



GUSTAVO COSTA SANTOS

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO
PROCESSO OXIDATIVO DURANTE A
SECAGEM DE SEMENTES DE CAFÉ**

**LAVRAS - MG
2010**

GUSTAVO COSTA SANTOS

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO PROCESSO
OXIDATIVO DURANTE A SECAGEM DE SEMENTES DE CAFÉ**

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

Orientadora

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

**LAVRAS - MG
2010**

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

Santos, Gustavo Costa.

Expressão de genes relacionados ao processo oxidativo durante a
secagem de sementes de café / Gustavo Costa Santos. – Lavras :
UFLA, 2010.

89 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Bibliografia.

1. Cafeicultura. 2. Isoenzimas. 3. Germinação. 4. Scavenger. 5.
Real-time. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.7321

GUSTAVO COSTA SANTOS

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO PROCESSO
OXIDATIVO DURANTE A SECAGEM DE SEMENTES DE CAFÉ**

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

APROVADA em 05 de agosto de 2010.

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa EMBRAPA Café
Dr. Antônio Chalfun Júnior DBI

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

**LAVRAS - MG
2010**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio e amor. Eu também amo vocês!

À Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, pela excelente orientação, dedicação, ética, e pelo reconhecimento do meu trabalho.

À Pesquisadora da Embrapa Café, Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, pela co-orientação neste trabalho, pelo incentivo, e por valorizar meus esforços.

Ao Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva, Coordenador do programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade.

À Universidade Federal de Lavras, pela qualidade de ensino e pesquisa.

Às agências de fomento CAPES e FAPEMIG.

Aos colegas que me ajudaram nos experimentos: Flavinha, Vívian, Heloísa, Cibele, Camila, Gabriel, Rodrigo JF, Deborah, Myss, Matraca, Madame, Andréa, Dayane, Alexana, Fernanda, Alexandre, Stefânia, Ana Calixto, Viviane, Rodrigo, Michelle, Ana, Gabi, Laís, Wilder 1, Wilder 2, Elenir, Dalva, Elza e Marta.

Aos colegas e amigos do programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, pela troca de conhecimentos.

À Profa. Dra. Ana Lucia Brunialti Godard, da UFMG, pela carta de referência e pela primeira oportunidade de trabalhar com genética e biologia molecular.

À comissão que elaborou o Manual de Normalização e Estrutura de Trabalhos Acadêmicos (2010), pela bonita dedicatória aos alunos da UFLA: “que com suas pesquisas tornam o mundo melhor”.

RESUMO

As sementes são um importante meio de propagação de culturas do gênero *Coffea*. A obtenção de sementes de café com alta qualidade é fundamental para a formação de mudas. O estresse oxidativo durante o processo de secagem é fator limitante para a obtenção de sementes com alta qualidade fisiológica. Diante do exposto, foi proposto nesta pesquisa estudar o efeito de diferentes métodos de secagem e graus de umidade na qualidade fisiológica de sementes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* e na expressão de alguns genes relacionados aos sistemas enzimáticos de combate ao estresse oxidativo, catalase e peroxidase. A colheita dos frutos no estágio cereja foi realizada no campo experimental da UFLA, na cidade de Lavras/MG. As sementes foram submetidas à secagem lenta e rápida até atingirem os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12%. Como testemunha uma amostra de sementes não recebeu qualquer tratamento de secagem, permanecendo com grau de umidade de 46%. As amostras foram submetidas às análises de qualidade fisiológica utilizando-se as variáveis protrusão radicular e plântulas normais aos 15 dias, normais e normais fortes aos 30 dias, plântulas com abertura cotiledonar e matérias secas de hipocótilo e radícula aos 45 dias. Para as análises fisiológicas utilizou-se DIC com esquema fatorial [(2x4) + 1]. As sementes foram submetidas às análises das isoenzimas esterase, catalase, peroxidase e endo- β -mananase. Foi realizada a busca por genes alvo no banco de dados do genoma café brasileiro. As sequências foram analisadas por bioinformática e posteriormente utilizadas para confecção de *primers* específicos. Foi avaliada a expressão gênica por meio da técnica de RT-qPCR dos genes catalase e peroxidase em cada amostra. De forma geral, na espécie *C. arabica* foram observados os melhores resultados de qualidade fisiológica em sementes com 20% de grau de umidade submetidas à secagem rápida e com 40 e 12% de grau de umidade, em sementes submetidas à secagem lenta. Para a espécie *C. canephora* obteve-se os melhores resultados de qualidade fisiológica em sementes submetidas à secagem rápida. Nessa mesma espécie, houve tendência de perda de qualidade fisiológica com a redução do grau de umidade, em ambos os métodos de secagem. Pelos resultados pode-se inferir que as sementes de *C. arabica* e *C. canephora* apresentaram maior tolerância à dessecação quando são submetidas à secagem rápida. Houve redução dos níveis de expressão dos transcritos das enzimas catalase (CAT3) e peroxidase (POXa) com a secagem das sementes de *C. arabica* e *C. canephora*. Os padrões de expressão dos genes peroxidase e catalase são diferentes, apesar de ambos serem ligados ao estresse oxidativo. A expressão de genes associados ao processo oxidativo é influenciada pelo método de secagem.

Palavras – chave: Cafeicultura. Isoenzimas. Germinação. Scavenger. Real-time.

ABSTRACT

Seeds are an important dispersal strategy used by coffee plants. Oxidative stress resulting from the drying process is a limiting factor for obtaining higher physiological quality seeds. Obtaining high quality coffee seeds is essential for the new plants formation. Given the above, it was proposed to study the effect of different drying methods and moisture content on *Coffea arabica* and *Coffea canephora* physiological qualities and gene expression of catalase and peroxidase, related to enzymatic systems to combat oxidative stress. Fruit harvesting was performed in the UFLA experimental field in Lavras / MG. Seeds were dried slowly and faster until they reach the moisture contents of 40, 30, 20 and 12%. As a control, some seed sample didn't receive any drying treatment, staying with 46% moisture content. The samples were analyzed for physiological quality using the variables protrusion and normal at 15 days, normal and strong normal at 30 days, seedlings with cotyledon opening and dry matter of hypocotyl and radicle at 45 days. The physiological analysis were carry out on CRD design, with [(2x4) + 1] factorial. Seeds were subjected to isoenzymes analysis of esterase, catalase, peroxidase and endo- β -mannanase. A search for target genes was performed in the Brazilian coffee genome database. The sequences were analyzed by bioinformatics and then used for making specific primers. The catalase and peroxidase gene expressions were evaluated by real-time PCR. In *C. arabica*, best physiological quality results were observed at 20% moisture content for faster dried seeds. In seeds subjected to slow drying, the best physiological quality results were observed at 40 and 12% of moisture content. The best results of physiological quality were obtained by seed fast drying, at *C. canephora*. In this same species, there was a trend of loss of physiological quality by reducing the moisture content in both drying methods. From the results we can infer that the seeds of *C. arabica* and *C. canephora* showed higher desiccation tolerance when they were dried faster. There was a reduction in the levels of expression of transcripts of catalase (CAT3) and peroxidase (Gosh) with the seed drying process in both species. The expression patterns of peroxidase and catalase genes are different, although both are linked to oxidative stress. The expression of genes associated with the cellular oxidation process is influenced by drying method.

Keywords: Coffee Culture. Isoenzymes. Germination. Scavenger. Real-time.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Padrão isoenzimático de esterase (EST) para sementes de <i>C. arabica</i> submetidas as secagens lenta e rápida, até os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12%; e testemunha sem secagem, com 46% de teor de umidade. UFLA, Lavras, 2010.....	53
Figura 2	Padrão isoenzimático de catalase (CAT) para sementes de <i>C. arabica</i> submetidas às secagens lenta e rápida, até os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12%; e testemunha sem secagem, com 46% de teor de umidade. UFLA, Lavras, 2010.....	54
Figura 3	Padrão isoenzimático de peroxidase (POX) para sementes de <i>C. arabica</i> submetidas as secagem lenta e rápida, até os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12%; e testemunha sem secagem, com 46% de teor de umidade. UFLA, Lavras, 2010.....	54
Figura 4	Resultado da ferramenta <i>Conserved Domains</i> , NCBI, para a sequência proteica traduzida <i>in silico</i> de catalase de café. UFLA, Lavras, 2010.....	56
Figura 5	Resultado da ferramenta <i>Conserved Domains</i> , NCBI, para a sequência proteica traduzida <i>in silico</i> de peroxidase de café. UFLA, Lavras, 2010.....	56
Figura 6	Padrão isoenzimático de catalase (CAT) para sementes de <i>C. canephora</i> submetidas às secagens lenta e rápida até os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12%; e testemunha sem secagem, com 46% de teor de umidade. UFLA, Lavras, 2010.....	67
Figura 7	Padrão isoenzimático de peroxidase (POX) para sementes de <i>C. canephora</i> submetidas às secagens lenta e rápida, até os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12%; e testemunha sem secagem, com 46% de teor de umidade. UFLA, Lavras, 2010..	67
Figura 8	Esquema dos domínios conservados da sequência traduzida <i>in silico</i> da catalase de café. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	68
Figura 9	Figura 9 Esquema dos domínios conservados da sequência traduzida <i>in silico</i> da catalase de café. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	69
Figura 10	Esquema dos domínios conservados da sequência traduzida <i>in silico</i> da peroxidase de café. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Atividade da enzima endo- β -mananase observada em sementes de <i>C. arábica</i> submetidas ao método de secagem rápida e lenta. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	49
Gráfico 2	Expressão gênica de Catalase 3 e Peroxidase A em sementes de <i>C. arábica</i> submetidas aos métodos de secagem lenta e rápida até os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12%; e testemunha sem secagem, com 46% de teor de umidade. UFLA, Lavras, 2010.....	57
Gráfico 3	Resultado de expressão gênica para ESTs de Catalase 3 e Peroxidase A em sementes de <i>C. canephora</i> submetidas aos métodos de secagem lenta e rápida até os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12%; e testemunha sem secagem, com 46% de teor de umidade. UFLA, Lavras, 2010.....	71
Gráfico 4	Atividade da enzima endo- β mananase observada em sementes de <i>C. canephora</i> submetidas ao método de secagem rápida e lenta. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Porcentagem média de plântulas normais de <i>C. arabica</i> L. aos 15 dias após a semeadura, submetidas aos diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	46
Tabela 2	Porcentagem média de plântulas normais de <i>C. arabica</i> L. aos 30 dias após a semeadura, submetidas aos diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	47
Tabela 3	Porcentagem média de plântulas normais fortes de <i>C. arabica</i> L. aos 30 dias após a semeadura, submetidas aos diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	48
Tabela 4	Porcentagem média de plântulas de <i>C. arabica</i> L. com abertura de folha cotiledonar aos 45 dias após a semeadura, submetidas aos diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	50
Tabela 5	Matéria seca de hipocótilo (mg/plântula) de <i>C. arabica</i> L. aos 45 dias após a semeadura, proveniente de sementes submetidas aos diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	51
Tabela 6	Matéria seca de radícula (mg/plântula) de <i>C. arabica</i> L. aos 45 dias após a semeadura, submetidas a diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	52
Tabela 7	Resultado de <i>BLASTp</i> e <i>Pfam</i> para as sequências traduzidas <i>in silico</i> dos genes alvo. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	55
Tabela 8	Pares de <i>primers</i> obtidos para os ensaios de PCR quantitativa. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	57
Tabela 9	Porcentagem média de plântulas normais de <i>C. canephora</i> aos 15 dias após a semeadura, submetidas aos diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	64

Tabela 10	Porcentagem média de plântulas normais de <i>C. canephora</i> aos 30 dias após a semeadura, submetidas aos diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	64
Tabela 11	Porcentagem média de plântulas normais fortes de <i>C. canephora</i> aos 30 dias após a semeadura, submetidas a diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	65
Tabela 12	Porcentagem média de plântulas de <i>C. canephora</i> com abertura de cotilédones aos 45 dias após a semeadura, submetidas aos diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	65
Tabela 13	Resultado de BLASTp e Pfam para as sequencias traduzidas <i>in silico</i> dos genes alvo. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	68
Tabela 14	Pares de <i>primers</i> obtidos para os ensaios de PCR quantitativa. UFLA, Lavras, MG, 2010.....	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Tolerância à dessecação em semente de café	15
2.2	Secagem de sementes de café	17
2.3	Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)	20
2.4	Mecanismos de controle das EROS	24
2.5	Expressão gênica em Ácido Ribonucleico (RNA)	27
2.6	Genômica funcional e expressão gênica em café	28
2.7	Análise de isoenzimas	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Local de coleta e material biológico	35
3.2	Tratamentos pós-colheita	35
3.3	Avaliação da qualidade fisiológica das sementes	37
3.3.1	Testes de germinação e vigor de plântula	37
3.3.2	Matéria seca de plântulas	38
3.4	Obtenção dos <i>primers</i> de PCR em tempo real	38
3.5	Ensaio de PCR em tempo real	39
3.6	Análises de isoenzimas	41
3.6.1	Eletroforese de isoenzimas esterase, catalase e peroxidase	41
3.6.2	Atividade de ENDO-B-MANANASE	41
3.7	Procedimento estatístico	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Espécie <i>C. ARABICA</i> L. cultivar Rubi	44
4.2	Espécie <i>COFFEA CANEPHORA</i> Apoatã IAC 2258	62
5	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE	87

1 INTRODUÇÃO

A semente do cafeeiro é um meio de propagação muito utilizado, porém apresenta germinação lenta, baixa longevidade e baixo potencial de armazenamento. A baixa longevidade e o baixo potencial de armazenamento têm sido atribuídos à baixa tolerância à dessecação dessas sementes.

A tolerância à dessecação em sementes é uma característica quantitativa, adquirida progressivamente. A taxa de secagem influencia a resposta à desidratação de sementes em desenvolvimento e a tolerância à dessecação de tecidos vegetativos. Em alguns trabalhos tem sido observada maior tolerância à dessecação das sementes de café submetidas à secagem lenta, presumivelmente devido ao tempo concedido para a indução e operação dos mecanismos de proteção. Na secagem rápida podem ocorrer danos em sistemas de membranas e em nível de ácidos nucleicos, sendo necessário mais tempo para os reparos destes durante a germinação.

Em estudos recentes tem sido observada que a perda de viabilidade das sementes durante a secagem é acompanhada pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (EROS) e peroxidação de lipídeos. As EROS são formas parcialmente reduzidas do oxigênio atmosférico. Elas interferem no DNA e no RNA, impedindo a síntese de enzimas associadas à qualidade de sementes.

Existem alguns mecanismos em plantas para evitar a formação de EROS nos quais, estão envolvidos enzimas como a superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, dehidroascorbato redutase, monodehidroascorbato redutase, glutatona redutase, glutatona peroxidase e guaiacol peroxidase.

Ressalta-se que pouco foi estudado, até o momento, com relação à expressão de genes associados ao processo oxidativo durante a secagem de sementes de café. Esses estudos são possíveis em função do recente sequenciamento do genoma funcional do café.

Diante do exposto, foi proposto nesta pesquisa estudar o efeito de diferentes métodos de secagem e graus de umidade na qualidade fisiológica de sementes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* e na expressão de alguns genes relacionados aos sistemas enzimáticos de combate ao estresse oxidativo, catalase e peroxidase.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tolerância à dessecação em semente de café

A demanda por mudas de cafeeiro para garantir a população de plantas no país é muito grande. Diante disso é importante o uso de sementes de alta qualidade, para a obtenção de mudas vigorosas e, conseqüentemente, a produtividade da lavoura.

Sabe-se, no entanto, que a manutenção da qualidade das sementes de café durante o armazenamento constitui uma das maiores dificuldades encontrada pelos produtores de mudas. Isso se deve ao fato das sementes de café perderem a viabilidade rapidamente, dificultando a sua utilização por período mais prolongado.

São vários os fatores que podem influenciar na qualidade das sementes de café. Dentre esses, a secagem parece influenciar sobremaneira, principalmente em função da sensibilidade das sementes à dessecação. Inicialmente, King e Roberts (1979) incluíram as sementes de café no grupo das recalcitrantes, porém, Roberts et al. (1984) verificaram que estas não eram verdadeiramente recalcitrantes e poderiam ser ortodoxas. Ellis et al. (1990) indicaram uma categoria intermediária para as sementes de café ao observarem que sementes de quatro cultivares de *C. arabica* não tiveram a germinação reduzida quando secadas até cerca de 10% de umidade e armazenadas a 10 °C, ocorrendo o inverso quando foram armazenadas sob temperaturas de 0 °C e -20 °C. Este comportamento é característico para sementes de categoria intermediária que podem resistir à desidratação até certo nível, mas têm sua armazenabilidade reduzida.

Existem diferenças nos níveis de sensibilidade à dessecação entre as espécies de *Coffea*. Essas diferenças podem ser atribuídas às relações

filogenéticas, centro de origem e ou duração do estágio de desenvolvimento (BRANDÃO JÚNIOR, 2000).

