzimática da catalase apenas em sementes submetidas à secagem e maior atividade foi observada em sementes em estágio de desenvolvimento mais avançado e com melhor potencial fisiológico. Porém, a fim de avaliar os perfis proteicos e o desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem, Taveira et al. (2012) avaliaram a atividade de várias enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, sendo que maior atividade da enzima catalase foi encontrada em sementes que apresentaram piores desempenhos fisiológicos, como os observados nessa pesquisa. Essa maior atividade pode ser explicada pela necessidade de maior atuação dessas enzimas durante a evolução da deterioração de sementes, principalmente a partir de 10% de teor de água.

Há enzimas em que o decréscimo da atividade faz com que haja maior vulnerabilidade das sementes ou de partes específicas dessas, ao ataque de radicais livres e peroxidação. A menor atividade enzimática também pode significar maior dificuldade para a mobilização de reservas (amilases, proteases, lipases). Em outras, como “scavengers”, a maior atividade indica maior intensidade de remoção de produtos tóxicos formados com o progresso da deterioração, ou seja, atuam mais intensamente em sementes mais deterioradas. É importante salientar que a eficiência de mecanismos de reparo depende da ação eficiente de enzimas (MARCOS FILHO, 2015).

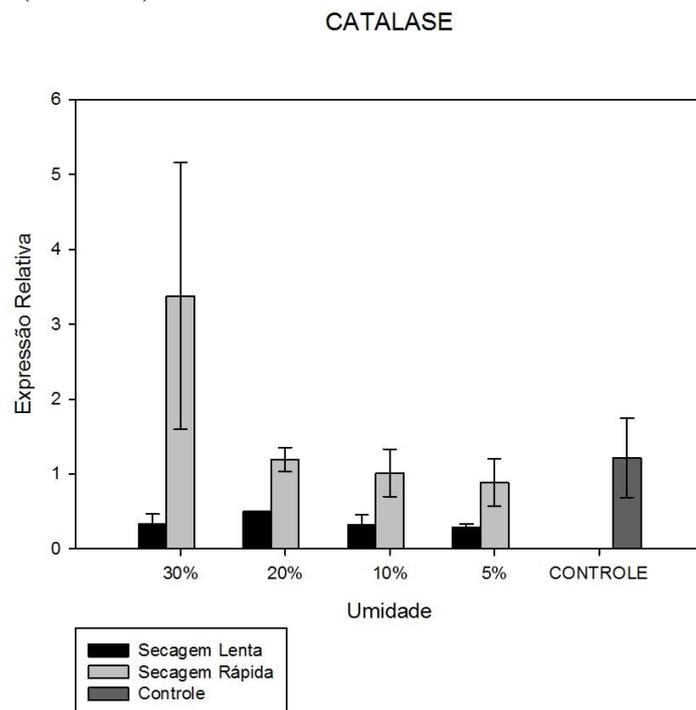
Quando submetidas à secagem as sementes reagem a esse estresse, induzindo uma transição na expressão gênica, silenciando ou atenuando a expressão de vários genes. Na presente pesquisa, observou-se maior expressão do gene *cat 3* em sementes submetidas à secagem rápida quando comparada a observada em sementes submetidas à secagem lenta, sendo a maior expressão em sementes secadas de forma rápida até 30% de teor de água (FIGURA 2). Aparentemente as diferentes taxas de secagem determinam a ocorrência de diferentes processos metabólicos, de modo que alguns eventos geralmente ocorrem de maneira mais intensa em sementes com teores de água relativamente mais altos (MARCOS FILHO, 2015). Diante do exposto, pode-se inferir que essas sementes sinalizaram o estresse a elas imposto, no caso a secagem, em sementes mais úmidas. Com o avanço da secagem, e redução do teor de água das sementes o estresse implantado parece ser reduzido o que resultou em menor expressão deste gene. Quando se compara a atividade da enzima catalase e a expressão do gene que a codifica, observa-se que a atividade desta isoenzima é mais acentuada em sementes com menor teor de água, ou seja, que permaneceram mais tempo no processo de secagem e que tiveram a necessidade da tradução desta enzima antioxidante provavelmente para eliminação das EROs.

Assim como se observou uma maior atividade da enzima catalase nas sementes secadas mais rapidamente, a expressão do gene *cat 3* também foi maior em sementes submetidas à secagem rápida. Santos et. al. (2013) analisando a expressão do gene *cat 3* em sementes de café, com diferentes teores de água e secadas de maneira rápida e lenta, observaram esse mesmo padrão de expressão dos transcritos, com maior expressão em sementes com maiores teores de água e diferença significativa entre as duas velocidades de

secagem testadas. Os autores observaram maior expressão em sementes submetidas à secagem rápida.

O gene *cat3* está presente em sementes e plantas jovens, cuja expressão está relacionada à remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido durante a degradação dos ácidos graxos no glioxissoma (BREUSEGEM et al., 2001).

**Figura 2** - Perfil de expressão relativa do gene *cat 3* em sementes submetidas à secagem lenta e rápida com diferentes teores de água, e em sementes não submetidas à secagem (Controle).



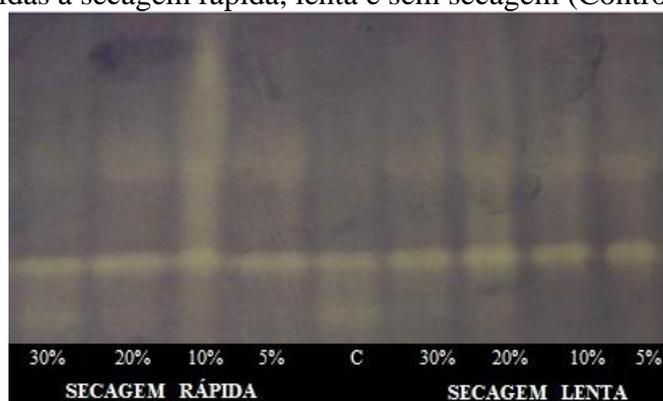
Fonte: Do autor (2017).

Em relação à enzima superóxido dismutase foram observadas três isoformas no perfil eletroforético, uma destas está presente em todos os tratamentos analisados, outra apenas nas sementes submetidas à secagem com teores de água de 20%, 10% e 5% e a terceira em sementes submetidas à secagem rápida a partir de 20% umidade e secadas lentamente a partir de 10% de teor de água. A enzima superóxido dismutase está entre as mais importantes enzimas do sistema de defesa, quando acoplada a rotas de eventos necessários à completa eliminação dos radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ALSCHER et al., 2002). Maior expressão dessa enzima em fases precoces ou tardias do processo de maturação das

sementes é indicativo de sua ação de defesa para redução de superóxido, e consequente redução da formação de radicais livres, foi mais demandada, seja em função do processo de deterioração ou pela imaturidade de sementes (MARTINS et al., 2011).

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

**Figura 3** - Atividade enzimática da superóxido dismutase em sementes de *C. arabica* submetidas à secagem rápida, lenta e sem secagem (Controle).



Fonte: Do autor (2017).

