

EXPRESSION DE PROTEÍNAS RESISTENTES AO CALOR EM SEMENTES DE CAFÉ SUBMETIDAS À SECAGEM DURANTE O ARMAZENAMENTO¹

Luciana Aparecida de Souza Abreu²; Édila Vilela de Resende Von Pinho³;
Sttela Dellyzette Veiga Franco da Rosa⁴

¹ Trabalho financiado pela CAPES

² Pesquisadora, PhD, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, luapsouza2003@yahoo.com.br

³ Professora, DSc, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, edila@reitoria.ufla.br

⁴ Pesquisadora, PhD, Embrapa Café, Brasília-DF, sttelaveiga@dag.ufla.br

RESUMO: Objetivou-se com a pesquisa investigar a expressão de proteínas resistentes ao calor em sementes de cafeeiro submetidas à secagem e ao armazenamento. Sementes de cafeeiro foram secadas até atingirem os teores de 40, 20, 12 e 5% de água por meio de dois métodos de secagem: lenta à sombra e rápida em secador mecânico. Após este processo, as sementes foram armazenadas em câmara fria por doze meses, sendo a qualidade, avaliada antes e ao final do armazenamento pelo teste de germinação. Para o padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor foram utilizados 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ e 1mM PMSF. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. As proteínas resistentes ao calor estão associadas com o processo de secagem das sementes de cafeeiro. Maior intensidade de bandas das proteínas resistentes ao calor é observada em sementes secas, e a expressão dessas proteínas é reduzida durante o período de armazenamento.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea arabica* L., longevidade, tolerância à dessecação.

EXPRESSION OF HEAT-RESISTANT PROTEINS IN COFFEE SEEDS SUBJECTED TO DRYING AND STORAGE.

ABSTRACT: The objective of this research was to investigate the expression of heat-resistant proteins in coffee seeds subjected to drying and storage. The coffee seeds were submitted to conventional drying after this process, the seeds were stored in cold chamber for 12 months and the seed quality was evaluated before and during storage by the germination test. For the extraction of heat-resistant proteins was used 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ and 1mM PMSF. Electrophoresis was performed in polyacrylamide SDS-PAGE gel 12.5% and 6% separating gel. Heat-resistant proteins are associated with drying process in coffee seeds. Greater intensity of bands of heat-resistant proteins is observed in dry seeds, and their expression is reduced over time of storage.

KEYWORDS: *Coffea arabica* L., longevity, desiccation tolerance.

INTRODUÇÃO

O conhecimento dos fatores e mecanismos que regulam as alterações durante o processo de indução da tolerância à dessecação e o armazenamento servirão de embasamento teórico para a criação de novas tecnologias de secagem que beneficiarão o produtor de sementes. Constata-se, em algumas pesquisas, que as sementes de cafeeiro toleram mais a dessecação quando submetidas à secagem lenta, pois é sugerido que o tempo concedido à indução e operação de mecanismos de proteção a danos as membranas é maior nesse tipo de secagem. Grande diversidade de características estruturais e bioquímicas tem sido relatada para as proteínas resistentes ao calor, sendo que uma característica importante da sobrevivência da semente seca é a capacidade de proteger a membranas em fase de transição, ou seja, durante o processo de secagem, impedindo a perda da integridade, papel atribuído às proteínas resistentes ao calor. Estudos que contribuam para o entendimento da complexa fisiologia da dessecação e da deterioração de sementes de cafeeiro durante o processamento pós-colheita revestem-se de grande importância, devido à relevância desta cultura para o país. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a expressão de proteínas resistentes ao calor em sementes de cafeeiro submetidas à secagem e ao armazenamento.

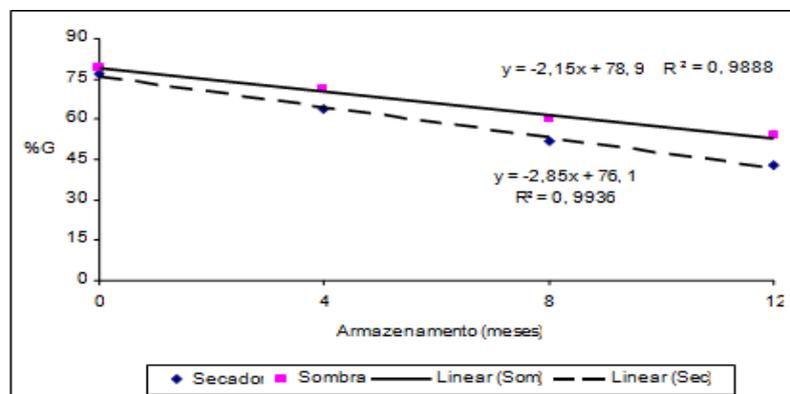
MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizadas sementes da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo IAC 62, colhidas na Fundação Procafé na cidade de Varginha, MG. Os frutos do cafeeiro foram colhidos no estádio cereja sendo despolpados e desmucilados

