



MARINA CHAGAS COSTA

**ESTUDOS FISIOLÓGICOS E PROTEÔMICOS
RELACIONADOS À DESSECAÇÃO DE SEMENTES DE CAFÉ
DURANTE O ARMAZENAMENTO**

**LAVRAS - MG
2019**

MARINA CHAGAS COSTA

**ESTUDOS FISIOLÓGICOS E PROTEÔMICOS RELACIONADOS À DESSECAÇÃO
DE SEMENTES DE CAFÉ DURANTE O ARMAZENAMENTO**

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

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Coorientadora

Dra. Elise de Matos Pereira
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2019**

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

Costa, Marina Chagas.

Estudos fisiológicos e proteômicos relacionados à dessecação
de sementes de café durante o armazenamento / Marina Chagas
Costa. - 2019.

47 p.

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

Coorientador(a): Sttela Dellyzete Veiga Franco Rosa, Elise de
Matos Pereira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Coffea arabica. 2. Produção de plantas. 3. Tolerância à
dessecação. I. Von Pinho, Édila Vilela de Resende. II. Rosa, Sttela
Dellyzete Veiga Franco. III. Pereira, Elise de Matos. IV. Título.

MARINA CHAGAS COSTA

**ESTUDOS FISIOLÓGICOS E PROTEÔMICOS RELACIONADOS À DESSECAÇÃO
DE SEMENTES DE CAFÉ DURANTE O ARMAZENAMENTO**

**PHYSIOLOGICAL AND PROTEOMIC STUDIES RELATED TO THE
DESSICATION IN COFFEE SEEDS DURING THE STORAGE**

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

APROVADA em 16 de julho de 2019.

Dra. Heloisa Oliveira dos Santos UFLA

Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva UNESP

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

**LAVRAS - MG
2019**

À minha família, por tudo que representam em minha vida.

Com todo amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades, por me guiar pelo melhor caminho e estar sempre presente em minha vida me abençoando dia após dia.

Ao meu pai, Tarciso, por ser um exemplo de pessoa, por me ensinar valores que fazem de mim o que sou, por me apoiar e me proporcionar realizar meus sonhos.

À minha mãe, Adelaide, por me ensinar a ser paciente e persistir mesmo diante das dificuldades.

Aos meus irmãos, Mariana, Gabriela e Álvaro, por todo amor e carinho. Ao meu primo Gabriel, irmão de coração, por todo cuidado e companheirismo.

Aos meus avós, Maria Aparecida, Maria Leonor, Sebastião e Haroldo, por sempre estarem presentes em minha vida, por todo apoio e todas as orações.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT CAFÉ) pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento - 001.

À minha orientadora, Prof. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, por todo conhecimento transmitido, pela dedicação e incentivo e por me acolher durante toda minha trajetória acadêmica.

Às minhas coorientadoras, Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa e Dra. Elise de Matos Pereira e à Prof. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos, por toda ajuda e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, Dra. Heloisa Oliveira dos Santos e Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva por terem aceitado o convite.

A todos os membros do grupo de pesquisa da professora Édila, por toda ajuda e assistência durante a realização do experimento, por todos os momentos de alegria e descontração e, principalmente, pela amizade.

Aos professores e funcionários do Setor de Sementes, por toda disponibilidade e ajuda.

Às minhas amigas, Paola, Luiza e Júlia, por nunca deixarem que eu me sinta sozinha, pela amizade e por serem minhas maiores incentivadoras.

E a todos que, de alguma forma, ajudaram na realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Entender a fisiologia de sementes de *Coffea arabica* durante a dessecação e ao longo do armazenamento é de grande importância, uma vez que produção e a qualidade das sementes influencia o vigor de mudas utilizadas para a formação das lavouras. O objetivo neste trabalho, foi avaliar a qualidade fisiológica e a expressão de proteínas possivelmente relacionadas à tolerância à dessecação em sementes de *Coffea arabica* submetidas a secagem e ao armazenamento. Foram utilizadas sementes de *Coffea arabica* L. da cultivar Catuaí Amarelo (IAC 62) produzidas na fazenda Bom Jardim localizada em Bom Sucesso, Minas Gerais. Os frutos foram colhidos no estágio de maturação cereja, descascados e as sementes passaram pelo processo de degomagem natural (sem produtos químicos). As sementes foram secadas até atingirem os teores de água de 40%, 20% e 10% e posteriormente armazenadas por 60, 120 e 180 dias em câmara fria ($10 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR 70%). Foram utilizadas sementes com 46% de teor de água e sem armazenamento como tratamento controle. A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada por meio dos testes de primeira contagem de germinação, germinação, plântulas normais fortes aos 30 dias da semeadura, plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias da semeadura, emergência e índice de velocidade de emergência (IVE). Foram avaliadas também as expressões das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase tipo III (PO), peroxidase de ascorbato (APX), esterase (EST), álcool desidrogenase (ADH) pelas técnicas de eletroforese e de espectrofotometria e a expressão das proteínas resistentes ao calor pela técnica de eletroforese. As avaliações foram feitas antes do armazenamento das sementes e após 60, 120 e 180 dias. De modo geral, foi observado maior vigor das sementes, em todas as épocas de armazenamento, quando secadas a 40% de teor de água e menor vigor em sementes secadas a 10% de teor de água. Foi verificada redução da expressão das enzimas do complexo antioxidante em sementes com 40% de teor de água e aumento em sementes secadas a 20% e 10% de teor de água durante o armazenamento. O que também foi observado para as enzimas EST e ADH. Já para as proteínas resistentes ao calor, verificou-se que a partir dos 60 dias de armazenamento a expressão se diferenciou em sementes secadas a 40% de teor de água ao longo do armazenamento a expressão destas proteínas foram reduzidas. Pode-se concluir que o teor de água e o armazenamento influenciam a qualidade fisiológica de sementes de *Coffea arabica* e que sementes secadas a 40% de teor de água possui menor perda de viabilidade durante o armazenamento. A maior expressão de enzimas do sistema antioxidantes e das enzimas EST e ADH estão associadas à menor qualidade fisiológica de sementes e podem ser correlacionadas à intolerância à dessecação. A expressão das proteínas resistentes ao calor reduz ao decorrer do armazenamento.

Palavras-chave: Proteínas resistentes ao calor. Sistema antioxidante. Vigor. Eletroforese. Espectrofotometria.

ABSTRACT

Understanding the physiology of *Coffea arabica* seeds during desiccation and during storage is of great importance, since seed production and quality influence the vigor of seedlings used for the formation of crops. The objective was to evaluate the physiological quality and the expression of proteins possibly related to the desiccation tolerance in *Coffea arabica* seeds submitted to drying and storage. Seeds of *Coffea arabica* L. of the cultivar Catuaí Amarelo (IAC 62) were grown at the Bom Jardim farm located in Bom Sucesso, Minas Gerais. The fruits were harvested at the stage of cherry ripening, peeled and the seeds went through the process of natural degumming (without chemicals). Seeds were dried to 40%, 20% and 10% water and then stored for 60, 120 and 180 days in a cold room (10 ± 2 ° C and 70% RH). Seeds with 46% water content and without storage as control treatment were used. The physiological quality of the seeds was evaluated by first germination test, germination test, normal seedling at 30 days of sowing test, cotyledonary leaves expanded at 45 days of sowing test, emergence test and rate of emergence (IVE). Expressions of the enzymes superoxide deaminase (SOD), catalase (CAT), peroxidase type III (PO), ascorbate peroxidase (APX), esterase (EST) and alcohol dehydrogenase (ADH) were also evaluated by electrophoresis and spectrophotometry the expression of heat-resistant proteins by the electrophoresis technique. The evaluations were done before the storage of the seeds and after 60, 120 and 180 days. In general, seed vigor was observed at all storage times when dried at 40% water content and less vigor in seeds dried at 10% water content. Reduction of the expression of antioxidant complex enzymes in seeds with 40% water content and increase in seeds dried at 20% and 10% water content during storage was verified. This was also observed for the EST and ADH enzymes. As for the heat-resistant proteins, it was found that from the 60 days of storage the expression differed in seeds dried at 40% water content during the storage the expression of these proteins were reduced. It can be concluded that water content and storage influence the physiological quality of *Coffea arabica* seeds and that seeds dried at 40% water content have a lower loss of viability during storage. The higher expression of enzymes in the antioxidant system and the EST and ADH enzymes are associated with lower physiological seed quality and can be correlated with desiccation intolerance. Expression of the heat-resistant proteins reduces in the course of storage.

Keywords: Heat resistant protein. Antioxidant system. Vigor. Eletrophoresis. Spectrophotometry

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	A cultura do Café	12
2.2	Tolerância à dessecação em sementes.....	13
2.3	Mecanismos de tolerância à dessecação	14
2.3.1	Sistemas enzimáticos	14
2.3.2	Carboidratos solúveis.....	15
2.3.3	Proteínas resistentes ao calor	16
2.4	Tolerância à dessecação em sementes de Café.....	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	Local e materiais.....	18
3.2	Secagem das sementes.....	18
3.3	Armazenamento das sementes	19
3.4	Determinação do teor de água.....	19
3.5	Análises fisiológicas	19
3.5.1	Teste de germinação.....	20
3.5.2	Primeira contagem de germinação	20
3.5.3	Plântulas normais fortes – 30 dias	20
3.5.4	Plântulas com folhas cotiledonares expandidas – 45 dias.....	20
3.5.5	Teste de tetrazólio.....	20
3.5.6	Emergência e índice de velocidade de emergência	21
3.6	Análises Proteômicas.....	21
3.6.1	Análise das enzimas Esterase (EST), Álcool desidrogenase (ADH), Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Peroxidase tipo III (POX) pela técnica de eletroforese	21
3.6.2	Quantificação das enzimas Álcool desidrogenase (ADH), Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Peroxidase de Ascorbato (APX) por espectrofotometria.....	22
3.6.3	Análise de proteínas resistentes ao calor.....	23
3.7	Análises Estatísticas	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos agrícolas comercializado no mundo e no Brasil. O Brasil é o principal produtor e exportador, responsável por produzir 25% do café consumido no mundo e é um produto de grande importância social-econômica para o país (ARAÚJO et al., 2008; CLEMENTE et al., 2015; FARIAS et al., 2015).