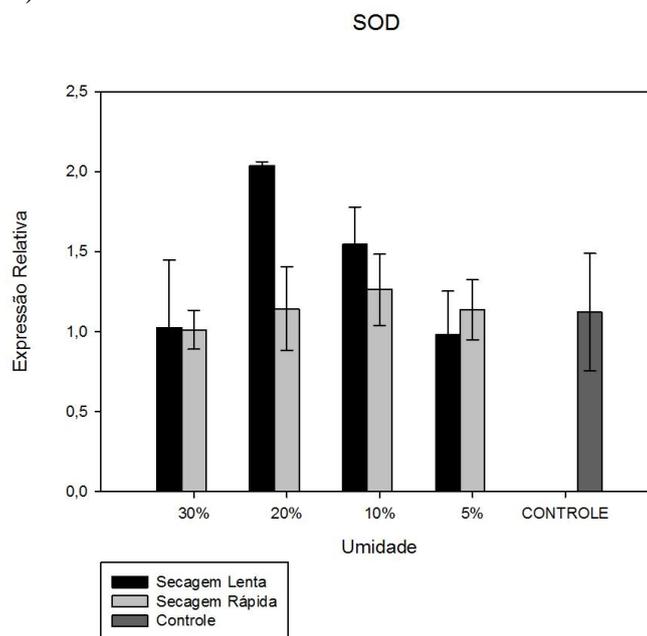
O padrão de expressão da SOD é o mesmo em grãos de café com teor de água de 11%, processados por via seca e/ou via úmida e armazenados por um período de 12 meses (SAATH et al.; 2010). Coelho et al. (2015) ao estudarem dois métodos de secagem, rápida e lenta, e armazenamento de sementes de *C. arabica* em temperaturas subzero, observou maior expressão da enzima superóxido dismutase em sementes secadas pelo método de secagem lenta. Baliza et al. (2012) observaram menor expressão desta enzima em sementes de café no estágio verde cana, sendo essa menor expressão associada à menor qualidade fisiológica. Esses resultados contrastantes são explicados pelo fato da alta ou baixa expressão dessa enzima estar ligada ao processo deteriorativo, por isso faz-se necessária uma combinação das análises bioquímicas com as análises fisiológicas.

Na Figura 4 observa-se a expressão relativa do gene que codifica a enzima superóxido dismutase. Maior expressão foi observada em sementes submetidas à secagem lenta até 20 e 10% de teor de água, em relação à observada em sementes submetidas à secagem rápida. No entanto não houve diferença em sementes submetidas à secagem lenta e rápida quando as

sementes foram secadas até 30% e 5% de teor de água. De uma maneira geral a expressão deste gene em sementes não submetidas à secagem (Controle) foi mais similar à observada em sementes submetidas à secagem rápida. Comparando esses resultados com os do índice de velocidade de emergência de plântulas (IVE), conclui-se que, essa maior expressão dos transcritos está relacionada ao maior vigor das sementes. Em sementes submetidas à secagem lenta até 20 e 10% de teor de água foram observados maiores valores de IVE quando comparados aos observados em sementes com os mesmos teores de água, mas submetidas à secagem rápida. A secagem lenta parece promover melhor tolerância à desidratação, presumivelmente, devido ao tempo suficiente que é concedido para a indução e a operação dos mecanismos de proteção. Oliver e Bewley (1997) sugeriram que a secagem rápida impede os processos de recuperação, deste modo é necessário mais tempo para os reparos na reidratação. Sementes secadas lentamente, por vários dias, continuam a metabolizar e desenvolver-se até que um nível crítico de teor de água seja alcançado, conseqüentemente, a tolerância à dessecação pode aumentar durante este lento processo de secagem.

O elevado aumento de transcritos de SOD sob condições de estresse corresponde, geralmente, a um aumento bem mais moderado da atividade da enzima (INZÉ and MONTAGU, 1995). Com base nos resultados obtidos na presente pesquisa, uma relação direta entre expressão gênica e atividade enzimática não foi verificada. Essas observações podem indicar a ação de prováveis mecanismos pós-transcricionais, traducionais e pós-traducionais que podem estar sendo ativados durante o processo de secagem (Nelson e Cox, 2013).

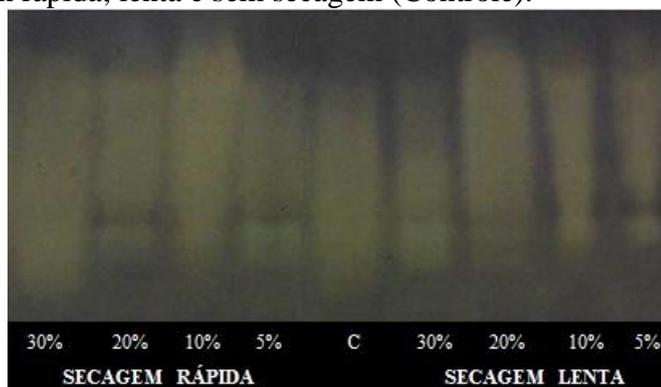
**Figura 4** - Perfil de expressão relativa de *SOD* em sementes submetidas à secagem lenta e rápida com diferentes teores de água, e em sementes não submetidas à secagem (Controle).



Fonte: Do autor (2017).

Em relação à atividade da enzima Isocitrato liase houve diferença em sementes submetidas aos diferentes tratamentos (FIGURA 5). Maior atividade foi observada em sementes submetidas à secagem rápida do que a observada naquelas secadas lentamente. Ao considerar a secagem rápida, maior atividade foi verificada em sementes com 30% e 10% de teor de água, respectivamente, sendo que na secagem lenta foi observada maior expressão em sementes secadas até 20% de teor de água. Ao relacionar a atividade da Isocitrato liase com os dados do índice de velocidade de emergência (TABELA 11), pode-se inferir que a maior atividade desta enzima está associada a melhor qualidade fisiológica das sementes, exceto daquelas com teor de água de 10%. Nestas foi observada uma intensidade maior nas sementes secadas rapidamente, as quais apresentaram qualidade inferior. Resultados semelhantes foram encontrados em sementes de soja, em que se observou maior atividade dessa enzima em sementes com melhor qualidade fisiológica (CARVALHO et. al., 2014).

**Figura 5** - Atividade enzimática da isocitrato liase em sementes de *C. arabica* submetidas à secagem rápida; lenta e sem secagem (Controle).

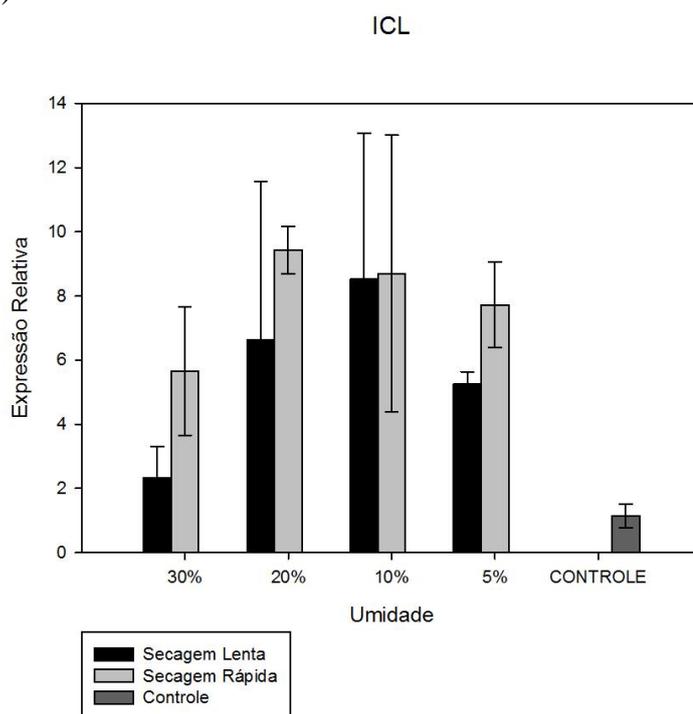


Fonte: Do autor (2017).

Selmar et al. (2006) e Bytof et al. (2007) verificaram maior e mais precoce atividade da enzima ICL em grãos de café que tiveram o exocarpo e o endocarpo removidos por fermentação em água, em relação às que foram mantidas no fruto. Essa enzima está relacionada com o processo de germinação, atuando no ciclo do glioxilato (TAIZ & ZEIGER, 2004; DE ROBERTIS and HIB, 1998). Neste ciclo, os lipídios insolúveis das sementes se transformam em açúcares solúveis (sacarose), os quais são facilmente deslocados para os meristemas radiculares e apicais (CIONI et al., 1981). As atividades dessa enzima aumentam durante a germinação, obtendo-se valores máximos quando ocorre a maior taxa de degradação de lipídios e síntese de sacarose (BEWLEY & BLACK, 1994).

No que diz respeito aos transcritos (FIGURA 6), observou-se maior expressão em sementes submetidas à secagem rápida quando comparada a observada em sementes submetidas à secagem lenta até 30 e 5% de teor de água. Quando secadas até 20 e 10% não houve diferença entre as sementes submetidas às secagens lenta e rápida, embora nestes tratamentos tenham sido observados os maiores valores de expressão deste gene em sementes de café. Ressalta-se que a menor expressão foi observada em sementes não submetidas à secagem (Controle).

