

TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)¹

RENATO MENDES GUIMARÃES²
MARIA DAS GRAÇAS GUIMARÃES CARVALHO VIEIRA²
ANTÔNIO CARLOS FRAGA²
ÉDILA VILELA DE RESENDE VON PINHO²
VANY PERPÉTTUA FERRAZ³

RESUMO – Com o objetivo de avaliar o desenvolvimento de mecanismos de tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro em diferentes estádios de maturação, foram conduzidos ensaios nos Laboratórios de Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras - UFLA e de Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Sementes de cafeeiro da cultivar Rubi foram colhidas nos campos de produção da UFLA quando se encontravam nos estádios de desenvolvimento caracterizados como verde, verde-cana e cereja. Os tratamentos constaram de métodos de secagem: convencional, em câmara com umidade do ar controlada (Higrostat) e sem secagem. As avaliações

foram feitas pelos testes de germinação, velocidade de germinação, dosagens de açúcares em HPLC e eletroforese de proteínas LEA's. De acordo com os resultados, concluiu-se que as sementes de cafeeiro apresentam redução de vigor e viabilidade quando submetidas à secagem. O vigor aumenta sensivelmente na fase de desenvolvimento entre os estádios verde e verde-cana. As proteínas estáveis ao calor (LEA proteínas) se correlacionam com a tolerância à dessecação existente nas sementes de cafeeiro. A sacarose não é fator limitante para aquisição de tolerância à dessecação. Glicose, rafinose e estaquiose não foram detectadas em embriões de sementes de cafeeiro.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Sementes, café, *Coffea arabica*, tolerância à dessecação, maturação.

DESICCATION TOLERANCE IN COFFEE SEEDS (*Coffea arabica* L.)

ABSTRACT – The development of mechanisms of desiccation tolerance was studied in coffee seeds at different maturation stages. Trials were conducted at the Seed Laboratory from the Department of Agriculture of the Federal University of Lavras (UFLA) and Chromatography Laboratory of the Department of Chemistry from the Federal University of Minas Gerais (UFMG). Coffee seeds cv. Rubi were harvested from an experimental field at UFLA at the developmental stages characterised as green, yellow and red. The treatments consisted of conventional drying, drying under controlled air humidity in chambers with saturated salt solution (Higrostat) and without drying. Evaluations

were done by means of germination percentage, germination velocity index, HPLC sugar dosage and Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins gel electrophoresis. The results demonstrated that seed vigor and viability were reduced when submitted to drying. Seed vigor increased the green to the yellow stage. The pattern of accumulation of LEA heat-stable proteins correlated with the level of desiccation tolerance presented by the coffee seeds at the different developmental stages. Sucrose appeared not to be a limiting factor for acquisition or induction of desiccation tolerance; glucose, raffinose and stachiose were could not be detected in embryos of developing coffee seeds.

INDEX TERMS: Seeds, coffee, *Coffea arabica*, desiccation tolerance, maturation.

-
1. Parte da tese apresentada à UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS – UFLA, Caixa Postal 37 – 37200.000 – Lavras, MG, pelo primeiro autor, como requisito para obtenção do Título de Doutor.
 2. Professores do Departamento de Agricultura – UFLA.
 3. Professora do Departamento de Química – UFMG.

INTRODUÇÃO

As sementes representam, para a maioria das espécies, não apenas a estrutura básica de propagação, fundamental para o sucesso da atividade agrícola, mas também um reservatório genético que pode ser preservado de maneira segura, econômica e por períodos longos de tempo. Entretanto, algumas espécies de plantas, em que estão incluídas as do gênero *Coffea*, apresentam sementes com potencial de longevidade de poucos meses, variando em função das diferentes espécies, modo de preparo das sementes, condições de armazenamento e outros fatores ainda desconhecidos e que precisam ser investigados. A tolerância à dessecação em sementes parece ser mediada por sistemas protetores que previnem danos letais em diferentes componentes celulares, incluindo membranas, proteínas e citoplasma. Três importantes sistemas têm sido caracterizados: (1) a acumulação de açúcares não reduzidos; (2) a habilidade para prevenir, tolerar ou reparar ataque de radicais livres; (3) proteínas LEA. Em relação à acumulação de açúcares não reduzidos que estabilizam membranas e proteínas em condições de sementes secas, existem evidências de que açúcares solúveis atuando como “substitutos da água” podem desenvolver um importante papel na tolerância à dessecação em sementes, por proteger membranas de mudanças de fase lipídica induzida por dessecação e também proteger proteínas, e pela formação de vidro a temperaturas fisiológicas (Leprince *et al.*, 1993). Sobre a habilidade para prevenir, tolerar ou reparar ataque de radicais livres durante a dessecação, sabe-se que radicais livres são naturalmente produzidos durante o metabolismo das plantas, particularmente em cloroplastos e mitocôndria (Senaratna & McKersie, 1986; Halliwell, 1987; Leprince *et al.*, 1990; Puntarulo *et al.*, 1991). As plantas são bem dotadas com moléculas antioxidantes e removedoras daqueles radicais. Moléculas removedoras de radicais livres incluem antioxidantes lipossolúveis (ácido ascórbico, glutathione); as sementes contêm altas concentrações de tais substâncias variando em diferentes tecidos e diferentes sementes (Franzen & Haas, 1991); sistemas enzimáticos processadores de radicais livres incluem superóxido dismutase (SOD) que cataliza a dismutação de superóxido (O_2^-) em H_2O_2 e O_2 e aquelas enzimas envolvidas na desintoxicação de H_2O_2 (isto é, catalase, glutathione reductase, ascorbato e outras peroxidases). Sistemas enzimáticos são mais provavelmente envolvidos em uma resposta anti-oxidante inicial pela neutralização do oxigênio ativado, potencialmente tóxico, formado durante a restrição hídrica. Os recentes