A utilização de mudas de qualidade na implantação da lavoura de *Coffea arabica* é de grande importância, em função da influência sobre a produtividade da lavoura. As mudas utilizadas na implantação das lavouras são obtidas a partir de sementes, tornando imprescindível o uso de sementes com alta qualidade fisiológica, para a obtenção de mudas vigorosas em condições de campo (ARAÚJO et al., 2008; KIKUTI et al., 2002).

Em muitas pesquisas, tem sido observado que a qualidade fisiológica das sementes de café é influenciada pela secagem das sementes. A semente de *Coffea arabica* é considerada uma semente de tolerância intermediária à dessecação (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990), sendo que a dessecação influencia o potencial de armazenamento das sementes.

A tolerância à dessecação é considerada um mecanismo de sobrevivência e, em sementes, se dá por meio de sistemas protetores responsáveis por prevenir danos letais em diferentes componentes das células (BERJAK, 2006; SANTOS et al., 2014). Dentre esses sistemas, três importantes têm sido estudados: a acumulação de açúcares não reduzidos; sistemas enzimáticos capazes de prevenir, tolerar e reparar as ações de radicais livres, conhecidos como sistemas antioxidantes e ainda a expressão de proteínas resistentes ao calor (GUIMARÃES et al., 2002).

Progressos têm sido alcançados por meio de estudos da morfologia, anatomia e fisiologia de sementes de café durante a germinação e o armazenamento, porém, o comportamento destas sementes durante a secagem, associado ao armazenamento ainda é complexo e os resultados de pesquisas se mostram conflitantes. O conhecimento do limite que as sementes de *Coffea arabica* toleram à secagem e a interação entre o teor de água e a temperatura ao longo do armazenamento são importantes para a aplicação em programas de controle de qualidade visando a formação de mudas vigorosas.

Enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (PO), peroxidase de ascarbato (APX), esterase (EST) e álcool desidrogenase (ADH) podem possivelmente ser relacionadas à tolerância à dessecação em sementes, já que estão presentes em processos de eliminação de espécies reativas de oxigênio, deterioração e respiração anaeróbica. Já as proteínas resistentes ao calor são conhecidas por comporem um mecanismo

de tolerância à dessecação. O estudo da expressão destas proteínas consiste em um método sensível e específico, capaz de complementar a avaliação da qualidade fisiológica de sementes, podendo contribuir para o entendimento de processos deteriorativos que resultam na perda da qualidade em sementes.

Sabe-se que secagem influencia no vigor e viabilidade das sementes de *Coffea arabica* (VIEIRA et al., 2007). Logo, o maior desafio para pesquisadores, produtores e comerciantes é manter a viabilidade destas sementes, já que é necessário o armazenamento das sementes (DUSSERT et al., 2012).

Assim, objetivou-se nesta pesquisa avaliar a qualidade fisiológica e a expressão de proteínas em sementes de café submetidas à secagem e ao armazenamento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do Café

Considerado um produto de alto valor comercial, o café é produzido e consumido em diversos países (CLEMENTE; CARVALHO; GUIMARÃES, 2012). No Brasil, a cafeicultura é considerada uma das atividades mais tradicionais da agricultura (FAGAN; HENRIQUE; SOUZA, 2011). Dados apresentados pela Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2019) estimam que, no ano de 2019, a produção de café no Brasil alcance um volume de até 54,48 milhões de sacas beneficiadas, com uma área total plantada de 1.842,2 mil hectares, alcançando produtividades de 27,4 a 29,58 sacas por hectare.

A implantação de lavouras de café é realizada por meio de mudas e a semeadura para a produção destas é feita nos meses de maio/junho, utilizando-se sementes recém-colhidas ou armazenadas da safra anterior, tornando as condições de armazenamento um fator importante para garantir a qualidade das sementes, das mudas e também da lavoura (CARVALHO; ALMEIDA; GUIMARÃES, 2014).

Apesar de vários estudos nas áreas de morfologia, anatomia e fisiologia de sementes de café, as informações observadas nos resultados mostram-se conflitantes.

Guimarães et al. (2002) concluíram que as sementes de *Coffea arabica* apresentam redução de viabilidade e vigor quando são submetidas à secagem, dificultando o seu armazenamento. Isto se deve ao fato de as sementes de *Coffea arabica* serem consideradas de tolerância intermediária à dessecação (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990). Estas sementes toleram parcialmente a secagem e não toleram a dessecação a teores baixos de água ou a combinação de secagem com baixos teores de água e armazenamento.

Manter a qualidade fisiológica de sementes de café durante o armazenamento é um dos maiores desafios de produtores de sementes, uma vez que estas sementes perdem rapidamente a viabilidade, o que limita o potencial de armazenamento destas (ARAUJO et al., 2008).

Por meio de resultados de pesquisas, tem sido observado que o potencial de armazenabilidade das sementes de café é influenciado pelos métodos de secagem e teor de água destas no final do processo de secagem.

2.2 Tolerância à dessecação em sementes

A tolerância à dessecação pode ser definida como a habilidade de um organismo sobreviver à perda de água, sendo capaz de recuperar seu mecanismo após ser reidratado (OLIVER; TUBA; MISHLER, 2000). Pode também ser definida como a capacidade de um organismo equilibrar o seu conteúdo interno de água com o ambiente e restaurar o seu funcionamento normal após a reidratação (ALPERT, 2000). É considerado um mecanismo de sobrevivência presente em organismos vivos como animais, plantas, algas, líquens e bactérias (BERJAK, 2006).

Vale ressaltar que a tolerância à dessecação vai além da capacidade de sobreviver à perda extrema de água, ela também torna possível a sobrevivência por longos períodos no estado desidratado (BERJAK, 2006).

Em sementes, a tolerância à dessecação pode ser definida como a capacidade destas germinarem após serem submetidas à secagem. Essa tolerância se dá por meio de sistemas protetores que previnem danos letais em diferentes componentes das células como membranas, proteínas e citoplasma (GOLOVINA et al., 2001; SANTOS et al., 2014). Dentre esses sistemas, três importantes têm sido mais estudados: o acúmulo de açúcares não reduzidos; sistemas enzimáticos capazes de prevenir, tolerar e reparar ações de radicais livres; expressão de proteínas resistentes ao calor (GUIMARÃES et al., 2002).

As sementes foram classificadas de acordo com a capacidade de tolerar a secagem e o armazenamento, sendo inicialmente divididas em dois grupos por Roberts (1973). O primeiro grupo são as sementes capazes de suportar a secagem a baixos teores de água e o armazenamento por longos períodos a baixas temperaturas sem perda da viabilidade. Este grupo de sementes foi denominado ortodoxas.

O segundo grupo é composto por sementes que não possuem a capacidades de suportar a secagem e o armazenamento a baixas temperaturas e que não mantêm a sua viabilidade por longos períodos. Esse grupo foi denominado de recalcitrantes. Grande número de espécies pertencentes a este grupo são de importância econômica, porém, são de difícil manejo uma vez que são dispersas com alto teor de água, o que inviabiliza o armazenamento das mesmas por longos períodos o que leva à necessidade de produzir as mudas logo após a colheita (ROBERTS, 1973).

Posteriormente, Ellis, Hong e Roberts (1990) criaram um terceiro grupo denominado como sementes intermediárias. Neste grupo estão as sementes que suportam parcialmente a

dessecação e que permanecem viáveis por períodos de armazenamento maiores que as sementes recalcitrantes e menores que as ortodoxas.

2.3 Mecanismos de tolerância à dessecação

2.3.1 Sistemas enzimáticos

Quando as sementes são submetidas aos estresses, como a secagem e o armazenamento a baixas temperaturas e por períodos prolongados, há um aumento nas espécies reativas de oxigênio (EROs), como exemplo, o radical superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (O_2), que são capazes de causar danos oxidativos no DNA, em proteínas e em lipídeos. Estas EROs podem ser produzidas nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomas. Quando produzidos em excesso, esses radicais prejudicam a qualidade das sementes, porém, as células vegetais possuem sistemas antioxidantes capazes de prevenir e remover esses radicais produzidos (APEL; HIRT, 2004; SHARMA et al., 2012).

As plantas possuem mecanismos de eliminação de EROs, compostos de enzimas como a Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Peroxidase (PO). Essas enzimas, também conhecidas como enzimas “scavengers”, estão envolvidas na atividade antioxidativa para neutralizar radicais livres (EROs) produzidos quando a semente é submetida a algum estresse (APEL; HIRT, 2004; DUSSERT et al., 2006).

A Superóxido dismutase (SOD) age transformando o superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Logo após, a enzima Catalase (CAT) é responsável por neutralizar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um composto altamente tóxico para as sementes (APEL; HIRT, 2004; SANTOS et al., 2014).

No grupo das Peroxidases (PO), a principal enzima é a Peroxidase de ascorbato (APX), responsável por eliminar radicais livres, principalmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), convertendo o mesmo em água (H_2O) (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999).

Em condições de baixa disponibilidade de oxigênio, é muito importante controlar a quantidade de piruvato, pois esse é responsável por controlar a taxa de respiração. Enzimas como a Álcool Desidrogenase (ADH) estão presentes na rota anaeróbica, responsável por regenerar NAD e regular a quantidade de piruvato convertendo-o em etanol (ZABALZA et al., 2009).

A Esterase (EST) participa do grupo de enzimas do processo de deterioração, promovendo a hidrólise de ésteres diretamente ligados com o metabolismo de lipídeos, desestabilizando a bicamada lipídica e acentuando o processo de deterioração (SANTOS; VON PINHO; ROSA, 2013; VIEIRA; VON PINHO; SALGADO, 2006).

Os efeitos causados pelos processos de dessecação de sementes podem não ser detectados por meio das análises fisiológicas, sendo assim, algumas ferramentas auxiliares tornam-se úteis na elucidação destes. A análise do perfil de enzimas diretamente relacionadas ao processo de deterioração e também aquelas relacionadas ao sistema antioxidante, juntamente com os dados da qualidade fisiológica, propiciam melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nos processos de tolerância à dessecação em sementes (COELHO et al., 2017).

2.3.2 Carboidratos solúveis

Em sementes classificadas como ortodoxas, a tolerância à dessecação é adquirida durante a fase de acúmulo de reservas e aparentemente os carboidratos solúveis estão diretamente relacionados com esse processo (BERJAK; PAMMENTER, 2013; GU et al., 2013).