**Figura 6** - Perfil de expressão relativa de ICL em sementes submetidas à secagem lenta e rápida com diferentes teores de água, e em sementes não submetidas à secagem (Controle).



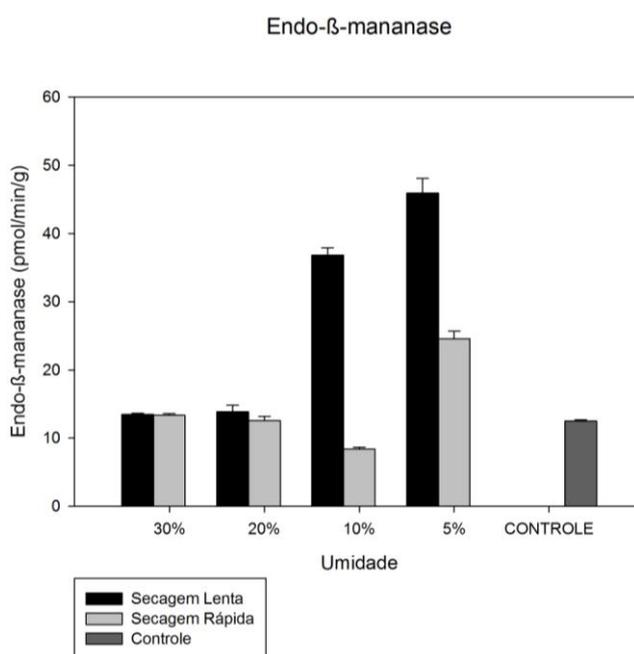
Fonte: Do autor (2017).

Segundo Selmar et al. (2001), o gene que codifica a enzima Isocitrato liase (ICL) apresenta níveis de expressão mais altos em sementes de café desidratadas quando comparado com sementes frescas.

Gaspari-Pezzopane et al. (2012) avaliaram a expressão de diferentes genes associados a processos de desenvolvimento e maturação de frutos de café. A caracterização da expressão gênica foi realizada pelas técnicas de RT-PCR semi-quantitativa e quantitativa. Quatro entre os 28 genes avaliados apresentaram perfil de expressão constante, em todas as cultivares e safras e, portanto, foram validados como genes candidatos a marcadores fenológicos de frutos de cafeeiro. Entre estes, o gene *ICL* teve expressão substancialmente maior em frutos cereja do que a observada nos demais tratamentos. Estas análises sugerem que esse gene possui potencial para se tornar marcador molecular das fases finais de maturação do fruto de café, porém a expressão deste não apresenta uma correlação clara diante da tolerância/sensibilidade à dessecação de sementes de café.

Na Figura 7 estão apresentados os dados de atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase. Pelos resultados obtidos nesta pesquisa, observou-se que os métodos de secagem não afetaram a sua atividade, quando as sementes foram secadas até 30 e 20%. Observa-se também maiores atividades da enzima em sementes submetidas à secagem lenta até os teores de água de 10 e 5%. Nesses tratamentos também foram observados os menores desempenhos fisiológicos, avaliados pelos testes de germinação e de vigor.

**Figura 7** - Atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes de *C. arabica* submetidas à secagem rápida, lenta e sem secagem (Controle).



	30%	20%	10%	5%
Secagem Lenta	13,46 aC	13,86 aC	36,81 aB $\gamma$	45,92 aA $\gamma$
Secagem Rápida	13,33aB	12,59 aBC	8,4 bC	24,54 bA $\gamma$
Controle	12,51			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade.  $\gamma$  Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett

Fonte: Do autor (2017).

Além de participar do processo germinativo, alguns trabalhos têm relacionado à atividade da endo- $\beta$ -mananase ao processo de deterioração de sementes de café, visto que há aumento da atividade da enzima ao longo do armazenamento, quando as sementes perdem

qualidade fisiológica (Veiga et. al., 2007). Assim a perda da qualidade de sementes de café, pode estar relacionada, dentre outros fatores, com o aumento da atividade dessa enzima.

A enzima endo- $\beta$ -mananase possui a capacidade de hidrolisar ligações internas de polímeros de mananas, causando degradação das paredes celulares que envolvem o embrião, facilitando a emergência da radícula, mas também pode estar relacionada com o processo de deterioração. Apesar de estar ligada a germinação, a atividade dessa enzima não é o fator limitante para a protrusão radicular (KONTOS and SPYROPOULOS 1996; TOOROP et al. 1996; VOIGT and BEWLEY 1996; STILL and BRADFORD 1997; NONOGAKI and MOROHASHI 1998).

Existem duas etapas que caracterizam o processo de enfraquecimento das estruturas do endosperma que circundam o embrião de café, sendo que a primeira delas consiste no aumento da atividade da enzima celulase e a segunda no aumento da atividade da endo- $\beta$ -mananase (Schroder et al. 2009). Como relatado no referencial teórico, a atuação dessas enzimas é regulada pela presença de fitormônios, como o ácido abscísico, o qual atua inibindo a ação de enzimas e da giberilina, induzindo a degradação do endosperma e consequentemente, promovendo a germinação (Bewley et al., 2012; Silva et al., 2005).

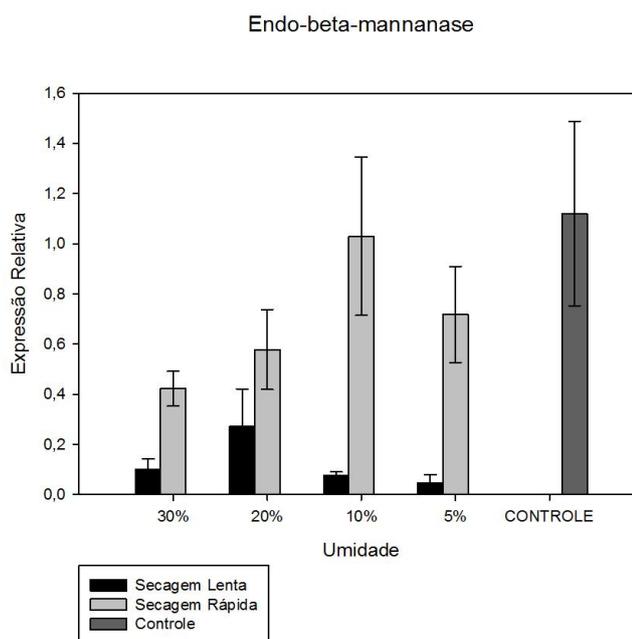
As sementes não foram embebidas para a determinação da atividade da endo- $\beta$ -mananase, deste modo, pode-se inferir que a atividade observada está relacionada ao processo de deterioração, ou seja, com a degradação desordenada das paredes celulares. Para que a atividade dessa enzima esteja associada à germinação de sementes com melhor desempenho fisiológico, a extração da enzima e detecção de sua atividade deve ser realizada após o início da protrusão das radículas, em sementes germinando. Takaki & Dietrich (1980) observaram que a atividade da endo- $\beta$ -mananase em sementes de café aumenta somente 10 dias após a embebição, estando esta associada ao amolecimento do endosperma cap e à disponibilização de carboidratos para o crescimento do embrião, durante o processo de germinação (Silva et al., 2005).

Os resultados da análise de expressão gênica, obtidos por meio da técnica de PCR em tempo real, não seguiram o mesmo padrão encontrado na análise da atividade da endo- $\beta$ -mananase, assim como observado nos transcritos dos genes da CAT, SOD e ICL.