desenvolvimentos em Biologia Molecular têm proporcionado muitos estudos durante os últimos anos sobre a expressão e regulação gênica, em resposta à severa perda de água durante a maturação de sementes. Mudanças no padrão de proteínas e mRNA durante os últimos estádios de maturação e o início da tolerância à dessecação têm sido investigadas em diversas espécies, como, por exemplo embriões de cevada (Bartels *et al.*, 1988), embriões de milho (Bochicchio *et al.*, 1988) e sementes de soja (Blackman *et al.*, 1991). Diversos grupos de proteínas têm sido correlacionados temporariamente com a transição da intolerância para tolerância. Esses grupos caracterizados como LEA têm sido detectados num grande número de espécies de sementes incluindo cevada, cenoura, algodão, milho, ervilha, nabo, arroz, girassol, tomate e trigo (Dure *et al.*, 1989; Skriver & Mundy, 1990; Lane, 1991). Tratamentos com ABA exógeno, que regula a aquisição de tolerância à dessecação, propiciaram o aparecimento dessas proteínas em embriões cultivados *in vitro*. Entretanto, nenhum desses mecanismos anteriormente citados consegue estabelecer a tolerância à dessecação completamente ou exclusivamente. Acredita-se que a tolerância à dessecação provavelmente não pode ser atribuída a um simples mecanismo de proteção; ao contrário, ela parece ser um fenômeno multifatorial em que cada componente é igualmente crítico, agindo em sinergismo e controlado pelo genoma (Leprince *et al.*, 1993).

Com esta pesquisa, objetivou-se avaliar a aquisição de tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro, obtidas de frutos em diversos estádios de desenvolvimento e submetidas a diferentes métodos de secagem.

MATERIAL E METODOS

Os ensaios foram realizados nos Laboratórios de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras e de Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, no período de janeiro de 1998 a janeiro de 1999.

Sementes de cafeeiro da cultivar Rubi foram colhidas dos campos de produção de sementes da Universidade Federal de Lavras, em três diferentes estádios de desenvolvimento: verde, verde-cana e cereja. Cada estádio foi obtido em época distinta, quando as plantas apresentavam a maior parte dos frutos no estádio objeto da colheita, em plantas tomadas aleatoriamente. Os frutos foram colhidos dos ramos médios das plantas e das partes medianas dos ramos. Após a colheita dos frutos

em cada estágio, esses eram selecionados para uniformização do estágio de maturação, em que se consideraram-se: - verdes – frutos com o exocarpo de coloração verde-escura, sem nenhuma mancha ou sinal de amadurecimento; - verde-cana- frutos com a coloração do exocarpo amarelada, com manchas de amarelo a vermelho, mostrando sinais do início da maturação dos frutos; - cereja – frutos com exocarpo de coloração vermelho-intenso, característico de maduro na cultivar Rubi. Logo após a colheita e seleção, os frutos de cada estágio foram submetidos à determinação do teor de água pelo método da estufa ($105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24 horas) (Brasil, 1992).

Obtenção dos tratamentos

As sementes foram avaliadas em cada estágio de desenvolvimento, nas seguintes condições relativas à secagem: **-sem secagem-** imediatamente após a colheita, antes que os frutos perdessem água; **-secagem convencional-** os frutos foram colocados em camada única dentro de bandejas plásticas e deixados em ambiente de laboratório, por 24 dias, até o equilíbrio higroscópico. **-secagem em ambiente controlado-** a secagem em ambiente controlado foi realizada pelo controle artificial da umidade relativa no interior de câmaras (Higrostat) (Fig.1). O aparelho consiste de uma caixa de acrílico com tampa para fechamento hermético, à qual foi adaptado um fundo telado, suspenso cerca de 20 cm em relação ao fundo verdadeiro, e um sistema de circulação de ar interno, com a finalidade de promover uma constante homogeneização da umidade relativa do ar dentro da caixa. No fundo

da caixa, numa bandeja, foi colocada uma solução salina higroscópica que, em função do tipo de sal utilizado, propicia uma dada umidade relativa do ar dentro da caixa. A solução salina utilizada no higrostat foi preparada dissolvendo-se o sal específico em água fervendo, em quantidade suficiente para alcançar a saturação. A saturação foi confirmada pela formação de cristais no fundo dos recipientes que continham as soluções, após o resfriamento para a temperatura na qual foi realizada o tratamento (20°C). Para o preparo das soluções, foi adotada metodologia descrita por Medeiros (1996) e consultado MERCK (1989) para obtenção da solubilidade do sal. O sal utilizado foi o carbonato de potássio (K_2CO_3), do qual foram gastos 5Kg para o preparo de 3 litros de solução, que propiciou uma umidade relativa dentro do higrostat de 48,4%. Os frutos foram colocados sobre o fundo telado em camada única dentro do higrostat (20°C e 48,4-%UR), onde permaneceram por oito dias, até atingirem o equilíbrio higroscópico. Em seguida, foram retiradas amostras para determinação do teor de água (sementes no fruto) e a secagem foi completada em 16 dias, à sombra, até o equilíbrio higroscópico no mesmo ambiente onde estavam as sementes do tratamento secagem convencional. Após cada tratamento, parte dos frutos foi descascada manualmente e as sementes avaliadas pelo teste de germinação, velocidade de germinação e condutividade elétrica, e outra parte submetida ao congelamento e mantida em "deep freezer" a -82°C , para futuras determinações bioquímicas (Determinação de Açúcares e Análise eletroforética de LEA's Proteínas).

