

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EXPRESSÃO GÊNICA NO EMBRIÃO E NO ENDOSPERMA
MICROPILAR DE SEMENTES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) DURANTE
A GERMINAÇÃO**

EUMÉNES TAVARES DE FARIAS

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp – Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Agricultura)

BOTUCATU-SP

Dezembro – 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EXPRESSÃO GÊNICA NO EMBRIÃO E NO ENDOSPERMA
MICROPILAR DE SEMENTES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) DURANTE
A GERMINAÇÃO**

EUMÉNES TAVARES DE FARIAS

Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp – Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Agricultura)

BOTUCATU-SP

Dezembro – 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

F224e Farias, Euménes Tavares de, 1984-
Expressão gênica no embrião e no endosperma micropilar de sementes de café (*Coffea arabica* L.) durante a germinação / Euménes Tavares de Farias. - Botucatu : [s.n.], 2012

xii, 59 f. : il. color., gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2012

Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

Inclui bibliografia

1. Ácido abscísico. 2. Café - Embrião - Crescimento e desenvolvimento. 3. Café - Semente. 4. Endosperma.

I. Silva, Edvaldo Aparecido Amaral da. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EXPRESSÃO GÊNICA NO EMBRIÃO E NO ENDOSPERMA
MICROPILAR DE SEMENTES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) DURANTE A
GERMINAÇÃO

ALUNO: EUMÊNES TAVARES DE FARIAS

ORIENTADOR: PROF. DR. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA:



PROF. DR. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA



PROF. DR. CLAUDIO CAVARIANI



PROF.ª DR.ª JULIANA PEREIRA BRAVO

Data da Realização: 03 de dezembro de 2012.

*A paciência é conquistada ao longo da vida. Conquiste-a
para chegar aos seus verdadeiros objetivos.*

Euménes Tavares de Farias

*Aos meus pais, por todos os ensinamentos concebidos,
força, carinho e compreensão em todos os momentos de
minha vida.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a oportunidade de realizar um grande sonho de obter minha Pós-Graduação na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”;

A Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” e a Faculdade de Ciências Agronômicas, pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação, em nível de Mestrado;

A Fazenda experimental de Machado, por ceder às sementes de café para a realização do experimento;

Ao meu orientador e amigo Edvaldo Amaral, onde me auxiliou, aconselhou, brigou, sorriu, elogiou e acreditou que eu poderia vencer cada obstáculo na minha vida;

A todo o corpo docente da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, que dispuseram de preciosas horas para passar o conhecimento ao próximo;

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa;

A todas as secretárias, técnicos e demais funcionários da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, onde dispuseram de seu tempo para que este trabalho fosse concretizado;

A banca examinadora, por toda atenção e sugestões sugeridas para o engrandecimento deste trabalho;

Aos meus amigos, que me incentivaram, ajudaram e dividiram vários momentos felizes e de descontração;

Aos amigos em especial: Alessandra Tenório, Aline Torres, Alessandra Vasconcellos, Bárbara Panoff, Claudiana Moura, Clíssia Barboza, Eldevânia Monteiro, Juliana Bravo, Patrícia Silveira, Rafael Garijo e Thaíse Ribeiro onde me ensinaram que amigos são conquistados ao longo do tempo;

A minha família, em especial, a minha irmã Elaine Cristina e minha sobrinha Amanda Farias, onde me propuseram momentos de alegria em toda esta jornada de Pós-Graduação;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
1. RESUMO.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
4.1. Origem, ocorrência e importância econômica no Brasil e no Mundo do café.....	6
4.2. Características morfológica e botânica da espécie.....	8
4.3. Cultivar Catuaí Amarelo.....	10
4.4. Formação das sementes.....	11
4.5. Germinação de sementes.....	11
4.6. Germinação de sementes de café.....	13
4.7. A ação do ácido abscísico (ABA) na indução da dormência de sementes.....	14
4.8. Genes em estudo.....	16
4.9. Estudos de expressão gênica em sementes.....	19
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
5.1. Curva de embebição.....	21
5.2. Crescimento do embrião de sementes de café embebidas em água e em ácido abscísico (ABA) [1000 µM].....	22
5.3. Testes de germinação em água e em ácido abscísico.....	22

5.4. Estudos moleculares das sementes de café durante os períodos de embebição em água e ácido abscísico.....	23
5.4.1. Extração de RNA	23
5.4.2. Síntese de cDNA.....	24
5.4.3. Desenho dos primers.....	25
5.4.4. Quantificação da expressão relativa por PCR em tempo real.....	27
5.5. Análises estatísticas.....	28
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÕES.....	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Genes (mRNAs) estudados no embrião e no endosperma micropilar durante a germinação de sementes de café.....26
- Tabela 2.** Primers específicos de embrião e endosperma micropilar de sementes de café utilizados para análises de PCR em tempo real.....27