Eira et al. (1999) estudaram o efeito do teor de água e da temperatura de secagem na sobrevivência de sementes de *Coffea* spp, sugerindo que diferenças em níveis de tolerância à dessecação podem ser atribuídas à variação genética. *C. racemosa* apresentou-se como a espécie mais tolerante, enquanto *C. liberica* foi a mais sensível à desidratação. Foram ainda verificadas diferenças quanto à tolerância à dessecação entre cultivares e espécies similares. Nesta mesma linha, Brandão Júnior (2000) concluiu que sementes de *C. arabica* apresentaram comportamento intermediário para a tolerância a dessecação, sendo que as de *C. canephora* foram intolerantes à dessecação.

Guimarães (2000) verificou redução no vigor e viabilidade das sementes de *C. arabica* cv. Rubi, colhidas nos estádios verde, verde-cana e cereja, quando foram submetidas a diferentes métodos de secagem. Isto demonstra o caráter de intolerância à dessecação das sementes de café, embora essa influência não tenha se apresentado drástica como a observada em sementes tipicamente recalcitrantes.

Vários mecanismos têm sido envolvidos na aquisição e manutenção da tolerância à dessecação, conferindo proteção contra as consequências da perda de água, em diferentes níveis de hidratação. Porém, nenhum mecanismo é, por si só, responsável por esta tolerância; cada componente é igualmente crítico, atuando em sinergismo e controlado no nível genético (LEPRINCE et al., 1993). O conhecimento desses mecanismos dá subsídios para o entendimento do comportamento de sementes de café durante o processo de secagem.

2.2 Secagem de sementes de café

A secagem de sementes pode ser definida como um processo de troca de energia e massa entre os tecidos e o ar de secagem, de forma que determinada quantidade de água é removida por meio de evaporação. Esse fenômeno é influenciado por vários fatores: método de secagem, temperatura e umidade relativa do ar de secagem, velocidade de passagem deste ar e tempo de secagem. O controle desses fatores é fundamental para a obtenção de um produto final com alta qualidade. A secagem da semente acontece pela difusão da água e do vapor pelos poros capilares dos tecidos. Esse processo é caracterizado por um período de velocidade constante de secagem e um período de velocidade decrescente. No primeiro período a água está fracamente retida por capilaridade e a temperatura da semente tende a se aproximar da temperatura do ar de secagem saturado. Já no período de velocidade de secagem decrescente, a taxa de retirada de água diminui, resultando no aumento da temperatura da semente até a temperatura do ar de secagem (BORÉM et al., 2008).

Várias pesquisas já foram realizadas buscando-se estudar métodos de secagem que possam prolongar o período de conservação das sementes de café. No entanto, os conhecimentos acumulados ainda não são conclusivos. Adicionalmente, quando comparados entre si, os resultados, a princípio, são discordantes, principalmente em relação ao grau de umidade das sementes. O entendimento da interferência das causas de variação é, em alguns casos, dificultado pelo excessivo número de fatores analisados conjuntamente em um mesmo experimento. Além disso, a expressiva variabilidade entre os métodos adotados prejudica as comparações entre os resultados oriundos de diferentes ensaios (GENTIL, 2001).

Em vários trabalhos a secagem lenta tem propiciado qualidade fisiológica superior em sementes de café e, por isso, tem sido comumente

recomendada e utilizada na produção destas sementes (BRANDÃO JUNIOR, 2002; LIMA, 2005; VEIGA, 2005; VIEIRA et al., 2007).

Em outras pesquisas, na secagem rápida foram observados resultados favoráveis à qualidade fisiológica. Rosa et al. (2005) estudaram o efeito de diferentes velocidades de secagem sobre a viabilidade e a armazenabilidade de sementes de *C. canephora*. Foi observado decréscimo da qualidade fisiológica das sementes à medida que se reduziu o conteúdo de água. Nesta pesquisa, a melhor qualidade das sementes foi observada em velocidade intermediária de secagem enquanto a secagem lenta, comumente recomendada, resultou em menor qualidade fisiológica das sementes. Dussert et al. (2006) estudaram os efeitos do equilíbrio de secagem em sementes de *C. arabica* com umidades relativas (UR) de 9 a 81%. A secagem lenta induziu um decréscimo significativo nas concentrações dos antioxidantes, glutathione e vitamina C. Conseqüentemente, a secagem lenta sob UR controlada induziu significativo processo deteriorativo em sementes de café.

Sabe-se que existe diferença de comportamento das sementes de *C. arabica* e *C. canephora* com relação à tolerância à secagem. Sementes de *C. canephora* são mais sensíveis à secagem rápida em relação às de *C. arabica*. Esse fato talvez esteja associado à porcentagem de sacarose presente em maior valor nas sementes de café arábica (LIMA, 2005).

Vários mecanismos tem sido envolvidos na aquisição e manutenção da tolerância à dessecação, conferindo proteção contra as conseqüências da perda de água, em diferentes níveis de hidratação. Porém, nenhum mecanismo é, por si só, responsável por esta tolerância; cada componente é igualmente crítico, atuando em sinergismo e controlado no nível genético (LEPRINCE et al. 1993). A ausência ou inefetiva expressão de um ou mais destes mecanismos determinam o grau relativo de sensibilidade à dessecação (PAMMENTER; BERJAK, 1999). Sementes que toleram a dessecação dispõem de alguns

mecanismos de proteção capazes de manter os sistemas de membranas das células, as estruturas das macromoléculas e as substâncias de reserva em condições de readquirir suas funções fisiológicas quando as sementes são novamente embebidas. O desenvolvimento destes mecanismos depende de características genéticas das espécies que determinam a presença de substâncias como açúcares solúveis, antioxidantes, enzimas que atuam contra o sistema de oxidação lipídica e proteínas específicas (*late embryogenesis abundant proteins* – LEA proteínas). Apesar de ser determinada geneticamente, a presença destes mecanismos pode ser intensificada ou reduzida de acordo com a taxa de secagem da semente ou com o meio ambiente no qual a semente se desenvolveu (GUIMARÃES, 1999).

Os organismos, quando submetidos à temperatura elevada, reagem a esse estresse induzindo a expressão de genes específicos. Um grupo específico de genes, chamado genes HS (*heat shock*), é rapidamente induzido em níveis elevados sob condições de estresse (SCHLESINGER et al., 1982 apud GURLEY, 2000, p. 458). Dentro desse grupo de genes, um dos mecanismos mais estudados na adaptação dos organismos à condição de estresse é a indução das proteínas resistentes ao calor, “*heat shock proteins*” (HSPs), o qual inclui várias famílias de proteínas conservadas. Proteínas codificadas por esses genes capacitam as células a sobreviverem aos efeitos nocivos do calor (SCHLESINGER et al., 1982 apud GURLEY, 2000, p. 458). A maior parte das HSPs, que são expressas em resposta ao calor e outros estresses, tem função relacionada e ameniza problemas causados pela agregação e má estruturação de proteínas. Entretanto, cada família tem um único mecanismo de ação; algumas promovem a degradação de proteínas mal estruturadas, outras juntam diferentes tipos de estruturas intermediárias, prevenindo-as da agregação (Hsp70 e Hsp60), e outras promovem a reativação de proteínas que tenham sido agregadas (Hsp100). Sendo assim, acredita-se que essas proteínas têm uma função na

estabilidade da conformação das proteínas, sugerindo um papel importante no mecanismo de tolerância a dessecação em sementes (SCHLESINGER et al., 1982 apud GURLEY, 2000, p. 458). Segundo Vertucci e Farrant (1995), a função das HSP tem sido relacionada tanto na preservação como no reparo das estruturas macromoleculares, membranas e organelas, durante a desidratação ou reidratação, respectivamente. Embora todos os organismos sintetizem HSPs em resposta ao calor, o balanço de proteínas sintetizadas e a relativa importância das famílias individuais de HSP na tolerância a estresse variam muito entre os organismos (QUEITSCH et al., 2000).

Em estudos recentes tem sido observada que a perda de viabilidade das sementes durante a secagem é acompanhada por um aumento na peroxidação de lipídios e acúmulo de radicais livres. No entanto, há a necessidade de se conhecer os mecanismos de ação das EROs, assim como os mecanismos de defesa ao acúmulo de radicais livres, durante o processo de secagem em sementes de café.

2.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

O O₂, apesar de essencial para a existência e sobrevivência da vida aeróbica, pode gerar estresse oxidativo, devido a uma variedade de mudanças fisiológicas. Estas mudanças, geralmente são maiores nas plantas em relação a outros eucariotos devido ao seu estilo de vida estacionário, sob ambientes variando constantemente e porque plantas geram O₂ no processo de fotossíntese e consomem O₂ durante a respiração. Além disso, entre todos os organismos, a concentração de O₂ é maior nas plantas, com maior potencial de produção de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente de danos oxidativos (SCANDALIOS, 1993).

As espécies reativas de oxigênio (EROs ou ROS) são formas parcialmente reduzidas do oxigênio atmosférico (O_2). Geralmente resultam da excitação do O_2 formando oxigênio singleto (O_2^1) ou da transferência de um, dois ou três elétrons para o O_2 para formar, respectivamente, um radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou um radical hidroxila (HO^-). Ao contrário do oxigênio atmosférico, EROS são capazes de oxidar vários componentes celulares e podem levar a morte celular (VANDENABEELE et al., 2000).

Existem muitas fontes de EROS nas plantas. Algumas estão envolvidas na respiração e na fotossíntese. Outras fontes estão envolvidas com os estresses bióticos e abióticos. Em geral, o O_2^- pode surgir quando elétrons são mal direcionados e doados ao oxigênio. Estima-se que 1% do consumo total de O_2 de um tecido vegetal vai para a produção de EROS (MOLLER, 2001).

A cadeia transportadora de elétrons mitocondrial é uma fonte de O_2^- bem estudada (SCANDALIOS, 1993). Plantas que crescem sob condições sem estresse apresentam o maior número de danos oxidativos em proteínas mitocondriais. Os dois maiores locais de formação de EROS na mitocôndria são os complexos I e II, onde a interação com o O_2 pode levar a produção de O_2^- (BARTOLI et al., 2004).

A cadeia transportadora de elétrons do aparato fotossintético é outra fonte de O_2^- nas células vegetais. Um problema adicional para os cloroplastos é a transferência de energia de excitação da clorofila para o oxigênio, que pode gerar O_2 . Os cloroplastos estão sujeitos ao risco da toxidez do oxigênio uma vez que o O_2 pode ser fotorreduzido a O_2^- e subsequentemente a H_2O_2 nos tilacóides. O local fotorredutor de O_2 nos cloroplastos é o fotossistema I (PSI), e seu produto primário é o O_2^- . Contudo, nos tilacoides o H_2O_2 é fotorreduzido via desproporcionamento do O_2^- mas não diretamente através da redução de dois elétrons do O_2 (ASADA, 1999).

O estresse biótico causado por vírus, fungos e bactérias pode ser combatido com o aumento da produção de EROs e com a indução de morte celular nos tecidos infectados. Acredita-se que esse seja um importante mecanismo de controle dos patógenos (MITTLER, 2002). Esse mecanismo foi denominado Resposta de Hipersensibilidade (HR) que age combatendo o patógeno e sinalizando sobre a infecção para os outros tecidos (JONES, 1996; KOSACK; VANDENABEELE et al., 2000).

O estresse abiótico pode causar grande aumento de EROs nas células vegetais. O estresse por calor estimula a geração de H_2O_2 em plantas (DAT et al., 1998; FOYER et al., 1998). As HSPs estão envolvidas no aumento da sobrevivência de plantas, animais e leveduras que sofreram estresse oxidativo (BANZET et al., 1998; FINKEL, 2000; GODON et al., 1998; FINKEL; HOLBROOK, 2000). Assim, a indução de genes codificando HSPs e seu fator de transcrição pelo H_2O_2 leva a um aumento na tolerância ao estresse oxidativo causado pelo calor. Outro tipo de estresse abiótico, a intoxicação com metais pesados, causa principalmente a peroxidação lipídica resultante das EROs (BACCOUCK et al., 2001). A exposição às altas temperaturas envolve o acúmulo de EROs. São vários os mecanismos, mas o primeiro local de produção provavelmente é o cloroplasto, com a quebra da cadeia transportadora de elétrons seguida do declínio na fixação de CO_2 . Além disso, uma oxidase dependente de NAD(P)H pode ser ativada (VANDENABEELE et al., 2000).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desbalanço em qualquer compartimento celular entre a produção de EROs e a defesa antioxidante, levando a danos. De acordo com Smith e Berjak (1995), entre os principais eventos não mutuamente exclusivos identificados ou sugeridos como decorrentes da deterioração estão: (i) alterações de membranas celulares; (ii) diferenças em atividade respiratória e produção de ATP; (iii) mudanças em

enzimas e reservas nutritivas; (iv) mudanças na síntese de RNA e proteínas; (v) aberrações cromossômicas e danos ao DNA (tanto nuclear quanto mitocondrial).

A indução de peroxidação lipídica é um dos efeitos mais danosos de EROs. Um indicativo de estresse oxidativo, devido à reação de EROs com ácidos graxos insaturados, é a peroxidação de lipídeos de membranas essenciais do plasmalema ou de organelas intracelulares (SCANDALIOS, 1993). De acordo com Khan et al. (1996), o dano de membranas é um fator de grande importância na deterioração de sementes armazenadas e na redução da longevidade de sementes sob condições naturais. A deterioração é resultado de mudanças metabólicas, destruição da membrana e perda de material orgânico e inorgânico (BEWLEY; BLACK, 1994).

O dano ao genoma é umas das causas de deterioração mais importantes em sementes. As EROs interferem no DNA e no RNA impedindo a síntese de enzimas essenciais para a germinação da semente. Há também uma redução na síntese de DNA (MARCOS FILHO, 2005). A eletrofilicidade do OH^\cdot possibilita sua interação com as bases nitrogenadas resultando em mutações. O OH^\cdot reage tanto com as bases nitrogenadas quanto com a desoxirribose (BARREIROS et al., 2006). Acredita-se que a maior produção de EROs ocorre nas mitocôndrias. Este fato aliado ao limitado mecanismo de reparo faz com que o DNA mitocondrial seja o mais afetado. As mitocôndrias danificadas tendem a produzir mais EROs que as normais gerando um ciclo vicioso de aumento na produção de EROs e dano ao DNA (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

A germinação de sementes depende da energia obtida no processo de respiração celular. Em sementes deterioradas, as células sofrem prejuízos em sua capacidade respiratória no início do processo germinativo. Isso acontece devido à quebra do gradiente protônico necessário para manter o acoplamento respiratório, em consequência de danos de membranas (COOLBEAR, 1994). A respiração envolve o ciclo da glicólise, o ciclo de Krebs e a cadeia de transporte

de elétrons. A atividade e expressão das enzimas envolvidas nestas rotas podem ser utilizadas para estudar o efeito do estresse oxidativo no processo de respiração celular (BETTEY; FINCH-SAVAGE, 1996).

As proteínas apresentam muitos sítios ativos que podem ser danificados durante o estresse oxidativo. Alterações ocorridas em algumas proteínas podem resultar em mudanças físicas, como fragmentação e agregação. Essas mudanças conformacionais fazem com que algumas 3 proteínas sejam mais susceptíveis à degradação por enzimas proteolíticas (DAVIES, 1993).

2.4 Mecanismos de controle das EROs

Primeiramente a célula deve evitar a formação de EROs. A mitocôndria em seu metabolismo normal controla a produção de EROs mantendo o balanço entre disponibilidade de substrato e o requerimento de ATP. Além disso, a mitocôndria dispõe de oxidases alternativas, proteínas de despareamento e NAD(P)H desidrogenases para prevenirem a formação de EROs em excesso. Uma vez formadas, as EROs devem ser removidas tão eficientemente quanto possível, para minimizar o dano, portanto, os mecanismos de desintoxicação constituem a segunda linha de defesa contra os efeitos deletérios das EROs. Por fim, a terceira linha de defesa contra as EROs é o reparo dos danos causados (MOLLER, 2001).

Antioxidantes como o ácido ascórbico e a glutatona são fundamentais para a defesa das plantas contra o estresse oxidativo (MITTLER, 2002). A cisteína, hidroquinonas, manitol, alguns carotenoides e β -caroteno, são também importantes antioxidantes não enzimáticos (SCANDALIOS, 1993).

Segundo Mittler (2002) alguns mecanismos podem evitar a produção de EROs: (i) adaptações anatômicas tais como movimento das folhas e curvatura, epiderme refratado a luz, proteção do estômato em estruturas especiais; (ii)

adaptações fisiológicas tais como metabolismos C4 e CAM; e (iii) mecanismos moleculares que reorganizem o aparato fotossintético de acordo com a qualidade de luz.

As principais vias de retirada das EROs em plantas são: (i) Ciclo água-água nos cloroplastos; (ii) Ciclo ascorbato-glutationa nos cloroplastos, citosol, mitocôndria, apoplasto e peroxissomos; (iii) Ação da catalase nos peroxissomos (GOMES JUNIOR, 2006).