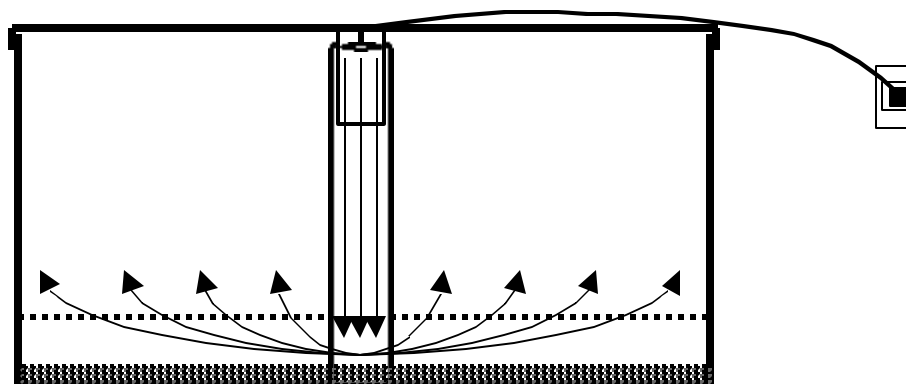


FIGURA 1 – Esquema de um higrostat. UFLA, Lavras, MG, 2000.

Determinação do grau de umidade dos frutos

Foram realizadas determinações do grau de umidade dos frutos logo após a colheita de cada estágio, após a retirada dos mesmos do Higrostat e após estabelecimento do equilíbrio higroscópico com o ambiente (método secagem em ambiente controlado) e ao final do processo da secagem convencional. Foram utilizadas duas amostras (frutos inteiros) de 20g cada uma e adotaram-se os procedimentos prescritos pelas Regras para Análise de Sementes (RAS) para o método da estufa a $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (Brasil, 1992).

Testes de velocidade de germinação e de germinação

Como substrato foi utilizado o rolo de papel-toalha umedecido com água na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel. Os rolos em número de quatro, contendo, em cada um 50 sementes sem pergaminho, foram mantidos em germinador regulado à temperatura de 30°C . Foram realizadas contagens a cada 3 dias, registrando-se o número de plântulas que apresentavam raiz primária com comprimento maior ou igual a 1mm. Após a estabilização desses valores, foi calculado o índice de velocidade de germinação, pelo somatório do número de sementes registrado a cada dia, dividido pelo número de dias decorridos entre a semeadura e a contagem (Maguire, 1962). A porcentagem de germinação foi avaliada após 30 dias, segundo as prescrições das RAS (Brasil, 1992).

Teste de condutividade elétrica

Este teste foi efetuado com quatro repetições de 50 sementes submetidas aos diversos tratamentos de secagem e de cada estágio de desenvolvimento, aparentemente isentas de danos mecânicos. Sementes de cada parcela foram pesadas com precisão de 0,01g e, a seguir, colocadas em copos plásticos contendo 75mL de água deionizada, permanecendo em embebição à temperatura constante de 30°C . Decorridas 24 horas, foi efetuada a leitura de condutividade elétrica das soluções em $\mu\text{S}/\text{cm}$, utilizando-se de um condutivímetro marca Digimed modelo CD 21A. Os resultados foram expressos em $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$.

Determinação do conteúdo de açúcares

Amostras de sementes provenientes de cada estágio de maturação dos frutos, e de cada método de secagem, foram retiradas do "deep-freezer" e deixadas por 24 horas para congelar em temperatura ambiente e, em se-

guida, embebidas em água destilada por mais 24 horas para facilitar a extração dos embriões. À medida que eram extraídos, os embriões eram colocados em microtubos contendo antioxidante (PVP- 40). Quando foi obtida a quantidade suficiente para as análises (200mg), os microtubos contendo os embriões foram imediatamente congelados pela submersão em nitrogênio líquido por 15 segundos e mantidos a -86°C em "deep-freezer". No momento da extração, 200 mg de embriões foram moídos em almofariz com areia lavada, na presença de 1 mL de metanol ultrapuro 80%. O almofariz foi lavado com 0.5 mL de metanol 80% e o conteúdo transferido para microtubos de 2mL, que foram incubados em banho-maria por 15 minutos a 75°C e congelados a -21°C até a análise em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (Bernal-Lugo & Leopold, 1992).

Para a análise em CLAE, as amostras foram diluídas em água ultrapura para 5mL em balão volumétrico, e filtradas em membranas de $0.45 \mu\text{m}$. Utilizando água ultra pura como fase móvel, um volume de injeção de $10 \mu\text{L}$ e um fluxo de 1,0 mL/minuto (bomba LC - 10 AD - Shimadzu), os açúcares foram separados em coluna Dextrapak -cartucho waters- 8mm x 10 cm- Radial - Pak e analisados em detector de Índice de Refração (Waters 410), sensibilidade 32x20, polaridade +. Como padrão utilizaram-se os seguintes açúcares e as respectivas diluições: - glicose (8,70mg/mL); sacarose(9,40mg/mL); rafinose(8,85mg/mL); estaquise(8,75).

Análise eletroforética de LEA's proteínas

Embriões das sementes, de cada um dos tratamentos, extraídos e conservados como descrito no item determinação do conteúdo de açúcares foram utilizados para análise eletroforética de LEA's proteínas. Os embriões foram pesados (100 mg), moídos por 1 minuto em almofariz na presença de nitrogênio líquido, colocados em microtubos de 1500 μL com 270 μL de tampão (50mM tris-HCl-7,5; 500mM NaCl; 5mM MgCl_2 ; 1mM PMSF; $5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Leupeptim; e $5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Antipain) e agitados em Vortex. O homegeneizado cru foi centrifugado a 16000xg por 20 minutos a 4°C , o sobrenadante incubado em banho-maria a 80°C por 10 minutos e novamente centrifugado como acima referido. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o pellet descartado. Antes da aplicação no gel, os tubos de amostras contendo 60 μL de extrato + 20 μL de solução tampão da amostra(5mL de glicerol; 2,5mL de solução tampão do gel concentrador; 2,5mg de azul Bromofenol e completado o volume para 25mL de água deionizada) foram colocados em banho-

maria com água em ebulição por 5 minutos (Blackman *et al.*, 1991). Foram aplicados 60µL do extrato com LEA proteína + 20µL do 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 cerca de 4 horas. Após a migração eletroforética, os géis foram corados em Coomassie Blue a 0,05%, conforme Alfenas *et al.* (1991), durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10%.

Análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial 3x3, sendo três estádios de maturação dos frutos (verde, verde-cana e cereja) e três métodos de secagem (sem secagem, secagem em ambiente controlado e secagem convencional), com quatro repetições. Os dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Umidade dos frutos

De acordo com a Tabela 1, observa-se que o teor de água dos frutos antes de serem submetidos à secagem (SS), no estádio verde-cana, apresentou valores mais baixos que os demais estádios. Essa variação pode ser atribuída às condições climáticas dos dias que antecederam as colheitas, uma vez que após a queda de umidade do estádio verde para o verde-cana, esta voltou a crescer nos frutos do estádio mais avançado de maturação, descaracterizando, dessa forma, um declínio da

umidade, típico do final da maturação. Pode ser notado que após a permanência dos frutos no Higrostat (AH) por 8 dias, houve uma uniformização entre os teores de água dos frutos colhidos nos diferentes estádios de maturação. Observa-se que houve uma queda, em relação aos valores observados antes da secagem, até a estabilização em um patamar determinado pela umidade relativa do ar conferida pela solução de K₂CO₃ dentro do Higrostat. Já nos frutos com secagem convencional, foi possível constatar certa desuniformidade entre os teores de água dos frutos colhidos nos diferentes estádios de maturação, que também pode ser atribuída às condições ambientais.

Teste de germinação

Verifica-se na Tabela 2 que as sementes antes de serem submetidas à secagem apresentaram maior porcentagem de germinação, independentemente do estádio de maturação, quando comparadas com aquelas submetidas aos outros métodos de secagem. Entre métodos de secagem em ambiente controlado e convencional, houve diferença apenas no estádio cereja, no qual a secagem controlada promoveu maior germinação. Pelas comparações efetuadas entre os estádios de maturação, infere-se, que as sementes nos estádios cereja e verde-cana apresentaram maior germinação para qualquer dos três métodos de secagem, se comparadas com aquelas do estádio verde. Os estádios cereja e verde-cana comparados entre si foram iguais nos métodos sem secagem e secagem convencional, e o método de secagem controlada promoveu maior germinação nas sementes no estádio cereja. O maior potencial de ger-

TABELA 1 – Teores médios de umidade dos frutos (%) antes de serem submetidos aos tratamentos sem secagem (SS), após incubação no higrostat (AH) e a umidade final alcançada pelas sementes (UF). UFLA, Lavras - MG, 2000.

Estádio de Maturação	Tratamentos		
	SS	AH	UF
Verde	56,95	46,12	9,97
Verde-Cana	52,79	45,98	13,09
Cereja	57,84	47,09	10,99

minação foi observado nas sementes colhidas em estádios de maturação mais adiantados, o que demonstra

que, nas sementes de cafeeiro, a germinação tende a aumentar com o seu desenvolvimento. Por outro lado,

não foi constatada na secagem controlada evolução do desenvolvimento durante período de tempo em que os frutos permaneceram com teores de água altos, fato esse comprovado em função da estabilidade dos níveis de germinação, ou seja, as sementes nos estádios verde ou verde-cana, mesmo sob secagem controlada, não atingiram taxa de germinação semelhantes àquelas alcançadas no estágio cereja. A capacidade de germinação é um atributo adquirido progressivamente (Kermode & Bewley, 1989), fato constatado pelos resultados que indicam uma evolução acentuada da germinação entre os estádios verde e verde-cana, e uma subsequente tendência de estabilização entre os estádios verde-cana e cereja, em todos os métodos de secagem. Outra observação importante é que as maiores porcentagens de germinação foram observadas nas avaliações realizadas antes da secagem em qualquer dos estádios estudados, evidenciando que sementes de café podem ser incluídas num grupo descrito por Kermode & Bewley (1989), para o qual a dessecação não representa um sinal que desvia o metabolismo da semente do programa de desenvolvimento, para o programa de germinação, visto que a secagem foi prejudicial à germinação em todos os estádios, mesmo no estágio verde, no qual fatores como altos teores de ABA (Long *et al.*, 1981; Ackerson, 1984; Finkelstein *et al.*, 1985; Prevost & Le Page-Degivry, 1985; Xu & Bewley, 1991), e resistência de tecidos que

circundam o embrião (Bewley *et al.*, 1989; Berry & Bewley, 1991) podem estar inibindo a germinação, e por isso, confundindo os efeitos degenerativos da secagem. A observação que qualquer tipo de secagem influencia negativamente a germinação demonstra o caráter de intolerância à dessecação das sementes de café, embora a intensidade dessa influência não tenha se apresentado de maneira drástica e com limites de umidades altos como aqueles apresentados pelas sementes tipicamente recalcitrantes. As sementes de café foram inicialmente classificadas por Roberts (1973) como recalcitrantes. Ellis *et al.* (1990) observaram que essas sementes apresentavam características tanto do comportamento ortodoxo, como do recalcitrante, e sugeriram a sua inclusão numa nova categoria chamada de intermediária. As sementes que apresentam comportamento intermediário, na fase pós-colheita, são relativamente tolerantes à dessecação, mas provavelmente não resistem à remoção de água para níveis tão baixos quanto as sementes ortodoxas. São sementes, particularmente de origem tropical (Ellis *et al.*, 1990; Hong & Ellis, 1995). Esses resultados podem explicar porque vários autores (Couturon, 1980; Reddy, 1987; Andreoli, 1992; Camargo *et al.*, 1993; Dias & Barros, 1993; Miranda *et al.*, 1993) preconizaram o armazenamento de sementes de café com altos níveis de umidade, confirmando essa tendência ao seu comportamento recalcitrante.