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** O ciclo celular consiste de uma fase mitótica (M), durante a qual ocorrem a primeira divisão nuclear (mitose) e a divisão celular (citocinese). A fase M é seguida de um período longo de crescimento conhecida como interfase (I). A interfase em células que se dividem possui três subfases (G_0 , G_1 , S e G_2).....16
- Figura 2.** Dados médios (●) do peso fresco para curva de embebição durante a germinação de sementes de café e barras indicam os desvios padrão. A seta indica 50 % da protrusão radicular.....30
- Figura 3.** Comprimento do embrião (●), hipocótilo (○) e cotilédones (▼) de sementes de café embebidas em água. As barras de erro indicam os desvios padrão. *Médias seguidas pelas mesmas letras nos pontos não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.....30
- Figura 4.** Comprimento do embrião (●), hipocótilo (○) e cotilédones (▼) de sementes de café embebidas em ABA. As barras de erro indicam os desvios padrão. *Médias seguidas pelas mesmas letras nos pontos não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.....31
- Figura 5.** Germinação de sementes de café embebidas em água (●) e em ABA (1000 μ M) (○). Os pontos de dados são em média de quatro repetições de 25 sementes e as barras de erro indicam o desvio padrão.....33
- Figura 6.** Germinação de sementes de café durante nove dias de embebição em água.....34
- Figura 7.** Ct do gene 18S em embriões de sementes de café embebidas em água e em ABA (1000 μ M). As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de três repetições biológicas.....35
- Figura 8.** Ct do gene 18S em região micropilar de sementes de café embebidas em água e em ABA (1000 μ M). As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de três repetições biológicas.....35
- Figura 9.** Expressão relativa do gene actina em embriões de sementes de café embebidas em água e em ABA (1000 μ M). As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de três repetições biológicas. * Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas dentro de cada tratamento e maiúsculas entre os tratamentos nas barras, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.....36

- Figura 10.** Expressão relativa do gene quinase dependente de ciclina em embriões de sementes de café embebidas em água e em ABA (1000 μM). As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de três repetições biológicas. *Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro de cada tratamento e maiúsculas entre os tratamentos nas barras, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.....38
- Figura 11.** Expressão relativa do gene α -expansina em embriões de sementes de café embebidas em água e em ABA (1000 μM). As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de três repetições biológicas. *Médias seguidas pela mesma letra minúscula dentro de cada tratamento e maiúscula entre os tratamentos nas barras não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.....40
- Figura 12.** Expressão relativa do gene α -galactosidase da região micropilar do endosperma de sementes de café embebidas em água e em ABA (1000 μM). As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de três repetições biológicas. *Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro de cada tratamento e maiúsculas entre os tratamentos nas barras não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.....42
- Figura 13.** Expressão relativa do gene β -manosidase da região micropilar do endosperma de sementes de café embebidas em água e em ABA (1000 μM). As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de três repetições biológicas. *Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro de cada tratamento e maiúsculas entre os tratamentos nas barras não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.....44
- Figura 14.** Expressão relativa do gene Endo- β -mananase da região micropilar do endosperma de sementes de café embebidas em água e em ABA (1000 μM). As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de três repetições biológicas. *Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro de cada tratamento e maiúsculas entre os tratamentos nas barras não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.....44

1. RESUMO

A germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) é lenta e irregular, controlada por eventos que ocorrem, simultaneamente, no embrião e no endosperma. Embora os referidos eventos estejam determinados, ainda são necessários estudos sobre a fisiologia molecular, para auxiliar na avaliação da qualidade fisiológica das sementes durante a germinação. O objetivo do trabalho foi realizar estudos fisiológicos e moleculares durante a germinação de sementes embebidas em água e em ácido abscísico (ABA) na concentração de 1000 μ M. Durante o trabalho foi determinado o teor de água, a curva de embebição, a germinação, o crescimento do embrião e a expressão dos genes associados com o crescimento do embrião e com a degradação do endosperma micropilar. Para tanto, embriões e os endospermas micropilares foram isolados para a extração de RNA total e síntese de cDNA. “Primers” específicos foram desenhados para o estudo da expressão gênica em PCR em tempo real. Foi estudada a expressão dos genes actina, ciclina e α -expansina, associados ao crescimento do embrião, e α -galactosidase, β -manosidase e endo- β -mananase, associados à degradação do endosperma micropilar. A curva de embebição apresentou um padrão trifásico. A primeira semente de café germinou com cinco dias de embebição e 50% de germinação ocorreram no décimo dia de embebição. A expressão dos genes associados com o crescimento do embrião, tais como actina, α -expansina e quinase dependente de ciclina, aumentou durante a germinação em água e inibiu parcialmente a expressão destes genes quando tratados com ABA. A expressão de β -manosidase e endo- β -mananase aumentou durante a embebição em água e

ABA inibiu completamente a expressão. No entanto, α -galactosidase parece ter a expressão mais constitutiva durante a germinação em água e é menos influenciada por ABA, em comparação com outras enzimas estudadas.

PALAVRAS-CHAVE: Crescimento do embrião, enfraquecimento do endosperma e ácido abscísico.