Pode-se observar maior expressão dos transcritos do gene *man A* em sementes submetidas à secagem rápida, enquanto que a maior atividade da enzima em questão foi

verificada nos tratamentos submetidos à secagem lenta (FIGURA 8). A princípio essa observação pode parecer incoerente, mas quando avalia-se a atividade enzimática, a resposta gerada representa a atividade de todas as isoformas de MANs funcionais naquele determinado momento. No entanto, na avaliação da expressão de transcritos, foi avaliado apenas uma isoforma, ManA. Como é sabido, a presença do transcrito não implica que o respectivo produto polipeptídico esteja sendo traduzido na mesma proporção, e mesmo que esteja sendo codificado proporcionalmente, isso não pressupõe que as enzimas estejam ativas e funcionais. Além disso, como reportado no referencial teórico, existem várias isoformas da endo- $\beta$ -mananase em café, sendo que estas apresentam funções distintas e diante dos resultados encontrados pode-se inferir que essas isoformas respondem de modo diferenciado a dessecação, em diferentes níveis.

**Figura 8** - Perfil de expressão relativa de *MAN A* em sementes submetidas à secagem lenta e rápida com diferentes teores de água, e em sementes não submetidas à secagem (Controle).



Fonte: Do autor (2017).

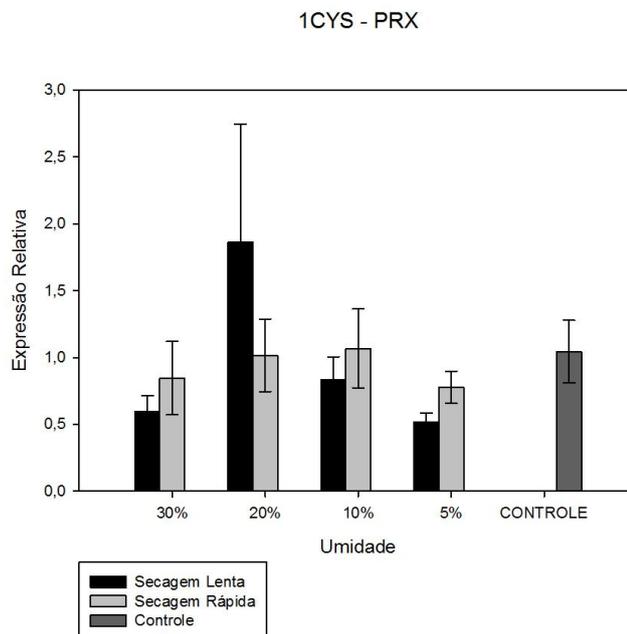
A expressão do gene *I Cys Prx* está apresentada na Figura 9. Maior expressão desse gene foi observada em sementes submetidas à secagem lenta até 20% de teor de água, diferindo estatisticamente da expressão em sementes submetidas aos demais tratamentos. Em sementes submetidas à secagem rápida e lenta até 30 e 10% de teor de água não houve

diferença significativa da expressão desse gene. Já quando as sementes foram secadas até 5% de teor de água, maior expressão foi observada em sementes submetidas à secagem rápida. Em sementes não submetidas à secagem (Controle), foi observada menor expressão do gene comparada à observada em sementes secadas de forma lenta até 20% de teor de água.

Não há registros de estudos sobre expressão do gene que codifica a enzima 1 Cys Prx em café e sua relação com sementes com diferentes teores de água. Peroxirredoxinas são enzimas antioxidantes que fazem parte do complexo mecanismo de proteção envolvido no reparo de danos causados por radicais livres, durante a dessecação e início da embebição, e também estão envolvidas na manutenção e proteção durante a dormência (HASLEKAS, et. al., 1998; MOWLA et. al., 2002). O gene 1 Cys Prx é expresso sozinho em sementes e somente nas partes tolerantes a dessecação (AALEN, 1999). É observado aumento do nível de sua expressão em sementes em desenvolvimento, bem como a sua manutenção em sementes maduras durante o armazenamento (MOWLA et. al., 2002).

Haslekas et al. (1998) mostraram o aumento na expressão do gene 1Cys Prx em *Arabidopsis* durante a maturação das sementes e redução durante a germinação. Soeda et al. (2005) observaram em sementes de *Brassica oleracea* níveis menores de RNA para este gene após o osmocondicionamento, quando as sementes foram secadas rapidamente e mais alto quando secadas lentamente, o que também pode ser observado na atual pesquisa.

**Figura 9** - Perfil de expressão relativa de 1 Cys Prx em sementes submetidas à secagem lenta e rápida com diferentes teores de água, e em sementes não submetidas à secagem (Controle).



Fonte: Do autor (2017).

Em relação ao “banco de dados” específico, para a enzima 1 Cys Prx, criado no programa *MASCOT*, observa-se no Apêndice B alta homologia das sequências de aminoácidos, das espécies: *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinífera*, *Solanum tuberosum*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* e *Diospyros kaki*. Além disso, todas as sequências apresentaram o domínio mais conservado da enzima (PVCTTE).

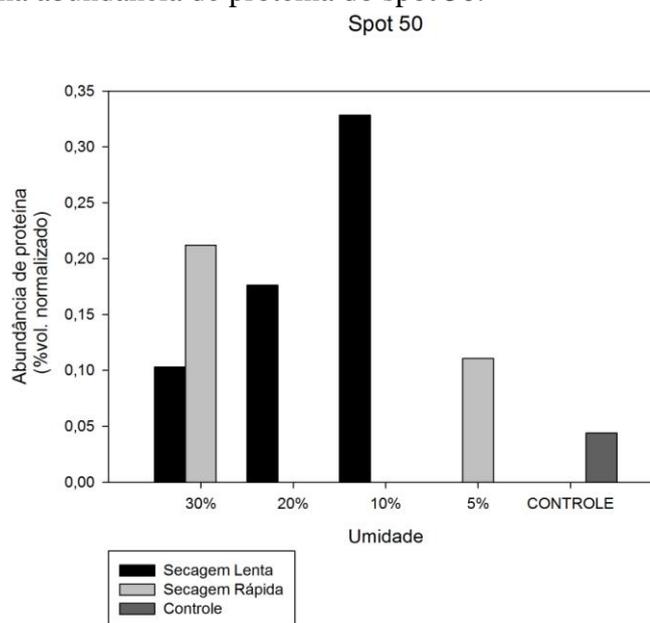
Após a excisão dos 13 spots, escolhidos de acordo com o peso molecular (23 a 25 KDa) e sequenciamento por espectrometria de massas, foi realizada a análise para a comparação das massas de peptídeos com os bancos de dados. No entanto, não houve homologia dos spots com as sequências de aminoácidos da enzima alvo, porém esta busca permitiu a identificação do spot 50, que apresentou similaridade significativa (*score* maior que o limite de significância) com a proteína Acyl-coenzyme A oxidase 3 (ACX) (TABELA 14).

**Tabela 14** - Proteína identificada por espectrometria de massas em sementes *C. arabica* L. submetidas à secagem lenta e rápida com diferentes teores de água, e em sementes não submetidas à secagem (Controle).

Spot	Identidade provável da proteína	Organismo	Nº de acesso	Score	MM (KDa)	pI	Banco
50	Acyl-coenzyme A oxidase 3	<i>Hordeum vulgare</i>	CA019045.1	65	23	6,2	EMBI-EBI

Fonte: Do autor (2017).

A alteração da quantidade da ACX (spot 50) em função dos tratamentos está representada na Figura 10. Houve diferencia significativa entre os tratamentos. Maior abundância foi observada em sementes submetidas à secagem lenta do que a observada naquelas secadas rapidamente. Sementes secadas lentamente até 10% de teor de água apresentou maior abundância quando comparadas com os demais tratamentos. Não foi observada a presença do spot 50 nos géis de sementes secadas rapidamente até os teores de água de 20 e 10%, assim como sementes secadas lentamente até 5% de teor de água. A maior abundância da proteína foi observada em sementes que apresentaram melhor qualidade fisiológica.

**Figura 10** - Alteração na abundância de proteína do spot 50.

Quantidade da proteína em sementes de *C. arabica* L. submetidas à secagem lenta e rápida com diferentes teores de água, e em sementes não submetidas à secagem (Controle) em % de volume normalizado.

Fonte: Do autor (2017).