Durante o processo de secagem, os solutos presentes nas células ficam mais concentrados, aumentando a taxa de reações químicas responsáveis pela degradação das células. Acontece também a cristalização de solutos, alterando o pH da solução intracelular e a desnaturação de proteínas juntamente com o rompimento de membranas (KOSTER, 1991). Açúcares específicos são capazes de prevenir o efeito provocado pela dessecação nas membranas celulares, formando ligações de hidrogênio, substituindo a água normalmente associada com as superfícies das membranas, mantendo, assim, o espaçamento dos grupos de lipídios (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Quando o citoplasma é dessecado, a mobilidade molecular diminui e ocorre um fenômeno chamado vitrificação, um estado amorfo onde o líquido celular se assemelha a um material sólido e quebradiço, porém tem a capacidade de conter a desordem celular e preservar todas as suas propriedades. A formação do vidro se dá pela interação de açúcares e pontes de hidrogênio, sendo possível ser associado com a aquisição de tolerância à dessecação e longevidade das sementes. A principal função dos vidros intracelulares é a estabilidade dos componentes macromoleculares e estruturais das células durante o armazenamento (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001).

2.3.3 Proteínas resistentes ao calor

Durante a fase de acumulação de reservas, há também a acumulação de moléculas protetoras tais como as proteínas resistentes ao calor. Estas proteínas são capazes de proteger e prevenir os danos causados nas membranas de sementes durante a secagem, sendo relacionadas à tolerância à dessecação (BERJAK, 2006; GUIMARÃES et al., 2002; VIDIGAL et al., 2009).

A atividade das proteínas resistentes ao calor pode ser influenciada pela concentração de ácido abscísico (ABA), pelo estresse osmótico durante a embebição e também pela secagem prematura durante o desenvolvimento das sementes (BLACKMAN et al., 1991).

Uma característica importante que permite a sobrevivência após a secagem é a capacidade do organismo de proteger as membranas durante a fase de transição, impedindo que aconteça a perda de integridade das células. Esta característica é atribuída à deidrinases, heat shocks (HSP) e LEA, ou seja, às proteínas resistentes ao calor e só é possível devido ao fato de estas proteínas serem altamente hidrofílicas e terem a sua ocorrência em estruturas celulares específicas (BOUCHER et al., 2010; MACHEREL et al., 2007).

LEA proteínas desempenham um papel importante na tolerância à dessecação e a maior expressão pode ser relacionada à tolerância à dessecação (JOSÉ et al., 2005; MACHEREL et al., 2007).

As proteínas resistentes ao calor são um mecanismo essencial de resposta precoce que protege os organismos contra os estresses devido ao início da dessecação, agindo antes que os açúcares alcancem altos níveis (BLACKMAN; OBENDORF; LEOPOLD, 1992). Porém, açúcares e proteínas resistentes ao calor são compostos presentes em elevadas concentrações na composição de sementes e, se necessário, podem interagir para a formação de vidros intracelulares (BERJAK, 2006).

2.4 Tolerância à dessecação em sementes de Café

Em sementes de café, a tolerância à dessecação é adquirida tardiamente, na fase final de maturação, não dependendo das condições do ambiente, mas sim do estágio de desenvolvimento das mesmas (DUSSERT et al., 2018).

Sementes de *Coffea arabica* L. são consideradas como intermediárias, pois toleram parcialmente a dessecação e são sensíveis ao armazenamento em baixas temperaturas, diferente das sementes recalcitrantes, que não toleram a dessecação e o armazenamento e das

sementes ortodoxas, que toleram a dessecação e o armazenamento em baixas temperaturas (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990). Este baixo potencial de armazenamento das sementes de *Coffea arabica* pode ser influenciado por alguns fatores, sendo alguns deles: o teor de água inicial, as condições de secagem e condições de armazenamento (COELHO et al., 2015, 2017; GUIMARÃES et al., 2002).

O teor de água da semente após a secagem possui influência na qualidade fisiológica de sementes de café, podendo causar danos de embebição, lixiviação de nutrientes, desorganização dos sistemas de combate ao estresse oxidativo e hídrico, perda de germinação e degradação do endosperma e das membranas (SANTOS; VON PINHO; ROSA, 2013). Dussert et al. (2012) concluíram que há grande variação em relação ao teor máximo de água que a semente de *Coffea arabica* tolera, podendo variar de 5 à 16%.

Desta forma, diversos autores afirmam que a secagem e o armazenamento são aspectos fundamentais para a preservação da viabilidade das sementes de café, tendo reflexo na produção de mudas de qualidade (BRAZ; ROSSETTO, 2008).

Apesar dos avanços nos estudos sobre a dessecação de sementes de café, os resultados são controversos, o que justifica mais pesquisas nessa área uma vez que a sensibilidade à dessecação é o principal entrave para conservação destas sementes (DUSSERT et al., 2012).

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 *Coffea arabica* da cultivar Catuaí Amarelo (IAC62), no estágio de maturação cereja, produzidas na Fazenda Bom Jardim, Bom Sucesso- MG. Após a colheita, os frutos foram descascados mecanicamente. As sementes foram degomadas naturalmente e, nesse processo, ficaram por cerca de 20 horas em tanque sem água. Após a degonagem as sementes foram pré-secadas à sombra para a retirada da água superficial.

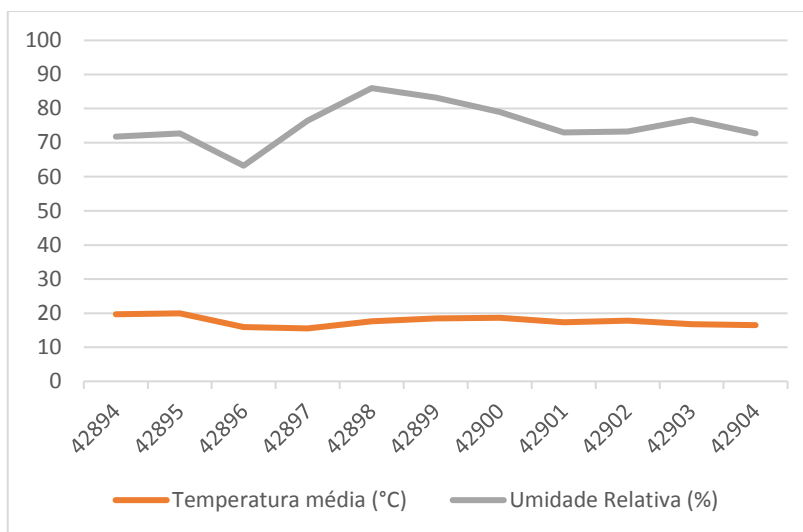
3.2 Secagem das sementes

As sementes foram espalhadas uniformemente no terreiro de cimento e revolvidas a cada uma hora. À tarde, as sementes foram enleiradas ainda quentes e cobertas com lona, para proteger do sereno da noite.

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 (40, 20 e 10%). O teor de água inicial das sementes era de 46%.

Os dados de temperatura média e umidade relativa durante a condução da secagem das sementes estão apresentados na Figura 1.

Figura 1 - Dados climáticos de Temperatura média (°C) e Umidade Relativa (%).



Fonte: Dados da Rede do Instituto Nacional de Meteorologia - INMET (2019).

3.3 Armazenamento das sementes

Após a secagem, as sementes foram acondicionadas em embalagens de rafia e estas colocadas em sacos de polietileno impermeáveis, com o intuito de manter os teores de água das sementes. Estas foram armazenadas por seis meses em ambiente controlado de câmara fria ($10 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR 70%).

A qualidade fisiológica das sementes e a expressão de proteínas foram avaliadas aos 0, 60, 120 e 180 dias de armazenamento.

3.4 Determinação do teor de água

A determinação do teor de água foi realizada pelo método de estufa a 105°C , durante 24 horas. 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).

3.5 Análises fisiológicas

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

3.5.1 Teste de germinação

Foi realizado com quatro repetições de 50 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).

3.5.2 Primeira contagem de germinação

No teste de germinação, foram contabilizadas as sementes protruídas aos 15 dias, segundo as prescrições da RAS (BRASIL, 2009).

3.5.3 Plântulas normais fortes – 30 dias

No teste de germinação, foram avaliadas as plântulas normais fortes, de acordo com o comprimento do eixo hipocótilo e sistema radicular. Foram consideradas como normais fortes as plântulas com eixo hipocótilo e sistema radicular com comprimento igual ou superior a três centímetros e os resultados foram expressos em porcentagem.

3.5.4 Plântulas com folhas cotiledonares expandidas – 45 dias

Aos 45 dias da sementeira, foram computadas as plântulas que apresentaram as folhas cotiledonares expandidas e os resultados foram expressos em porcentagem.

3.5.5 Teste de tetrazólio

Foi realizado com 100 sementes sem pergaminhos. As sementes foram colocadas em recipiente contendo água destilada para embebição por período de 48 horas, a 30°C (CLEMENTE; CARVALHO; GUIMARÃES, 2012). Após esse período, os embriões foram removidos. 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).

3.5.6 Emergência e índice de velocidade de emergência

Foram realizados com oito repetições de 25 sementes sem pergaminhos. As sementes foram semeadas em bandejas contendo substrato de areia e solo na proporção volumétrica de 2:1. Foram realizadas leituras a cada dois dias sendo consideradas como emersas as plântulas que apresentaram o cotilédone totalmente exposto. A emergência de plântulas em bandeja também foi realizada, considerando a porcentagem de plântulas normais emersas aos sessenta dias, nas mesmas condições relatadas acima. O índice de velocidade de emergência foi calculado utilizando a fórmula abaixo (MAGUIRRE, 1962).

$$IVE = E1/T1 + E2/T2 + \dots + Ei/Ti$$

Onde:

IVE é índice de velocidade de emergência;

E1 até Ei é o número de plântulas emersas a cada dia;

T1 até Ti é o tempo (dias).

3.6 Análises Proteômicas

3.6.1 Análise das enzimas Esterase (EST), Álcool desidrogenase (ADH), Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Peroxidase tipo III (POX) pela técnica de eletroforese

Para análise eletroforética das enzimas Esterase (EST), Álcool desidrogenase (ADH), Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Peroxidase tipo III (POX) as sementes foram trituradas na presença de PVP e nitrogênio líquido em mortar de porcelana e posteriormente as amostras foram armazenadas em *deep freezer*, à temperatura de -86°C.

Para a extração das enzimas, foi utilizado o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + (0,1% de mercaptoetanol), na proporção de 250µL por 100mg de sementes. O material foi homogeneizado em vortex e mantido por 2 horas, em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4°C.