GENE EXPRESSION IN EMBRYO AND MICROPYLAR ENDOSPERM OF SEEDS COFFEE (*Coffea arabica* L.) DURING GERMINATION. Botucatu, 2012; 59p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: EUMÉNES TAVARES DE FARIAS

Advisor: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

2. ABSTRACT

Germination of coffee (*Coffea arabica* L.) seed is slow and uneven. The germination is a net result of events that occur simultaneously in the embryo and endosperm under the control of ABA. The aim of the study was to perform physiological and molecular studies during germination of seeds imbibed in water and 1000 μ M abscisic acid (ABA). We studied the expression of the genes cyclin, α -expansin and cyclin-dependent of kinase in the embryo and α -galactosidase, β -mannosidase, endo- β -mannanase in the micropylar endosperm. The first coffee seed germinate at five days of imbibition and 50% germinate at tenth day of imbibition. Coffee embryo grew inside the seed prior radicle protrusion and ABA inhibited the embryo grow as well as radicle protrusion. The expression of the genes associated with the growth of the embryo such as cyclin, α -expansin and cyclin-dependent of kinase increased during germination and ABA partially inhibited the expression of these genes. The expression of β -mannosidase and endo- β -mannanase increased during imbibitions in water and ABA completely inhibited its expression. However, α -galactosidase seems to have a more constitutive expression during germination in water and it is less affected by ABA as compared with other enzymes studied.

KEYWORDS: Embryo growth, endosperm weakening and abscisic acid.

3. INTRODUÇÃO

O café pertence à família Rubiaceae apresentam mais de 70 espécies existentes. No entanto, as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são responsáveis, respectivamente, por 70 e 30% do volume comercializado no mundo. Devido a esta grande importância, o café é considerado uma das principais “commodities” do mundo, perdendo apenas para o petróleo. O Brasil é considerado o maior produtor de café do mundo, responsável por 25% da produção mundial (ABIC, 2012).

Para satisfazer a cadeia produtiva do café e os consumidores no Brasil e no mundo, diversas linhas de pesquisas estão em andamento. Todavia, é verificada a ausência de trabalhos voltados à qualidade de sementes para fins de propagação. Segundo Da Silva et al. (2004), a germinação das sementes de café é lenta e desuniforme devido à elevada rigidez das paredes celulares do endosperma, que precisam ser degradadas (“enfraquecidas”) para ocorrência da protrusão da radícula.

Além dos eventos presentes no endosperma, o crescimento do embrião, durante o processo de germinação, ocorre, em *Coffea arabica*, por expansão e alongamento celular que acontece, concomitantemente, com a síntese de DNA (SILVA et al., 2004; SILVA et al., 2008). De acordo com Hilhorst et al. (1998) a protrusão da radícula acontece quando a força exercida pelo embrião supera a força de resistência imposta pelo endosperma micropilar.

Embora referidos eventos sejam conhecidos para a ocorrência da germinação, quando é detectado um elevado nível de ácido abscísico (ABA) nas sementes, ocorre uma inibição da expansão e alongamento celular, concomitantemente com a inibição da síntese de DNA, associados ao crescimento do embrião. Em conjunto a estes eventos, ocorre a inibição da degradação das paredes celulares impedindo seu alongamento, resultando em uma elevada rigidez no endosperma das sementes de café (DA SILVA et al., 2004; DA SILVA et al., 2008).

De acordo com Kucera et al. (2005) o ABA é um hormônio regulador positivo da dormência e negativo da germinação das sementes. Pesquisas voltada ao papel do ABA durante a germinação de sementes, mostram o efeito inibitório no afrouxamento das paredes celulares do embrião, do acúmulo da proteína β -tubulina, o crescimento e a divisão celular do embrião, a organização transversal dos microtúbulos e a replicação do DNA nuclear durante a embebição (SCHOPFER e PLACHY, 1985; BEWLEY, 1997; CHEN et al., 2001; TAIZ e ZEIGER, 2004; DA SILVA et al., 2008).

Embora estes estudos tenham permitido o conhecimento do mecanismo e da regulação da germinação de sementes de café, pesquisas sobre a fisiologia molecular das sementes, que combinem de modo integrado os eventos que ocorrem no embrião e no endosperma, além, também, do papel de ácido abscísico, precisam ser realizadas. As tecnologias conhecidas, como o sequenciamento e análise de transcriptoma e o desenvolvimento do projeto genoma do café (ESTs) (http://solgenomics.net/about/about_solanaceae.pl), podem ser usadas para investigar genes associados com a germinação de sementes de café e ampliar o conhecimento desse processo.