A ACX é a enzima-chave que catalisa a etapa determinante da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos nos peroxissomos, catalisando a oxidação de acil-CoA com oxigênio molecular, produzindo trans-2,3-desidroacil-CoA e  $H_2O_2$  (KHAN et al., 2012).

Como mencionado, a  $\beta$ -oxidação de lipídeos tem como objetivo a conversão de lipídeos a açúcares, a exemplo da sacarose. Durante a desidratação, açúcares específicos podem prevenir os efeitos danosos da dessecação sobre as membranas celulares, na medida em que formam ligações de hidrogênio, substituindo a água normalmente associada com as superfícies das membranas, mantendo, assim, o espaçamento dos grupos de lipídios, evitando a peroxidação de lipídeos (PAMMENTER; BERJAK, 1999). Além disso, estes também podem interagir com as proteínas, evitando a mudança de sua conformação e, conseqüentemente, de sua função (LEPRINCE et al., 1993). Brandão Júnior (2000), estudando marcadores da tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro, observou, em embriões, que acréscimos no conteúdo de glicose e sacarose estão associados com proteção de sementes de cafeeiro contra danos na secagem e com aquisição da tolerância à dessecação.

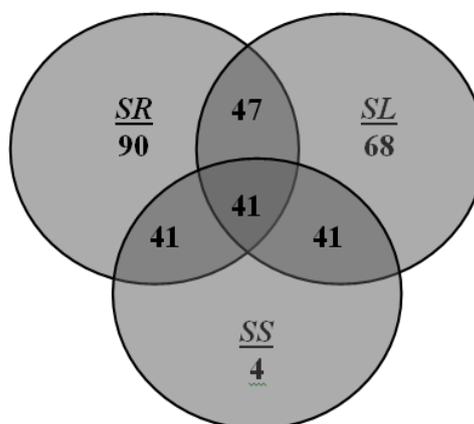
Diante disso, pode-se inferir que a maior abundância da ACX está associada a maior tolerância à dessecação em sementes de café.

Rylot et al.,(2003) estudando mutantes com deficiência dos genes *ACX3* e *ACX4* de *A. thaliana*, observaram 25% de embriões abortados nos mutantes duplos homozigotos. Esta letalidade do mutante duplo provavelmente ocorreu devido acúmulo de intermediários tóxicos nos embriões. Os mutantes *acx1*, *acx3* e *acx4* exibem resistência ao hormônio Ácido indolil-3-butírico (IBA), a conversão de IBA para Ácido indolil-3-acético (IAA) é um processo que também ocorre nos peroxissomos (STRADER et al., 2010), o que sugere que esta via também é alterada pela inatividade da enzima ACX.

No presente trabalho, além da identificação do spot 50 foram detectados em média 162 spots com massas moleculares que variaram entre 10 e 35 KDa, presentes no pH entre 4 a 7, sendo que destes spots apenas 8 foram comuns nos 27 géis.

Duas avaliações comparativas dos mapas proteicos foram realizadas. Na primeira foram comparados apenas os métodos de secagem e a ausência da mesma, já na segunda avaliação a porcentagem de spots foi determinada nas duas variáveis (métodos de secagem e teores de água). Pode-se observar na Figura 11 que maior número de spots foi encontrado em sementes submetidas à secagem rápida e menor número em sementes não submetidas à secagem. Este último apresentou 45 spots, sendo que 41 destes estavam presentes nos tratamentos de secagem rápida e lenta. Comparando os dois métodos de secagem, observa-se 47 spots em comum. Segundo Bewley e Black (1985), a secagem pode modificar o padrão da síntese protéica, reduzindo a produção de RNAs mensageiros (RNAs-m) no eixo embrionário, relacionados com a formação de proteínas envolvidas no desenvolvimento da semente, chegando, inclusive, a cessar a produção destes. Enquanto isso, a produção de RNAs-m relacionados aos processos germinativos é ativada. Enzimas associadas exclusivamente a processos pós-germinativos têm sua produção induzida pela secagem da semente durante seu processo de desenvolvimento/maturação.

**Figura 11** - Número de spots de proteínas de sementes de *Coffea arabica*, secadas rapidamente (SR), lentamente (SL) e não submetidas à secagem (SS), em pH entre 4 a 7 e massa molecular de 10 a 35 KDa, e sua correlação apresentada em esquema de conjunto numérico.



Fonte: Do autor (2017).

Na avaliação das duas variáveis observou-se diferença significativa nos tratamentos cujas sementes foram secadas até 20% e 10% de teor de água quando comparados aos tratamentos com o mesmo teor de água submetidos à secagem rápida e não submetidos à secagem (TABELA 15).

**Tabela 15** - Porcentagem do número de spots de proteínas dos géis bidimensionais das sementes de *C. arabica* submetidas à secagem lenta e rápida com diferentes teores de água, e em sementes não submetidas à secagem (Controle).

Secagem	% num. de spots			
	30%	20%	10%	5%
Lenta	34,6	42	40,1	26,5
Rápida	36,4	17,9	26	27,2
Controle	27,8%			

Fonte: Do autor (2017).

Em sementes secadas lentamente até 20% de teor de água verificou-se a maior porcentagem de spots. Como discutido anteriormente em sementes submetidas a este tratamento observou-se alta qualidade fisiológica por meio dos testes de viabilidade e vigor. Portanto a maior porcentagem de spots obtidos destas sementes pode estar relacionada ao melhor desempenho fisiológico dessas sementes, uma vez que, o estresse oxidativo causa danos às proteínas (Smirnoff, 1993).

## 5 CONCLUSÕES

- A qualidade fisiológica das sementes de café está relacionada com a velocidade da secagem e o teor final de água destas.
- Em sementes secadas lentamente até 10% de teor de água observa-se qualidade fisiológica superior quando comparadas a sementes com mesmo teor de água, mas secadas rapidamente.
- A maior atividade das enzimas catalase e endo- $\beta$ -mananase está associada à menor qualidade fisiológica de sementes de café.
- A maior expressão das isoenzimas ICL e ACX estão relacionadas à maior qualidade fisiológica das sementes de café.
- Há maior expressão dos genes *CAT 3* e *ENDO-B-MANANASE* em sementes submetidas à secagem rápida.
- O gene *ICL* apresenta níveis de expressão mais altos em sementes submetidas à secagem quando comparado com a observada em sementes não submetidas à secagem.
- As maiores expressões dos genes *ICys Prx* e *SOD* estão associadas à alta qualidade fisiológica das sementes de café.
- Em sementes de café secadas lentamente até 20 e 10% de teor de água há maior porcentagem de spots de proteínas nos géis bidimensionais.

## REFERÊNCIAS

- AALEN, R. B. et al. Transcripts encoding an oleosin and a dormancy-related protein are present in both the aleurone layer and the embryo of developing barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds. **Plant J**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 385-396, 1994.
- AALEN, R. B. Peroxiredoxin antioxidants in seed physiology. **Seed Science Research**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 285-295, apr. 1999.
- ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, may. 2002.
- ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Biosynthesis and catabolism of caffeine in low-caffeine-containing species of *Coffea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 8, n. 8, p. 3425-3431, aug. 1999.
- BACCHI, O. Novos ensaios sobre a seca de sementes de café ao sol. **Bragantia**, Campinas, v. 15, n. 8, p. 83-91, 1956.
- BACCHI, O. Seca da semente de café ao sol. **Bragantia**, Campinas, v. 14, n. 22, p. 225-236, 1955.
- BAIER, M.; DIETZ, K. J. Protective function of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic *Arabidopsis*, **Plant Physiol.** [S. l.], v. 119, n. 4, pg. 1407-1414, apr. 1999.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology, **Seed Science Research**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 93-107, may. 2004.
- BALIZA, D. P. et al. Physiological quality of coffee seeds produced under different levels of solar radiation and maturation stages. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 416-423, 2012.
- BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Science Research**, [S. l.], v. 16, n. 1, pg. 1-15, mar. 2006.
- BEWLEY, J. D. et al. **Seeds. Physiology of development, germination and dormancy**. New York: Springer, 2012.
- BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**, [S. l.], v. 9, n. 7, pg. 1055-1066, july. 1997.

- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994.
- BHATT, I.; TRIPATHI, B. N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, India, v. 29, p. 850-859, july. 2011.
- BOWLER, C., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 43, p. 83-116. 1992.
- BRACCINI, A. L. et al. Conservação de sementes de café-robusta (*Coffea canéfora* Pierre ex Frochner) cultivar conillon em função do grau de umidade e do tipo de embalagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 2, p. 160-169, 1998.
- BRANDÃO JÚNIOR, D. da S. **Marcadores da tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro**. 2000. 144 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)—Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- BRANDÃO JÚNIOR, D. S. et al. Tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 17-23, mar./abr. 2002.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. 1 ed. Brasília: Mapa/ACS, 2009.
- BREUSEGEM, F. V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, [S. l.], v. 161, n. 3, p. 405-414, aug. 2001.
- BUDZINSKI I. G. et al. Expression patterns of three  $\alpha$ -expansin isoforms in *Coffea arabica* during fruit development. **Plant Biol**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 462-471, july. 2011.
- BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 10, p. 788-795, 2008.
- BUITINK, J. et al. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. **The Plant journal**, [S. l.], v. 47, n. 5, p. 735-750, sep. 2006.
- BYTOF, G. et al. Transient occurrence of seed germination processes during coffee post-treatment. **Annals of Botany**, v. 100, n. 1, p. 61-66, may. 2007.
- CARVALHO, E. F. et al. Alterações isoenzimáticas em sementes de cultivares de soja em diferentes condições de armazenamento. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 49, n. 12, p. 967-976, dez. 2014.
- CIONI, M.; PINZAUTI, G.; VANNI, P. Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 70, n. 1, p. 1-26, 1981.

- CLEMENTE, A.C.S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 38-44, jul. 2011.
- COELHO, S. V. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, jun. 2015.
- CORBINEAU, F. Markers of seed quality: from present to future. **Seed sci. res.**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 61-68, feb. 2012.
- CORRÊA, P. C. et al. Efeito da temperatura de secagem na cor dos grãos de café pré processado por "via seca" e "via úmida". **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, n. 5, p. 22-27, 2002.
- CROMARTY, A. S.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. Design of seed storage facilities for genetic conservation. **International Board of Plant Genetic Resources**, v. 100, p. 1985.
- DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 152, n. 4, p. 465-512, dec. 2006.
- DE ROBERTIS, E.M.F.; HIB, J. **Bases da biologia celular e molecular**. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1998.
- DELOUCHE, J. C. Germinação, deterioração e vigor da semente. **Seed News**, Pelotas, n. 6, p. 24-31, nov/dez. 2002.
- DIETZ, K. J. et al. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. **J. Exp. Bot.**, [S. l.], v. 57, n. 8, p. 1697-1709, apr. 2006.
- DIETZ, K. J. Plant peroxiredoxins. **Annu Rev. Plant. Biol.**, [S. l.], v. 54, p. 93-107, june. 2003.
- DIETZ, K. J. et al. The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. **J. Exp. Bot.**, [S. l.], v. 53, p. 1321-9, may. 2002.
- DIPLOCK, A. T. et al. Functional food science and defense against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 77-112, aug. 1998.
- DIRK, L. M. A. et al. Multiple isozymes of endo- $\beta$ -mannanase in dry and imbibed seeds. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 1045-1056, nov. 1995.
- DOWNIE, B.; HILHORST, H. W. M.; BEWLEY, J. D. A new assay for quantifying endo- $\beta$ -mannanase activity using Congo Red dye. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 829-835, july. 1994.
- DUSSERT, S. et al. Biologie de la conservation des semences de caféiers : aspects fondamentaux et conséquences pratiques. **Cah Agric**, [S. l.], v. 21, n. 2-3, p. 106-114, 2012.

DUSSERT, S. et al. Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. **Physiol. Plant.** [S. l], v. 127, n. 2, p. 192-204, june. 2006.

DUSSERT, S. et al. Basis of coffee seed sensitivity to liquid nitrogen exposure: oxidative stress or imbibitional damage. **Physiol. Plant.**, [S. l], v. 119, n. 4, p. 534-543, nov. 2003.

DUSSERT, S. et al. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultralow temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition and cooling procedure. **Physiol. Plant.**, [S. l], v. 112, p. 495-504, mar. 2001.

EASTMOND, P. J.; GRAHAM, I. A. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. **Trends in Plant Science**, [S. l], v. 6, n. 2, p. 72-77, feb. 2001.

ELLIS, R. H.; HO, G. T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, may. 1991a.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. Effect of temperature and moisture content on the germination of papaya seeds. **Seed Science Research**, California, v. 1, p. 69-72, 1991b.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Review nutrition**, [S. l], v. 18, n. 10, p. 872-879, oct. 2002.

FERREIRA, D. F. **Programa de análises estatísticas (statistical analysis software) e planejamento de experimentos – SISVAR 5.0, build 67**, Lavras: DEX/UFLA, 2003. Software.

FINK, R. C.; SCANDALIOS, J. G. Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. **Arch Biochem Biophys**, [S. l], v. 399, n. 1, p. 19-36, mar. 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Final 2011 data and preliminary 2012 data for 5 major commodity aggregates now available. Rome, 2011.** Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 12 dez. 2011.

GARCIA, D. C. et al. A secagem de sementes. **Ciência Rural**, Santa maria, v. 34, n. 2, apr. 2004.

GASPARI-PEZZOPANE, C. et al. Gene expression profile during coffee fruit development and identification of candidate markers for phenological stages. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 47, n. 7, p. 972-982, july. 2012.

GENTIL, D. F. O. **Conservação de sementes de *Coffea arabica* L.: interferências do grau de umidade e da temperatura.** 1999. 41 p. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1999.

GEROMEL, C. et al. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. **Journal of Experimental Botany** (Online), [S. I], v. 57, n. 12, p. 3243-3258, aug. 2006.

GOMES, R. A. **Resposta antioxidativa de células in vitro de café (*Coffea arabica*) submetidas aos metais pesados cádmio (Cd) e níquel (Ni)**. 2006. 134 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

GRAHAM, I. A. Seed storage oil mobilization. **Annual review of plant biology**, v. 59, p. 115-42, june. 2008.

GROOT, S. P. C. et al. Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seed prior to radicle protrusion. **Planta**, [S. I], v. 174, n. 4, p. 500-504, dec. 1988.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2 ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.

HASLEKAS, C. et al. Seed 1-cysteine peroxiredoxin antioxidants are not involved in dormancy, but contribute to inhibition of germination during stress. **Plant Physiol**, [S. I], v. 133, n. 3, p. 1148-1157, nov. 2003.

HASLEKAS, C. et al. The expression of a peroxiredoxin antioxidant gene, AtPer1, in *Arabidopsis thaliana* is seed-specific and related to dormancy. **Plant Mol Biol**, [S. I], v. 36, n. 6, p. 833-845, apr. 1998.

HENDRY, G. A. F. et al. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytol**, [S. I], v. 122, n. 2, p. 273-279, apr. 1992.

HOFMANN, B.; HECHT, H. J.; FLOHE, L. Peroxiredoxins. **Biol Chem**, [S. I], v. 383, n. 3-4, p. 347-364, apr. 2002.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Optimum air-dry seed storage environments for Arabica coffee. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 20, p. 547-560, 1992.

ILLING, N. et al. The signature of seeds in resurrection plants: A molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. **Integrative and Comparative Biology**, [S. I], v. 45, n. 5, p. 771-787, nov. 2005.

INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M. Oxidative stress in plants. **Curr Opin Biotechnol**, [S. I], v. 6, n. 2, p. 153-158, 1995.

JIA, H.; SUZUKI, M.; MCCARTY, D. R. Regulation of the seed to seedling developmental phase transition by the LAFL and VAL transcription factor networks. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, [S.I], v. 3, n. 1, p. 135-145, feb. 2013.