TABELA 2 – Porcentagem média de germinação de sementes de café obtidas de frutos colhidos nos estádios de desenvolvimento verde, verde-cana e cereja, submetidos à secagem controlada (SL), secagem convencional (SC) e sem secagem (SS). UFLA, Lavras - MG, 2000.

Estádio de Maturação	Tratamentos			Médias
	SS	SL	SC	
Verde	75,75 a B	60,75 b C	65,50 b B	67,33
Verde-Cana	89,75 a A	76,25 b B	78,50 b A	81,50
Cereja	93,00 a A	87,50 b A	78,75 c A	86,42
Médias	86,16	74,83	74,25	78,42

As médias seguidas de uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Velocidade de germinação

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados do índice de velocidade de germinação de sementes de café quando submetidas a diferentes métodos de secagem, em diferentes estádios de maturação. O vigor das sementes não variou com o método de secagem, quando as sementes estavam no estágio verde. No estágio verde-cana, o maior vigor foi apresentado pelas sementes sem secagem e o mais baixo, pelas sementes com secagem controlada. O vigor das sementes com secagem convencional não diferiu do vigor daquelas submetidas aos dois outros métodos. No estágio cereja, as sementes submetidas aos métodos sem secagem e secagem controlada apresentaram resultados iguais entre si e superiores ao método secagem convencional. Pode-se verificar que sementes não submetidas à secagem ou após secagem controlada apresentaram valores de vigor diferentes para estágio de maturação, e quanto mais altos eram os níveis de vigor observados, tanto mais avançado era esse estágio de desenvolvimento. A secagem convencional promoveu valores de vigor significativamente iguais para estádios cereja e verde-cana e superiores quando comparados àqueles apresentados no estágio verde. A exemplo dos resultados obtidos no teste de germinação, as sementes não submetidas à secagem apresentaram melhor desempenho, evidenciando as perdas de qualidade devidas à dessecação. Entretanto, vale ressaltar que as diferenças, principalmente entre métodos de secagem, não foram tão evidentes como o foram para germinação, especialmente no estágio verde. Esse fato parece indicar que, nesse estágio, a secagem removeu fatores tais como: altas concentrações de ABA ou resistência de tecidos que circundam o embrião, que reduzem a velocidade de germinação das sementes, sem,

no entanto, reduzir sua porcentagem final. Provavelmente os tecidos que circundam o embrião e as altas concentrações de ABA tenham sido os fatores que mais sofreram alterações. A exemplo do teste de germinação, o vigor avaliado pelo índice de velocidade de germinação aumentou com o avanço do desenvolvimento das sementes, apresentando melhores resultados nos estádios mais avançados.

Condutividade elétrica

Pelos dados contidos na Tabela 4, verifica-se que, no estágio de maturação verde, as sementes não submetidas à secagem apresentaram os valores de condutividade elétrica do lixiviado menores que os das sementes avaliadas após secagem controlada, que, por sua vez, apresentaram valores menores do que aquelas submetidas à secagem convencional. As sementes nos estádios verde-cana e cereja também apresentaram menores valores quando sem secagem se comparadas com aquelas com secagem controlada ou convencional, que foram iguais entre si. Nas sementes sem secagem não houve diferenças entre os valores de condutividade para os diferentes estádios de desenvolvimento. Nos métodos secagem controlada e secagem convencional, as sementes nos estádios verde-cana e cereja apresentaram os valores de condutividade iguais entre si e maiores que aqueles encontrados para sementes sem secagem. Esses resultados são coerentes com aqueles encontrados para o teste de germinação e demonstram claramente que a secagem, lenta ou convencional, provocou danos ao sistema de membranas celulares das sementes, os

TABELA 3 – Índice de velocidade de germinação de sementes de café obtidas de frutos colhidos nos estádios de desenvolvimento verde, verde-cana e cereja, submetidos à secagem: secagem controlada (SL), secagem convencional (SC) e sem secagem (SS). UFLA, Lavras - MG, 2000.

Estádio de Maturação	Tratamentos			Médias
	SS	SL	SC	
Verde	3,94 a C	3,97 a C	4,29 a B	4,06
Verde-Cana	5,65 a B	4,98 b B	5,25 a b A	5,29
Cereja	6,14 a A	5,85 a A	5,23 b A	5,74
Médias	5,24	4,93	4,92	5,03

As médias seguidas de uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

quais são diferenciados em relação aos estádios de desenvolvimento das mesmas, e no estádio verde, as sementes são mais susceptíveis que nos estádios cereja e verde-cana, inferindo-se que os mecanismos de proteção às membranas são desenvolvidos entre os estádios verde e verde-cana. Muitas sementes sofrem uma rápida transição de uma fase de intolerância à tolerância à dessecação, aproximadamente na metade do seu período de desenvolvimento, precedendo ou coincidindo com a deposição de reservas (Kermode & Bewley, 1989; Hong & Ellis, 1992). Nas sementes verdes, o menor índice de danos apresentados por aquelas submetidas à secagem controlada em relação àquelas submetidas à secagem convencional pode ser atribuído ao desenvolvimento de mecanismos de proteção durante a secagem. Um indicador precoce de dano induzido por dessecação em membranas é a lixiviação de várias soluções citoplasmáticas (íons, açúcares e proteínas) que ocorrem na reidratação de tecidos dessecados (Senaratna & McKersie, 1983, 1986; Crowe *et al.*, 1989). A taxa e extensão de lixiviado plasmático está possivelmente relacionada com o grau de sensibilidade à dessecação (Senaratna & McKersie, 1983, 1986; Crowe *et al.*, 1989).