Assim, os estudos acima fornecem a base para o conhecimento atual da irregularidade da germinação de sementes de café graças a abordagens moleculares recentemente usadas para decifrar o mecanismo de ação a nível celular. Assim, o objetivo deste estudo foi em avaliar o perfil de expressão de genes associados com o crescimento do embrião e a degradação do endosperma micropilar de sementes de café e com a regulação da expressão destes genes por ácido abscísico.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Origem, ocorrência e importância econômica no Brasil e no mundo do café

Originária da Etiópia, centro da África, onde ainda hoje faz parte da vegetação natural da região, o cafeeiro tornou-se espécie de grande importância para os Árabes, onde tinham o controle completo sobre o cultivo e a preparação da bebida (RIESEBERG et al., 2000). De origem árabe, o nome café surgiu da palavra qahwa, que significa vinho. Assim, o café era conhecido como “vinho da Arábia” quando chegou à Europa no século XIV (STARBUCKS, 2012).

Difundida para o continente Europeu em 1615, trazido por viajantes em suas frequentes viagens ao oriente, alemães, franceses e italianos procuravam desesperadamente uma maneira de desenvolver o plantio em suas colônias. Mas apenas os holandeses conseguiram cultivar as primeiras mudas de café nas estufas do jardim botânico de Amsterdã. Franceses presenteados com uma muda de cafeeiro pelo burgomestre de Amsterdã, iniciavam testes nas ilhas de Sandwich e Bourbon. Com experiências holandesas e francesas com o cultivo do café foi levado para outras colônias europeias. Pelas mãos de colonizadores europeus e com o crescente mercado consumidor, o café chega ao Norte do Brasil através da Guiana Francesa (ABIC, 2012).

Em 1727 os portugueses compreenderam que a terra do Brasil tinha todas as possibilidades que convinhem à cafeicultura, mas, no entanto não possuíam mudas e grãos. Assim, o governo do Pará enviou Palheta, um jovem oficial a Guiana Francesa com a missão simples de conseguir mudas de café com o governador M. d'Orvilliers (STARBUCKS, 2012). Seguido ordens expressas do rei da França, o governador nega o pedido de Palheta. Porém, não resistindo aos encantos do jovem tenente que já regressava ao Brasil, a esposa do governador lhe envia um ramo de flores, onde nas folhagens encontravam-se escondidas sementes de café (ABIC, 2012).

A espécie *Coffea arabica* L. era assim introduzida no Brasil, que no decorrer do tempo foram denominadas como Típicas. Por volta de 1760 às sementes de café foram levadas do Pará para o estado do Maranhão, Bahia e Rio de Janeiro por João Alberto Castelo Branco, onde se espalhou pela baixada Fluminense e posteriormente pelo Vale do Paraíba (CARVALHO, 2008).

Por quase um século, o café foi a grande riqueza brasileira, e as divisas geradas pela economia cafeeira aceleraram o desenvolvimento do Brasil e o inseriram nas relações internacionais de comércio. Entretanto, com o total descuido quanto à preservação do solo, a cultura cafeeira migrou para oeste da província de São Paulo, centralizando-se em Campinas e estendendo-se até Ribeirão Preto (ABIC, 2012). Assim, o cultivo do café migrou constantemente à procura de novas terras, ricas em matéria orgânica e produtivas (IAC, 2012).

A exportação brasileira do café começou a crescer a partir de 1816. Na década de 1830-1840, o produto assumiu a liderança das exportações, com mais de 40% do total, tornado-se o país o maior produtor mundial de café. Em 1870-1880, o café passou a representar até 56% do valor das exportações. Começou então o período áureo do chamado ciclo do café que durou até 1930. No final do século XIX, o café representava 65% do valor das exportações do país, chegando a 70% no ano de 1920 (SOBESA, 2012).

O ciclo do café teve repercussões econômicas e sociais importantes no Brasil. À expansão da lavoura levou à ampliação das vias férreas em São Paulo, portos do Rio de Janeiro e de Santos foram modernizados para exportação e necessidades de mão de obra trouxeram imigrantes europeus, principalmente depois da abolição dos escravos

(CARVALHO, 2008). O café foi o primeiro produto de exportação controlado pelo país, possibilitando o acúmulo de capitais (SOBESA, 2012).

Em 1996, o consumo mundial superou a barreira dos 100 milhões de sacas de café. Em 1997 o Brasil atingiu quase três bilhões de dólares na exportação de café, tendo a Alemanha e os EUA como maiores importadores. Atualmente, o café é uma das “commodities” mais importantes no mercado internacional, perdendo apenas para o petróleo (LASHERMES et al., 2008). Mais de 80 países dependem da cultura do café para subsistência na América Latina, África e Ásia. DaMatta e Ramalho (2006) relatam que a produção mundial chega a 134 milhões de sacas/ano, movimentando cerca de 91 bilhões de dólares. No entanto, estes valores estão sujeitos às oscilações regulares explicados pelo processo natural de adversidades climáticas e pelos ciclos bienais de produção da cultura (CONAB 2012).

No Brasil, o café continua sendo gerador de divisas, contribuindo com mais de 2% do valor total das exportações do país e mais de 30% da produção mundial (EMBRAPA, 2012). O Brasil ocupa em área plantada 2.346,48 mil hectares, sendo Minas Gerais o estado onde se concentra a maior parte desta produção, seguido de Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Paraná e Rondônia (CONAB 2012). Devido à diversidade de solos e climas, o Brasil apresenta uma vantajosa característica para produzir diferentes tipos de café, atendendo assim, exigências mundiais no referente a paladares e preços (EMBRAPA, 2012).