A corrida eletroforética foi realizada em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH

8,9. Foram aplicados 60 μL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética foi efetuada a 120 V por 5 horas.

Terminada a corrida, os géis das enzimas Esterase (EST), Álcool desidrogenase (ADH), Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), e Peroxidase tipo III foram revelados conforme Alfenas et al. (2006).

3.6.2 Quantificação das enzimas Álcool desidrogenase (ADH), Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Peroxidase de Ascorbato (APX) por espectrofotometria

Para a análise das enzimas Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), Peroxidase de ascorbato (APX) e Álcool desidrogenase (ADH), as sementes foram maceradas na presença de PVP e nitrogênio líquido e, posteriormente, as amostras foram armazenadas em *deep-freezer* na temperatura de $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para a extração das enzimas Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD) e Peroxidase de ascorbato (APX) foram utilizados 0,050 g de cada material e adicionados 1,5 ml do tampão de extração (em cada microtubo) contendo 1452 μL de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), 15 μL de EDTA 100 mM, 15 μL de ácido ascórbico 100 mM, 6 μL de DTT 500 mM e 12 μL de PMSF. O material foi homogeneizado em vortex, seguido de centrifugação a 14.000 rpm a 4°C por 20 minutos. Em seguida, foi coletado o sobrenadante e transferido para outro microtubo (aproximadamente 1000 μL).

A atividade da enzima catalase foi avaliada por meio do espectrofotômetro de microplacas, utilizando microplacas ultravioletas. Utilizou-se uma alíquota de 5 μL do sobrenadante. Adicionaram-se 195 μL da solução de incubação contendo 100 μL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 85 μL de água destilada. O mix de incubação foi colocado em B.O.D. a 28°C , e por último, adicionados 10 μL peróxido de hidrogênio 250 mM. A leitura foi realizada na absorvância de 240 nm de 15 em 15 segundos durante 3 minutos. O coeficiente de extinção molar utilizado foi de $18\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

A atividade da enzima superóxido dismutase foi avaliada em espectrofotômetro de microplacas, utilizando-se microplacas visíveis e foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT). Utilizou-se uma alíquota de 5 μL do sobrenadante. Adicionou-se 195 μL da solução de incubação contendo 100 μL de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), 40 μL de metionina 70mM, 3 μL de EDTA 10 μM , 35 μL de água destilada, 15 μL de NBT 1 mM e 2 μL de riboflavina 0,2 mM. A placa de acrílico visível,

contendo o meio de incubação e a amostra, foi iluminada com lâmpada fluorescente por 7 minutos antes da leitura. A leitura foi realizada a 560 nm.

A atividade da enzima ascorbato peroxidase foi avaliada por meio do espectrofotômetro de microplacas, utilizando-se microplacas ultravioletas. Utilizou-se uma alíquota de 5 μL do sobrenadante. Adicionaram-se 195 μL da solução de incubação contendo 100 μL fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 10 μL de ácido ascórbico 10 mM, 75 μL de água destilada e 10 μL de peróxido de hidrogênio 250 mM (o mix de incubação foi colocado em B.O.D. a 28° C). A leitura foi realizada na absorvância de 290 nm de 15 em 15 segundos durante 3 minutos. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 1,4 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Na extração da enzima Álcool desidrogenase (ADH), foram utilizados 0,050 g de cada material e adicionados 800 μL do tampão de extração (em cada microtubo) contendo 400 μL de HEPES 200 mM, 0,6 μL de β -Mercaptoetanol, 138 μL de glicerol 87%, 261,4 μL de água e 6% do volume final de PVP. O material foi homogeneizado em vortex, seguido de centrifugação a 14.000 rpm a 4°C por 15 minutos. Em seguida, foi coletado o sobrenadante e transferido para outro microtubo (aproximadamente 600 μL).

A atividade da enzima álcool desidrogenase foi avaliada por meio do espectrofotômetro de microplacas, utilizando-se microplacas ultravioletas. Utilizou-se uma alíquota de 5 μL do sobrenadante. Adicionaram-se 175 μL da solução de incubação contendo 27 μL de Tris HCl 1 M (pH 8,0), 3,6 μL de NAD^+ 10 mg/mL, 134,4 μL de água destilada e 10 μL de etanol puro 98% (o mix de incubação foi colocado em B.O.D. a 30° C). A leitura foi realizada na absorvância de 340 nm de 15 em 15 segundos durante 3 minutos. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 6,22 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

A temperatura do ambiente no qual foram feitas a aplicação e a leitura foi de 28°C.

Para cada enzima, foi instalada uma placa contendo duas repetições biológicas e triplicatas para cada tratamento.

3.6.3 Análise de proteínas resistentes ao calor

Para a análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor, utilizou-se sementes maceradas na presença de PVP e nitrogênio líquido e, posteriormente, as amostras foram armazenadas em *deep-freezer* na temperatura de -86 °C

Em microtubos com capacidade de 1500 μL foi acrescentada solução tampão (50mM tris-HCL-7,5; 500mM NaCL; 5mM MgCl₂; 1mM PMSF) na proporção de 1:10 (peso do material: volume tampão de extração). Os homogeneizados foram centrifugados a 14000 rpm

por 30 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante incubado em banho-maria a 85 °C por 15 minutos e novamente centrifugado. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o pellet descartado. Antes da aplicação no gel os tubos de amostras contendo 70µL de extrato + 40µL de solução tampão da amostra foram colocados em banho-maria com água em ebulição por 5 minutos (BLACKMAN et al., 1991). Foram aplicados 50µL do extrato com proteínas + tampão da amostra por canaleta, em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 150 v por 8 horas e os géis corados em Coomassie Blue a 0,05%, durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10% (ALFENAS, 2006).

3.7 Análises Estatísticas

Para a análise dos resultados das avaliações da qualidade fisiológica e quantificação das enzimas por espectrofotômetro, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial [(3x4) + controle] sendo, três teores de água (40, 20 e 10%), quatro épocas de armazenamento (antes do armazenamento, 60, 120 e 180 dias após) e o controle (Adicional) com 46% de teor de água. Utilizou-se o programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) do pacote ExpDes para a análise dos dados de germinação e vigor, e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Utilizando do mesmo software, realizou-se o teste de Dunnett para a comparação da interação das médias entre cada tratamento com a média do tratamento controle a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação entre os fatores época de armazenamento e teor de água das sementes foi significativa para as variáveis resposta: primeira contagem de germinação (PC), emergência (E) e para a quantificação da enzima peroxidase de ascorbato (APX) pela técnica de espectrofotometria (TABELA 1).

Para as variáveis plantas normais fortes (PNF) e plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias (FC), houve diferença significativa para época de armazenamento e para o teor de água das sementes, porém a interação dos fatores não foi significativa. Já o índice de velocidade de emergência (IVE) foi influenciado pela época de armazenamento enquanto para a variável germinação (G) houve diferença significativa para o teor de água das sementes (TABELA 1).

Quando comparada a média geral dos tratamentos com a média do controle (sementes com 46% de teor de água e não armazenadas), o contraste foi significativo para as variáveis plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias (FC), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE) e para a quantificação da enzima catalase (CAT) pela técnica de espectrofotometria. Para a quantificação das enzimas superóxido desmutase (SOD) e álcool desidrogenase (ADH) pela técnica de espectrofotometria, houve diferença significativa para os fatores estudados (TABELA 1).

Foi feito o monitoramento do teor de água das sementes de todos os tratamentos antes das avaliações fisiológicas e proteômicas em todas as épocas de armazenamento, não sendo observada a variação do teor de água nos tratamentos.

Tabela 1 - Resumo da análise de variância dos dados obtidos no teste de primeira contagem de germinação (PC), germinação (G), plântulas normais fortes aos 30 dias (PNF), plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias (FC), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE) e quantificação das enzimas catalase (CAT), peroxidase de ascorbato (APX), superóxido desmutase (SOD) e álcool desidrogenase (ADH). UFLA, Lavras, 2019.

	QM									
	PC	G	PNF	FC	E	IVE	CAT	APX	SOD	ADH
Época	983,78*	54,89	1531,33*	710,89*	11809,94*	0,40*	29,89	27986,82	460,31	1163,81
Umidade	226,75*	665,58*	2048,08*	965,08*	577,17	0,02	79,37	3083,07	548,02	3775,87*
Época x Umidade	263,53*	51,81	244,08	194,64	1002,28*	0,03	58,66	114681,55*	422,98	547,62
Contraste	92,38	64,10	148,10	1025,64*	8308,01*	0,23*	978,35*	10351,24	0,51	1607,07
Resíduo	33,70	32,10	126,54	92,18	463,64	0,02	46,23	24195,26	206,89	989,08
CV(%)	6,59	6,67	26,67	14,80	6,49	11,69	9,40	0,42	2,51	4,04

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Fonte: Da autora (2019).

Pelos resultados da primeira contagem da germinação, 15 dias após a semeadura, verificou-se menor vigor das sementes antes de serem armazenadas (Época 1) em função do teor de água, sendo o menor vigor observado em sementes com 10% de teor de água. Para as demais épocas de armazenamento, não houve diferença significativa entre os tratamentos, considerando as sementes com 10%, 20% e 40% de teor de água (TABELA 2).

Quando comparada as médias dos tratamentos com a média do controle, maior vigor foi observado em sementes armazenadas por 60 e por 120 dias independentemente do teor de água das sementes e em sementes armazenadas por 180 dias com 20% de teor de água. (TABELA 2).

Tabela 2 - Porcentagem média de plântulas normais de *Coffea arabica* L. (15 dias após semeadura) oriundas de sementes com diferentes teores de água, armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2019.

Armazenamento	Primeira Contagem de Germinação (%)		
	10%	20%	40%
Época 1	59bC γ	75bB	90aA
Época 2	94aA γ	93aA γ	96aA γ
Época 3	93aA γ	94aA γ	92aA γ
Época 4	90aA	94aA γ	87aA
Controle	83		
CV (%)	6,60		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. γ Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Fonte: Da autora (2019).

Na Tabela 3, observa-se a redução da germinação das sementes secadas à 10% de teor de água. Não houve diferença significativa entre as sementes secadas a 20% e 40% de teor de água.

Guimarães et al. (2002) observaram que a secagem influencia negativamente a germinação de sementes de café, sendo essa influência menos drástica quando a semente é secada em teores mais altos de água, evidenciando a intolerância parcial à dessecação das sementes.

