

## ATIVIDADE DE ENDO- $\beta$ - MANANASE EM SEMENTES DE CAFÉ COLHIDAS EM DIFERENTES ESTÁDIOS FENOLÓGICOS<sup>1</sup>

Flávia Carvalho Santos<sup>2</sup>; Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa<sup>3</sup>; Édila Resende Vilela Von Pinho<sup>4</sup>; Débora de Matos Pereira<sup>5</sup>; Vivian Elias do Nascimento<sup>6</sup>, Wilder de Souza Silva<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Trabalho financiado pelo CNPq e com apoio da Embrapa Café, UFLA, e FAPEMIG

<sup>2</sup> Pós-doutoranda, D.Sc., bolsista Capes/FINEP, DAG/UFLA, flavinha.agronomia@dag.ufla.br

<sup>3</sup> Pesquisadora Embrapa Café, Setor Sementes, DAG/UFLA, sttelarosa@embrapa.br

<sup>4</sup> Professora, D.Sc., UFLA, Lavras – MG, edila@ufla.br

<sup>5</sup> Graduanda em Agronomia, bolsista PIBIC/CNPq, DAG/UFLA, deboradematosp@yahoo.com.br

<sup>6</sup> Pós-doutoranda, D.Sc., bolsista Capes/UFLA, Lavras – MG, vivian\_nascimento@hotmail.com

<sup>7</sup> Biólogo, Laboratorista Setor Sementes, DAG/UFLA, Lavras-MG, wilderssilva@yahoo.com.br

### RESUMO

Sementes de café apresentam germinação lenta e desuniforme, dificultando consideravelmente a formação das mudas. Nestas sementes a germinação é limitada pelo endosperma, e para que ocorra a emergência da radícula, o amolecimento do endosperma é desempenhado por várias enzimas, principalmente, a endo- $\beta$ -mananase. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade da enzima endo- $\beta$ -mannase em sementes de café (*Coffea arabica* L.) colhidas em diferentes estádios fenológicos e submetidas à secagem. As sementes foram avaliadas nos estádios de desenvolvimento verde, verde cana, cereja, passa e seco, após três tratamentos de secagem: sem secagem, sementes avaliadas imediatamente após a colheita e antes que os frutos perdessem água; secagem convencional, em que os frutos foram colocados em camada única dentro de bandejas plásticas e deixados em ambiente de laboratório, até que atingissem a umidade desejada; secagem em ambiente controlado, realizada em estufa de circulação forçada de ar, regulada à temperatura constante de 35°C. Realizou-se a eletroforese da enzima endo- $\beta$ -mananase em gel de agarose. Concluiu-se que há diferenças na atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes colhidas nos diferentes estádios fenológicos; a secagem não afeta a atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes colhidas nos estádios verde, verde cana e cereja; e ocorre maior atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes colhidas no estágio seco e submetidas à secagem lenta, convencional.

**Palavras chaves:** *Coffea arabica* L., germinação, qualidade fisiológica.

## ENDO- $\beta$ - MANANASE ACTIVITY IN COFFEE SEEDS HARVESTED AT DIFFERENT MATURATION STAGES

### ABSTRACT

Coffee seeds have slow and uneven germination, which difficult the seedlings establishment. The germination of this seeds is limited by endosperm and for radicle emergence, it is necessary the weakening of the endosperm, which is done mainly by the endo- $\beta$ -mananase enzyme. In this work, the objective was to evaluate the activity of endo- $\beta$ -mannase in coffee seeds (*Coffea arabica* L.) harvested at different phenological stages and submitted to different methods of drying. The seeds were evaluated in the stages of development green, green-cane, cherry, overripe and dried fruit, after three drying methods: without drying, seeds evaluated immediately after harvest; conventional drying, in which the fruits were placed in single layer at room temperature until they reached the desired moisture; and, in an incubator with forced air, under constant temperature of 35 ° C. The electrophoresis of endo- $\beta$ -mannase enzyme was performed in agarose gel. It was observed that, there are differences in the activity of endo- $\beta$ -mannanase in seeds harvested at different phenological stages; the drying does not affect the endo- $\beta$ -mannase activity of green, green-cane and cherry fruits; and the highest activity of endo- $\beta$ -mannase occurs in dry seeds and submitted to conventional drying.