- KANG, S. W.; BAINES, I. C. RHEE, S. G. Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. **J. Biol. Chem.**, [S. l], v. 273, n. 11, p. 6303-6311, mar. 1998.
- KAYIHAN, C. et al. Cu/Zn superoxide dismutase activity and respective gene expression during cold acclimation and freezing stress in barley cultivars. **Biologia plantarum**, [S. l], v. 56, n. 4, p. 693-698, dec. 2012.
- KHAN, B. R.; ADHAM, A. R.; ZOLMAM, B. K. Peroxisomal Acyl-CoA oxidase 4 activity differs between *Arabidopsis* accessions. **Plant Mol Bio**, [S. l], v. 78, n. 1-2, p. 45-78, jan. 2012.
- KONTOS, F.; SPYROPOULOS, C. G. Seed coat inhibits the production of  $\alpha$ -galactosidase and endo- $\beta$ -mannanase in the endo sperm of developing carob seeds. **Plant Physiol Biochem**, [S. l], v. 34, p. 787-793, 1996.
- LEE, K. O. et al. Rice 1 Cys-peroxiredoxin over-expressed in transgenic tobacco does not maintain dormancy but enhances antioxidant activity. **FEBS Lett**, [S. l], v. 486, n. 2, p. 103-106, dec. 2000.
- LEPRINCE, O.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, F. A. Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. **J Exp Bot**, [S. l], v. 50, n. 338, p. 15515–15524, 1999.
- LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, [S. l], v. 3, n. 4, p. 231-246, dec. 1993.
- MARRACCINI, P. et al. Molecular and biochemical characterization of endo- $\beta$ -mannanase from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. **Planta**, Berlin, v. 213, n. 2, p. 296-308. June. 2001.
- MARTINS, D. C. et al. Qualidade fisiológica de sementes de café provenientes de diferentes níveis de radiação solar e estádios de maturação. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 7., 2011, Araxá. **Anais eletrônicos...** Brasília : Embrapa - Café, 2011. 1 CD-ROM.
- MIGLIORANZA, E. **Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L. cv. Catuai) com diferentes teores de umidade, armazenadas em embalagens hermeticamente fechadas.** 1982. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1982.
- MIRANDA, J. M. **Estudo de alguns fatores que influenciam a duração da viabilidade de sementes de café (*Coffea arabica* L. cv. Catuai).** 1987. 60 p. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1987.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, [S. 1], v. 7, n. 9, p. 405-410, sep. 2002.

MIZZUNO, K. et al. Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.). **FEBS Letters**, v. 534, n. 1-3, p. 75-81, jan. 2003.

MONTEIRO, G. et al. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. **Proc Natl Acad Sci USA**, [S. 1], v. 104, n. 12, p. 4886-4891, mar. 2007.

MOORE, J. P. et al. Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, [S. 1], v. 14, n. 2, p. 110-117, feb. 2009.

MOWLA, S. B. et al. A novel stress-inducible antioxidant enzyme identified from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. **Planta**, [S. 1], v. 215, n. 5, p. 716-726, sep. 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 6 ed. New York: W.H. Freeman Publishers, 2013.

NELSON, D. L. COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre : Artmed, 2011.

NETTO, L. E. S. et al. Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. **Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol**, [S. 1], v. 146, n. 1-2, p. 180-193, sep. 2007.

NONOGAKI, H. et al. A germination-specific endo- $\beta$ -mannanase gene is expressed in the micropylar endo-sperm cap of tomato seeds. **Plant Physiol**, [S. 1], v. 123, n. 4, p. 1235-1245, aug. 2000.

NONOGAKI, H.; MOROHASHI, Y. Temporal and spatial pattern of the biochemical activation of the endosperm during and following imbibition of tomato seeds. **Physiol Plant**, [S. 1], v. 102, n. 2, p. 236- 242, feb. 1998.

OLIVER, M. J.; TUBA, Z.; MISHLER, B. D. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**, [S. 1], v. 151, n. 1, p. 85-100, nov. 2000.

OLIVER, M. J.; BEWLEY, J. D. Desiccation tolerance of plant tissues: a mechanistic overview. **Horticultural Reviews**, New York, v. 18, p. 171-213, july. 1997.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in: relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 9, n. 1, p. 13-37, oct. 1999.

PARKHEY, S. et al. ROS production and lipid catabolism in desiccating *Shorea robusta* seeds during aging. **Plant Physiology and Biochemistry**, India, v. 57, p. 261-267, june. 2012.

- PEREIRA, L. F. P. et al. Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. **Braz. J. Plant Physiol.**, Londrina, v. 17, n. 3, p. 283-289, sep. 2005.
- PERROIS, C. et al. Differential regulation of caffeine metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta). **Planta**, [S. l], v. 241, n. 1, p. 179-91, jan. 2015.
- PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable house Keeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Bestkeeper – Excel – based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, p. 509-515, mar. 2004.
- PHILLIPS, J. R.; OLIVER, M. J.; BARTELS, D. Molecular genetics of desiccation and tolerant systems. In: Black M, Pritchard H, eds. Desiccation and survival in plants: drying without dying. Wallingford, UK: **CABI Publishing**, p. 319–341, 2002.
- PRITCHARD, H. W. et al. Ecological correlates of seed desiccation tolerance in tropical African dryland trees. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 91, n. 5, p. 863-870, june. 2004.
- PUKACKA, S. The effect of desiccation on viability and phospholipid composition of *Acer saccharinum* L. seeds. **Trees**, [S. l], v. 3, n. 3, p. 144-148, dec. 1989.
- PULIDO, P.; CAZALIS, R.; CEJUDO, F. J. An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. **Plant J**, [S. l], v. 57, n. 1, p. 132-145, jan. 2009.
- QUETTIER, A. L.; EASTMOND, P. J. Storage oil hydrolysis during early seedling growth. **Plant physiology and biochemistry**, [S. l], v. 47, n. 6, p. 485-490, june. 2009.
- REINATO, C. H. R. **Secagem e armazenamento do café: Aspectos qualitativos e sanitários**. 2006. 111 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- RHEE, S. G.; CHAE, H. Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signalling. **Free Rad. Biol. Med.**, [S. l], v. 38, n. 12, p. 1543-1552, june. 2005.
- RHEE, S. G. et al. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. **IUBMB Life**, [S. l], v. 52, n. 1-2, p. 35-41, july. 2001.
- ROBERTS, E. H. Predicting the storage of life seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 3, p. 499-514, 1973.
- ROSA, S. D. V. F. Da et al. Effects of different drying rates on the physiological quality of *Coffea canéfora* Pierre seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, n. 2, p. 199-205, mar./apr. 2005

ROUHIER, N. et al. Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. **Plant Physiol**, [S. 1], v. 127, n. 3, p. 1299-1309, nov. 2001.

ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; JACQUOT, J. P. Glutaredoxin dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. **J Biol Chem**, [S. 1], v. 277, n. 16, p. 13609-13614, apr. 2002.

SAATH, R. **Qualidade do café natural e despulpado em diferentes condições de secagem e tempos de armazenamento**. 2010. 246 p. Tese (Doutorado em agronomia)–Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2010.

SALMONA, J. et al. Deciphering transcriptional networks that govern *Coffea arabica* seed development using combined cDNA array and real-time RT-PCR approaches. **Plant Mol Biol**, [S. 1], v. 66, n. 1-2, p. 105-124, jan. 2008.

SANTOS, G. S.; VON PINHO, E. V. R.; ROSA, S. D. V. F. Gene expression of coffee seed oxidation and germination processes during drying. **Genetics and Molecular Research**, Brasil, v. 12, n. 4, p. 6968-6982, december. 2013.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses, **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, [S. 1], v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHRODER, R.; ATKINSON, R. G.; REDGWELL, R. J. Re-interpreting the role of endo- $\beta$ -mannanases as mannanendotransglycosylase/hydrolases in the plant cell wall. **Annals of Botany**, [S. 1], v. 104, n. 2, p. 197-204, aug. 2009.

SELMAR, D. et al. Expression of isocitrate lyase and the abundance of  $\beta$ -tubulin: feasible markers for the estimation of germination processes in differently processed green coffees. In

INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 19., 2001, Trieste.  
**Abstracts** ... Trieste: ASIC, 2001. p. 257-260.