Não houve diferença dos valores de plântulas normais entre os tratamentos nos quais as sementes foram secadas com diferentes teores de água e o observado em sementes submetidas ao tratamento controle.

Tabela 3 - Porcentagem média de plântulas normais de *Coffea arabica* L. (30 dias após semeadura) oriundas de sementes com diferentes teores de água e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2019.

Teor de água (%)	Germinação (%)
10	78b
20	87a
40	90a
Controle (46%)	89
CV (%)	6,67

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Fonte: Da autora (2019).

Quando comparada a germinação das sementes submetidas ao tratamento controle com a germinação daquelas sementes secadas a 20% e 40% de teor de água, independentemente da época de armazenamento e com a observada em sementes com 10% de teor de água armazenadas por 60 dias não foi observada diferença estatística. No entanto, menores valores de germinação foram observados em sementes secadas a 10% de teor de água, sem serem submetidas ao armazenamento e armazenadas por 120 e 180 dias, quando comparadas ao valor observado em sementes com 46% de teor de água (controle) (TABELA 4).

Tabela 4 - Porcentagem média de plântulas normais de *Coffea arabica* L. (30 dias após semeadura) oriundas de sementes com diferentes teores de água, armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2019.

Armazenamento	Germinação (%)		
	10%	20%	40%
Época 1	75 γ	86	93
Época 2	83	87	93
Época 3	77 γ	89	91
Época 4	76 γ	89	83
Controle (46%)	89		
CV (%)	6,67		

γ Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Fonte: Da autora (2019).

Em relação às plântulas normais fortes, aos 30 dias após a semeadura, foi observado maior vigor em sementes secadas à 20% de teor de água. Nas porcentagens de plântulas normais fortes provenientes de sementes secadas a 10% e 40% de teor de água não houve diferença significativa (TABELA 5).

Santos, Von Pinho e Rosa (2013) observaram menor porcentagem de plântulas normais fortes em sementes degomadas por fermentação em água e secadas de forma lenta à

sombra até atingirem baixos teores de água, incluindo sementes secadas a 20% de teor de água, diferente do que foi observado neste trabalho quando as sementes que foram degomadas naturalmente, sem uso de água e secadas em terreiro a pleno sol.

Para variável porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, aos 45 dias após a semeadura, verifica-se menor vigor quando as sementes foram submetidas à secagem a 20% e 10% de teor de água (TABELA 5). Este resultado corrobora com o encontrado por Santos, Von Pinho e Rosa (2013), que observaram também a redução da porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas em função da secagem das sementes. Estes autores consideraram esta variável importante para a avaliação do vigor, pois sementes de café possuem cotilédones fotossintéticos que são responsáveis por acelerar o desenvolvimento das plântulas (FERREIRA; BORGUETTI, 2004; SANTOS; VON PINHO; ROSA, 2013).

Tabela 5 - Porcentagem média de plântulas normais fortes de *Coffea arabica* L. (30 dias após semeadura) e de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (45 dias após a semeadura) oriundas de sementes com diferentes teores de água e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2019.

Teor de água (%)	Plântulas Normais Fortes (%)	Plântulas com Folhas Cotiledonares Expandidas (%)
10	34b	57b
20	55a	64b
40	37b	73a
Controle (46%)	49	82
CV (%)	26,67	14,80

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Fonte: Da autora (2019).

Na Tabela 6, observa-se as porcentagens de plântulas normais fortes, 30 dias após a semeadura e de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, 45 dias após a semeadura, em função da época de armazenamento. Durante as primeiras épocas de armazenamento, não houve diferença estatística entre os valores de vigor. Porém, a porcentagem de plântulas normais fortes reduziu significativamente aos 180 dias de armazenamento. A porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas decresceu aos 120 e 180 dias de armazenamento, não diferenciando estatisticamente entre si.

Estes resultados corroboram com Coelho et al. (2015), os quais verificaram que com armazenamento há redução das porcentagens de plântulas normais fortes e de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, prejudicando o vigor de sementes de *Coffea arabica*.

Não houve diferença estatística significativa dos valores observados para essas variáveis respostas quando comparadas ao valor observado para as provenientes de sementes submetidas ao tratamento controle.

Tabela 6 - Porcentagem média de plântulas normais fortes (30 dias após a semeadura) e de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (45 dias após a semeadura) de *Coffea arabica* L. em quatro épocas de armazenamento e proveniente de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2019.

Armazenamento	Plântulas Normais Fortes (%)	Plântulas com Folhas Cotiledonares Expandidas (%)
Época 1	53a	70a
Época 2	46a	71a
Época 3	43a	64ab
Época 4	26b	54b
Controle (46%)	49	82
CV(%)	26,67	14,80

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Fonte: Da autora (2019).

Na Tabela 7 é possível observar a comparação entre a porcentagem de plantas normais fortes provenientes do tratamento controle com a porcentagem observada em sementes submetidas aos demais tratamentos. Foi observado menor vigor em sementes armazenadas durante 180 dias (Época 4), independentemente do teor de água. Maior vigor foi verificado em sementes secadas a 20% de teor de água e não submetida ao armazenamento (Época 1).

Tabela 7 - Porcentagem média de plântulas normais fortes de *Coffea arabica* L. (30 dias após semeadura) oriundas de sementes com diferentes teores de água, armazenadas por diferentes períodos e armazenamento e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2019.

Armazenamento	Plântulas Normais Fortes (%)		
	10%	20%	40%
Época 1	35	72 γ	52
Época 2	42	63	35
Época 3	35	56	39
Época 4	26 γ	30 γ	23 γ
Controle		49	
CV (%)		26,67	

γ Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Fonte: Da autora (2019).

Os valores observados para a variável folhas cotiledonares expandidas, provenientes de sementes secadas a 10% de teor de água, independentemente do tempo de armazenamento,

as sementes com 20% de teor de água e armazenadas por 120 e 180 dias (Épocas 3 e 4) e as sementes com 40% do teor de água armazenadas por 180 dias (Época 4) foram estatisticamente inferiores em relação aos observados para as sementes submetidas ao tratamento controle (TABELA 8).

Por meio desta variável, observa-se que há redução do vigor quando as sementes de café são secadas principalmente a 10% de teor de água, mesmo quando não armazenadas. Também, mesmo com os teores de água mais altos, 20% e 40% a partir dos 120 dias de armazenamento há redução do vigor, o que pode comprometer a formação de mudas (TABELA 8).

Tabela 8 - Porcentagem média de plântulas com folhas cotiledonares expandidas de *Coffea arabica* L. (45 dias após semeadura) oriundas de sementes com diferentes teores de água e armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2019.

Armazenamento	Plântulas com Folhas Cotiledonares Expandidas (%)		
	10%	20%	40%
Época 1	62 \bar{x}	68	81
Época 2	57 \bar{x}	71	86
Época 3	55 \bar{x}	64 \bar{x}	73
Época 4	56 \bar{x}	55 \bar{x}	52 \bar{x}
Controle	82		
CV (%)	14,80		

\bar{x} Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.
Fonte: Da autora (2019).

Verificou-se que a emergência de plântulas decresce ao longo do armazenamento e o grau dessa redução varia com o teor de água das sementes quando armazenadas. Foi observado menor vigor em sementes armazenadas com 40% de teor de água aos 180 dias de armazenamento. Com exceção das sementes secadas a 10%, 20% e 40% e não armazenadas e das sementes secadas com 10% de teor de água e armazenadas por 60 dias, em sementes submetidas aos demais tratamentos, houve redução do percentual de plântulas com folhas cotiledonares expandidas quando comparado com ao observado em sementes submetidas ao tratamento controle (TABELA 9).

Resultados semelhantes foram encontrados por Vieira et al. (2007), os quais observaram que a porcentagem de emergência e o índice de velocidade de emergência decresce em função do armazenamento das sementes.

Tabela 9 - Porcentagem média de emergência de sementes de *Coffea arabica* L. oriundas de sementes com diferentes teores de água e armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2019.

Armazenamento	Emergência (%)		
	10%	20%	40%
Época 1	61aA	69aA	84aA
Época 2	48abA	44abA γ	37bA γ
Época 3	24bA γ	27bA γ	14bcA γ
Época 4	34abA γ	37bA γ	9cB γ
Controle	74		
CV (%)	6,49		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si, no nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. γ Médias diferem da testemunha, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Fonte: Da autora (2019).

Em relação ao índice de velocidade de emergência de plântulas, é possível verificar que o vigor decresce ao longo do armazenamento, sendo possível observar um decréscimo mais acentuado nos valores de emergência de plântulas provenientes de sementes armazenadas aos 120 e 180 dias (TABELA 10).

Tabela 10 - Porcentagem média de índice de velocidade de emergência de plântulas de *Coffea arabica* L. oriundas de sementes armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2019.

Armazenamento	Índice de Velocidade de Emergência
Época 1	0,39a
Época 2	0,24b
Época 3	0,11c
Época 4	0,13c
Controle (46%)	0,40
CV(%)	11,69

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, no nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Fonte: Da autora (2019).

Quando comparado o índice de velocidade de emergência (IVE) de plântulas proveniente de sementes submetidas ao tratamento controle com o observado em sementes provenientes dos demais tratamentos, observou-se que as sementes com 40% de teor de água armazenadas por 60 dias (Época 2) e as sementes armazenadas por 120 (Época 3) e 180 (Época 4) dias diferiram estatisticamente do tratamento controle com menores valores de IVE desses em relação ao IVE observado em sementes submetidas ao tratamento controle (TABELA 11).

Tabela 11 - Valores médios do índice de velocidade de emergência de plântulas de *Coffea arabica* L. oriundas de sementes com diferentes teores de água e armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2019.