**Key words:** *Coffea arabica* L., germination, physiological quality.

## INTRODUÇÃO

Sementes de café apresentam germinação lenta e desuniforme, aumentando consideravelmente o período de formação de mudas. Sabe-se que a propagação predominante do cafeeiro é por meio de mudas oriundas de sementes, as quais também apresentam sensibilidade à dessecação e problemas de conservação por períodos prolongados. Assim, a semeadura geralmente é feita logo após a colheita das sementes, o que coincide com o período frio do ano, tornando a germinação ainda mais lenta e irregular. Essa lentidão na germinação tem sido atribuída a várias causas, e, dentre estas, o pergaminho uma vez que constitui uma barreira, dificultando a absorção de água pela semente.

No entanto, de acordo com Rosa (2002), as causas do lento processo de germinação dessas sementes ainda não estão totalmente esclarecidas, havendo necessidade de se estudar os mecanismos que controlam a germinação.

Algumas enzimas são consideradas essenciais no processo de germinação de sementes. Em sementes de café a germinação é limitada pelo endosperma, necessitando do amolecimento deste na região micropilar ou endosperma *cap*, para que ocorra a emergência da radícula (Silva et al., 2004). De acordo com estes autores o processo de amolecimento é desempenhado por várias enzimas, principalmente, a endo- $\beta$ -mananase, que está presente no endosperma das sementes desta espécie, localizada na região próxima à radícula. Desta forma, o amolecimento é considerado uma consequência da atividade das enzimas, as quais hidrolisam a parede celular, processo este muito investigado em sementes de tomate, café e alface. Este amolecimento do endosperma correlaciona-se com o aumento da atividade da enzima endo- $\beta$ -1,4-mananase (Groot et al., 1988; Nonogaki et al., 1992).

A longevidade das sementes está relacionada à tolerância à dessecação das mesmas. As sementes de *Coffea arabica* L. apresentam comportamento intermediário para a tolerância à dessecação (Brandão Junior et al., 2002). A aquisição da tolerância à dessecação ocorre durante a maturação, período em que ocorre a síntese de proteínas e de outras substâncias, as quais contribuem para a aquisição de tolerância, bem como, são utilizadas têm importância no processo de germinação.

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade da enzima endo- $\beta$ -mannanase de sementes de café (*Coffea arabica* L.), colhidas em diferentes estádios fenológicos e submetidas a diferentes condições de secagem.

## MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal de Lavras, na cidade de Lavras situada a 21 °14' de latitude sul, 45 °00' de longitude W.Gr. e altitude de 918m. 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.

Sementes de café, cultivar Rubi, foram colhidas em lavoura da Universidade, nos estádios de desenvolvimento verde, verde-cana, cereja, passa e seco. Os frutos, em cada estádio, foram colhidos em épocas distintas, quando as plantas apresentavam a maior parte dos frutos no estádio objeto da colheita, em plantas tomadas aleatoriamente. Os frutos foram colhidos dos ramos médios das plantas e das partes medianas dos ramos. Após a colheita em cada estádio de desenvolvimento os frutos foram selecionados para uniformização do estádio de maturação, considerando escala fenológica proposta por Pezzopane et al. (2003). Logo após a colheita e seleção, os frutos de cada estádio foram submetidos à determinação do teor de água pelo método da estufa, conforme estabelece as RAS (Brasil, 1992).

As sementes foram avaliadas em cada estádio de desenvolvimento após serem submetidas aos seguintes tratamentos de secagem: sem secagem, imediatamente após a colheita e antes que os frutos perdessem água; secagem convencional, em que os frutos foram colocados em camada única em bandejas plásticas e deixados em ambiente de laboratório, até que atingisse a umidade desejada; e secagem em ambiente controlado, realizada em estufa com circulação forçada de ar, regulada à temperatura constante de 35°C.