As enzimas utilizadas nestes mecanismos são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), dehidroascorbato redutase (DHAR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), glutaciona redutase (GR), glutaciona peroxidase (GPX) e guaiacol peroxidase (GOPX).

O ciclo água-água é um sistema dos cloroplastos que foto reduz o O_2 em água. Esse sistema foi assim denominado porque os elétrons da água no PSII são doados ao O_2 para redução à água no PSI sem a mudança líquida na quantidade de O_2 . A função mais importante deste ciclo é a limpeza rápida e imediata de O_2^- e H_2O_2 no local de geração, antes que estes possam interagir com outras moléculas alvo. Além disso, esse ciclo é capaz de dissipar o excesso de energia luminosa com segurança. Este ciclo é composto das seguintes reações: fotooxidação da água no PSII; fotorredução do O_2 no PSI; dismutação do O_2^- catalisada pela SOD; redução do H_2O_2 pelo ascorbato catalisada pela APX; e redução do ascorbato oxidado (ASADA, 1999).

O ciclo ascorbato-glutationa (ou ciclo de Halliwell-Foyer-Asada) é uma via eficiente das células vegetais se desfazerem do H_2O_2 em certos compartimentos celulares onde este metabólito é produzido e a CAT não está presente. Este ciclo utiliza os antioxidantes: APX, MDHAR, DHAR e GR (FOYER et al., 1998). O primeiro passo deste ciclo é a limpeza do H_2O_2 pela APX produzindo monodehidroascorbato (MDHA). A enzima MDHAR utiliza uma molécula de NAD(P)H para reduzir o MDHA a ascorbato. A DHAR utiliza

duas moléculas de glutathione (GSH) para reduzir o DHA a ascorbato, com a geração de uma molécula de glutathione oxidada (GSSG). E por fim, a GR catalisa a redução do GSSG a GSH (FOYER et al., 1998; JIMÉNEZ et al., 1997).

A enzima CAT possui a função de eliminar o H_2O_2 produzido na fotorrespiração e na β -oxidação de ácidos graxos. Durante o estresse oxidativo os peroxissomos aumentam em quantidade e assim maior quantidade CAT fica disponível para combater o aumento na produção de EROs (MITTLER, 2002). A CAT também protege a SOD contra a inativação por altos níveis de H_2O_2 (FRIDOVICH, 1995).

A GPOX é uma importante enzima do mecanismo de desintoxicação dependente de glutathione presente no citoplasma. Durante o estresse oxidativo, sua função é reduzir hidroperóxidos citotóxicos em seus respectivos alcoóis. Isso inclui o peróxido de hidrogênio e os hidroperóxidos de ácidos graxos e fosfolípidios (R-OOH). Desta forma, ela possui um papel na desintoxicação de produtos da peroxidação de lipídeos formados pela atividade das EROs (DIXON et al., 1998).

As oxidases alternativas previnem a formação excessiva de EROs. Ao contrário do que ocorre em animais, a mitocôndria vegetal possui uma cadeia de transporte de elétrons bifurcada. Além da rota respiratória do citocromo, encontrada em todos os eucariotos, as plantas possuem uma rota alternativa que diverge na ubiquinona. O transporte de elétrons através da via alternativa ignora dois dos três sítios ao longo da cadeia de citocromo onde o transporte de elétron se liga a síntese de ATP. A rota alternativa compreende uma única proteína, a oxidase alternativa (AOX), que existe na membrana mitocondrial. O distúrbio da rota do citocromo leva a indução da AOX em muitos organismos (MAXWELL et al., 1999). Prevenindo a restrição severa da respiração, as AOX atuam prevenindo a geração excessiva de EROs (YIP; VANLERBERGHE, 2001).

2.5 Expressão gênica em ácido ribonucleico (RNA)

A expressão gênica é o processo pelo qual a informação contida em um gene é usada para a síntese de um produto gênico funcional. Esse produto gênico funcional pode ser um RNA mensageiro (mRNA), um RNA não-codante (ncRNAs), e polipeptídeos. Os mRNAs contêm os códons que serão usados para a tradução de um polipeptídeo. Com relação aos chamados ncRNAs, essas moléculas de ácido ribonucleico têm uma função diferente de intermediários da informação gênica. Algumas dessas funções são RNA transportador de aminoácido, RNA ribossômico estrutural, pequenos RNAs nucleares catalisadores de splicing, RNA de interferência no “silenciamento” gênico, dentre outras (ALBERTS et al., 2007; LODISH et al., 2005; NELSON; COX, 2002; STRYER et al., 2004).

O transcriptoma de uma célula é o conjunto de RNAs transcritos presentes na mesma em determinado período ou situação. Esse genoma funcional varia entre as células em quantidade, localização, e genes expressos. Ou seja, apesar de a maioria das células de um organismo conter o mesmo genoma, o transcriptoma varia. Este fenômeno é explicado pela regulação da expressão gênica. Isso permite que a célula ou organismo responda aos diferentes estímulos ambientais. Além disso, isto possibilita a diferenciação dos tecidos. A regulação da expressão gênica acontece em vários níveis, dentre estes: DNA; RNA e proteína. Em especial, a regulação da formação do RNA mensageiro sofre influência de vários fatores: empacotamento do DNA; metilação do DNA; amplificação do DNA e rearranjos; formação da heterocromatina; inativação do cromossomo X em humanos; adição da cauda poli-A; *splicing* correto; adição do capacete durante o processamento; degradação do RNAm; transporte do RNAm para o citoplasma; ligação do RNAm com o ribossomo; silenciamento gênico com RNA interferente; etc

(ALBERTS et al., 2007; LODISH et al., 2005; NELSON; COX, 2002; STRYER et al., 2004).

2.6 Genômica funcional e expressão gênica em café

Com término da primeira etapa do Projeto Genoma EST-Café, iniciado em fevereiro de 2002, o Brasil lidera a pesquisa genética do produto e os cientistas brasileiros passam a deter um maior conhecimento sobre o genoma do vegetal. No Projeto Genoma do Café foram sequenciadas as ESTs (*expressed sequence tags*) das espécies *C. arabica*, *C. canephora*, *C. racemosa* (CAIXETA et al., 2003; VIEIRA et al., 2006). No total, foram sequenciados 214.964 clones de 37 bibliotecas de cDNA. Os ESTs foram agrupados em 17.982 *contigs* e 32.155 *singletons*, resultando na identificação de cerca de 33.000 unigenes diferentes (VIEIRA et al., 2006). As sequências obtidas nesse projeto podem ser utilizadas para o desenho de *primers* que, por sua vez, serão utilizados para estudar a expressão das ESTs em outras situações de interesse que não foram contempladas no projeto genoma. Além disso, existem técnicas mais sensíveis para estudar o efeito de determinados tratamentos na expressão de genes de interesse.

Estudos de expressão gênica para genes relacionados à qualidade da bebida de café têm sido realizados, a exemplo daqueles que expressam para as enzimas α -galactosidase e β -mananase (MARRACCINI et al., 2001; GEROMEL et al., 2006). A caracterização da expressão de genes envolvidos na via biossintética da cafeína e dos ácidos clorogênicos representam a maioria dos trabalhos de expressão gênica em café (ASHIARA; CROZIER, 1999; MELO, 2005; MIZZUNO et al., 2003). Oliveira (2007) utilizou a técnica de RT-PCR (semiquantitativa) para estudar a expressão de genes envolvidos na via biossintética da cafeína em cafeeiros mutantes não produtores de cafeína. Foi

observado que plantas sem cafeína (AC) apresentaram polimorfismos na expressão de um transcrito alternativo do gene cafeína sintase.

A qualidade de bebida também está relacionada à fase de maturação do fruto como um todo. O fitormônio etileno está relacionado essa maturação. Sendo assim, Pereira et al. (2005) avaliaram o padrão de expressão do gene ACO durante o desenvolvimento do fruto de cafeeiro. Esse gene participa da última etapa da produção de etileno. O grupo de pesquisadores observou que houve um aumento da expressão de ACO no estágio verde-cana indicando um comportamento climatérico. Além disso, as sequências gênicas e proteicas apresentaram alta homologia com a ACO de plantas climatéricas.

O desenvolvimento da semente e do grão de café é outra área de enfoque dos estudos de expressão gênica. A maioria dos trabalhos procura uma ligação entre genes de interesse para a qualidade da bebida e sua expressão durante o desenvolvimento. Salmona et al. (2008) fizeram a análise da expressão de 266 genes durante o desenvolvimento da semente de *C. arabica*. Nesse trabalho a utilização da técnica “real time” PCR foi eficiente na definição de *clusters* de genes coexpressados. A expressão dos genes ACC oxidase e ACC sintase durante a maturação dos frutos foi analisada por Pereira et al. (2005). Pré et al. (2008) isolaram e caracterizaram os cDNAs relacionados a proteínas da rota de síntese das galactomananas. Posteriormente, esses autores analisaram a expressão desses genes durante o desenvolvimento do grão de café. Nos resultados desse trabalho foi observada uma diferença de expressão entre os grãos das espécies *C. arabica* e *C. canephora*.

A expressão do gene que codifica a proteína isocitrato liase foi estudada em sementes de cafeeiro frescas e durante a secagem, utilizando-se a técnica RT-PCR com oligonucleotídeos específicos (SELMAR et al., 2001). Os autores observaram uma quantidade maior de transcritos em sementes de cafeeiro durante a secagem e baixa expressão em sementes frescas. Tal constatação

sugere que essa enzima é indicadora de germinação e também está relacionada à qualidade da bebida, pois quando há maior expressão observou-se bebida superior.

Dentre as técnicas de estudo de expressão gênica (RNA) e transcriptômica podem-se enumerar: *Northern Blotting*; *RT-PCR*; *real-time RT-PCR*; *arranjos de cDNA e RNA*; *SAGE*; *Differential Display*; *Hibridização Subtrativa*; dentre outras. A técnica de análise de expressão gênica por PCR quantitativa possui várias denominações, *real-time RT-PCR* e *RT-qPCR* são as siglas mais utilizadas. As letras RT significam transcrição reversa e as letras PCR significam reação em cadeia da polimerase. Esta técnica é capaz de detectar e quantificar a formação dos *amplicons* à medida que a PCR acontece, ou seja, em tempo real. Essa medição gera uma curva de amplificação. Quanto maior o número de cópias inicial, menor será o número de ciclos da PCR necessários para a fluorescência ser detectada e atingir a linha de corte. Os resultados de cada amostra, ou tratamento, são comparados com os resultados da amostra calibradora. Se a normalização da expressão do gene alvo for realizada comparando com a expressão de um gene constitutivo, teremos a quantificação relativa. Porém, se a comparação da expressão do gene alvo, for realizada com um padrão de quantidade absoluta conhecida, temos a quantificação absoluta (BUSTIN, 2002; WONG; MEDRANO, 2005).

Os dados de experimentos de expressão gênica são frequentemente normalizados com os níveis de expressão de genes constitutivos, genes de referência. A utilização destes genes se torna possível desde que os mesmos possuam uma expressão uniforme durante as várias fases de desenvolvimento de um organismo, em tipos celulares diferentes e em condições ambientais diferentes. Para cada tipo de experimento, pode existir um controle endógeno diferente. Isso acontece porque cada tratamento pode influenciar de maneira diferente na expressão do controle endógeno. Cavallari et al. (2009) compararam

a expressão relativa de uma série de genes considerados constitutivos em diferentes tecidos e órgãos de cafeeiro. Também validaram os perfis de expressão dos genes selecionados em vários estádios de desenvolvimento e sob o estresse biótico causado pelo fungo da ferrugem laranja. Os genes analisados foram a álcool desidrogenase (*adh*), 14-3-3, poliubiquitina (*poly*), β -actina (*actin*) and gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*). Os resultados obtidos revelaram uma variação significativa nos níveis de expressão de todos os genes analisados, com exceção do *GAPDH*, para as condições experimentais analisadas neste experimento. Salmona et al. (2008) compararam a eficiência de sete genes para serem utilizados como controles endógenos durante o desenvolvimento e amadurecimento da semente de café arábica. Os genes analisados foram: actina, β -tubulina, Ubiquitina, cyclofilina, histona 2B, espermidina sintase e a proteína 40S ribossomal. Nenhum dos controles endógenos manteve a expressão estável durante a última fase de amadurecimento do fruto. A solução encontrada pelos autores foi utilizar dois controles. A ubiquitina foi utilizada com controle endógeno, por ter sido a menos instável, e o gene de resistência à canamicina foi utilizado como controle positivo externo. Essa estratégia forneceu um efeito satisfatório de normalização, comprovado pelo programa geNorm (SALMONA et al., 2008). O geNorm é um algoritmo de domínio público utilizado para determinar qual gene controle endógeno, referência, é mais estável. Por meio desse *software* um fator de normalização de expressão gênica pode ser calculado para cada amostra, baseado na média geométrica da expressão do controles endógenos testados (VANDESOMPELE et al., 2002).

2.7 Análise de isoenzimas

As enzimas são um grupo de moléculas orgânicas que podem ser de natureza proteica ou de RNA (ribozimas). Essas moléculas possuem em comum a capacidade de catalisar reações químicas que, sem sua presença, dificilmente aconteceriam. Estas transformam os substratos em produtos por meio da redução da energia de ativação (STRYER et al., 2004; ZEIDLE, 2000).

As denominadas isoenzimas, ou isozimas, são diferentes enzimas cujos sítios ativos possuem afinidade pelo mesmo tipo de substrato e apresentam diferenças na sequência de aminoácidos. As isoenzimas e aloenzimas são, portanto, isoformas de uma mesma enzima (STRYER et al., 2004; ZEIDLE, 2000). Na maioria das publicações, não é feita essa distinção da origem dessas isoformas, sendo então, todas chamadas como isoenzimas.

A existência de isoformas enzimáticas permite uma regulação mais refinada do metabolismo quando uma célula é exposta à diferentes estímulos ambientais e necessidades. Diferenças no sítio de regulação da enzima permitem que somente uma isoforma seja ativada, ou desativada, durante determinado processo biológico. Diferenças na sequência de aminoácidos do peptídeo sinal permitem que as diferentes isoformas sejam transportadas para compartimentos celulares diferentes (STRYER et al., 2004; ZEIDLE, 2000).

A técnica de eletroforese de enzimas é muito utilizada na área de tecnologia de sementes, principalmente com o propósito de associação com a qualidade fisiológica das mesmas após determinado tratamento. A difusão do uso de isoenzimas ocorreu por meio do desenvolvimento de métodos eficientes para a visualização do produto enzimático, e da aplicabilidade imediata encontrada em várias áreas de biologia. A detecção de isoenzimas envolve as etapas de extração de proteínas totais do tecido vegetal; separação destas enzimas através de eletroforese em gel de acrilamida não-desnaturante, ou

amido; e coloração histoquímica do gel com o substrato da enzima. A reação do produto da reação forma bandas que são usadas para desenhar o zimograma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Em vários trabalhos a técnica de eletroforese de enzima tem sido utilizada para estudar a qualidade fisiológica de sementes submetidas a determinado tratamento. Gomes Junior et al. (2006) verificaram o aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GOPX), e ascorbato peroxidase (APX) em células de cafeeiro que foram colocadas em contato com níquel (Ni). O contato das células de café com metais pesados desencadeia o processo de estresse oxidativo, e consequente ativação das enzimas *scavengers*. Brandão Junior (1996) selecionou sistemas de enzimas que permitissem visualizar variações nos padrões eletroforéticos de sementes de milho com diferentes níveis de deterioração. O autor observou que os sistemas enzimáticos da fosfatase ácida e peroxidase podem atuar como marcadores bioquímicos para a avaliação da deterioração de sementes de milho. Além disso, o autor observou que os marcadores bioquímicos permitem avaliar diferenças pequenas na qualidade fisiológica de sementes de milho deterioradas pela ação de microrganismos. Em alguns trabalhos foi observado que a presença de infecção nas sementes pode alterar o perfil isoenzimático de determinadas enzimas, o que pode resultar em resultados pouco precisos na análise de qualidade fisiológica (SILVA, 1997; VIEIRA, 1996). Pertel (2001) avaliou os efeitos do condicionamento fisiológico, em sementes de café, no perfil enzimático de álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), glutamato desidrogenase (GDH), fosfatase ácida (ACP), peroxidase (POX) e esterase (EST). O autor concluiu que os efeitos do condicionamento fisiológico variam conforme a qualidade fisiológica inicial dos lotes. Imolesi (1999) estudou a influência de diferentes doses de nitrogênio, aplicadas durante o desenvolvimento das plantas de milho, sobre isoenzimas de sementes. Os

resultados permitiram concluir que o tratamento com doses de nitrogênio não interfere nos padrões das isoenzimas catalase, esterase e malato desidrogenase.