Armazenamento	Índice de Velocidade de Emergência		
	10%	20%	40%
Época 1	0,34	0,37	0,46
Época 2	0,27	0,26	0,20 γ
Época 3	0,12 γ	0,14 γ	0,07 γ
Época 4	0,17 γ	0,18 γ	0,04 γ
Controle		0,40	
CV (%)		11,69	

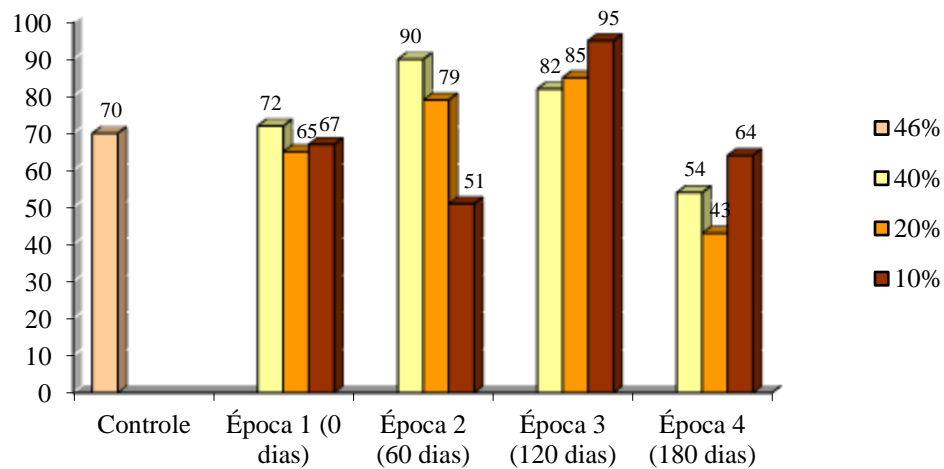
Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si, no nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. γ Médias diferem da testemunha, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Fonte: Da autora (2019).

Na Figura 2, observa-se a porcentagem de embriões viáveis pelo teste de tetrazólio. Por meio deste teste foi possível verificar que o vigor aumentou, em valores absolutos, em sementes armazenadas por 60 dias (Época 2) com 40% e 20% de teor de água e para as sementes armazenadas por 120 dias (Época 3) com 20% e 10% de teor de água. Já para as sementes armazenadas por 180 dias (Época 4), foi possível observar redução nos valores de embriões viáveis, com o maior valor absoluto verificado em sementes com 10% de teor de água.

Os resultados observados no teste de tetrazólio não foram consistentes quando comparados aos observados nos demais testes utilizados nessa pesquisa para a avaliação da qualidade fisiológica. Em sementes de outras espécies, tem sido observado que o teste de tetrazólio pode superestimar o vigor das sementes.

Figura 2 - Porcentagem de embriões viáveis de *Coffea arabica* pelo teste de tetrazólio (TZ) oriundos de sementes com diferentes teores de água e armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle.

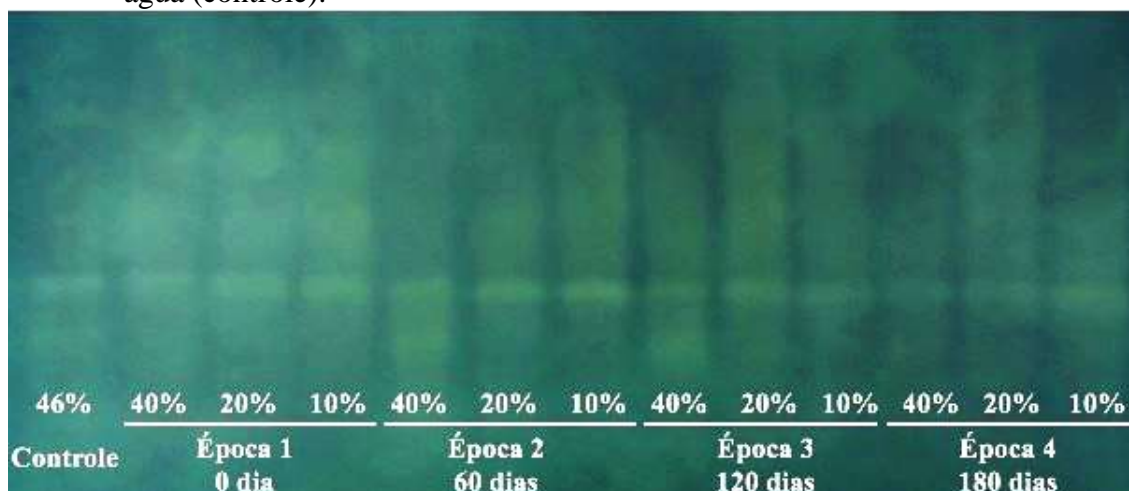


Fonte: Da autora (2019).

Quando as sementes são submetidas a estresses, como a secagem e o armazenamento a baixas temperaturas e por períodos prolongados, há aumento nas espécies reativas de oxigênio (EROs). As plantas possuem mecanismos de eliminação de EROs, compostos de enzimas como a Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Peroxidase (PO), que são capazes de prevenir e remover esses radicais produzidos. Estas enzimas fazem parte do sistema antioxidante das plantas (APEL; HIRT, 2004; DUSSERT et al., 2006).

Na Figura 3, está representado o padrão da enzima superóxido dismutase (SOD) observado em sementes de café com diferentes teores de água e armazenadas por diferentes períodos. Em sementes com 40% de teor de água, após 60 dias de armazenamento foi observado uma nova isoforma da SOD, podendo verificar menor expressão da enzima em sementes secadas até 40% de teor de água e armazenadas por 180 dias.

Figura 3 - Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) em sementes de *Coffea arabica* submetidas à secagem até os teores de água 40%, 20% e 10% armazenadas por diferentes períodos de armazenamento e com 46% de teor de água (controle).



Fonte: Da autora (2019).

A Superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima a agir contra as EROs, essa transforma o superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Logo após, a enzima Catalase (CAT) é responsável por neutralizar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um composto altamente tóxico para as sementes (APEL; HIRT, 2004; SANTOS et al., 2014). As enzimas SOD, CAT e PO também estão associadas à remoção de produtos indesejados resultantes da peroxidação de lipídeos (TAVEIRA et al., 2012).

Em relação à quantificação da atividade da enzima superóxido dismutase (TABELA 12) pelo método de espectrofotometria, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 12 - Quantificação da enzima Superóxido Dismutase (SOD) por espectrofotometria em sementes de *Coffea arabica* L. com diferentes teores de água, armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras 2019.

Armazenamento	Superóxido Dismutase		
	10%	20%	40%
Época 1	79,85	71,30	68,55
Época 2	66,55	72,05	32,50
Época 3	81,25	92,60	58,00
Época 4	59,65	65,85	79,55
Controle		68,45	
CV (%)		2,51	

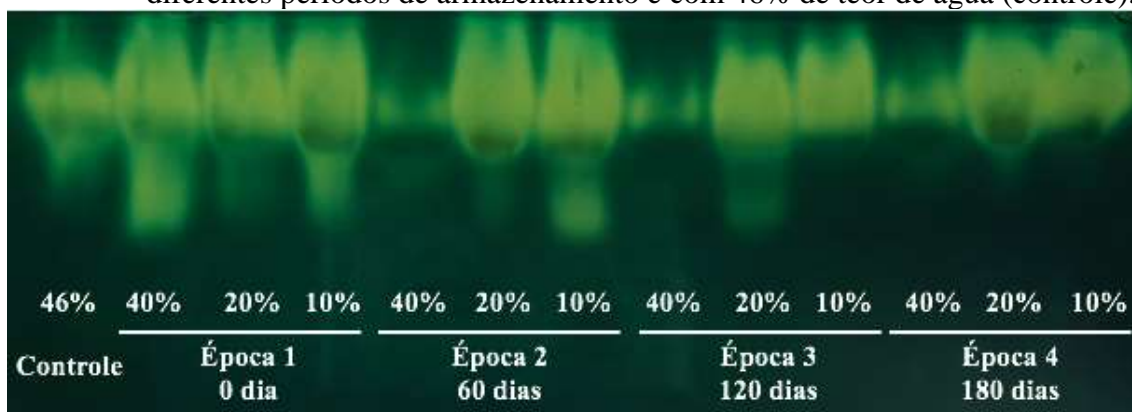
Fonte: Da autora (2019).

Ao analisar a expressão da enzima catalase (CAT), é possível observar menor expressão das sementes submetidas à secagem até atingirem 10% de teor de água e armazenadas por 60 e 120 dias, seguida daquelas com 46% de teor de água (controle). Na época 1, verifica-se maior expressão em sementes com 40% de teor de água e menor com 20% de teor de água. É possível verificar que a partir da época 2, há o aumento da expressão da enzima quando há a redução do teor de água das sementes. Logo, em sementes secadas a 10% e 20% de teor de água há maior expressão da enzima, indicando maior estresse por secagem (FIGURA 4).

Estes resultados corroboram com os observados por Santos et al. (2014), os quais observaram que a expressão da enzima catalase é menor em sementes não submetidas à secagem e verificaram também aumento da expressão em sementes que foram submetidas à secagem.

A enzima catalase tem como função converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), resultante da ação da enzima superóxido dismutase, em água (H_2O) (APEL; HIRT, 2004).

Figura 4 - Atividade enzimática da catalase (CAT) em sementes de *Coffea arabica* submetidas a secagem até os teores de água 40%, 20% e 10% armazenadas por diferentes períodos de armazenamento e com 46% de teor de água (controle).



Fonte: Da autora (2019).

Quando quantificada a atividade da enzima catalase (CAT) pela técnica de espectrofotometria, não houve diferença entre os tratamentos (TABELA 13).

Tabela 13 - Quantificação da enzima Catalase (CAT) por espectrofotometria em sementes de *Coffea arabica* L. com diferentes teores de água e armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras 2019.