O decréscimo do conteúdo de água durante a secagem foi acompanhado por meio de pesagens durante o processo, nos dois métodos adotados, até atingirem um conteúdo de água em torno de 13%, determinado pelo método de estufa (Brasil, 1992).

Após secagem, os frutos foram descascados manualmente e as sementes maceradas e armazenadas em *deep freezer*. Para a extração das enzimas, foram adicionados 300  $\mu$ L 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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 µ L 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).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 3, sendo quatro estádios de maturação dos frutos (verde, verde-cana, cereja, passa e seco) e três métodos de secagem (sem secagem, secagem em ambiente controlado e secagem convencional), com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Scott Knot a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados obtidos nesta pesquisa, observou-se que os métodos de secagem não afetaram a atividade da enzima endo-β-mananase, nos estádios verde, verde cana e cereja (Tabela 1). Observa-se também que a secagem convencional proporcionou as maiores atividades desta enzima em sementes colhidas nos estádios passa e seco. Estas sementes apresentaram, também, os piores desempenhos fisiológicos, avaliados pelos testes de germinação e de vigor (dados não apresentados).

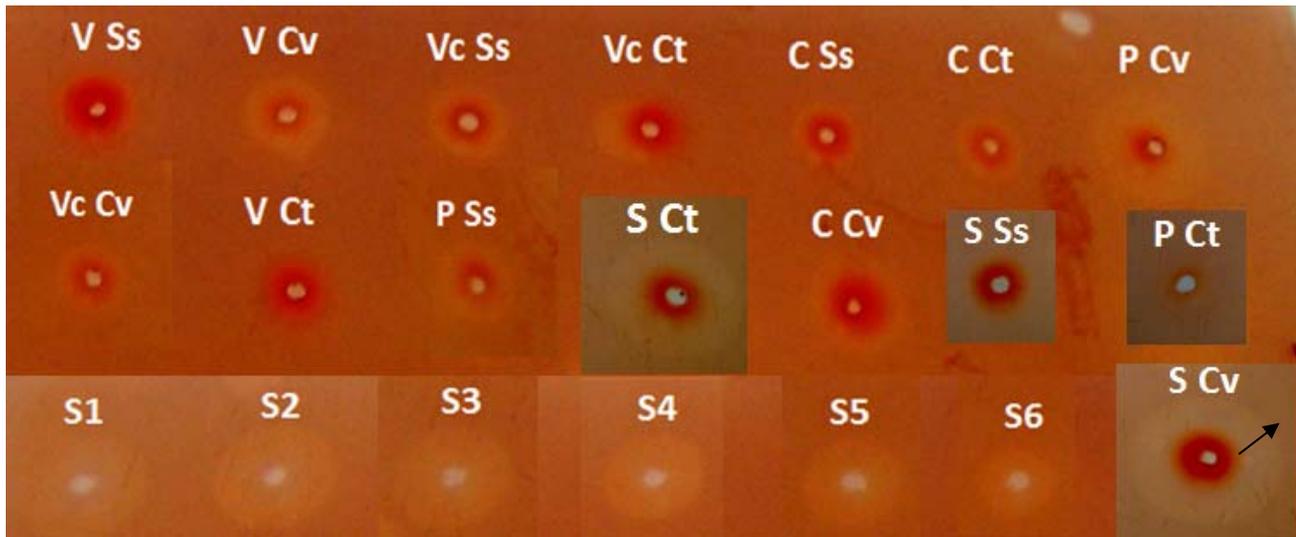
De maneira geral, foi verificada menor atividade da enzima endo-β-mananase nos estádios verde, verde cana e cereja e maior atividade nos estádios passa e seco independente do método de secagem. Essa menor atividade pode ser explicada pelo fato da extração das enzimas ter sido realizada sem embebição das sementes em água. Takaki & Dietrich (1980) observaram que a atividade da mananase em sementes de café aumenta somente 10 dias após a embebição, estando esta associada ao amolecimento do endosperma *cap* e à disponibilização de carboidratos para o crescimento do embrião, durante o processo de germinação (Silva et al., 2004).