Dentre as maiores dificuldades para utilização das isoenzimas na análise da qualidade fisiológica de sementes pode-se citar a dificuldade de interpretação de alguns zimogramas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). O zimograma é uma representação gráfica dos *spots*, ou bandas, reveladas no gel. Quanto maior o número de genes e alelos envolvidos no zimograma maior será a dificuldade de interpretação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de coleta e material biológico

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório Central de Análise de Sementes LCAS, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG. A colheita dos frutos de café foi realizada na área experimental do setor de cafeicultura da UFLA, no município de Lavras. A cidade de Lavras está situada a 21 °14' de latitude sul, 45 °00' de longitude W. Gr. e altitude média de 918 m. O clima se enquadra no tipo Cwb da classificação de Köppen. A temperatura média anual é de 19,4 °C. A pluviosidade se distribui principalmente de outubro a abril em valores anuais de 1529,7 mm.

Foram utilizadas as espécies *Coffea arabica* L. cultivar Rubi e *Coffea canephora* cultivar Apotã IAC 2258. Os frutos no estágio cereja de cada espécie foram colhidos em 50 plantas.

Após a colheita, os frutos foram descascados mecanicamente, permanecendo parte do endocarpo ou mucilagem nas sementes. As sementes foram submetidas ao processo de fermentação natural em água por 24 h e 30 °C, para a desmucilagem. Após o processo de fermentação foi realizada seleção manual das sementes retirando-se as mal formadas e as impurezas que poderiam comprometer os testes subsequentes.

3.2 Tratamentos pós-colheita

Após a desmucilagem foi determinado o grau de umidade das sementes pelo método da estufa a 105±3 °C por 24 horas (BRASIL, 2009). O grau de umidade das sementes foi de 46%, para as duas espécies.

As sementes foram submetidas às secagens lenta e rápida. As sementes não submetidas à secagem, com 46% de grau de umidade foram utilizadas como controle.

Para a secagem lenta, as sementes de ambas as espécies foram secadas naturalmente à sombra sobre telados em ambiente fechado e protegido de chuvas até atingirem 40, 30, 20 e 12% de grau de umidade. O grau de umidade das sementes foi monitorado utilizando-se de pesagem de uma amostra controle. O grau de umidade de todas as amostras foi confirmado pelo método da estufa aos 105 ± 3 °C por 24 horas (BRASIL, 2009). Durante a secagem, a temperatura média foi de 18,3 °C e a umidade relativa média de 70%.

Para a secagem rápida as sementes foram secadas artificialmente utilizando um secador estacionário experimental, de pequena escala, conforme modelo descrito por Navratil e Burris (1982). O secador foi regulado a 35 °C e fluxo de ar de aproximadamente $20 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1} \text{ t}^{-1}$ e as sementes foram secadas até atingirem 40, 30, 20 e 12% de grau de umidade. Durante o processo, as sementes foram revolvidas a cada 30 minutos. O grau de umidade das sementes foi monitorado da mesma forma que na secagem lenta, utilizando pesagens de uma amostra controle. O grau de umidade final de todas as amostras foi confirmado pelo método da estufa a 105 ± 3 °C por 24 horas (BRASIL, 2009).

Após a secagem, cinco quilogramas de sementes de cada tratamento foram transferidos para o LCAS, para as análises de qualidade fisiológica, bioquímicas e expressão gênica. As sementes foram armazenadas em embalagens plásticas, herméticas, sob temperatura de 10°C e umidade relativa de 50%.

3.3 Avaliação da qualidade fisiológica das sementes

3.3.1 Testes de germinação e vigor de plântula

O teste de germinação foi realizado com quatro repetições de 50 sementes, sem pergaminho, para cada tratamento. As sementes foram distribuídas em papel *germitest*, umedecido com água em quantidade equivalente a duas vezes e meia o peso do substrato seco. As sementes foram mantidas em germinador regulado à temperatura de 30 °C, na presença de luz. As avaliações foram realizadas aos quinze e trinta dias após a semeadura, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) e os resultados expressos em porcentagem. Aos 15 dias após a semeadura, avaliou-se a presença de protrusão e plântulas normais. Foi considerada protrusão a identificação visual do eixo embrionário, de cor branca, rompendo o tegumento da semente. Foi considerada plântula normal aquela que apresentasse visualmente a diferenciação morfológica da radícula e de raízes secundárias. Aos 30 dias após a semeadura, avaliou-se a presença de plântulas normais e normais fortes. Considerou-se plântula normal aquela que apresentasse radícula medindo mais que 1cm e presença de raízes secundárias. Considerou-se plântula normal forte aquela que apresentasse radícula maior que 2,5 cm e presença de raízes secundárias.

Aos 45 dias após a semeadura foi realizada a contagem de plântulas com abertura cotiledonar. Esse resultado também foi expresso em porcentagem.

3.3.2 Matéria seca de plântulas

Determinou-se a matéria seca de hipocótilos e radículas de plântulas que apresentavam abertura de folhas cotiledonares aos 45 dias do teste de germinação. O material foi colocado em estufa de fluxo contínuo a 35 °C por até cinco dias, ou até peso constante. Os resultados foram expressos na forma de gramas/ plântulas.

3.4 Obtenção dos *primers* de PCR em tempo real

As *ESTs* foram obtidas do Banco de Dados do Genoma Café brasileiro, CAFEST. Para isso foram utilizadas as ferramentas de bioinformática disponíveis no site LGE.

Para a análise das sequências obtidas utilizou-se a metodologia descrita por Santos et al. (2009). A análise dos *contigs* foi iniciada com a identificação das *ORFs* utilizando a ferramenta *ORF Finder* do National Center For Biotechnology Information – NCBI (2010). Posteriormente, estas sequências foram comparadas com outras sequências disponíveis nos bancos de dados públicos usando os algoritmos *BLASTn* e *BLASTx*, também disponíveis no site NCBI (2010). As *ORFs* foram traduzidas *in silico* utilizando a ferramenta de tradução do site *Expasy*. As sequências traduzidas foram comparadas com outras sequências disponíveis, utilizando o algoritmo *BLASTp*, do NCBI (2010). Os domínios e motivos proteicos foram analisados utilizando a ferramenta *Conserved Domains*, do site NCBI (2010). Para refinar essa análise de motivos e domínios, também foi utilizada a ferramenta *Motif Scan*, do site *MyHits*, baseando-se no banco de dados *Pfam*. As sequências de nucleotídeos das duas espécies estudadas foram alinhadas com a utilização da ferramenta *ClustalW*, acessada pelo site *Biology WorkBench*. Foi feita a busca por genes ortólogos

utilizando a ferramenta *BLASTO*, site *Oxitricha*. O endereço eletrônico desses sites se encontra no referencial bibliográfico.

As sequências obtidas por essa metodologia serviram de molde para obtenção dos *primers* de PCR em tempo real. Foi utilizado o *Software Primer Express*[®] v3.0, da empresa *Applied Biosystems*. Esse *software* permite a obtenção de vários pares de *primers*, dando notas para a qualidade dos mesmos de acordo com as especificações de compatibilidade com o kit de reação da mesma empresa. Além disso, esse site permitiu verificar a presença de formação de dímeros de *primers*, grampos de *primers*, dentre outras estruturas que poderiam comprometer a quantificação da expressão gênica utilizando sonda *SYBR*. Foram desenhados *primers* para os prováveis genes *Catalase 3* e *Peroxidase A* (Tabelas 9 e 16). Esses genes foram escolhidos por sua importância conhecida durante o estresse oxidativo, conforme descrito no referencial teórico.

Os *primers* para amplificarem os controles endógenos foram obtidos do artigo de Cavallari et al. (2009) os quais testaram o efeito normalizador desses genes em café (Tabelas 9 e 16). Para aumentar a confiabilidade desse trabalho, foram utilizados dois controles endógenos, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e poli-ubiquitina (UBQ).

3.5 Ensaio de PCR em tempo real

Para a extração de RNA foi utilizado o reagente *RNA Plant (Invitrogen)*. A quantidade e integridade do RNA total foram avaliadas utilizando espectrofotômetro Nanovue Plus (GE Healthcare Life Sciences) e gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. O RNA íntegro foi tratado com *DNAseI RNase Free (Applied Biosystems)*. Posteriormente, o RNA foi purificado utilizando-se o *RNeasy minelute cleanup kit (QIAGEN)*. Essa etapa de

purificação foi realizada para garantir a retirada de DNA genômico e de sais resultantes da extração, os quais comprovadamente comprometem a eficiência da PCR. Realizou-se uma PCR convencional, seguida de observação em gel de agarose 1,5%, para detectar a presença de DNA genômico contaminando o material.

A reação de RT-qPCR foi dividida em duas etapas. A transcrição reversa (RT) foi feita separadamente em alíquotas de cDNA, que se conservam melhor que o RNA. Para a reação de RT utilizou-se o kit *HighCapacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems).

A qPCR foi realizada utilizando o reagente *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Todas as reações foram realizadas com três repetições, incluindo os controles negativos e endógenos. Para a coleta de dados foi utilizado o *software* v. 2.0.1, do sistema 7500 de PCR em tempo real (Applied Biosystems) no Laboratório Central de Análise de Sementes/Fitotecnia/UFLA. Após cada reação de PCR em tempo real realizou-se a construção da curva de dissociação durante 30 min com o aumento gradual da temperatura de 60 °C a 95 °C. Com essa curva não foram observadas amplificações inespecíficas, comprovando desta maneira a qualidade dos *primers* e cDNAs na reação.

O método de quantificação relativa utilizado foi o $\Delta\Delta C_t$. Para cada amostra foi obtido o valor do C_t (*Threshold cycle*) a partir da curva de amplificação gerada no aparelho. A média dos C_t 's de cada amostra foi utilizada para estudo de quantificação relativa utilizando o GAPDH e UBIQUITINA como normalizadores, controles endógenos. A amostra de sementes controle, não submetidas a secagem, foi utilizada como calibradora (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As equações utilizadas para obter a quantificação relativa (RQ) foram:

(i) $\text{médiaCt GENE} - (\text{médiaCt GAPDH} + \text{médiaCt UBQ})/2 = \Delta\text{Ct}$
GENE normalizado.

(ii) $\text{Ct GENE no tratamento} - \text{Ct GENE no calibrador} = \Delta\Delta\text{Ct}$.

(iii) $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = \text{RQ}$, Quantificação Relativa ou Expressão Relativa.

3.6 Análises de isoenzimas

3.6.1 Eletroforese de isoenzimas esterase, catalase e peroxidase

Para as análises de isoenzimas, amostras de 50 sementes de cada tratamento foram trituradas em moinho da marca Tecnal modelo TE613/1, refrigerado a 4 °C, na presença de PVP e armazenadas à temperatura de -86 °C. A extração das proteínas foi realizada adicionando-se a 100 mg do pó da semente, 280 µL do tampão de extração (0,2M Tris) homogeneizados em vortex e, posteriormente, mantidos por uma hora em geladeira. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4 °C por 50 minutos e 60 µL do sobrenadante foram aplicados nos géis de poliacrilamida. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi tris-glicina pH 8,9. A eletroforese foi realizada a 150V durante 4 horas e os géis foram revelados para os seguintes sistemas isoenzimáticos: esterase (EST), peroxidase (PO) e catalase (CAT), conforme metodologia descrita por Alfenas (1998). Os resultados foram fotografados utilizando câmera digital SONY de 12.1 mega pixels e lente de 30 mm.

3.6.2 Atividade de endo-β-mananase

Foram adicionados 300 µL do tampão de extração (0,1 M Hepes; 0,5 M de NaCl pH 8,0; ácido ascórbico na proporção de 5 mg do ácido para cada mL de tampão) em cada microtubo com 100 mg de pó de cada amostra. Em seguida,

os microtubos contendo as amostras foram agitados em agitador tipo vortex por 1 minuto e centrifugados, a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi aplicado em gel contendo 6 mL de locust bean gum, ou LBG (Sigma); 0,24 g de agarose (Qbiogene); 24 mL de tampão pH 5,0 (11 mL de ácido cítrico 1M, 50 mL de Na₂HPO₄ e 149 mL de água destilada). O LBG 0,5% foi preparado aquecendo-se a solução por 2 horas, a 80 °C, seguido de resfriamento em temperatura ambiente.

Os suportes do gel com *U-frame* (Pharmacia) (vidros) foram limpos com etanol. Esse suporte foi coberto com gelbond film (Pharmacia), ficando o lado hidrofóbico em contato com o primeiro vidro, para que o lado hidrofílico ficasse em contato com o gel. O *gelbond* foi coberto com o segundo suporte e esses suportes foram unidos por prendedores. O gel foi aquecido em microondas, por 1 minuto, até a total dissolução da agarose. Pelo mesmo período, o suporte foi aquecido em estufa, a 80 °C, para que não houvesse risco de trincar o vidro por diferença de temperatura entre o vidro e o gel. Foi feita a aplicação do gel em temperatura ambiente. Após a solidificação, o gel foi armazenado em geladeira por um período de 24 horas. O gel foi furado com furador de 2 mm de diâmetro e esses furos foram succionados para a retirada de restos de gel com bomba a vácuo. Foram aplicados 2 µL do extrato da amostra por furo, em três repetições de cada amostra. O gel foi transferido para um germinador, a 25 °C, pelo período de 21 horas, no escuro, em câmara úmida.

Para a revelação, o gel foi inicialmente lavado em água destilada e, em seguida, lavado em tampão (tampão do gel) por 30 minutos e novamente lavado em água destilada. Logo após, o gel foi coberto com o corante vermelho congo 0,5% por 30 minutos e colocado em etanol por 10 minutos para a remoção do corante. Removido o etanol com água destilada, foi adicionada uma solução 1M de NaCl até a observação visual da formação de halos brancos nos furos que continham as amostras. Nesse momento, foi feita a medição do diâmetro das

amostras em duas direções com um paquímetro, resultando em um valor médio. Para o cálculo da atividade da enzima, foi feita uma comparação com a curva padrão gerada pela endo- β -mananase comercial de *Aspergillus niger* (Megazyme). O cálculo da atividade da enzima endo- β -mananase foi realizado segundo Downie et al. (1994).

3.7 Procedimento estatístico

Para a análise dos resultados das avaliações da qualidade fisiológica foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial [(2X4) + testemunha] sendo, dois métodos de secagem (secagem rápida e secagem lenta), quatro graus de umidade de sementes (40, 30, 20, 12%) e a testemunha com 46% de grau de umidade. Esse delineamento foi aplicado para as duas espécies *C. arabica* e *C. canephora*. Utilizou-se o *software Assistat Versão 7.5 Beta 2010* (SILVA; AZEVEDO, 2002) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Por meio do mesmo *software*, utilizou-se o teste de Dunnant para a comparação das médias dos tratamentos com as médias das testemunhas também em 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Espécie *C. arabica* L. cultivar Rubi

As taxas médias de secagem para os tratamentos de secagem rápida com os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12 foram, respectivamente, 3, 2, 1 e 0,9 unidades de % por hora. Já na secagem lenta, as taxas de secagem médias para os mesmos graus de umidade foram 0,2, 0,1, 0,08 e 0,07 unidades de % por hora. Observa-se, por esses resultados, que a taxa de secagem foi maior na secagem rápida em relação à secagem lenta. Em ambos os métodos, a taxa de secagem diminuiu à medida que a secagem prosseguiu.

Por meio da análise de variância foi observada interação significativa entre os fatores grau de umidade das sementes e métodos de secagem para: plântulas normais e normais fortes aos 30 dias após a semeadura; e plântulas com abertura cotiledonar, matéria seca de hipocótilo e radícula aos 45 dias após a semeadura (Tabela 1A – APÊNDICE A).

Para a variável protrusão radicular aos 15 dias após a semeadura não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 1A – APÊNDICE A). Essa fase da germinação é caracterizada pelo aumento em tamanho das células do embrião. Esse aumento celular exige relativamente menor metabolismo celular em relação às etapas seguintes, que são caracterizadas por mitoses e diferenciação dos tecidos (SILVA et al., 2004). Na hipótese de que os tratamentos empregados tenham causado estresse oxidativo significativo, este pode ser mais bem correlacionado nas fases de maior complexidade celular, com a incidência de danos em membranas e DNA. O Dano ao DNA e RNA é uma das causas da perda de qualidade fisiológica de sementes (MARCOS FILHO, 2005). As espécies reativas de oxigênio causam mutações no DNA mitocondrial e essas organelas possuem um mecanismo de

reparo limitado. O dano ao DNA mitocondrial gera um ciclo vicioso de aumento de produção de EROs e danos ao DNA nessas organelas, causando o efeito acumulativo ao longo das divisões celulares (BARREIROS et. al, 2006; FINKEL; HOLBROOK, 2000). Além disso, nas mitocôndrias ocorre a respiração celular, necessária para gerar a energia utilizada na germinação (BETTEY, 1996; COOLBEAR, 1994; BETTEY; FINCH-SAVAGE, 1996). Danos aos DNA mitocondrial resultantes do estresse oxidativo possuem, portanto, o potencial de diminuir a qualidade fisiológica de sementes de café. E essa perda de qualidade fisiológica pode ser mais bem observada a medida que se acumulam os danos ao DNA e às membranas celulares.