Armazenamento	Catalase		
	10%	20%	40%
Época 1	22,43	18,76	15,09
Época 2	12,93	16,08	15,00
Época 3	12,59	29,71	16,31
Época 4	21,28	17,41	10,36
Controle		31,65	
CV (%)		9,40	

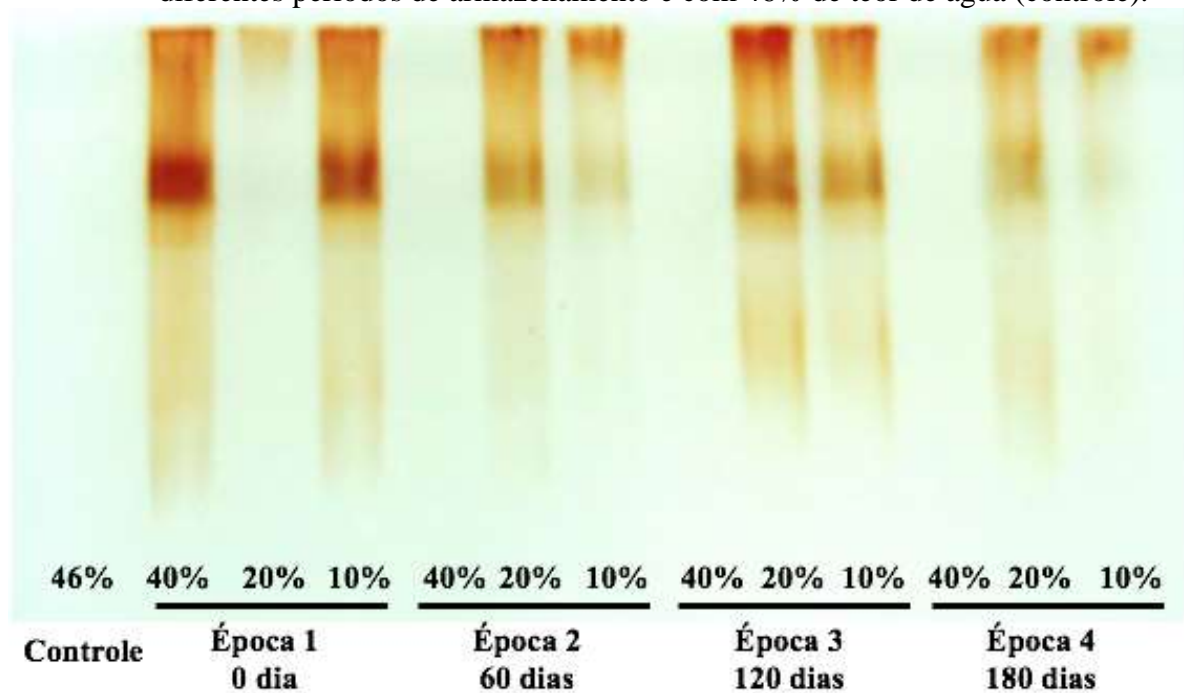
Fonte: Da autora (2019).

Em relação aos padrões para a enzima Peroxidase (PO) em sementes com 46% de teor de água (controle) não houve expressão. Em sementes não armazenadas (Época 1), maior expressão da enzima foi observada em sementes secadas a 40% e 10% de teor de água. Nas épocas seguintes, maior expressão foi observada em sementes armazenadas e secadas a 10% e 20% de teor de água. A expressão da enzima pode ser relacionada ao dano por estresse por secagem até baixos teores de água, uma vez que não foi observada expressão da mesma em sementes armazenadas com 40% de teor de água (FIGURA 5). Importante ressaltar que a partir de 60 dias de armazenamento maior atividade da enzima PO foi observada em sementes secadas até 20% de teor de água. Para Taveira et al. (2012), a enzima peroxidase pode ser considerada um indicador fisiológico da deterioração em sementes de café.

Coelho et al. (2015) observaram, em seu experimento, que o aumento da expressão da enzima peroxidase está relacionado à redução no teor de água das sementes.

A peroxidase, assim como a catalase, é responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), composto altamente tóxico para as sementes, em água (H_2O) (APEL; HIRT, 2004).

Figura 5 - Atividade enzimática da peroxidase (POX) em sementes de *Coffea arabica* submetidas a secagem até os teores de água 40%, 20% e 10% armazenadas por diferentes períodos de armazenamento e com 46% de teor de água (controle).



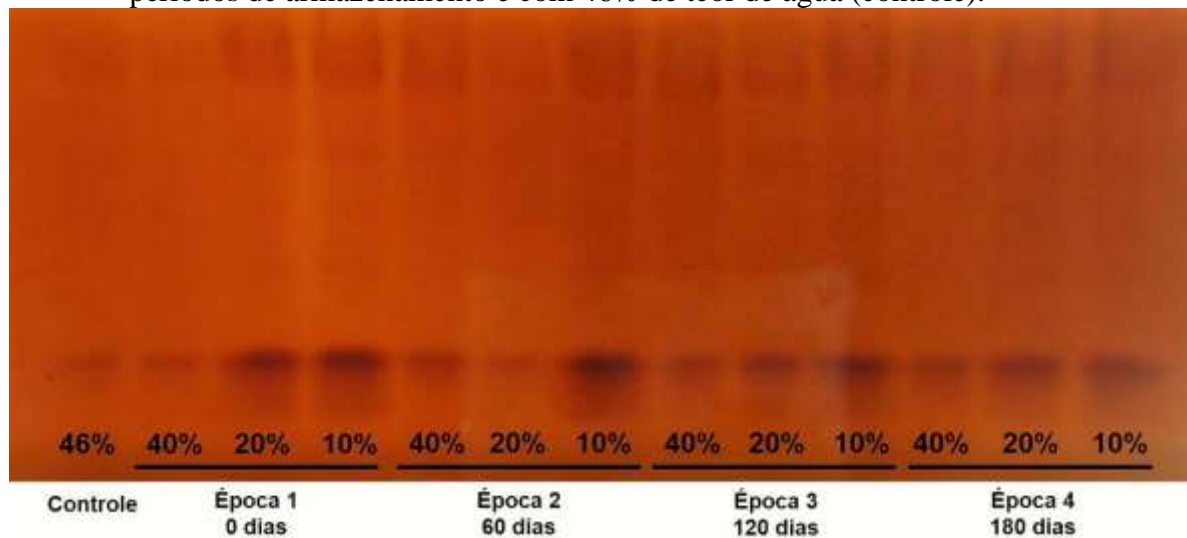
Fonte: Da autora (2019).

A enzima esterase está envolvida em reações de hidrólise de ésteres, diretamente associada ao metabolismo de lipídios. O aumento da sua atividade pode demonstrar que ocorreu deterioração, podendo contribuir para que aconteça a redução da qualidade da semente (SAATH et al., 2014).

Na Figura 6 é possível observar maior expressão da enzima esterase à medida que ocorre a redução do teor de água das sementes, independente da época de armazenamento. De acordo com Saath et al. (2014), este aumento está relacionado com a oxidação de lipídeos, identificando a degradação das membranas celulares das sementes armazenado.

Coelho et al. (2015) observaram que o aumento da expressão da enzima esterase está relacionado à diminuição da qualidade fisiológica de sementes de *Coffea arabica*, que reduziu com a secagem das sementes. Quando comparada a expressão da enzima esterase com os resultados dos testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes, foi possível observar menor qualidade e maior expressão dessa enzima em sementes secadas a 10% de teor de água, independentemente da época de armazenamento, confirmando o observado por Coelho et al. (2015).

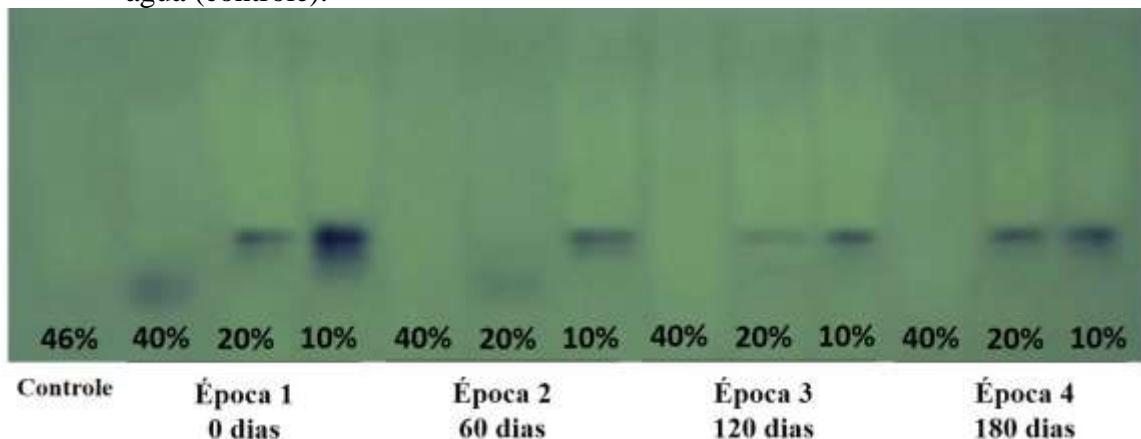
Figura 6 - Atividade enzimática da esterase (EST) em sementes de *Coffea arabica* submetidas a secagem até os teores de água 40%, 20% e 10% armazenadas por diferentes períodos de armazenamento e com 46% de teor de água (controle).



Fonte: Da autora (2019).

Em relação à enzima álcool desidrogenase (ADH), verifica-se maior expressão em sementes secadas até 10% de teor de água. Aos 180 dias de armazenamento houve aumento da expressão da ADH também em sementes secadas até 20% de teor de água. Essa enzima também está relacionada ao estresse causado pela secagem a baixos teores de água. A partir da Época 2, não houve expressão da enzima nas sementes secadas até 40% do teor de água (FIGURA 7). Esta enzima é responsável por controlar a taxa de respiração anaeróbica (ZABALZA et al., 2009).

Figura 7 - Atividade enzimática da álcool desidrogenase (ADH) em sementes de *Coffea arabica* submetidas a secagem até os teores de água 40%, 20% e 10% armazenadas por diferentes períodos de armazenamento e com 46% de teor de água (controle).



Fonte: Da autora (2019).

Foi observada maior atividade da enzima ADH pela técnica de espectrofotometria em sementes secadas até 20% do teor de água e menor atividade em sementes secadas até 40% do teor de água. A atividade da ADH em sementes secadas até 10% não se diferenciou estatisticamente da atividade observada em sementes secadas até 20% e 40% do teor de água (TABELA 14).

Tabela 14 - Quantificação da enzima Álcool desidrogenase (ADH) por espectrofotometria em sementes de *Coffea arabica* L. com diferentes teores de água e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras 2019.

Teor de água (%)	Álcool desidrogenase
10	55,77ab
20	81,20a
40	37,97b
Controle (46%)	87,82
CV (%)	4,04

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Fonte: Da autora (2019).

Quando comparada atividade da enzima álcool desidrogenase pelo método de espectrofotometria de sementes submetidas ao tratamento controle com o observado em sementes provenientes dos demais tratamentos, não foi possível observar diferenças significativas.

Tabela 15 - Quantificação da enzima Álcool desidrogenase (ADH) por espectrofotometria em sementes de *Coffea arabica* L. com diferentes teores de água e armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras 2019.