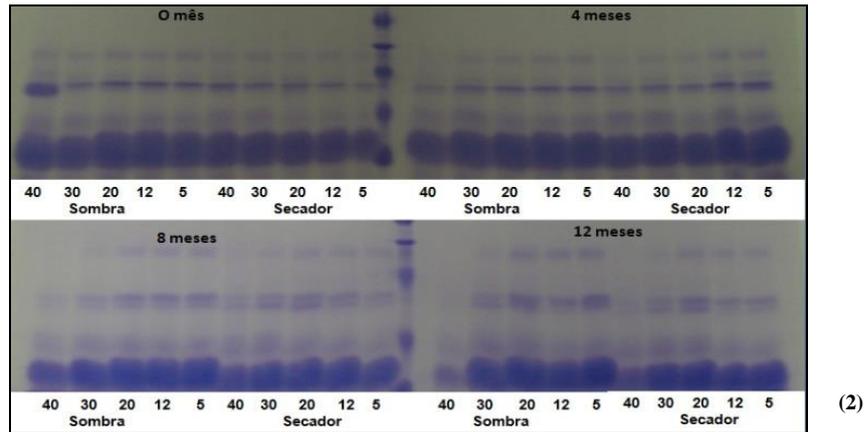
mecanicamente antes da secagem. As sementes foram secadas até atingirem os teores de água de 40, 30, 20, 12 e 5% por meio de dois métodos de secagem: lenta à sombra e rápida em secador estacionário a temperatura de 35 °C e fluxo de ar de aproximadamente 20 m³. min⁻¹.t⁻¹. Durante a secagem foram amostradas sementes de cada tratamento com diferentes teores de água, as quais foram armazenadas à temperatura de 10 °C e umidade relativa de 50%. Antes e a cada quatro meses de armazenamento, a qualidade das sementes de café foi avaliada quanto aos aspectos fisiológicos pelo teste de germinação (Brasil, 2009) e enzimáticos. *Análises isoenzimáticas* - Na análise das proteínas resistentes ao calor, foram retiradas amostras de 100 gramas de sementes dos tratamentos, antes e durante o armazenamento para a análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor. As amostras foram trituradas em mortar sobre gelo na presença de PVP e nitrogênio líquido e posteriormente, armazenadas à temperatura de -86 °C. No momento da extração das proteínas foi utilizado o tampão 50 mM Tris-HCL pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF) na proporção de 1:10, peso do material:volume do tampão de extração, e transferidos para microtubos. O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 x g por 30 minutos, a 4 °C, o sobrenadante foi incubado em banho-maria a 85 °C por 15 minutos e novamente centrifugado, como citado. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o precipitado, descartado. Antes da aplicação no gel, os tubos contendo 70 µL de extrato + 40 µL de solução tampão da amostra (2,5 mL de glicerol, 0,46 g de SDS, 20 mg de azul de bromofenol e o volume completado para 20 mL de tampão de extração Tris pH 7,5) foram colocados em banho-maria com água em ebulição por 5 minutos. Foram aplicados 50 mL da amostra (extrato + tampão da amostra) por canaleta no gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 150 V e os géis foram corados durante 12 horas em Coomassie Blue Brilliant a 0,05%, conforme Alfenas et al. (2006), e descorados em solução de ácido acético 10%. *Delineamento experimental* - Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições em esquema fatorial (2x4x5), correspondente a dois métodos de secagem (lenta e rápida), quatro épocas de avaliação (0, 4, 8 e 12 meses) e cinco teores de água após a secagem (40, 30, 20, 12 e 5%). As análises dos dados do esquema fatorial foram realizadas por meio do programa estatístico SISVAR® (Ferreira, 2011), e foi realizada análise de regressão para fonte de variação quantitativa época de armazenamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise da germinação das sementes de cafeeiro nota-se a superioridade das sementes secadas à sombra em relação à secagem artificial em secador ao longo do período de armazenamento avaliado. De acordo com a interação tripla significativa entre os fatores método de secagem, teor de água atingido após a secagem e tempo de armazenamento, foi possível observar que os melhores resultados ao longo dos doze meses de armazenamento das sementes, foram obtidos com a secagem a sombra até um teor de água de 20%. Maior expressão das proteínas resistentes ao calor foi verificada à medida que as sementes são secadas, entanto a expressão dessas proteínas é reduzida ao longo do período de armazenamento das sementes de cafeeiro. Modificações ocorridas no perfil de proteínas resistentes ao calor, como a ausência de bandas em sementes sem secagem, podem indicar intolerância à dessecação em sementes dessa espécie. Padrão de bandas mais expressivo foi detectado nas sementes que foram secadas à sombra antes do armazenamento. Nota-se também maior atividade dessas proteínas nas sementes secadas à sombra até o teor de água de 20% antes do armazenamento, as quais obtiveram maior porcentagem de germinação. Assim sugere-se que a baixa tolerância à dessecação e baixa longevidade das sementes de cafeeiro armazenadas, fato que pode ser correlacionado aos resultados obtidos no teste de germinação. Isso dificulta ou mesmo impossibilita o armazenamento dessas sementes por períodos prolongados, fato enfatizado pelos resultados deste trabalho.



(1)



Figuras 1 e 2. Germinação de sementes de café durante o armazenamento (1) e padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor extraídas durante o armazenamento (2).

CONCLUSÕES

1. Maior intensidade de bandas de proteínas resistentes ao calor é verificada à medida que as sementes de cafeeiro são secadas.
2. A expressão de proteínas resistentes ao calor é reduzida ao longo do período de armazenamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C. Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos. 2.ed. Viçosa: UFV, 2006. 627p.
- BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. *Seed Science Research*, v.16, p.1-15, 2006.
- BRANDÃO JR, D. S.; VIEIRA, M. G. G. C.; HILHORST, H. W. M. Aquisição da tolerância à dessecação nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, v.26, n.4, p.673-681, 2002.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behavior? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. *Journal of Experimental Botany*, v.42, n. 238, p. 653-657, 1991.
- GUIMARÃES, R. M.; VIEIRA, M. G. G. C.; FRAGA, A. C.; VON PINHO, E. V. R.; FERRAZ, V.P. Tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, v.26, p.128-139, 2002.
- VIEIRA, A. R.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; PEREIRA, C.E.; CARVALHO, F.E. Armazenamento de sementes de cafeeiro: ambientes e métodos de secagem.