Para satisfazer a demanda da cadeia produtiva do café e dos consumidores do Brasil e do mundo, programas de criação intensiva são realizados para novas cultivares resistentes a doenças fúngicas e insetos, e para incorporação de valores comerciais. Além disso, novas tecnologias de produção e processamento são introduzidas a cada ano, o que permite uma melhoria na produção de café nos últimos anos (SILVA, 2002).

4.2. Características morfológica e botânica do café

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae, que abrange mais de 10 mil espécies agrupadas em 630 gêneros, onde, sua herança biológica ao gênero *Coffea*. Este gênero foi descrito primeiramente, no século 18, pelo botânico sueco Carolus Linneaus. De

acordo com a classificação recente de Bridson e Verdcourt (1988), o gênero *Coffea* é subdividido nos subgêneros *Coffea*, representado por mais de 80 espécies, e *Baracoffea* constituído por sete espécies. A classificação do café sempre está em desacordo, o que é compreensível, se considerarmos que as plantas podem variar de pequenos arbustos a árvores altas, com folhas 1 a 40 centímetros de comprimento e cor variando de roxo ou amarelo a verde escuro.

Economicamente dominam no comércio mundial do café as espécies *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre (DAMATTA e RAMALHO, 2006). Descendente das plantas originais da Etiópia, a *C. arabica* produz um café fino, suave aromático e representa aproximadamente 70% da produção mundial de café. No mercado mundial, este tipo de café tem preços superiores quando comparados com *C. canephora* (REVISTACAFEICULTURA, 2012).

O cafeeiro é um arbusto de crescimento contínuo, que atinge alturas de 2 a 4 metros, com dimorfismo de ramos, conforme as condições climáticas da região. A planta possui caule cilíndrico, lenho duro, branco amarelado e dois tipos de ramos: ortotrópicos (normal) e plagiotrópicos (transversal) (RENA e MAESTRI, 1986). A raiz principal do cafeeiro é pivotante e amplamente ramificada na camada superior do solo (DAMATTA e RAMALHO, 2006). A parte pivotante das raízes é pequena, grossa e termina abruptamente sem ultrapassar os 50 cm da superfície do solo. Assim, Reis et al. (2010) consideram uma raiz pseudo pivotante.

As folhas do cafeeiro possuem pecíolo curto, lâmina elíptica, glabra, verde-luzidia na parte adaxial e verde clara na parte abaxial (KONTOS e SPYROPOULOS, 1995). As folhas são opostas e cruzadas no caule (ramo ortotrópico e ladrão), enquanto nos ramos plagiotrópicos são opostas e no mesmo plano (SGUAREZI et al., 2001). As flores possuem pedicelo curto e estão agrupadas em glomérulos axilares e varia de duas a 20 flores por axila foliar (RUBIM et al., 2010).

O cafeeiro possui fruto simples, derivado do ovário, classificado como drupa, carnoso e contém duas sementes. Morfologicamente o fruto possui um pedúnculo curto, oval e elíptico, com superfície lisa e brilhante, sendo verde quando imaturo, podendo

posteriormente alterar sua coloração para vermelho ou amarelo quando maduro (COSGROVE, 1997).

A semente é formada pela película prateada, endosperma e embrião. Seu formato é plano-convexa, elíptica e sulcada na face plana (BORÉM et al., 2008). A película prateada é o envoltório mais externo da semente, formada por uma camada de células esclerenquimatosas. O endosperma é o principal tecido de reserva constituindo-se no tecido de maior volume da semente madura de café (BORÉM et al., 2008). Silva et al. (2008) relatam que as paredes celulares espessadas do endosperma são compostas principalmente de mananas e 2% de galactose. Conforme ainda os mesmos, o embrião é diferenciado, de 3-4 mm e consistindo de um eixo embrionário, uma radícula e dois cotilédones.

4.3. Cultivar Catuaí Amarelo

Introduzida no país em 1727, foi descrita em 1913 como espécie de frutos vermelhos foi denominada como café Comum, Nacional, Crioulo e Sumatra, onde sua denominação *Typica* (*Coffea arabica* L. var. *typica* Cramer) foi proposta por Cramer, por ser a cultivar que representa as características típicas da espécie *C. arabica* (CARVALHO, 2008). Desta cultivar para as mais atuais, foram obtidos ganhos de até 240% de produtividade pelo processo contínuo de seleção (IAC, 2012).

Resultante do cruzamento artificial de cafeeiros selecionados de Caturra Amarelo e Mundo Novo o Catuaí Amarelo, apresenta porte baixo, ramificação secundária e terciária abundante e de alta produtividade. Lançado pelo IAC no início da década de 70, modificou os sistemas de produção e permitiu a utilização de novas áreas para cafeicultura. Suas características aumentaram a lucratividade e a viabilidade do cultivo de café em regiões improdutivas como cerrado de São Paulo e do Triângulo Mineiro onde a cultivar é mais plantada (IAC, 2012).