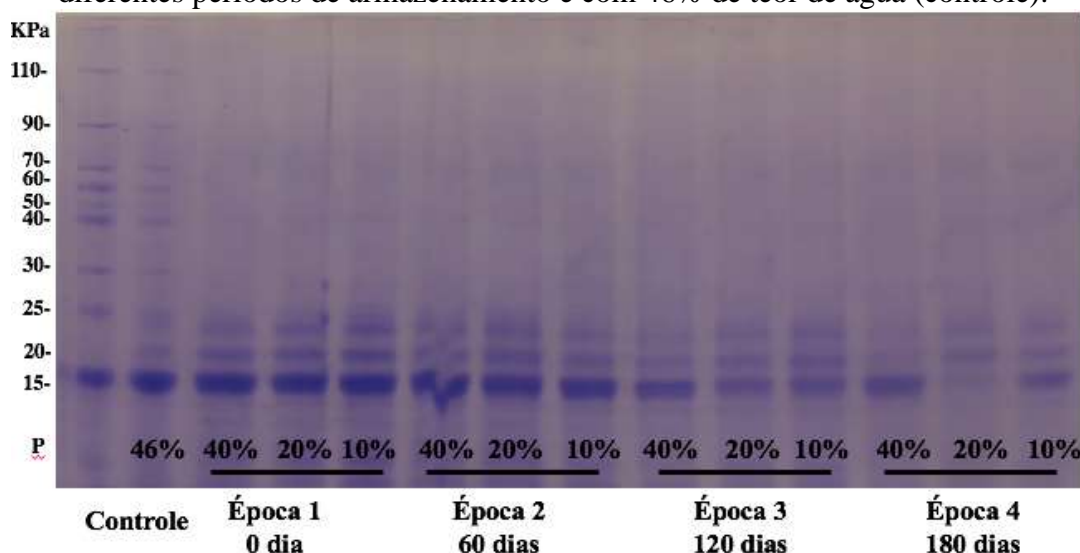
Armazenamento	Álcool desidrogenase		
	10%	20%	40%
Época 1	42,40	57,10	33,13
Época 2	44,78	65,93	43,97
Época 3	53,81	109,18	19,97
Época 4	82,07	92,58	54,81
Controle		87,82	
CV (%)		4,04	

Fonte: Da autora (2019).

Ao analisar a Figura 8, verifica-se que a expressão das proteínas resistentes ao calor foi reduzida ao longo do armazenamento, com menor expressão em sementes armazenadas por 180 dias, indicando que as proteínas resistentes ao calor foram degradadas.

Em sementes de café, as proteínas resistentes ao calor podem agir como um agente protetor de membranas, sendo assim, as modificações na sua expressão podem ser relacionadas a tolerância à dessecação (GUIMARÃES et al., 2002).

Figura 8 - Atividade das proteínas resistentes ao calor em sementes de *Coffea arabica* submetidas à secagem até os teores de água 40%, 20% e 10% e armazenadas por diferentes períodos de armazenamento e com 46% de teor de água (controle).



Fonte: Da autora (2019).

Taveira et al. (2012) concluíram que a expressão de proteínas resistentes ao calor e de enzimas do sistema antioxidantes são variáveis promissoras para diferenciar a qualidade de sementes de café após os manejos pós-colheita.

Para a atividade da enzima peroxidase de ascorbato (APX) pela técnica de espectrofotometria, foi possível observar menor atividade em sementes com 10% de teor de água armazenadas por 120 dias e em sementes com 20% de teor de água armazenadas por 60 dias. Já, quando comparada à atividade da enzima em sementes do tratamento controle com os demais tratamentos, verifica-se maior atividade em sementes com 20% de teor de água armazenadas por 120 dias (Época 3) (TABELA 16).

Tabela 16 - Quantificação da enzima Peroxidase de Ascorbato (APX) por espectrofotometria em sementes de *Coffea arabica* L. com diferentes teores de água e armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras 2019.

Armazenamento	Peroxidase de ascorbato		
	10%	20%	40%
Época 1	619,05aA	423,60abA	317,11aA
Época 2	601,26aA	212,19bA	449,76aA
Época 3	217,95aB	854,00aA γ	664,57aA
Época 4	569,07aA	489,53abA	428,05aA
Controle	406,33		
CV (%)	0,42		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si, no nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. γ Médias diferem da testemunha, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Fonte: Da autora (2019).

A atividade das enzimas feitas por meio da técnica de eletroforese e das proteínas resistentes ao calor pode ser associada aos resultados dos testes de qualidade fisiológica, confirmando o estresse ocorrido pela secagem durante o armazenamento das sementes.

Quando comparada a expressão das enzimas pela técnica de eletroforese com a quantificação das enzimas pela técnica de espectrofotometria é possível verificar que a técnica de eletroforese se mostra mais promissora para diferenciar a expressão das enzimas de interesse entre os tratamentos.

A análise da atividade de enzimas é um método rápido, sensível e específico que complementa a avaliação da qualidade fisiológica de sementes. As enzimas estão associadas ao metabolismo das sementes, estando presentes em processos como o de germinação e mecanismo de proteção durante a secagem e o armazenamento (ABREU et al., 2014). O estudos dos sistemas enzimáticos contribuem para o entendimento de processos deteriorativos, que resultam na perda da qualidade fisiológica de sementes (TAVEIRA et al., 2012).

5 CONCLUSÕES

A qualidade fisiológica de sementes de *Coffea arabica* é influenciada pelo teor de água e pelo armazenamento. Sementes com 40% de teor de água mantiveram o seu vigor durante o armazenamento até 180 dias.

Foi observado menor vigor das sementes de café secadas a 10% do teor de água antes e durante o armazenamento por 180 dias.

As enzimas do sistema antioxidante e as enzimas esterase (EST) e álcool desidrogenase (ADH) podem ser associadas à tolerância à dessecação.

A expressão das proteínas resistente ao calor reduziu ao longo do armazenamento para os teores de água avaliados.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. A. S. et al. Behavior of coffee seeds to desiccation tolerance and storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 4, p. 399–406, 2014.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627 p.
- ALPERT, P. The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 151, n. 1, p. 5–17, 2000.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004.
- ARAUJO, R. F. et al. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) despolpado e não despolpado. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 71–78, 2008.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 478, p. 1–9, 2013.
- BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 16, p. 1–15, 2006.
- BLACKMAN, S. A. et al. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant physiology**, Bethesda, v. 96, n. 3, p. 868–74, 1991.
- BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 100, n. 1, p. 225–230, 1992.
- BOUCHER, V. et al. MtPM25 is an atypical hydrophobic late embryogenesis-abundant protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins. **Plant, Cell and Environment**, Glasgow, v. 33, n. 3, p. 418–430, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 399 p.
- BRAZ, M. R. S.; ROSSETTO, C. A. V. Condicionamento fisiológico na germinação e no vigor de sementes armazenadas de café. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1849–1856, 2008.
- CARVALHO, C. A. M.; ALMEIDA, T. T.; GUIMARÃES, R. M. Plântulas de café originadas de sementes armazenadas e submetidas ao condicionamento fisiológico em matriz sólida. **Pesquisas Agrárias e Ambientais**, Champaign, v. 2, n. 3, p. 166–169, 2014.
- CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 37, n. 9/10, p. 949–962, 1999.

CLEMENTE, A. C. S.; CARVALHO, M. L. M.; GUIMARÃES, R. M. Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para sementes de café recém colhidas e armazenadas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 4, p. 415–423, 2012.

CLEMENTE, A. C. S. et al. Post-harvest operations and physicochemical and sensory quality of coffees. **Coffee Science**, Lavras, v. 10, n. 2, p. 233–241, 2015.

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

COELHO, S. V. B. et al. Tolerance of *coffea arabica* L. seeds to sub zero temperatures. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 41, n. 3, p. 312–321, 2017.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**. Brasília, 2019.

DUSSERT, S. et al. Coffee seed conservation biology: fundamental aspects and practical implications. A review. **Cahiers Agricultures**, London, v. 21, n. 2/3, p. 106–114, 2012.

DUSSERT, S. et al. Integrative analysis of the late maturation programme and desiccation tolerance mechanisms in intermediate coffee seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 69, n. 7, p. 1583–1597, 2018.

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

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behavior? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 238, p. 1167–1174, 1990.

FAGAN, E. B.; HENRIQUE, C.; SOUZA, E. Efeito do tempo de formação do grão de café (*Coffea* sp) na qualidade da bebida. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 5, p. 729–738, 2011.

FARIAS, E. T. et al. Expression studies in the embryo and in the micropylar endosperm of germinating coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seeds. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 75, n. 2, p. 575–581, 2015.

FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

GOLOVINA, E. A.; HOEKSTRA, F. A.; VAN AELST, A. C. The competence to acquire cellular desiccation tolerance is independent of seed morphological development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 358, p. 1015–27, 2001.

GUIMARÃES, R. M. et al. Tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 128–139, 2002.

GU, L. et al. Functional analysis of the 5' regulatory region of the maize GALACTINOL SYNTHASE2 gene. **Plant Science**, Limerick, v. 213, p. 38–45, 2013.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Sciences**, Cambridge, v. 6, n. 9, p. 431–438, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **BDMEP-Banco de dados meteorológicos para ensino e pesquisa**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>>. Acesso em: 02 jul. 2019.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 2, p. 115–121, 2005.

KIKUTI, A. L. P. et al. Application of antioxidant on coffee seeds (*Coffea arabica* L.) aiming at quality preservation. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 663–672, 2002.

KOSTER, K. L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 96, n. 1, p. 302–304, 1991.

MACHEREL, D. et al. Function and stress tolerance of seed mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 129, n. 1, p. 233–241, 2007.

MAGUIRRE, J. D. Speed of germination-aid seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176–177, 1962.

OLIVER, M. J.; TUBA, Z.; MISHLER, B. D. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 151, n. 1982, p. 85–100, 2000.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 01, p. 13–37, 1999.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, p. 39–52, 1973.

SAATH, R. et al. Activity of some isoenzymatic systems in stored coffee grains. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 1, p. 15–24, 2014.

SANTOS, F. C. et al. Desiccation sensitivity from different coffee seed phenological stages. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 25–31, 2014.

SANTOS, G. C.; 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**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 6968–6982, 2013.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, London, p. 1–26, 2012.

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

VIDIGAL, D. S. et al. Sweet pepper seed quality and lea-protein activity in relation to fruit maturation and post-harvest storage. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 37, n. 1, p. 192–201, 2009.

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, 2007.

VIEIRA, M. G. G. C.; VON PINHO, E. V. R.; SALGADO, K. C. P. C. Técnicas moleculares em sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 232, p. 88–96, 2006.

ZABALZA, A. et al. Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 149, n. 2, p. 1087–1098, 2009.