Análise eletroforética de LEA's proteínas

O perfil eletroforético de proteínas apresentado na Figura 2 revela a presença de proteínas extraídas pelo calor em todos os estádios de desenvolvimento avaliados, independente do método de secagem. Entretanto, é evidente a ausência de algumas bandas nas sementes sem secagem (1) no terço superior perfil eletroforético, e alteração na intensidade de outras, também nas semen-

tes sem secagem(1), principalmente na parte mediana do perfil eletroforético, e que se tornam presentes de forma mais evidente, à medida que avança o estádio de desenvolvimento das sementes (A-B-C). Esses resultados são coerentes com a tendência observada nas demais avaliações, nos quais se verificou, nas sementes de cafeeiro, um comportamento de intolerância à dessecação, pela queda de qualidade demonstrada na maioria das avaliações das sementes submetidas à secagem. A ausência de determinadas bandas nas sementes sem secagem demonstram diferenças nas proteínas tipo LEA, que são coincidentes com as variações fisiológicas, inferindo-se que as modificações nas proteínas estão atreladas à redução na tolerância à dessecação das sementes. Observações semelhantes foram verificadas em relação ao teste de condutividade elétrica, o que parece indicar que as proteínas LEA podem agir também em sementes de café, como um agente protetor de membranas. Essas constatações e indicações podem ser explicadas ou sustentadas por relatos encontrados na literatura relativos às caracterizações de LEA's por análise de seqüência e predição estrutural (Baker *et al.*, 1988; Dure *et al.*, 1989; Piatkowski *et al.*, 1990; Lane, 1991), que indicam que elas são ricas em glicina e outros aminoácidos hidrofílicos e têm poucos resíduos hidrofóbicos. Essas proteínas são, dessa forma, facilmente solúveis em água, com alto nível de hidratação e provavelmente, localizadas exclusivamente na fração citosol. Elas geralmente são formadas por segmentos aleatórios, na forma de espiral, ocasionalmente com uma longa α -hélice amplificada, que deve servir como uma base para

TABELA 4 – Valores médios da condutividade elétrica do lixiviado de sementes de cafeeiro nos estádios de desenvolvimento verde, verde-cana e cereja, submetidos à secagem controlada (SL), secagem convencional (SC) e sem secagem (SS). UFLA, Lavras - MG, 2000.

Estádio de Maturação	Tratamentos			Médias
	SS	SL	SC	
Verde	34,34 a A	106,04 b B	143,95 c B	94,78
Verde-Cana	27,28 a A	67,81 b A	69,57 b A	54,89
Cereja	22,83 a A	58,24 b A	56,92 b A	46,00
Médias	28,15	77,36	90,15	65,22

As médias seguidas de uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

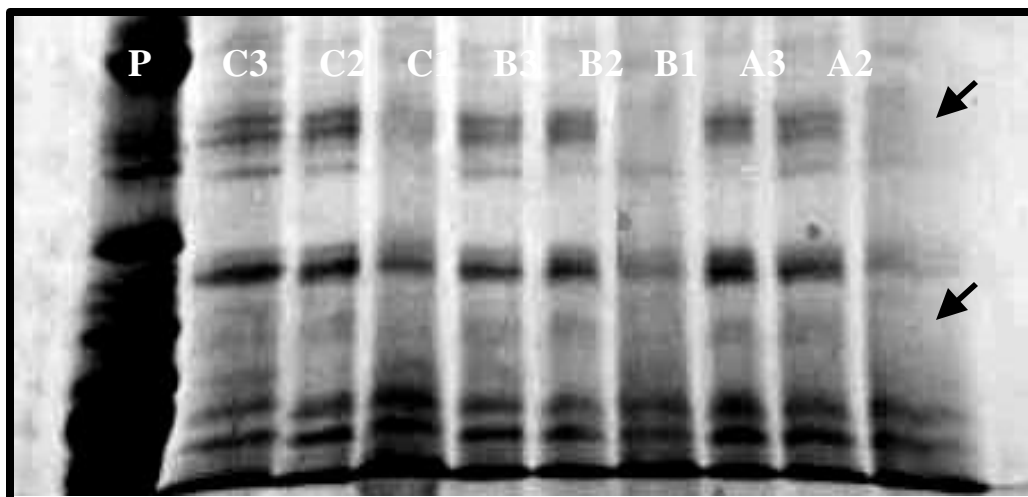


FIGURA 2 – Perfil eletroforético de proteínas extraídas pelo calor em sementes de café nos estádios de desenvolvimento verde (A), verde-cana (B) e cereja (C), sem secagem (1) ou submetidas a secagem controlada (2) e secagem convencional (3). Padrão referencial extraído de sementes de soja (P).UFLA, Lavras - MG, 2000.

ordenar a estrutura superior. Elas são solúveis na fervura e não têm estado determinado termodinamicamente. Com base nesses dados, diversos autores sugerem que tais proteínas desempenham um papel estrutural como protetoras à dessecação (McCubbin & Kay, 1985; Baker *et al.*, 1988; Lane, 1991). Por exemplo, LEA-D11 e D113 de algodão são colocadas como desempenhadoras de um papel em sinergismo com açúcares solúveis na inibição da cristalização do citoplasma e na preservação da superfície da membrana, enquanto D29 e GD29 prenderiam íons caóticos (Baker *et al.*, 1988). Papel semelhante tem sido sugerido para a proteína (Em), que poderia substituir uma matriz de água ligada em sítios estratégicos e estabilizar estruturas citoplasmáticas, durante a dessecação de embriões de trigo (McCubbin & Kay, 1985; Lane, 1991).