Observou-se que os valores de protrusão radicular em sementes submetidas aos métodos de secagem lenta e rápida, e com diferentes graus de umidade foram acima de 90%. Esses valores não foram estatisticamente diferentes do tratamento controle, cujas sementes não foram submetidas à secagem. No entanto, aos 15 dias após a semeadura, foram observadas plântulas normais apenas naquelas provenientes de sementes não submetidas à secagem. O efeito de testemunha x fatorial foi significativo para a variável normais aos 15 dias após a semeadura (Tabela 1). Por meio desse resultado observa-se que as sementes de *C. arabica* são sensíveis a dessecação. Resultado semelhante foi observado pelos autores Rosa et al. (2005) e Vieira et al. (2007).

Tabela 1 Porcentagem média de plântulas normais de *C. arabica* L. aos 15 dias após a semeadura, submetidas aos diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010

GRAU DE UMIDADE	Plântulas Normais 15d (%)	
	MÉTODO DE SECAGEM	
	RÁPIDA	LENTA
40	0 γ	0 γ
30	0 γ	0 γ
20	0 γ	0 γ
12	0 γ	0 γ
46 (Testemunha)	9	
CV(%)	5,71	

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

Em relação aos dados de plântulas normais aos 30 dias após a semeadura (Tabela 2), foi observada diferença significativa entre o tratamento em que as sementes foram submetidas à secagem rápida até 12% de grau de umidade (12RA) e o tratamento testemunha. Também foram observados maiores valores de plântulas normais, em sementes com grau de umidade intermediário quando submetidas à secagem rápida. Em contrapartida na secagem lenta, menor valor de plântulas normais foi observado em sementes com 20% de grau de umidade. Este fenômeno provavelmente está relacionado com a diminuição da eficiência dos mecanismos enzimáticos de combate aos radicais livres nesse grau de umidade.

Tabela 2 Porcentagem média de plântulas normais de *C. arabica* L. aos 30 dias após a semeadura, submetidas aos diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010

GRAU DE UMIDADE	Plântulas Normais 30d (%)	
	MÉTODO DE SECAGEM	
	RÁPIDA	LENTA
40	83 bB	91 aA
30	89 aAB	89 aA
20	92 aA	78 bB
12	74 bC γ	87 aA
46 (Testemunha)	85	
CV(%)	5,11	

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

Observa-se na Tabela 2 que a secagem lenta propiciou maiores porcentagens de plântulas normais em sementes com 40, 30 e 12% de grau de umidade. No entanto, na secagem rápida maiores valores de plântulas normais foram observados em sementes com 30 e 20% de grau de umidade.

Na variável de plântulas normais fortes aos 30 dias após a semeadura, foram observados resultados semelhantes (Tabela 3). Para essa variável, em sementes que foram submetidas a secagem rápida, observa-se menor vigor de plântula para as sementes secadas em relação aquelas com 46% de grau de umidade, não submetidas à secagem, com exceção daquelas secadas até 20% de grau de umidade.

Tabela 3 Porcentagem média de plântulas normais fortes de *C. arabica* L. aos 30 dias após a semeadura, submetidas aos diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010

% UMIDADE	Plântulas Normais Fortes 30d (%)	
	MÉTODO DE SECAGEM	
	RÁPIDA	LENTA
40	14 bB γ	29 aAB
30	15 bB γ	34 aA
20	57 aA γ	21 bB
12	12 bB γ	21 aB
46 (Testemunha)	28	
CV(%)	22,58	

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

Na secagem lenta, observou-se maior vigor de plântulas em sementes com 30% de grau de umidade (Tabela 3), o que também correspondeu à maior atividade da enzima endo- β -mananase (Figura 1). Na secagem rápida até 20% de grau de umidade, também se observou aumento do vigor e atividade do sistema isoenzimático endo- β -mananase (Tabela 3 e Figura 1) A atividade da enzima endo- β -mananase está relacionada ao processo de mobilização das reservas do endosperma e disponibilização para o crescimento e desenvolvimento da plântula (GIORGINI; COMOLI, 1996). A germinação precoce é evitada quando a semente está no fruto, principalmente devido ao efeito do ácido abscísico e ao potencial osmótico no ambiente do fruto fresco. Ao longo do processamento, o endocarpo é removido, permitindo o início da germinação (SELMAR et al., 2005). Bytof et al. (2007) também observaram aumento da expressão de genes relacionados a rota metabólica da germinação durante o processamento de sementes de café. Nesse trabalho, os genes estudados foram da isocitrato liase e β -tubulina.

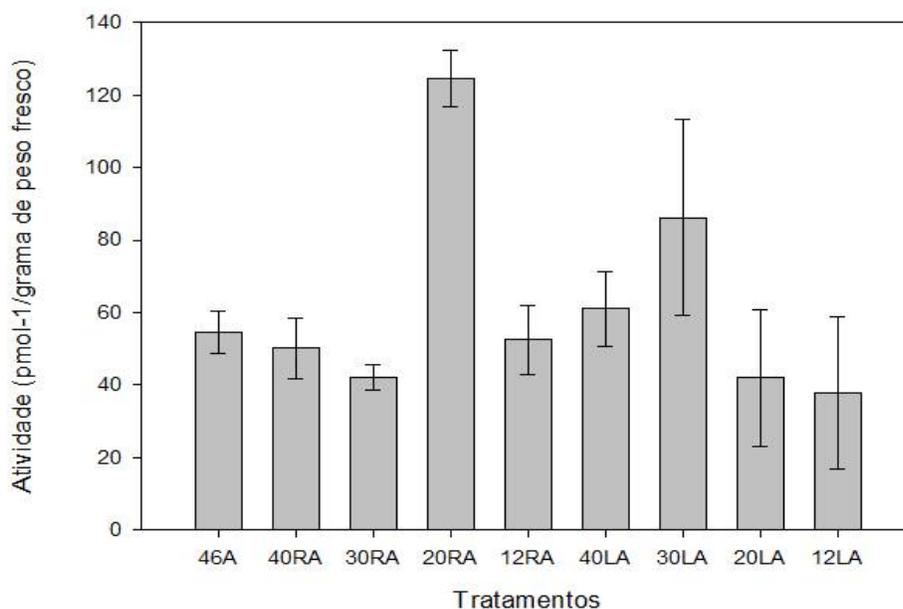


Gráfico 1 Atividade da enzima endo- β -mananase observada em sementes de *C. arábica* submetidas ao método de secagem rápida e lenta. UFLA, Lavras, MG, 2010

Legenda: 46, 40, 30, 20 e 12: graus de umidade nas sementes (%); R: Método de secagem rápida; L: Método de secagem lenta; A: Espécie *C. arábica*.

A variável abertura de cotilédones fornece inferências sobre o vigor da plântula. Na Tabela 5, pode-se observar que as plântulas de café perderam vigor em todos os tratamentos nos quais as sementes foram submetidas à secagem, com exceção do resultado observado em sementes submetidas à secagem lenta até 40% de grau de umidade, em relação à testemunha. Além disso, pode-se observar, em ambos os métodos de secagem, que quanto menor o grau de umidade na semente, menor foi o vigor observado na abertura de cotilédones. Sementes de café possuem cotilédones do tipo foliáceos e fotossintetizantes, o que ajuda na velocidade de desenvolvimento da plântula (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Sendo assim, essa variável é importante para avaliar a

perda de vigor nas sementes de café, apesar do período extenso a avaliação. O grau de umidade de 12% é recomendado por alguns autores como sendo a ideal durante o armazenamento, já que diminui a taxa de respiração e incidência de patógenos. Porém, mesmo que essa seja a umidade ideal para armazenamento, ela resultará em perda de qualidade fisiológica. Como pode ser observado na Figura 1, existe uma baixa atividade da enzima endo- β -mananase em sementes submetidas à secagem lenta até 20 e 12% de grau de umidade.

Tabela 4 Porcentagem média de plântulas de *C. arabica* L. com abertura de folha cotiledonar aos 45 dias após a semeadura, submetidas aos diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010

GRAU DE UMIDADE	Plântulas com folha cotiledonar aberta 45d (%)	
	MÉTODO DE SECAGEM	
	RÁPIDA	LENTA
40	16 bAB γ	30 aA
30	19 aA γ	14 aB γ
20	16 aAB γ	12 aB γ
12	7 aB γ	1 aC γ
46 (Testemunha)	41	
CV(%)	14,99	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula 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.

Por meio do método de secagem lenta, observa-se redução na qualidade fisiológica em níveis críticos (Tabela 4). Esses resultados mostram a grande importância dos estudos para melhorar o processamento pós-colheita, secagem e armazenamento de sementes de cafeeiro, fundamentais para a obtenção de mudas vigorosas.

Pelos resultados de matéria seca de hipocótilo, menores valores foram observados em sementes que foram secadas até 12% de grau de umidade, em ambos os métodos de secagem (Tabela 5). Esse resultado foi semelhante ao verificado para a abertura de cotilédone (Tabela 4). Na secagem lenta, observaram-se maiores valores de matéria seca de hipocótilo para as sementes com 40% de grau de umidade, em relação ao observado em sementes com 12% de grau de umidade (Tabela 5).

Tabela 5 Matéria seca de hipocótilo (mg/plântula) de *C. arabica* L. aos 45 dias após a semeadura, proveniente de sementes submetidas aos diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010

GRAU DE UMIDADE	Matéria Seca de Hipocótilo 45d (mg/plântula)	
	MÉTODO DE SECAGEM	
	RÁPIDA	LENTA
40	.013 aA	.014 aA
30	.014 aA	.012 bBC
20	.013 aA	.013 aAB
12	.011 aB γ	.011 aC
46 (Testemunha)	.013	
CV(%)	6.33	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula 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.

Em relação à matéria seca de radícula (Tabela 6) maiores valores foram observados em sementes secadas até 30 e 20% de grau de umidade, pelo método de secagem rápida. Resultados semelhantes foram observados para plântulas normais e normais fortes um mês após a semeadura (Tabelas 2 e 3). Na secagem lenta, menores valores de matéria seca de radícula foram observados para as

sementes com 20% de grau de umidade (Tabela 6). Esse resultado também foi observado nas variáveis de plântulas normais e normais fortes (Tabelas 2 e 3). Esses resultados observados no grau de umidade de 20% podem ser comparados bioquimicamente com os resultados de isoenzimas para esterase e catalase (Figuras 2 e 3). A esterase indica que está ocorrendo hidrólise dos ésteres, geralmente de membrana. Ou seja, nesse grau de umidade podem estar ocorrendo danos às membranas e compartimentos celulares. Esses danos podem causar aumento do estresse oxidativo.

Tabela 6 Matéria seca de radícula (mg/plântula) de *C. arabica* L. aos 45 dias após a semeadura, submetidas a diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010

% UMIDADE	Matéria Seca de Radícula 45d (mg/plântula)	
	MÉTODO DE SECAGEM	
	RÁPIDA	LENTA
40	.007 aB	.008 aB
30	.008 aA γ	.009 aA γ
20	.008 aA γ	.006 bC
12	.006 bC	.007 aB
46 (Testemunha)	.007	
CV(%)	6,78	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula 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.

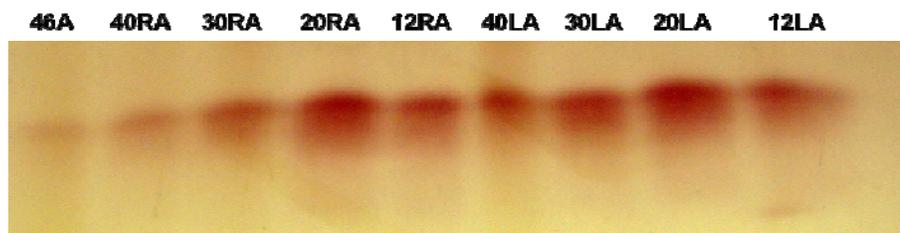


Figura 1 Padrão isoenzimático de esterase (EST) para sementes de *C. arabica* submetidas as secagens lenta e rápida, até os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12%; e testemunha sem secagem, com 46% de teor de umidade. UFLA, Lavras, 2010

Legenda: 46, 40, 30, 20 e 12: graus de umidade (%); R: método de secagem rápida; L: método de secagem lenta; A: espécie *C. arabica*.

Na Figura 1, pode ser observada menor atividade da enzima esterase em sementes não submetidas à secagem (46%), em sementes secadas de forma rápida até 40 e 30% de grau de umidade e em sementes submetidas à secagem lenta até 40% de teor de umidade. Esse mesmo comportamento foi observado em relação à enzima catalase (Figura 3). As enzimas catalases são removedoras do peróxido de hidrogênio, extremamente tóxico. Essas enzimas são um tipo de peroxidase bastante ativas (FAGAGNA, 2008; HENDRY, 1993; TAKAHASHI; OHTANI, 2007). Esse peróxido de hidrogênio pode ser produzido na β -oxidação de ácidos graxos, sendo que a esterase é um indicador desse metabolismo (MITTLER, 2002).

Observa-se ainda em relação a catalase (Figura 3) que a redução dos graus de umidade das sementes durante a secagem aumenta a atividade da enzima. Esse aumento pode ser observado principalmente em sementes submetidas à secagem rápida. Essa mesma tendência pode ser observada em relação à atividade da enzima peroxidase (Figura 4). Não houve atividade da

enzima peroxidase em sementes não submetidas à secagem e submetidas à secagem lenta e rápida até 40% de grau de umidade.

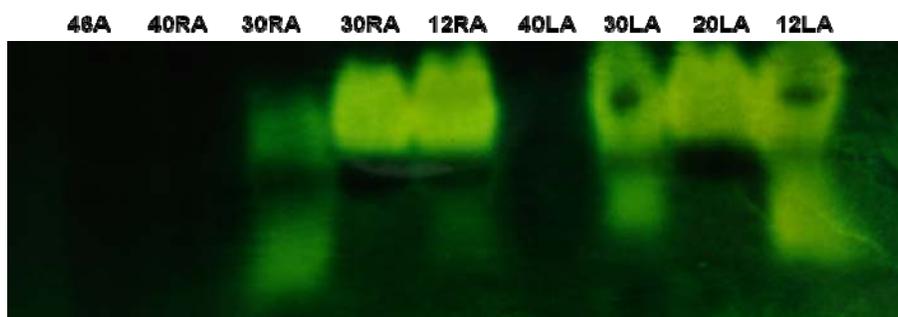


Figura 2 Padrão isoenzimático de catalase (CAT) para sementes de *C. arabica* submetidas às secagens lenta e rápida, até os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12%; e testemunha sem secagem, com 46% de teor de umidade. UFLA, Lavras, 2010

Legenda: 46, 40, 30, 20 e 12: graus de umidade (%); R: método de secagem rápida; L: método de secagem lenta; A: espécie *C. arabica*

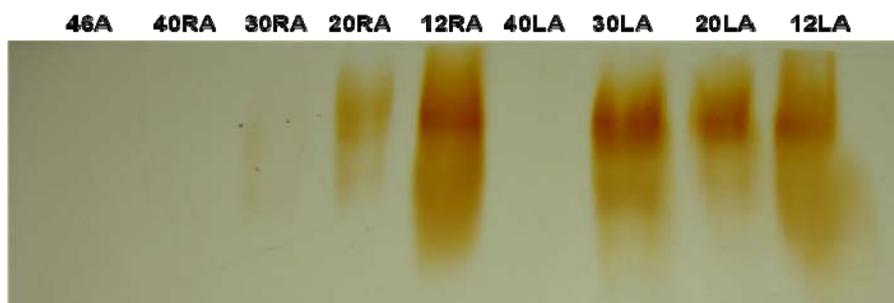


Figura 3 Padrão isoenzimático de peroxidase (POX) para sementes de *C. arabica* submetidas as secagem lenta e rápida, até os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12%; e testemunha sem secagem, com 46% de teor de umidade. UFLA, Lavras, 2010

Legenda: 46, 40, 30, 20 e 12: graus de umidade (%); R: método de secagem rápida; L: método de secagem lenta; A: espécie *C. arabica*.

Como descrito na metodologia, as sequências alvo foram analisadas por bioinformática, para comprovar a sua identidade. Essa estratégia foi necessária pois o banco de dados do genoma café brasileiro, CAFEST, possui um conjunto de ESTs que ainda não foram completamente anotadas. Na Tabela 7 está apresentado o resultado da análise de identidade. O e-value foi satisfatório para as duas sequências alvo, tanto no BLASTp quanto no Pfam.