4.4. Formação das sementes

A fertilização ocorre com a dispersão e a polinização do grão de pólen que adere à superfície do estigma (órgão reprodutor feminino). Nesta etapa, é iniciada a emissão do tubo polínico através do estilete até atingir o óvulo. A divisão celular é iniciada através de uma meiose originando dois cromossomos (n). Uma das células une-se aos dois núcleos polares existentes no óvulo, dando origem ao endosperma ou albume, triploide ($3n$). A outra célula reprodutiva une-se a oosfera, originando o ovo, futuro embrião da semente (MARCOS FILHO, 2005).

Carvalho e Nakagawa (2000) comentam que após a dupla fecundação, processo exclusivo das angiospermas, inicia-se uma série de transformações na parede do ovário que, juntamente com as estruturas relacionadas, origina o fruto; o zigoto ou ovo que se transforma no eixo embrionário; o núcleo endospermático primário, que se divide em mitoses sucessivas originando o endosperma (tecido de reserva) e os intergumentos do óvulo transformam-se em tegumentos ou testa da semente.

Assim, a semente pode ser definida como óvulo maduro e fecundado. Muitas vezes, o termo semente é aplicado impropriamente para designar certos frutos secos monospermicos, tais como cariopses dos cereais, aquênios e ainda certos propágulos vegetativos como bulbilho; partes de tubérculos, esporos de samambaias e de cogumelos. As sementes apresentam basicamente uma estrutura única que participa da disseminação, proteção e reprodução das espécies (FERREIRA e BORGHETTI, 2004).

4.5. Germinação de sementes

Por definição, a germinação de uma semente começa com a absorção de água e completa-se com a protrusão da radícula, através de seus tecidos circundantes. Definições como esta, levam a diversas contradições de eventos celulares e moleculares que ocorrem durante a germinação, quando na verdade, o crescimento da plântula também faz parte da germinação (NONOGAKI et al., 2010).

Carvalho et al. (2001) relataram que a germinação das sementes inicia-se por um processo que envolve o reinício e a continuidade das atividades metabólicas, promovendo o desenvolvimento das estruturas do embrião, com a formação de uma plântula. Para que este processo se complete, o teor de água da semente tem que exceder um valor crítico que possibilite a ativação dos processos metabólicos promotores do crescimento do eixo embrionário (Zhang e Hasenstein, 2000). No entanto, a maioria dos estudos sobre germinação de sementes considera a protrusão da radícula como o término da fase de germinação.

A velocidade de absorção de água pela semente varia com a espécie, permeabilidade do tegumento, disponibilidade de água, temperatura, pressão hidrostática, área de contato da semente/água, forças intermoleculares, composição química e condição fisiológica da semente (CARVALHO et al., 2012). De acordo com Marcos Filho (2005), a água é de fundamental importância ao metabolismo celular da germinação, pois interfere na atividade enzimática, na solubilização e transporte de fotoassimilados, atuando como reagente na digestão das reservas da semente. Assim, Bewley e Black (1978) propuseram um padrão trifásico de absorção de água, satisfazendo grande parte dos resultados dos estudos de curva de embebição de sementes de diferentes espécies.

De acordo com Carvalho e Nakagawa (2000) a fase I representa, de maneira geral, um estágio muito rápido. É caracterizado fisiologicamente por um acentuado aumento na intensidade respiratória, resultando em produção de energia, a qual será utilizada em uma série de reações bioquímicas. Em geral, esta fase é dirigida sobretudo pelo potencial matricial da semente seca, devido ser um processo puramente físico (FERREIRA e BORGHETTI, 2004).

Ocorridas reduções drásticas da velocidade de hidratação e da intensidade de respiração, é caracterizado assim, a fase II (MARCOS FILHO, 2005). Nesta fase, aparentemente, ocorre um transporte ativo das substâncias desdobradas na fase anterior, do tecido de reserva para o tecido meristemático (CARVALHO e NAKAGAWA 2000). Ferreira e Borghetti (2004) relatam que nesta fase as células embrionárias não podem absorver

mais água, pois as paredes celulares estão demasiadamente rígidas ou as estruturas que cercam o embrião impedem sua expansão.

O início da fase III é tornado visível pela retomada do crescimento do embrião, identificando a protrusão da raiz primária, tratando-se de uma etapa alcançada apenas por sementes vivas e não dormentes (MARCOS FILHO, 2005). Ferreira e Borghetti (2004) relatam que a absorção de água esta associada com o aumento de divisões mitóticas, expansão celular e alongamento do eixo embrionário, perdendo assim, sua tolerância à desidratação.