SELMAR, D. et al. Germination of coffee seeds and its significance for coffee quality. **Plant Biology**, [S. 1], v. 8, n. 2, p. 260-264, mar. 2006.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Review. European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SILVA, E. A. A. et al. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* L., cv. Rubi) seed germination. **Planta**, [S. 1], v. 220, n. 2, p. 251-261, dec. 2005.

SILVA, W. R.; DIAS, M. C. L. L. Interferência do teor de umidade das sementes de café na manutenção de sua qualidade fisiológica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 5, p. 551-560, 1985.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist, Oxford**, [S. l], v. 125, n. 1, p. 27-58, sep. 1993.

SOEDA, Y. et al. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level 1. **Plant physiology**, [S. l], v. 137, n. 1, p. 354-368, jan. 2005.

STACY, R. A. et al. A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancy-related gene, Per1, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. **Plant Mol Biol**, [S. l], v. 31, n. 6, p. 1205-1216, sep. 1996.

STACY, R. A. et al. The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER 1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. **Plant J**, [S. l], v. 19, n. 1, p. 1-8, july. 1999.

STILL, D. W.; BRADFORD, K. J. Endo- $\beta$ -mannanase activity from individual tomato endosperm caps and radicle tips in relation to germination rates. **Plant Physiol**, [S. l], v. 113, n. 1, p. 21-29, jan. 1997.

STRADER, L. C. et al. Conversion of endogenous indole-3-butyric acid to indole-3-acetic acid drives cell expansion in arabidopsis seedlings. **Plant Physiol**, [S. l], v. 153, n. 4, p. 1577-1586, 2010.

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

TAVEIRA, J. H. et al. Perfis proteicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. **Pesq. Agropec. Bras.**, [S. l], v. 47, n. 10, p. 1511-1517, 2012.

THOMAS, J. A. Estresse oxidativo e defesa contra antioxidantes. In.: SHILS, M. E. et al. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. v. 1, 9 ed, São Paulo: Manole, 2003. 1026 p.

TOOROP, P. E.; BEWLEY, J. D.; HILHORST, H. W. M. Endo- $\beta$ -mannanase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination. **Planta**, v. 200, n. 2, p. 153-158, oct. 1996.

TRUJILLO, M. Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite. **Subcell Biochem**, [S. l], v. 44, p. 83-113, 2007.

VANDENABEELE, J. D. S. et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Science**, Brasil, v. 57, n. 5, p. 779-795, jan. 2000.

VASCONCELOS, L. M.; GROTH, D.; RAZERA, L. F. Efeito de processos de secagem, diferentes graus de umidade e tipos de embalagens na conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 181-188, 1992.

VEIGA, A. D. et al. Armazenabilidade de sementes de cafeeiro em diferentes estádios de maturação e submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, [S. l], v. 29, n. 1, p. 83-91, 2007.

VERDIER, J. et al. A regulatory network-based approach dissects late maturation processes related to the acquisition of desiccation tolerance and longevity of *Medicago truncatula* seeds. **Plant Physiology**, [S. l], v. 163, n. 2, p. 757-774, oct. 2013.

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

VIEIRA, L. G. E. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 95-108, mar. 2006.

VOIGT, B. BEWLEY, J. D. Developing tomato seeds when removed from the fruit produce multiple forms of germinative and post germinative endo- $\beta$ -mannanase. Responses to desiccation, abscisic acid and osmoticum. **Planta**, [S. l], v. 200, n. 1, p. 71-77, 1996.

VOSSSEN, H. A. M. Methods of preserving the viability of coffee seed in storage. **Seed Science & Technology**, Zürich, v. 7, p. 65-74, 1979.

WANG, L. et al. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. **Jornal of proteomics**, China, v. 75, p. 2109-2127, jan. 2012.

YI, L. I. et al. Impact of ultra-dry storage on vigor capacity and antioxidant enzyme activities in seed of *Ammopiptanthus mongolica*. **Botanical Studies**, [S. l], v. 51, p. 465-472, may. 2010.

## APÊNDICE A

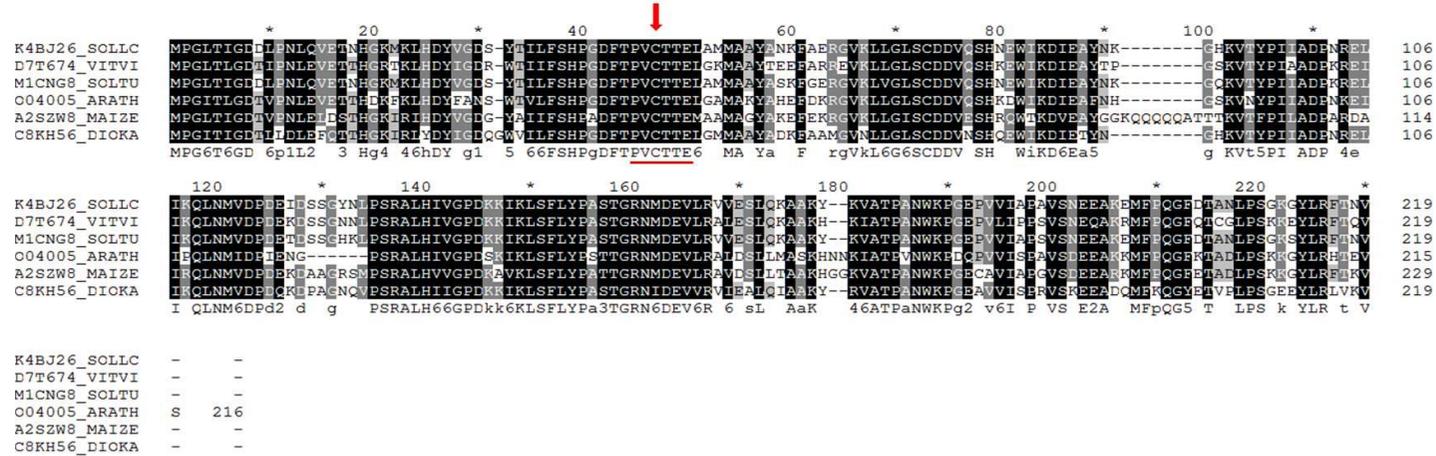
**Tabela 16** - Resumo da análise de variância de sementes de *C. arabica* submetidas à secagem(S) lenta, rápida, com diferentes teores de água(U) e tratamento controle(Test).

FV	G	PROT	G	FCE	NF	TZ	EM	IVE	MSP	MSR	EB
	L								A		
S	1	1352,0 **	0,125ns	24,50ns	98,00*	11,28n s	4,50ns	0,01 ns	0,001 ns	0,001 *	982,69 **
U	3	4738,6 **	14248,37 **	13895,1 **	2485,0 **	391,86 **	8716,5* *	0,45 **	1,23* *	0,04* *	646,75 **
S x U	3	760,0* *	127,37ns	133,83n s	675,00 **	17,11n s	129,83n s	0,03 **	0,03* *	0,003 **	305,53 **
(SxU) x Test	1	648,0* *	2255,68* *	2664,50 **	256,88 **	394,33 **	6766,72 **	0,33 **	0,36* *	0,013 **	197,16 **
Erro	27	30,07	46,72	55,40	14,88	25,02	154,66	0,06 2	0,005	0,03	504,6/ 18
CV	-	6,45	9,82	11,17	17,99	5,64	21,36	18,9 2	11,54	15,79	10,56

Fonte: Do autor (2017).

## APÊNDICE B

**Figura 12** - Múltiplo alinhamento das seqüências de aminoácidos da enzima 1 Cys Prx de seis espécies diferentes.



Seqüência proteica deduzida a partir de *Arabidopsis thaliana*, *AtPER1*, alinhada com 1-Cys Prxs de diferentes acessos de bases de dados públicas utilizando o *CLUSTALW2* e o editor de alinhamento *BIOEDITsequence*. O sítio ativo e conservado está indicado pela seta vermelha.

Fonte: Do autor (2017).