Tabela 7 Resultado de *BLASTp* e *Pfam* para as sequências traduzidas *in silico* dos genes alvo. UFLA, Lavras, MG, 2010

Gene Alvo	Acesso NCBI	Provável Função NCBI	E-value BLASTp	E-value Pfam
Catalase	P49317.1	<i>Catalase 3</i>	0,0	5.8e-71
Peroxidase	AAU04879.1	<i>Peroxidase a</i>	0,0	4.3e-179

A EST de catalase foi traduzida *in silico* para identificação de domínios proteicos. A análise de domínios conservados nas sequências alvo (*query sequence*) mostrou a presença de domínios típicos dos genes de interesse. A Figura 4 foi obtida pela ferramenta *Conserved domain* do NCBI (2010). Nesta figura pode-se observar a presença dos domínios pfam06628 e pfam00199 presente em todas as famílias de Catalases. Esses domínios fazem parte da superfamília *Catalase-related immune-responsive, Catalase-rel*, como apresentado na Figura 4. Também foi observada a presença do hit específico de Catalase classe 1, presente em bactérias, algas, plantas e também do hit de Catalase 3, que possibilita a ligação de um grupo heme na parte interna da estrutura e também permite a ligação de uma molécula de NADPH como cofator.

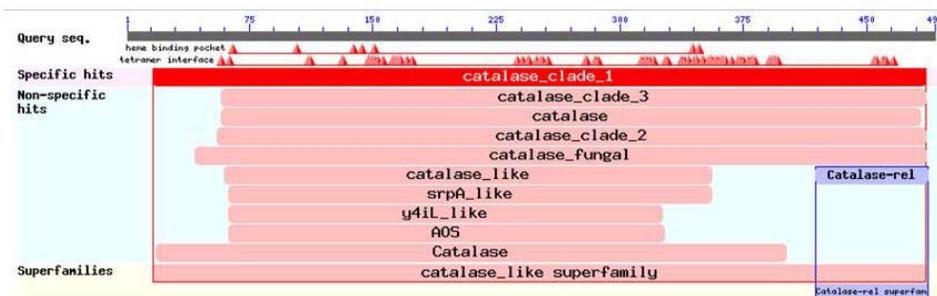


Figura 4 Resultado da ferramenta *Conserved Domains*, NCBI, para a sequência proteica traduzida *in silico* de catalase de café. UFLA, Lavras, 2010

A análise de domínios proteicos também foi realizada para conferir a anotação da sequência traduzida de peroxidase. Pela Figura 6 pode-se observar a presença de motivos característicos de ligação de cofator (ion cálcio), sítios de ligação ao grupo prostético (heme ou ferriprotoporfirina IX), sítios de ligação ao substrato (H_2O_2). A análise de hits específicos e inespecíficos mostra que possivelmente se trata de uma peroxidase secretória de classe III, que podem ser encontradas no meio extracelular ou em vacúolos. Observou-se também alguns domínios proteicos semelhantes à de peroxidases de ascolbato (Figura 5).

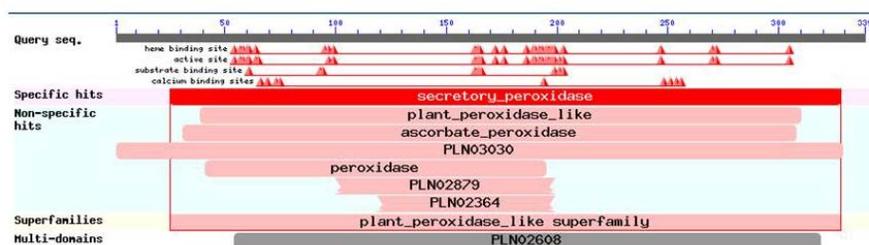


Figura 5 Resultado da ferramenta *Conserved Domains*, NCBI, para a sequência proteica traduzida *in silico* de peroxidase de café. UFLA, Lavras, 2010

Na Tabela 8 são apresentados os pares de *primers* para os genes alvo os quais foram desenhados utilizando as sequências anotadas do genoma café.

Tabela 8 Pares de *primers* obtidos para os ensaios de PCR quantitativa. UFLA, Lavras, MG, 2010

Gene	Primer	Sequências	Eficiência (%)
Catalase	forward	5' ttcgatcctgttcgtcatget3'	99,94
	reverse	5' aacacacctgtcacgettcc 3'	
Peroxidase	forward	5' ggacagtgaatatgcagcaaatct 3'	96,61
	reverse	5' cctggatccattcaactatcgt 3'	
GAPDH	forward	5' ttgaagggcggtgcaaa 3'	97,51
	reverse	5' aacatgggtgcatccttgct 3'	
UBQ	forward	5' cgctgactacaatatccaaaagga 3'	95,11
	reverse	5' ctgcattccaccctcaga 3'	

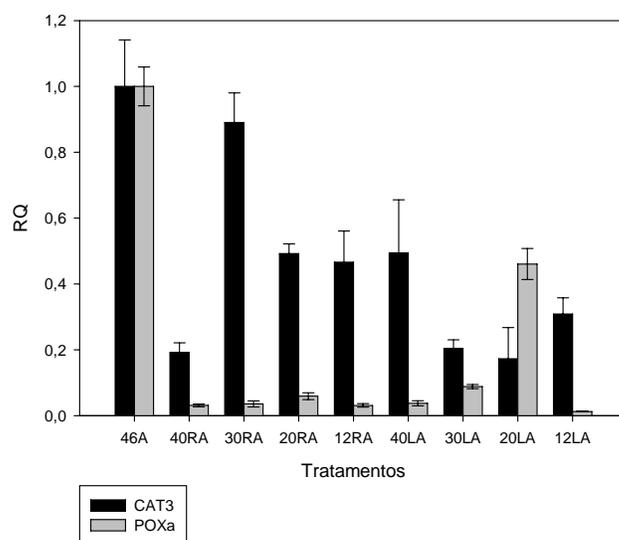


Gráfico 2 Expressão gênica de Catalase 3 e Peroxidase A em sementes de *C. arabica* submetidas aos métodos de secagem lenta e rápida até os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12%; e testemunha sem secagem, com 46% de teor de umidade. UFLA, Lavras, 2010

Legenda: 46, 40, 30, 20 e 12: graus de umidade (%); R: método de secagem rápida; L: método de secagem lenta; A: espécie *C. arabica*.

Os transcritos da catalase (CAT3) e peroxidase (POXa) apresentaram valores superiores de expressão na testemunha em relação aos demais tratamentos (Figura 7). A testemunha foi utilizada como amostra de referência para a normalização da expressão relativa. Salmona et al. (2008) também observaram aumento da expressão relativa do mRNA catalase no estádio cereja fresco. Os autores observaram que transcritos relacionados aos processos de germinação e aquisição de tolerância à dessecação eram acumulados nos estádios finais de desenvolvimento da semente de café. A acumulação desses transcritos é uma forma das células das sementes se prepararem para responder mais rapidamente às futuras condições fisiológicas, como o estresse por dessecação. (SOEDA et al., 2005). Além disso, as respectivas proteínas produzidas por esses genes acumulados não foram observadas, provavelmente porque sua presença acarretaria inviabilidade da semente ou gasto desnecessário de energia metabólica. Os resultados observados por esses autores podem ajudar a entender por que não foi observada a atividade das isoenzimas catalase e peroxidase (Figuras 3 e 4). Esse resultado é compatível com os conhecimentos atuais sobre o dogma da biologia molecular. Nesses novos conhecimentos a presença do RNA não mais significa presença obrigatória do produto proteico. Entre o RNA e seu produto proteico existem diferentes mecanismos de regulação da expressão gênica, que podem ser utilizados de acordo com as necessidades da célula (CARRINGTON; AMBROS, 2003; JAENISCH; BIRD, 2003). Com o tratamento de secagem, houve redução dos níveis de expressão dos genes em estudo em relação à testemunha (Figura 7). Essa redução pode representar a utilização do estoque inicial de transcritos quando as sementes foram submetidas aos diferentes tratamentos onde esses transcritos são necessários. A hipótese de degradação foi descartada devido aos bons resultados observados no gel de acrilamida e a alta eficiência dos *primers* na qPCR.

Também foi observada a reorganização da expressão desses genes, ora repondo parte do estoque original de transcritos desses genes ora perdendo novamente a expressão (Figura 7). Os estímulos que levaram a essa reorganização não foram detectados no experimento, provavelmente por ocorrer combinação dos efeitos de taxa de secagem, grau de umidade, conteúdo de EROs, mecanismos não enzimáticos de defesa, dentre outros. Isso acontece porque a tolerância a dessecação em sementes é uma característica de controle genético quantitativo (BRANDÃO JÚNIOR, 2000).

A expressão da catalase foi aumentada aos 30% de grau de umidade na secagem rápida e reduzida nas umidades subsequentes. Na secagem lenta, a retomada da expressão da catalase foi em nível reduzido. Além disso, houve uma redução nas umidades intermediárias e aumentando novamente aos 12% de grau de umidade (Figura 7). Essa diferença pode estar associada à diferença de taxa de secagem nos dois métodos (BORÉM, 2008). Não foi possível observar relação clara da expressão gênica da catalase com a qualidade fisiológica.

Pelos resultados de expressão gênica para a POXa observa-se uma redução da presença desse transcrito em sementes submetidas à secagem, em relação à amostra testemunha (Figura 7). Além disso, observou-se uma reorganização da expressão dessa enzima, resultando em aumento da expressão em sementes com 20% de grau de umidade e submetidas a secagem lenta. Esse resultado permite inferir que houve um aumento do estresse durante a secagem lenta até 20% de grau de umidade.

Na quantificação relativa utilizando PCR tempo real, não se pode comparar quantitativamente a expressão de genes diferentes. Isso ocorre porque a expressão do gene em cada amostra é normalizada com a expressão do mesmo gene na amostra de referência. Isso pode ser observado na expressão da amostra de referência, testemunha, onde ambas tem expressão relativa igual um. Comparações quantitativas entre as expressões relativas de genes diferentes só

podem ser feitas na quantificação absoluta, porém, podem-se fazer comparações de padrão de expressão (BUSTIN, 2002; WONG; MEDRANO, 2005). O padrão de expressão do alvo POXa foi diferente do padrão analisado para CAT3, com exceção da maior presença do transcrito na amostra testemunha (Figura 7).

Essas flutuações nos níveis dos genes CAT3 E POXa (Figura 7) podem estar relacionadas à manutenção das EROs em níveis adequados à sobrevivência celular. Já foi bem descrito em biologia celular, que o peróxido de hidrogênio possui funções benéficas para a célula, além de causar estresse oxidativo. Uma dessas funções benéficas é parar o ciclo celular durante o reparo do DNA após algum estresse e envelhecimento. Em algumas situações de estresse, ocorre mutagênese no material genético, que precisa ser reparado antes que se prossiga o ciclo celular. A retirada excessiva do radical livre peróxido de hidrogênio pode causar diminuição dessa inibição do ciclo celular, que então retoma seu curso mesmo com o DNA danificado. Com essa regulação refinada, as células das sementes de café provavelmente conseguem combater o estresse oxidativo, sem interferir na regulação do ciclo celular (FAGAGNA, 2008; HENDRY, 1993; TAKAHASHI; OHTANI, 2007). A ausência de catalase pode resultar em inativação da enzima superóxido dismutase que é outra enzima que combate o estresse oxidativo (FRIDOVICH, 1995), portanto sua expressão deve ser mantida em níveis adequados.

Como foi discutido anteriormente nos resultados de endo- β mananase (Figura 1), o processamento pós-colheita pode ativar os mecanismos enzimáticos de germinação em uma situação de estresse oxidativo. Ou seja, as células do embrião vão receber os estímulos ambientais que levam ao crescimento celular em um momento que pode estar ocorrendo mutações em genes importantes. O processo de secagem causa estresse hídrico e oxidativo, gerando espécies reativas de oxigênio mutagênicas (DUSSERT, 2006). Se a célula prosseguir com a divisão celular, algumas mutações vão se fixar de forma definitiva. Portanto, a

hipótese do controle refinado da divisão celular utilizando uma concentração adequada de peróxido de hidrogênio pode explicar a diminuição dos níveis de expressão dessas enzimas removedoras desta espécie reativa de oxigênio.

A tolerância ao estresse oxidativo é claramente quantitativa, dificultando seu estudo. Isso pode explicar o fato dos resultados de expressão gênica não seguirem claramente o padrão de qualidade fisiológica. No ciclo ascorbato-glutationa, por exemplo, o peróxido de hidrogênio é retirado sem a presença de catalase, mas sim utilizando as enzimas ascorbato peroxidase, monodehidroascorbato redutase, dehidroascorbato redutase, glutatona redutase (FOYER et al., 1998; JIMÉNEZ et al., 1997). Outro exemplo é o ciclo água-água, que ocorre no cloroplasto e também não envolve a participação da enzima catalase (ASADA, 1999). Além disso, existem vários antioxidantes não enzimáticos, como a cisteína, manitol, carotenoides ácido ascórbico e glutatona (MITTLER, 2002; SCANDALIOS, 1993). Uma estratégia alternativa seria tentar obter *primers* degenerados que anelem em todas as isoformas de uma classe enzimática. É uma tarefa difícil, pois existem inúmeros enzimas em uma mesma classe. Outra estratégia seria avaliar os níveis de expressão de genes para fatores de transcrição ligados ao estresse. Esses fatores de transcrição controlam a expressão de vários genes ao mesmo tempo.

Os resultados de PCR tempo real para ESTs de Catalase e Peroxidase (Figura 7) não seguem o padrão encontrado nas respectivas análises isoenzimáticas. Na testemunha são observados os maiores valores de expressão relativa e posteriormente os níveis de expressão relativa caem, para ambos os genes. A princípio essa observação pode parecer incoerente, mas os resultados de isoenzimas (Figuras 2, 3 e 4) representam a atividade de todas as enzimas que reagem com o mesmo substrato (STRYER et al., 2004; ZEIDLE, 2000). Em contrapartida, na PCR em tempo real consegue-se separar uma única sequência EST, como foi evidenciado pelos resultados de bioinformática e curva de

dissociação do produto de reação. A presença do transcrito não implica que o respectivo produto polipeptídico esteja sendo traduzido na mesma proporção e mesmo que esteja sendo traduzido proporcionalmente, isso não implica que as enzimas estejam ativadas e funcionais. Esses são os conhecidos mecanismos de regulação da expressão gênica, que possuem vários níveis desde o DNA até o fenótipo propriamente dito. Qualquer íon metálico, em especial cobre (II) e ferro (II), pode agir como inibidor não competitivo da catalase. Os venenos cianeto e curare são inibidores competitivos da catalase, ou seja, ligam-se fortemente ao centro ativo, impedindo a ligação do peróxido de hidrogênio.

4.2 Espécie *Coffea canephora* Apoatã IAC 2258

As taxas médias de secagem para os tratamentos de secagem rápida com os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12 foram, respectivamente, 2, 2, 0,8 e 0,7 unidades de % por hora. Já na secagem lenta, as taxas de secagem médias para os mesmos graus de umidade foram 0,2, 0,1, 0,1 e 0,1 unidades de % por hora. Observa-se por esses resultados que a taxa de secagem foi maior na secagem rápida em relação à secagem lenta. Na secagem rápida houve diminuição da taxa média de secagem a partir de 20% de grau de umidade. Na secagem lenta, a diminuição da taxa média de secagem ocorreu em 30% de grau de umidade, mas manteve-se constante até 12% de grau de umidade.

Por meio da análise de variância foi observada interação significativa entre os fatores grau de umidade das sementes e métodos de secagem para: plântulas normais aos 15 dias, plântulas normais e normais fortes aos 30 dias após a semeadura; e plântulas com abertura cotiledonar aos 45 dias após a semeadura (Tabela 2A).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos e entre a testemunha nas variáveis protrusão aos 15 dias após a semeadura e matéria seca

de hipocótilo aos 45 dias após a semeadura. Na variável matéria seca de radícula só houve diferença significativa entre testemunha e os tratamentos de 20 e 12% de grau de umidade, da secagem lenta (Tabela 2A).

Os resultados de plântulas normais aos 15 e 30 dias, e normais fortes aos 30 dias após a semeadura, para a espécie *C. canephora* apresentaram um padrão onde, na secagem rápida, as médias dos tratamentos que receberam secagem até 40% de teor de umidade (40RC) sempre foram maiores (Tabelas 10, 11 e 12). O mesmo foi observado na variável plântulas com abertura de cotilédone aos 45 dias após a semeadura (Tabela 13). Esses resultados coincidem com a maior atividade de isoenzima endo- β -mananase (Figura 12) e com a menor expressão da CAT3 (Figura 11). Outro padrão de comportamento foi observado na secagem lenta, onde os tratamentos que receberam secagem até 40 e 30% de grau de umidade sempre obtiveram os melhores resultados nas avaliações acima para a secagem rápida, normais e normais fortes aos 30 dias e abertura de cotilédones aos 45 dias após a semeadura (Tabelas 11, 12 e 13). Alguns autores estudaram a variação da sensibilidade a secagem no gênero *Coffea*. Esses resultados mostram que a espécie *C. canephora* é mais sensível a secagem do que a espécie *C. arabica*. Esta última possui comportamento considerado intermediário (BRANDÃO JÚNIOR, 2000; EIRA et al., 1999). Isso pode explicar por que a secagem de sementes de *C. canephora* resultou em diminuição da qualidade fisiológica à medida que a umidade era retirada. Esse resultado também teve boa correspondência com os resultados de endo- β -mananase (Figura 10). Rosa et al. (2005) também observaram a perda de qualidade fisiológica em sementes de *C. canephora* a medida que se reduziu o conteúdo de água.