Análise cromatográfica de açúcares

Apenas a sacarose, dentre os açúcares incluídos no padrão, foi detectada. As variações quantitativas podem ser verificadas na Tabela 5, onde são apresentados os resultados do conteúdo de sacarose em porcentagem. Percentuais mais elevados e discrepantes em relação aos demais foram apresentados pelos embriões das sementes no estágio verde-cana. Como esse fato não provocou efeito diferencial aparente que influenciasse nos testes fisiológicos, sugere-se que a quantidade de sacarose necessária para contribuir como mecanismo de tolerância à dessecação seja menor que aquela encon-

trada no tratamento que apresentou menor percentual. Diversos resultados de pesquisas correlacionam a aquisição ou perda de tolerância à dessecação com açúcares solúveis durante a maturação de sementes de mostarda (Fischer *et al.*, 1988), milho (Chen & Burris, 1990) e durante a germinação de sementes de ervilha, soja e milho (Koster & Leopold, 1988), e *Brássica campestris* L. (Leprince, 1992; Leprince *et al.*, 1992). De acordo com esses dados, os tecidos tolerantes são caracterizados por apresentarem alta quantidade de sacarose e oligossacarídeos (estaquiose ou rafinose) (Kuo *et al.*, 1988), e por apresentarem ausência ou pelo menos baixa quantidade de monossacarídeos redutores, como a galactose, manose, glucose e frutose. Ao contrário, os tecidos intolerantes à dessecação são geralmente dotados de altas concentrações de monossacarídeos e baixas concentrações de dissacarídeos e sacarídeos maiores. Em síntese, uma quantidade substancial de evidências apóia a visão de que açúcares agindo como “substitutos de água” podem desempenhar um papel-chave na tolerância à dessecação em sementes, por proteger as membranas na fase de transição de lipídeos, induzida pela dessecação, e também proteger as proteínas, ou por formar vidro a temperaturas fisiológicas. Todavia, diversos autores relataram uma alta concentração de sacarose e oligossacarídeos, durante o desenvolvimento de sementes recalcitrantes, sensíveis à dessecação (Farrant *et al.*, 1993), sugerindo que a capacidade de tolerar desidratação não ocorre somente por causa da presença daqueles sacarídeos.

TABELA 5 – Porcentagem de sacarose em embriões de sementes de cafeeiro nos estádios de desenvolvimento verde, verde-cana e cereja, submetidas à secagem controlada (SL), secagem convencional (SC) e sem secagem (SS). UFLA, Lavras - MG, 2000.

Estádio de Maturação	Métodos de Secagem			Médias
	SS	SL	SC	
Verde	6.85	6.11	7.12	6.69
Verde-Cana	15.36	14.85	8.11	12.77
Cereja	6.76	4.34	6.88	5.99
Médias	9.66	8.43	7.37	8.48

CONCLUSÕES

As sementes de cafeeiro apresentam redução de vigor e viabilidade quando submetidas à secagem.

O vigor das sementes de café aumenta sensivelmente na fase de desenvolvimento entre os estádios verde e verde-cana.

As proteínas estáveis no calor (LEA proteínas) contribuem para a tolerância à dessecação existente nas sementes de café.

A sacarose não é fator limitante para aquisição de tolerância à dessecação em sementes de café.

Glicose, rafinose e estaquiose não foram detectadas em embriões de sementes de cafeeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERSON, R.C. Abscisic acid and precocious germination in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, London, v.35, n.152, p.414-421, Mar. 1984.

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUCE, W.; PASSADOS, G.C. **Eletrofresc de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242 p.

ANDREOLI, D.M.C. **Qualidade fisiológica de sementes de café (*Coffea canephora* cv. Guarani) armazenadas com diferentes graus de umidade em dois tipos de embalagem após secagem natural e artificial**. 1992. 87 f. Dissertação (Mestrado em Pré-Processamento) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BAKER, J.; STEELE, C.; DURS, L. III. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from

cotton. **Plant Molecular Biology**, Drechit, v.11, n.3, p.277-291, 1988.

BARTELS, D.; SINGH, M.; SALAMINE, F. Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. **Planta**, Berlim, v.175, n.3, p.485-492, Sept. 1988.

BERNAL-LUGO, I.; LEOLPOLD, A.C. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. **Plant Physiology**, Rockville, v.98, n.3, p.1207-1210, Mar. 1992.

BERRY, T.; BEWLEY, J.D. Seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) which develop in a fully hydrated environment in the fruit switch from a developmental to a germinative mode without a requirement for desiccation. **Planta**, Berlim, v.186, n.1, p.27-34, Jan. 1991.

BEWLEY, J.D.; KERMODE, A.R.; MISRA, S. Desiccation and minimal drying treatments of seeds of castor bean and *Phaseolus vulgaris* which terminate development and promote germination cause changes in protein and messenger RNA synthesis. **Annals of Botany**, New York, v.63, n.1, p.3-17, Jan. 1989.

BLACKMAN, S.A.; WETTLAUFER, S.H.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, n.3, p.868-874, July 1991.

BOCHICCHIO, A.; VAZZANA, C.; RASCHI, A.; BARTELS, D.; SALAMINI, F. Effect of desiccation on isolated embryos of maize. Onset of desiccation tolerance during development. **Agronomie**, Paris, v.8, n.1, p.29-36, 1988.

- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- CAMARGO, D.M.; GROTH, D.; RAZERA, L.F. Armazenamento de sementes de café (*Coffea canephora* L. cv. Guarini) condicionadas em dois tipos de embalagens após secagem natural e artificial. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.15, n.1/2, p.87-95, jul./dez. 1993.
- CHEN, Y.; BURRIS, J.S. Role of carbohydrates in desiccation tolerance and membrane behavior in maturing maize seed. **Crop Science**, Madison, v.30, n.4, p.971-975, July/Aug. 1990.
- COUTURON, E. Mantenimiento de la viabilidad de las semillas de cafetos por el control de su contenido en agua y de la temperatura de almacenamiento. **Cafe Cacao The**, Paris, v.24, n.1, p.27-32, jan./mar. 1980.
- CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; HOEKSTRA, F.A.; AURELL WISTROM, C. Effects of water on the stability of phospholipid bilayers: the problem of imbibition damage in dry organisms. In: STANWOOD, P. C.; MCDONALD, M. B. (Ed.). **Seed moisture**. Madison: Crop Science Society of America, 1989. p.1-22. (CSSA Special Publication, 14).
- DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) em diferentes embalagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.15, n.1/2, p.197-202, jun./dez. 1993.
- DURE, L.H.; CROUCH, M.; HARADA, J.; MUNDY, H.J.; QUATRANO, R.; THOMAS, T.; SUNG, Z.R. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.12, n.5, p.475-486, May 1989.
- ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, London, v.41, n.230, p.1167-1174, Sept. 1990.
- FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation-sensitive (reclacitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation-tolerant types. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.1, p.1-13, Mar. 1993.
- FINKELSTEIN, R.R.; TENBARGE, K.M.; SHUMWAY, J.E.; CROUCH, M.L. Role of ABA in maturation of rape-seed embryos. **Plant Physiology**, Rockville, v.78, n.4, p.630-636, Aug. 1985.
- FISCHER, W.; BERGFELD, R.; PLACHY, C.; SCHAFER, R.; SCHPFER, P. Accumulation of storage materials, precocious germination and development of desiccation tolerance during seed maturation in mustard (*Sinapis alba* L.). **Botanica Acta**, Stuttgart, v.101, p.344-354, 1988.
- FRANZEN, J.J.; HAAS, M.M. Vitamin E content during development of some seedling. **Phytochemistry**, Oxford, v.30, n.9, p.2911-2913, Sept. 1991.
- HALLIWELL, B. Oxidative damage, lipid preoxidation and antioxidant protection in chloroplasts. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v.44, p.327-340, 1987.
- HONG, T.D.; ELLIS, R.H. Development of desiccation tolerance in Norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds during maturation drying. **Seed Science Research**, Wallingford, v.2, n.2, p.169-172, June 1992.
- HONG, T.D.; ELLIS, R.H. Interspecific variation in seed storage behaviour within two genera – *Coffea* and *Citrus*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.23, n.1, p.165-181, 1995.
- KERMODE, A.R.; BEWLEY, J.D. Developing seeds of *Ricinus communis* L. When detached and maintained in an atmosphere of high relative humidity, switch to a germinative mode without the requirement for complete desiccation. **Plant Physiology**, Rockville, v.90, n.3, p.702-707, July 1989.
- KOSTER, K.L.; LEOPOLD, A.C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.88, n.4, p.829-832, Dec. 1988.
- KUO, T.M.; VANMIDDLESWORTH, J.F.; WOLF, W.J. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.36, n.1, p.32-36, Jan./Feb. 1988.
- LANE, B.G. Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. **FASEB Journal**, Bethesda, v.5, n.14, p.2893-2901, Nov. 1991.

- LEPRINCE, O. **Etude des mécanismes de la résistance à la déshydratation dans les embryos des plantes supérieures.** Liège: University of Liège, 1992. (PhD Thesis).
- LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; HENDRY, G.A.F. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, London, v.116, n.4, p.573-580, Dec. 1990.
- LEPRINCE, O.; HENDRY, G.A.F.; MCKERSIE, B.D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.3, p.231-246, Sept. 1993.
- LEPRINCE, O.; VAN DER WERF, A.; DELTOUR, R.; LAMBERS, H. Respiratory pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.84, n.4, p.581-588, Apr. 1992.
- LONG, S.R.; DALE, R.M.K.; SUSSEX, L.M. Maturation and germination of *Phaseolus vulgaris* embryonic axes in culture. **Planta**, Berlin, v.153, n.3, p.405-415, May 1981.
- MAGUIRRE, J.D. Speed of germination - aid seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, Mar./Apr. 1962.
- MCCUBBIN, W.D.; KAY, C.M. Hydrodynamic and optical properties of the wheat Em protein. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v.63, p.803-810, 1985.
- MEDEIROS, A.C. dos S. **Comportamento fisiológico, conservação de germoplasma a longo prazo e previsão de longevidade de sementes de aroeira (*Austromum urundeuva* (Fr. All.) Eng.).** 1996. 130 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- MERCK. **The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals.** 11. ed. New Jersey, USA, 1989. 1605 p.
- MIRANDA, J.M.; CARVALHO, M.M. de; CARVALHO, M.L. de; VIEIRA, M. das G. Estudos de alguns fatores que influenciam a duração da viabilidade de sementes de café. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.15, n.1/2, p.215-220, jun./dez. 1993.
- PIATKOWSKI, D.; SCHNEIDER, K.; SALAMINI, F.; BARTELS, D. Characterization of five abscisic acid-responsive cDNA clones isolated from the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water-stress genes. **Plant Physiology**, Rockville, v.94, n.4, p.1682-1688, Dec. 1990.
- PREVOST, I.; LE PAGE-DEGIVRY, M.T. Inverse correlation between ABA content and germinability throughout the maturation and the *in vitro* culture of the embryo of *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Experimental Botany**, London, v.36, n.170, p.1457-1464, Sept. 1985.
- PUNTARULO, S.; GALLEANO, M.; SANCHEZ, R.A.; BOVERIS, A. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1074, n.2, p.277-283, July 1991.
- REDDY, L.S. Effect of different stages of maturity and postharvest treatments on the seed viability of *Coffea arabica* L. **Journal of Coffee Research**, Karnataka, v.17, p.14-25, 1987.
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.2, p.499-514, 1973.
- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D. Characterization of solute efflux from dehydration injured soybean (*Glycine max* L. Merr) seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.72, n.4, p.911-914, Aug. 1983.
- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D. Loss of desiccation tolerance during seed germination: a free radical mechanism of injury. In: LEOPOLD, A.C. (Ed.). **Membranes, metabolism and dry organisms.** Ithaca: Cornell University Press, 1986. p.85-101.
- SKRIVER, K.; MUNDY, J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. **Plant Cell**, Rockville, v.2, n.6, p.503-512, June 1990.
- XU, N.; BEWLEY, J.D. Sensitivity to abscisic acid and osmoticum changes during embryogenesis of alfalfa (*Medicago sativa*). **Journal of Experimental Botany**, London, v.42, n.240, p.821-826, July 1991.