Ferreira e Borghetti (2004) comentam que em alguns casos, a protrusão inicial da radícula através dos tecidos de revestimento envolve apenas a expansão das células existentes, enquanto, em outros, pode ocorrer um número substancial de divisões celulares e morfogênese antes da protrusão e da emergência, como acontece em sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) e de cenoura (*Daucus carota*).

Embora a utilização destas fases seja conveniente para ilustrar os eventos que ocorrem na germinação de sementes, não definem os eventos metabólicos, pois, o conteúdo celular de uma semente seca é estabelecido durante um prévio desenvolvimento, o que permite a retomada dos acontecimentos metabólicos rapidamente após a reintrodução de água (NONOGAKI et al., 2010). Ainda conforme os mesmos, como produto de germinação, o metabolismo da semente, presumivelmente, torna-se envolvido nos processos vitais para o surgimento da radícula.

4.6. Germinação de sementes de café

As sementes de café são normalmente obtidas de frutos maduros denominados de frutos-cereja. Vários estudos elucidam sobre viabilidade irregular, germinação lenta, desuniforme e baixa velocidade no processo de retomada do crescimento do embrião de sementes de café (SGUAREZI et al., 2001; PEREIRA et al., 2002; MEIRELES 2004; MEIRELES et al., 2007; BRAZ e ROSSETTO 2008; REIS et al., 2010; RUBIM et al., 2010 e ZONTA et al., 2010). Carvalho et al. (2012) relataram que estes tipos de características

ainda não estão totalmente elucidadas, embora seja evidencia em estudos correlacionado com aspectos fisiológicos desta espécie.

Estudos com sementes de pimenta (*Capsicum frutescens* L.) (WATKINS et al., 1985), de tomate (GROOT, 1987), de melão (*Cucumis melo* L.) (WELBAUM et al., 1995) e de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) (SILVA et al., 2004) relatam que degradação hidrolítica das paredes das celulares ocasiona um enfraquecimento no endosperma micropilar, permitindo que a radícula supere essa resistência e promova a germinação. No entanto, este enfraquecimento da região micropilar no endosperma é apenas um pré-requisito sugerido por diversos pesquisadores, mas ainda pouco é conhecido sobre esse processo durante a germinação.

De acordo com Pereira et al. (2002), à vagarosa germinação das sementes de café aliada à rápida perda do poder germinativo, não poderá refletir no verdadeiro estado fisiológico da semente em tempo hábil. A determinação de forma rápida do potencial germinativo é fator importante a ser considerado no programa de produção de sementes. Atualmente, testes que forneçam resultados em períodos relativamente curtos são os mais demandados, pois auxiliam em tomadas de decisões nas diferentes etapas do processo produtivo (REIS et al., 2010; ZONTA et al., 2010).

Eira et al. (2006) comentam que quando as sementes de café são semeadas em solo, os cotilédones emergem, caracterizando tipo de germinação epígea. Sementes de café do tipo *C. arabica* são submetidas a condições ótimas (30°C, no escuro), no décimo dia é observado mais de 50% de germinação (protrusão da radícula). Silva et al. (2004) observaram mais de 90% de germinação de sementes de café a partir do 15º dia quando embebidas em água.

4.7. A ação do ácido abscísico (ABA) na indução da dormência de sementes

A dormência é definida como a incapacidade de uma semente intacta e viável completar seu processo germinativo sob diversas condições favoráveis (MARCOS FILHO, 2005). Existem diferentes tipos de dormência, no entanto, o controle germinativo é

frequentemente uma consequência da competitividade da interação entre o potencial de crescimento embrionário e a limitação da força dos seus tecidos circundantes (TAIZ e ZEIGER, 2009). Vários hormônios vegetais estão envolvidos neste controle germinativo como, por exemplo, o ácido abscísico (ABA).

A tradução do sinal gerado pelo ABA é iniciada com sua ligação a receptores supostamente localizados na membrana plasmática ou em membranas situadas no citosol (FERREIRA e BORGHETTI, 2004). A ocorrência desta tradução, segundo Bewley e Black (1994), inibe a germinação de sementes de muitas espécies vegetais. Silva et al. (2004) em estudos com sementes de café (*C. arabica*) demonstraram a ocorrência de um aumento transitório no conteúdo de ABA endógeno nas células do embrião durante a germinação, que inibe a extensibilidade da parede celular, e, assim, limitar a elevação do turgor celular.

Inibidores endógenos exercem controle na embriogênese e na maturação de sementes, particularmente na prevenção da germinação precoce (CARVALHO et al., 2001). A ocorrência destas substâncias mostra-se variável de acordo com a espécie, cujos locais de ação nem sempre são os mesmos de onde são extraídos (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

O padrão trifásico da germinação proposta por Bewley e Black (1978), tem um conteúdo de ABA em níveis muito baixos no início da embriogênese, atingindo níveis mais elevados na fase intermediária desse processo e, então, diminuindo gradualmente os níveis deste hormônio até a semente atingir a maturidade. Assim, o balanço hormonal das sementes ainda é complexo, devido ao fato que nem todos os tecidos possuem o mesmo genótipo (TAIZ e ZEIGER, 2009).