Comparando-se os métodos de secagem, a secagem rápida apresentou os melhores resultados nas variáveis normais 15, 30 dias, e normais fortes aos 30 dias após a secagem (Tabelas 11, 12 e 13), em todos os graus de umidades,

diferentemente dos resultados encontrados para a variável plântulas normais aos 15 dias após a semeadura (Tabela 9). Outros autores também encontraram melhores resultados de qualidade fisiológica de sementes para a secagem rápida em sementes de *C. canephora* (DUSSET, 2006; ROSA et al., 2005).

Tabela 9 Porcentagem média de plântulas normais de *C. canephora* aos 15 dias após a semeadura, submetidas aos diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010

GRAU DE UMIDADE	Plântulas Normais 30d (%)	
	MÉTODO DE SECAGEM	
	RÁPIDA	LENTA
40	46 aA	40 aA γ
30	15 bB γ	29 aAB γ
20	2 bC γ	23 aBC γ
12	2 bC γ	13 aC γ
46 (Testemunha)	58	
CV(%)	24,01	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula 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.

Tabela 10 Porcentagem média de plântulas normais de *C. canephora* aos 30 dias após a semeadura, submetidas aos diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010

GRAU DE UMIDADE	Plântulas Normais 30d (%)	
	MÉTODO DE SECAGEM	
	RÁPIDA	LENTA
40	92 aA γ	84 bA
30	83 aB	84 aA
20	90 aA γ	78 bB γ
12	74 aC γ	25 bC γ
46 (Testemunha)	85	
CV(%)	1,0	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula 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.

Tabela 11 Porcentagem média de plântulas normais fortes de *C. canephora* aos 30 dias após a semeadura, submetidas a diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010

GRAU DE UMIDADE	Plântulas Normais Fortes 30d (%)	
	MÉTODO DE SECAGEM	
	RÁPIDA	LENTA
40	78 aA γ	24 bAB γ
30	56 aB	33 bA γ
20	49 aB	11 bBC γ
12	48 aB	1 bC γ
46 (Testemunha)	60	
CV(%)	21,40	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula 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.

Tabela 12 Porcentagem média de plântulas de *C. canephora* com abertura de cotilédones aos 45 dias após a semeadura, submetidas aos diferentes métodos de secagem e graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2010

GRAU DE UMIDADE	Plântulas Folha Cotiledonar Aberta 45d (%)	
	MÉTODO DE SECAGEM	
	RÁPIDA	LENTA
40	39 aA	14 bAB γ
30	20 aB	22 aA
20	25 aB	4 bB γ
12	22 aB	6 bB γ
46 (Testemunha)	30	
CV(%)	30,08	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula 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.

As análises de isoenzimas para esterase e catalase apresentaram um padrão de atividade semelhante (Figuras 6 e 7). Nas sementes da testemunha e dos tratamentos com 40% de grau de umidade observou-se atividade relativamente baixa, ou nenhuma atividade detectável pela técnica. Essa observação vai de encontro com os resultados de plântulas normais 15 e 30 dias, normais fortes 30 dias, e abertura de cotilédones 45 dias após a semeadura (Tabelas 10, 11, 12 e 13). Lima (2005) sugere que essa sensibilidade a dessecação em *C. canephora* pode ser atribuída ao menor conteúdo de sacarose, porém os resultados de isoenzimas mostram que os mecanismos enzimáticos de defesa são importantes, mesmo nas sementes secas (Figuras 6, 7 e 8). Outros autores também observaram aumento na atividade de enzimas *scavengers* em sementes submetidas à condições de estresse oxidativo (BRANDÃO JÚNIOR, 1996; GOMES JUNIOR, 2006).

O estresse hídrico e térmico causa aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e estimula a geração de peróxido de hidrogênio (DAT et al., 1998; FOYER et al., 1998). Provavelmente, isso estimulou o aumento da atividade dos complexos isoenzimáticos de catalase e peroxidase (Figuras 7 e 8). O peróxido de hidrogênio pode ser produzido durante a peroxidação lipídica (SCANDALIOS, 1993), a qual pode ser indicada pelo aumento da atividade da esterase (Figura 5).

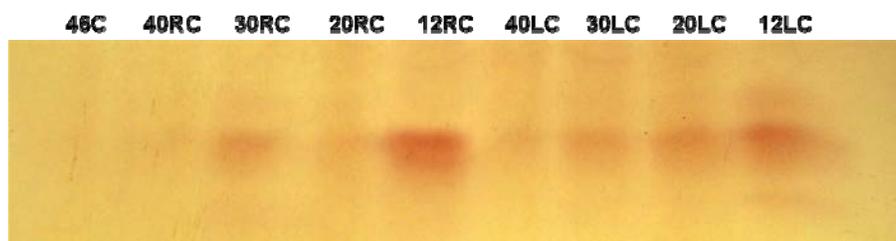


Figura 6 Padrão isoenzimático de esterase (EST) para sementes de *C. canephora* submetidas às secagens lenta e rápida até os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12%; e testemunha sem secagem, com 46% de teor de umidade. UFLA, Lavras, 2010

Legenda: 46, 40, 30, 20 e 12: graus de umidade (%); R: método de secagem rápida; L: método de secagem lenta; A: espécie *C. canephora*.

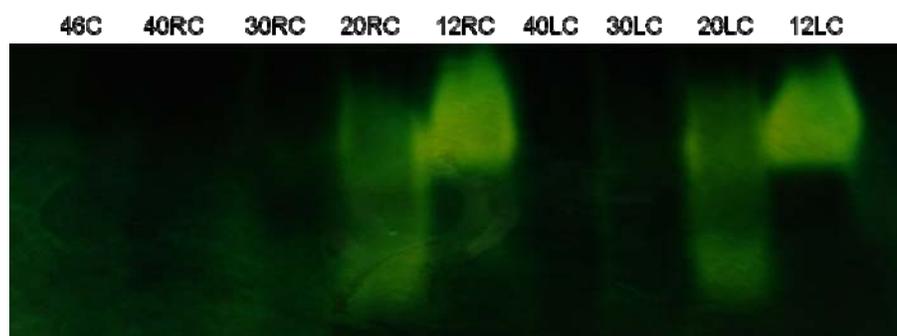


Figura 7 Padrão isoenzimático de catalase (CAT) para sementes de *C. canephora* submetidas às secagens lenta e rápida até os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12%; e testemunha sem secagem, com 46% de teor de umidade. UFLA, Lavras, 2010

Legenda: 46, 40, 30, 20 e 12: graus de umidade (%); R: método de secagem rápida; L: método de secagem lenta; A: espécie *C. canephora*.

Os resultados de peroxidase são semelhantes aos resultados de catalase e esterase (Figura 7). De forma geral, pelos resultados de enzimas sugere-se um aumento do estresse oxidativo ao longo do processo de secagem.

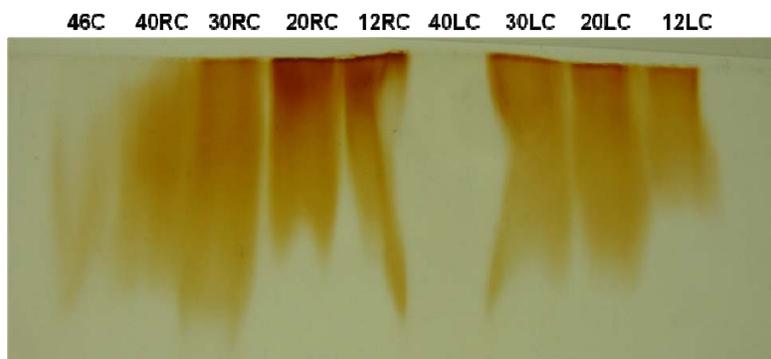


Figura 8 Padrão isoenzimático de peroxidase (POX) para sementes de *C. canephora* submetidas às secagens lenta e rápida, até os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12%; e testemunha sem secagem, com 46% de teor de umidade. UFLA, Lavras, 2010

Legenda: 46, 40, 30, 20 e 12: graus de umidade (%); R: método de secagem rápida; L: método de secagem lenta; C: espécie *C. canephora*

Para confecção dos primers foram obtidas as sequencias dos genes alvo no site LGE, do genoma café humano. Os contigs obtidos foram traduzidos *in silico* no site *Expasy* e realizaram-se as comparações com sequencias conhecidas no site do NCBI (2010). Os resultados dessa análise se encontram na Tabela 14 e mostram que houve baixos e-values, ou seja, o alinhamento entre as sequencias alvo e modelo teve poucas diferenças em aminoácidos.

Tabela 13 Resultado de BLASTp e Pfam para as sequencias traduzidas *in silico* dos genes alvo. UFLA, Lavras, MG, 2010

Gene Alvo	Acesso NCBI	Provável Função NCBI	E value NCBI	E value Pfam
Catalase	P49317.1	Catalase 3	4e-124	2.7e-104
Peroxidase	AAU04879.1	Peroxidase a	3e-115	4.3e-74

Foi realizada a análise de domínios proteicos pela ferramenta *Conserved Domains* do site NCBI (2010), para os contig-ESTs, traduzidos *in silico*, de catalase e peroxidase. No polipeptídeo traduzido foram observados 248 aminoácidos. Foram encontrados vários domínios comuns a várias classes de catalase, domínios não específicos, portanto a proteína pode ser classificada como sendo da superfamília das catalases (Figura 9). A sequência traduzida da peroxidase apresentou a presença de domínios característicos de peroxidases de classe III, que são encontradas em vacúolos vegetais (NCBI, 2010).

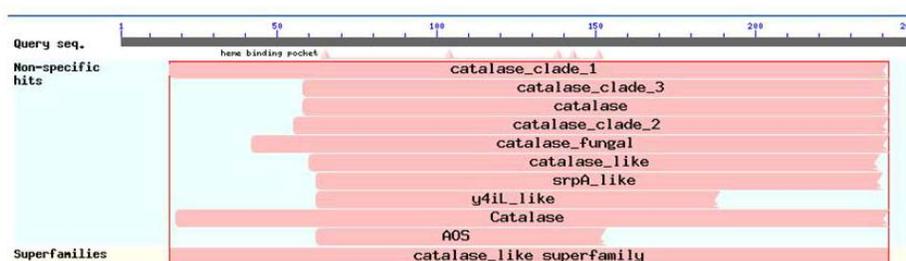


Figura 9 Esquema dos domínios conservados da sequência traduzida *in silico* da catalase de café. UFLA, Lavras, MG, 2010

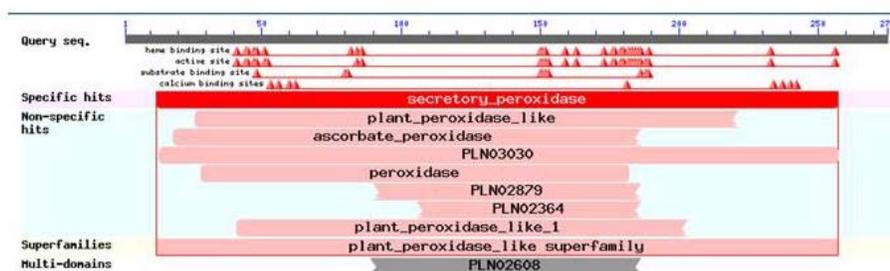


Figura 10 Esquema dos domínios conservados da sequência traduzida *in silico* da peroxidase de café. UFLA, Lavras, MG, 2010

Com as sequências de cada gene foram desenhados os *primers* de PCR tempo real (Tabela 14). A análise de *primers* mostrou baixa formação de estruturas secundárias e a eficiência ficou dentro da faixa aceitável de 90 a 105%. Os controles endógenos GAPDH e UBQ foram obtidos do trabalho de validação de controles endógenos de café feito por Cavallari et al. (2009).

Tabela 14 Pares de *primers* obtidos para os ensaios de PCR quantitativa. UFLA, Lavras, MG, 2010

Gene	Primer	Sequências	Eficiência (%)
Catalase	forward	5' agggagggtaatttcgattgg 3'	98,887
	reverse	5' ggatcgaatctgggaatttcatt3'	
Peroxidase	forward	5' tcaggagctcatcacgattggaat 3'	100,00
	reverse	5' tgcatttctttgcttcagatttg 3'	
GAPDH	forward	5' ttgaaggcggtgcaaa 3'	97,51
	reverse	5' aacatgggtgcatccttgcct 3'	
UBQ	forward	5' cgctgactacaatatccaaaagga 3'	95,11
	reverse	5' ctgcattccaccctcaga 3'	

Os resultados de PCR tempo real mostram, de forma geral, uma presença maior de transcritos tanto de catalase quanto de peroxidase em sementes com 46% de grau de umidade. Nos tratamentos de secagem rápida a catalase teve sua maior expressão relativa em sementes com 30% de grau de umidade, já na secagem lenta a maior expressão foi em sementes 40% de grau de umidade. Na secagem rápida, a peroxidase teve sua maior expressão relativa nos tratamentos com 20% de grau de umidade e, na secagem lenta, teve sua maior expressão nos tratamentos com 30% de grau de umidade. De forma geral, observam-se maiores valores de expressão dessas enzimas na secagem rápida. Podemos inferir que a secagem estimula a expressão desses genes. Esses resultados de PCR em tempo real mostram que o padrão de expressão de peroxidase e catalase não são semelhantes, apesar de ambos serem ligados ao

estresse oxidativo. Provavelmente isso se deve às diferenças nas regiões promotoras e acentuadoras. Na revisão bibliográfica foi verificado que esses genes, apesar de terem mesma função de remover H_2O_2 , podem ter outras funções e localizações diferentes e isso justifica um padrão de expressão diferente (ASADA, 1999; DIXON et al., 1998; FOYER et al., 1998; ORENDI et al., 2001; OSTERGAARD et al., 1998; POLIDOROS; SCANDALIOS, 1997; YIP; VANLERBERGHE, 2001).

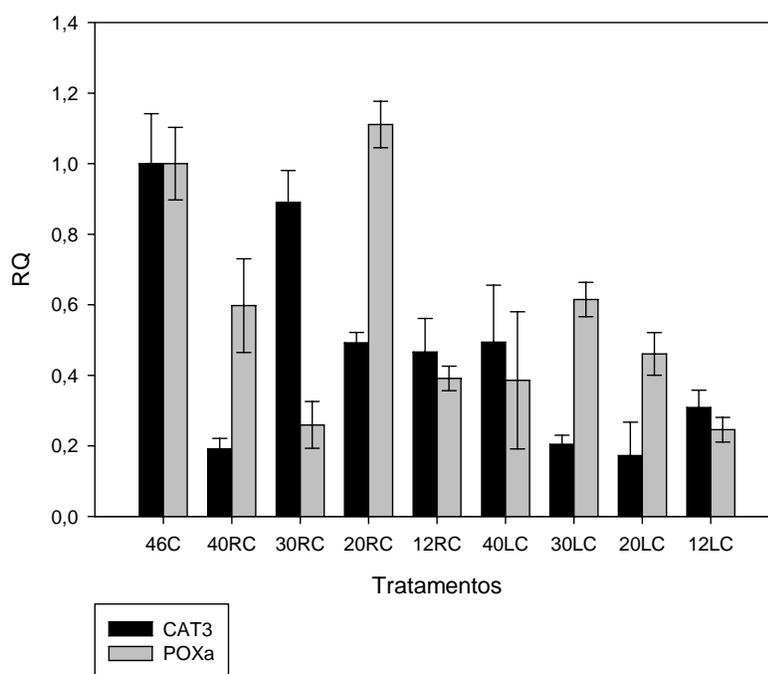


Gráfico 3 Resultado de expressão gênica para ESTs de Catalase 3 e Peroxidase A em sementes de *C. canephora* submetidas aos métodos de secagem lenta e rápida até os graus de umidade de 40, 30, 20 e 12%; e testemunha sem secagem, com 46% de teor de umidade. UFLA, Lavras, 2010

Legenda: 46, 40, 30, 20 e 12: graus de umidade (%); R: método de secagem rápida; L: método de secagem lenta; A: espécie *C. arabica*

Os resultados de atividade de endo- β -mananase tiveram boa correspondência com os resultados fisiológicos, onde na secagem rápida a melhor germinação ocorreu em 40% de grau de umidade e na secagem lenta a melhor germinação ocorreu em 30% de grau de umidade (Figura 11). Como foi discutido para a espécie *C. arabica*, a enzima endo- β mananase é um bom indicador de germinação, pois a atividade dela pode estar sendo utilizada para a mobilização de reservas do endosperma para o embrião.