Assim, pode-se inferir que as maiores atividades da enzima endo-β-mananase detectadas nas sementes de pior qualidade, podem estar relacionadas com o seu estado de deterioração, ou seja, com a degradação das paredes celulares resultante do processo de deterioração das sementes. Para que a atividade desta enzima seja associada à germinação de sementes com melhor desempenho fisiológico, a extração das enzimas e detecção de sua atividade deve ser realizada após o início da protrusão das radículas, em sementes germinando.

Estádios	Tratamentos de secagem		
	Sem secagem	Secagem convencional	Secagem controlada
Verde	0.95Aa	1.99Ca	0.20Ba
Verde cana	0.93Aa	0.60Ca	0.79Ba
Cereja	1.01Aa	6.72Ca	2.84Ba
Passa	2.80Ab	39.80Ba	2.70Bb
Seco	0.97Ac	352.33Aa	37.46Ab

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% pelo teste de Skott Knot

**Tabela 1.** Atividade da enzima endo-β-mananase em sementes de café colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas à secagem convencional, secagem controlada e sem secagem. UFLA, Lavras - MG, 2011.



**Figura 1.** Atividade, em gel de agarose, da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes de café colhidas nos estádios de desenvolvimento verde (V), verde cana (Vc), cereja (C), passa (P) e seco (S), submetidas à secagem convencional (Cv), secagem controlada (Ct) e sem secagem (Ss). UFLA, Lavras - MG, 2011.

Na Figura 1, pode-se, também, ser verificada a maior atividade da enzima nas sementes colhidas nos estádios passa e seco, submetidas à secagem, principalmente à secagem convencional, lentamente em ambiente sombreado. Provavelmente este método de secagem tenha proporcionado maior degradação de paredes celulares, uma vez que estas sementes foram secadas ainda na planta, expostas, portanto, à condições adversas.

## CONCLUSÕES

Há diferenças na atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes colhidas nos diferentes estádios fenológicos.

A secagem não afeta a atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes colhidas nos estádios verde, verde cana e cereja.

Ocorre maior atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes colhidas no estágio seco e submetidas à secagem lenta, convencional.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANDÃO JUNIOR, D. da S.; VIEIRA, M. G. G. C.; HILHOST, H. W. Aquisição da tolerância à dessecação nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 673- 681, jul./ago. 2002.

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

DOWNIE, B.; HILHORST, H.W.M.; BEWLEY, J.D. A new assay for quantifying endo- $\beta$ -mananase activity using Congo Red dye. **Phytochemistry**, v. 36, p. 829-835, 1994.

GROOT, S. P. C.; KIELISZEWSKA-ROKICKA, B.; VERMEER, E.; KARSSSEN, C. M. Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls and gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. **Planta**, Berlin, v. 174, n. 4, p. 500-504, Aug. 1988.

NONOGAKI, H.; MATSUSHIMA, H.; MOROHASHI, Y. Galactomannan hydrolyzing activity develops during priming in micropylar endosperm tip of seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 2, p. 167- 172, June 1992.

PEZZOPANE, J.R.M.; PEDRO JÚNIOR, M.J.; THOMAZIELLO, R.A.; CAMARGO, M.B.P. Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro Arábica. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 3, p. 499-505, 2003.

ROSA, S. D. V. D.; SANTOS, C. G. dos; PAIVAR, R.; GUIMARÃES, R. M.; VEIGA, A. A. D.; MELO, L. Q. De Cafeína exógena inibe o desenvolvimento In Vitro de embriões de *Coffea arabica* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 28. 2002 Caxambu-MG. **Anais...** Caxambu, 2002. p. 164-166.

SILVA, E. A. A. da.; TOOROP, P. E.; VAN ELST, A. C.; HILHORST H. W. M. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* L., cv. Rubi) seed germination. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 2, p. 251-261, Dec. 2004.