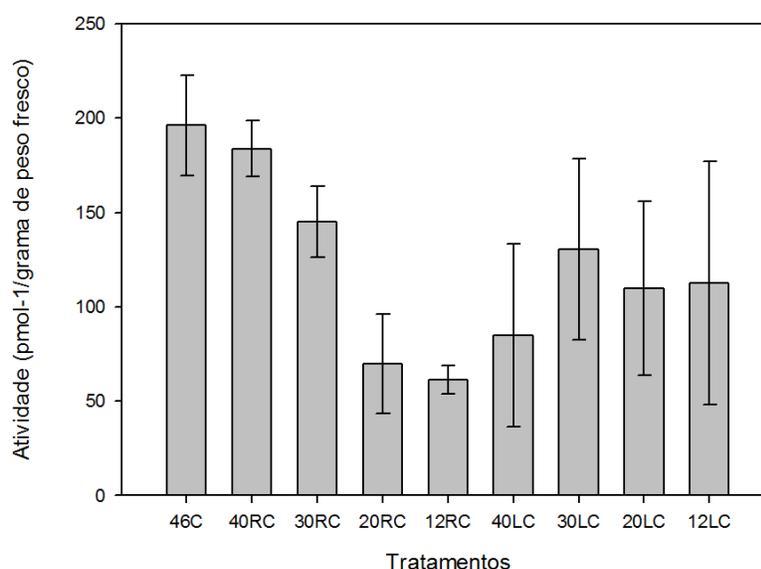


Gráfico 4 Atividade da enzima endo- β mananase observada em sementes de *C. canephora* submetidas ao método de secagem rápida e lenta. UFLA, Lavras, MG, 2010

Legenda: 46, 40, 30, 20 e 12: graus de umidade nas sementes (%); R: Método de secagem rápida; L: Método de secagem lenta; A: Espécie *C. arabica*.

De forma geral, os resultados desse trabalho mostram que os mecanismos enzimáticos são muito importantes para sobrevivência e qualidade fisiológica de sementes de café submetidas à secagem, independente da espécie

estudada. Não foi possível encontrar nesse trabalho um marcador molecular que correspondesse perfeitamente com os resultados de qualidade fisiológica. Os resultados de expressão por PCR em tempo real provaram que a expressão gênica também se modifica ao longo do processo de secagem, mesmo em sementes com baixo grau de umidade. Além disso, esses resultados de expressão mostraram que o método de secagem também interfere no padrão de expressão gênica, em ambas as espécies.

5 CONCLUSÕES

Sementes de *C. arabica* e *C. canephora* apresentaram maior tolerância à dessecação quando foram submetidas à secagem rápida.

Houve redução dos níveis de expressão dos transcritos das enzimas catalase (CAT3) e peroxidase (POXa) com a secagem das sementes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.

Os padrões de expressão das enzimas peroxidase e catalase são diferentes, apesar de ambas serem ligadas ao estresse oxidativo.

A expressão de genes associados ao processo oxidativo é influenciada pelo método de secagem.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Manipulação de genes e células: fundamentos da biologia celular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 1092 p.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 242 p.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 601-639, Nov. 1999.

ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Biosynthesis and catabolism of caffeine in low-caffeine-containing species of *Coffea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 8, n. 1, p. 3425-3431, Apr. 1999.

BACCOUCH, S.; CHAOUI, E. L.; EL FERJANI, E. Nickel toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v. 24, n. 7, p. 1085-1097, July 2001.

BANZET, N. et al. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. **The Plant Journal**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 519-527, Aug. 1998.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, jan./fev. 2006.

BARTOLI, C. G. et al. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 1, p. 1663-1669, July 2004.

BETTEY, M.; FINCH-SAVAGE, W. E. Respiratory enzyme activities during germination in Brassica seeds lots of differing vigor. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 6, n. 4, p. 165-173, Aug. 1996.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BORÉM, F. M.; REINATO, C. H. R.; ANDRADE, E. T. Secagem do café. In: BORÉM, F. M. (Ed.). **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA, 2008. cap. 7, p. 205-240.

BRANDÃO JÚNIOR, D. S. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas na avaliação da qualidade de sementes de milho**. 1996. 110 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

_____. **Marcadores da tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro**. 2000. 144 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

BRANDÃO JÚNIOR, D. S. et al. Tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 17-23, mar./abr. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 365 p.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bethesda, v. 29, n. 1, p. 23-39, Aug. 2002.

BYTOF, G. et al. Transient occurrence of seed germination processes during coffee post-harvest treatment. **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 1, p. 61-66, Feb. 2007.

CAIXETA, E. T. et al. Avanços tecnológicos em biologia molecular: projeto genoma no melhoramento de plantas. In: ZAMBOLIM, L. **Produção integrada de café**. Viçosa, MG: UFV, 2003. p. 223-246.

CARRINGTON, J. C.; AMBROS, V. Role of MicroRNAs in plant and animal development. **Science**, New York, v. 301, n. 5631, p. 336-338, 2003.

CAVALLARI, C. F. B. et al. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC Molecular Biology**, Bethesda, v. 10, n. 1, p. 1-11, Jan. 2009.

COOLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration. In: BASRA, A. S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: Food Products, 1994. p. 223-275.

DAT, J. F. et al. Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedling. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 116, n. 1, p. 1351-1357, Jan. 1998.

DAVIES, K. J. A. Protein modification by oxidants and the role of proteolytic enzymes. **Biochemistry Society Transactions**, London, v. 21, n. 2, p. 346-353, Mar. 1993.

DIXON, D. P. et al. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, n. 3, p. 258-266, June 1998.

DOWNIE, B.; HILLHORST, H. W. M.; BEWLEY, J. D. A new assay for quantifying endo- β -mannanase activity using Congo Red dye. **Phytochemistry**, London, v. 36, n. 2, p. 829-835, Jan. 1994.

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

EIRA, M. T. S. et al. Tolerance of coffeea spp. seeds to desiccation and low temperature. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, n. 2, p. 97-105, ago. 1999.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behavior?: I. coffee. **Journal of Experimental Botany**, Ottawa, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, Sept. 1990.

FAGAGNA, F. D. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. **Nature Reviews**, London, v. 8, n. 1, p. 512-522, July 2008.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220 p.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, London, v. 408, n. 7315, p. 239-247, Nov. 2000.

FOYER, C. H. et al. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, n. 1, p. 241-254, Jan. 1998.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 64, n. 1, p. 97-112, July 1995.

GENTIL, D. F. O. Conservação de sementes do cafeeiro: resultados discordantes ou complementares? **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 3, p. 149-154, 2001.

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

GIORGINI, J. F.; COMOLI, E. Effect of embryo exogenous GA₃ on endospermic endo-β-mannanase activity of *Coffea arabica* L. during germination and early seedling growth. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 8, n. 1, p. 43-49, jan./fev. 1996.

GODON, C. et al. The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 34, p. 22480-22489, Dec. 1998.

GOMES JUNIOR, R. A. et al. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 44, n. 1, p. 420-429, Jan. 2006.

GUIMARÃES, R. M. **Fisiologia de sementes**. Lavras: UFLA-FAEPE, 1999. 132 p.

_____. **Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*, L.)**. 2000. 180 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

GURLEY, W. B. HSPs: a key component for the acquisition of thermotolerance in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 4, p. 457-460, Apr. 2000.

HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 3, p. 141-153, Sept. 1993.

IMOLESI, A. S. **Efeito da adubação nitrogenada na qualidade fisiológica, em características morfo-agronômicas e nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho**. 1999. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature**, London, v. 33, n. 3, p. 245-254, Apr. 2003.

JIMÉNEZ, A. et al. Evidence for the presence of the ascorbato-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 114, n. 1, p. 275-284, Apr. 1997.

KHAN, M. M. et al. Free radical accumulation and lipid peroxidation in testas of rapidly aged soybean seeds: a light-promoted process. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 6, n. 3, p. 101-107, June 1996.

KING, M. W.; ROBERTS, E. H. **The storage of recalcitrant seeds: achievements and possible approaches**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1979. 96 p.

KOSACK, K. E. H.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 1, p. 1773-1791, May 1996.

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, June 1993.

LIMA, D. M. **Armazenabilidade de sementes de *Coffea arabica* L. e de *Coffea canephora* Pierre, submetidas a diferentes métodos de desmucilagem e de secagem**. 2005. 106 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

LIVAK, K. J. L.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001.

LODISH, H. et al. **Biologia celular e molecular**. Barueri: Manole, 2005. 587 p.

MARCOS FILHO, J. Deterioração de sementes. In: _____. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. cap. 9, p. 291-352.

MARRACCINI, P. et al. Molecular and biochemical characterization of endo- β -mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. **Planta**, Berlin, v. 214, n. 2, p. 296-308, Apr. 2001.

MAXWELL, D. P.; WANG, Y.; MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 96, n. 14, p. 8271-8276, July 1999.

MELO, G. A. **Purificação da enzima polifenoloxidase do cafeeiro, sua relação com resistência a pragas e o controle da síntese de seu principal substrato, o ácido clorogênico**. 2005. 98 p. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

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

MOLLER, I. M. Plant mitochondrial and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 561-591, Sept. 2001.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Blast**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 22 ago. 2009.

NAVRATIL, R. J.; BURRIS, J. S. Small-scale dryer designer. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, n. 1, p. 159-161, Jan./Feb. 1982.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1202 p.

OLIVEIRA, M. P. A. **Expressão de genes da biossíntese de cafeína em frutos e endospermas de *Coffea arabica*: sem cafeína**. 2007. 75 p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) - Instituto Agronômico, Campinas, 2007.

ORENDI, G. et al. Loss of stress-induced expression of catalases3 during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* is restricted to oxidative stress. **Plant Science**, Shannon, v. 161, n. 6, p. 301-314, June 2001.

OSTERGAARD, L. et al. Computational analyses and annotations of Arabidopsis peroxidase gene family. **FERBS Letters**, Amsterdam, v. 433, n. 1, p. 98-102, Aug. 1998.

PAMMENTER, N. M.; BERJAK, P. Uma revisão da fisiologia de sementes recalcitrantes em relação aos mecanismos de tolerância à dessecação. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 13-37, Mar. 1999.

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

PEREIRA, L. F. P. et al. Ethylene production and ACC oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. Braz. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 17, n. 3, p. 283-289, Mar. 2005.

POLIDOROS, A. N.; SCANDALIOS, J. G. Response of the Maize Catalases to light. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 23, n. 3, p. 497-504, June 1997.

PRÉ, M. et al. Characterization and expression analysis of the genes directing galactomannan synthesis in coffee. **Annals of Botany**, London, v. 102, n. 6, p. 207-220, June 2008.

QUEITSCH, C. et al. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 4, p. 479-492, Apr. 2000.

ROBERTS, E. H.; KING, M. W.; ELLIS, R. H. Recalcitrant seeds: their recognition and storage. In: HOLDEN, J. H. W.; WILLIAMS, J. T. **Crop genetic resources: conservation and evolution**. London: G. A. Unwin, 1984. p. 38-52.

ROSA, S. D. V. F. et al. Effects of different drying rates on the physiological quality of *Coffea canephora* pierre seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, n. 2, p. 199-205, 2005.

SALMONA, J. et al. Deciphering transcriptional networks that govern *Coffea arabica* seed development using combined cDNA array and real-time RT-PCR approaches. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 66, n. 1, p. 105-124, Nov. 2008.

SANTOS, G. C. et al. Predição in silico da estrutura protéica da enzima superóxido dismutase mitocondrial de cafeeiro. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 18., 2009, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2009. 1 CD-ROM.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 101, n. 1, p. 7-12, Jan. 1993.

SELMAR, D. et al. Expression of isocitrate lyase and the abundance of β -tubulin: feasible markers for the estimation of germination processes in differently processed green coffees. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 19., 2001, Trieste. **Abstracts...** Trieste: ASIC, 2001. p. 257-260.

_____. Germination of coffee seeds and its significance for coffee quality. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 8, n. 2, p. 260-264, Feb. 2005.

SILVA, E. A. A. **Padrões eletroforéticos de isoenzimas e proteínas de sementes e coleótilos de milho em associação com microorganismos**. 1997. 123 p. Tese (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

SILVA, E. A. A. et al. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. **Silva Fennica**, Helsinki, v. 220, n. 2, p. 251-261, 2004.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SMITH, M. T.; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with lost of viability of stored desiccations tolerant and desiccations sensitive seeds. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Basel-Hang Yong, 1995. p. 701-745.

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

STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L.; BERG, J. M. **Bioquímica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. 973 p.

TAKAHASHI, A.; OHTANI, N.; HARA, E. Irreversibility of cellular senescence: dual roles of p16^{INK4a}/Rb-pathway in cell cycle control. **Cell Division**, London, v. 2, n. 10, p. 1-5, 2007.

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

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, p. 49-57, July 2002.

VEIGA, A. D. **Armazenabilidade de sementes de cafeeiro em diferentes estádios de maturação e submetidas a diferentes métodos de secagem**. 2005. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: M. Dekker, 1995. p. 237-271.

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

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

VIEIRA, M. G. G. C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 1996. 144 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation: review. **BioTechniques**, Natick, v. 39, n. 1, p. 1-11, Mar. 2005.

YIP, J. Y. H.; VANLERBERGHE, G. C. Mitochondrial alternative oxidase acts to dampen the generation of active oxygen species during a period of rapid respiration induced to support a high rate of nutrient uptake. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 112, n. 1, p. 327-333, Jan. 2001.

ZEIDLE, M. Electrophoretic analysis of plant isozymes. **Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, Facultas Rerum Naturalium**, Olomouc, v. 38, n. 1, p. 7-16, Jan. 2000.

APÊNDICE A

Tabelas de resumo da análise de variância dos dados obtidos em avaliações de qualidade fisiológica.

Tabela 1A Resumo da análise de variância dos dados obtidos em avaliações da qualidade fisiológica de sementes de *C. arabica* submetidas a diferentes métodos de secagem, lenta e rápida, e graus de umidade, 46, 40, 30, 20, 12. UFLA, Lavras, MG, 2010

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios e significâncias						
		P15	N15	N30	NF30	AC45	MSH45	MSR45
Método de secagem	1	32 ns	0 **	24.50 **	24,5 ns	0,7 **	0 **	0 **
Grau de umidade	3	8,8 ns	0 **	103.5 **	764.3 ns	11,7 **	0 **	0 *
Método * Umidade	3	6,3 ns	0 ns	260.2 **	1264.2 **	3,5 **	0 **	0 **
Fatores * Testemunha	1	4,5 ns	17,9 **	0.5 ns	32 **	27,5 **	0 *	0 ns
Erro	27	-	-	-	-	-	-	-
C.V. (%)		4.03	5.72	5.11	22.58	14.99	6,78	6.33

Protrusão aos 15 dias após a semeadura (P15), normal aos 15 dias após a semeadura (N15), normal 30 dias após a semeadura (N30), normal forte aos 30 dias após a semeadura (NF30), abertura de cotilédone aos 45 dias após a semeadura (AC45), matéria seca de hipocótilo aos 45 dias após a semeadura (MSH45), matéria seca de radícula aos 45 dias após a semeadura (MSR45); não significativo (ns); significativo em 5% de probabilidade (*); significativo em 1% de probabilidade (**), pelo Teste de Turkey e pelo Teste de Dunnant (Fatores x Testemunha).

Tabela 2A Resumo da análise de variância dos dados obtidos em avaliações da qualidade fisiológica de sementes de *C. canephora* submetidas a diferentes métodos de secagem, lenta e rápida, e graus de umidade, 46, 40, 30, 20, 12. UFLA, Lavras, MG, 2010

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios e significâncias						
		P15	N15	N30	NF30	AC45	MSH45	MSR45
Método de secagem	1	0 ns	780,1 *	10,4 **	13122 **	1770 **	0 **	0 **
Grau de umidade	3	151,5 ns	1952,1 **	11,6 **	1190,2 **	284 **	0 **	0 ns
Método * Umidade	3	24,8 ns	242,5 **	5,6 **	379 **	281 **	0 ns	0 ns
Fatores * Testemunha	1	8,7 ns	4720,7 **	1,2 **	1780 **	387 **	0 ns	0 ns
Erro	27	-	-	-	-	-	-	-
C.V. (%)		5,38	24,01	1,00	21,40	30,07	25,75	22,96

Protrusão aos 15 dias após a semeadura (P15), normal aos 15 dias após a semeadura (N15), normal 30 dias após a semeadura (N30), normal forte aos 30 dias após a semeadura (NF30), abertura de cotilédone aos 45 dias após a semeadura (AC45), matéria seca de hipocótilo aos 45 dias após a semeadura (MSH45), matéria seca de radícula aos 45 dias após a semeadura (MSR45); não significativo (ns); significativo nos 5% de probabilidade (*); significativo em 1% de probabilidade (**), pelo Teste de Turkey e pelo Teste de Dunnant (Fatores x Testemunha).