O ABA induz e bloqueia a expressão de diversos genes, entre eles os que codificam polipeptídeos com domínio de ligação ao RNA e diversas proteínas (FERREIRA e BORGHETTI, 2004). Mesmo não conhecendo a identidade dos transcriptos, acredita-se que estejam envolvidos com a dormência e que a inibição da síntese e/ou a remoção ativa deles seja(m) necessária(s) para a progressão da germinação.

Silva et al. (2008) expõem que o ABA inibe o enfraquecimento da região micropilar do endosperma de sementes de café e a atividade da endo- β -mananase. Em sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) (HALMER et al., 1975), tomateiro (*Solanum lycopersicum*) (GROOT e KARSEN 1992), alfarrobeira (*Ceratonia siligua* L.) (KONTOS e SPYROPOULOS, 1995) e *Sebastiania marginata* Benth (POTOMATI, 2000), apresentam a mobilização do galactomanano inibida pelo ABA quando aplicada exogenamente, demonstrando a interferência das atividades de enzimas que hidrolíticas.

Silva et al. (2002) constataram o envolvimento do ABA na regulação de algumas etapas iniciais do processo germinativo de embebição das sementes de café; a protrusão radicular coincide com níveis próximos de zero. Esta correlação negativa entre os níveis de ABA no embrião e no início do processo de germinação de sementes de cafeeiro, ocorre também de maneira semelhante em diferentes espécies vegetais.

Outra importante função do ABA no desenvolvimento da semente é a aquisição da tolerância a dessecação. Durante períodos entre as fases intermediária e tardia do desenvolvimento da semente ocorre tanto um acúmulo de RNAs-mensageiros específicos quanto um aumento nos níveis endógenos do ABA (TAIZ e ZEIGER, 2009). Assim, o envolvimento do ABA em vários processos fisiológicos importantes, em várias espécies vegetais, já é estabelecido e caracterizado, proporcionando importantes ferramentas para aplicação na área sementeira e biotecnológica.

4.8. Genes de estudo

A actina (ACT) é um gene que desempenha um papel importante na morfogênese das células das plantas, envolvendo o transporte de organelas, vesículas, membranas e células componentes da parede para o crescimento de células como em pelos radiculares, tricomas e tubos polínicos (LI et al., 2005). Kandasamy et al. (2001) referem que este gene participam em processos dirigidos pelo citoesqueleto, tal como a iniciação rápida da proliferação, expansão e diferenciação celular, que são fundamentais para o crescimento das plantas.

A atividade da quinase dependente de ciclina (CDK) é bem conhecida no ciclo celular das plantas e regulada por vários mecanismos bioquímicos, incluindo fosforilação de proteínas e proteólise (HEALY et al., 2000; YANG et al., 2011). De acordo com Volkweis et al. (2008) o ciclo celular compreende todo o período entre duas divisões mitóticas. É controlado por uma série de moléculas presentes no núcleo celular, que determinam se a célula entrará em mitose, diferenciação, repouso ou morte. Apresenta cinco fases: G_1 (*first gap*), S (*DNA synthesis*), G_2 (*second gap*), M (mitose) e G_0 (repouso) (Figura 1).

Durante a fase G_1 , ocorre a síntese de proteínas e de ácido ribonucléico (RNA). Nessa fase, há um ponto crítico, denominado ponto de restrição (Ponto R), quando a célula pode seguir o ciclo para a divisão ou sair e entrar em repouso. Na fase S, ocorre a duplicação do DNA e a célula torna-se tetraplóide ($4n$). Em G_2 , a célula prepara-se para a mitose. Na fase M,

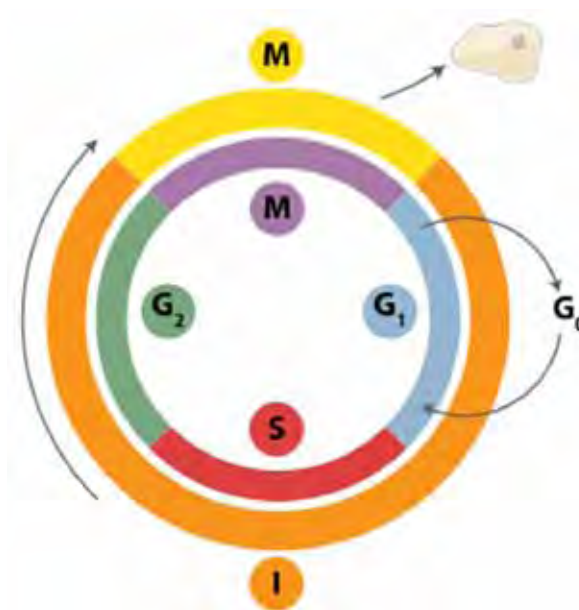


Figura 1. O ciclo celular consiste de uma fase mitótica (M), durante a qual ocorrem a primeira divisão nuclear (mitose) e a divisão celular (citocinese). A fase M é seguida de um período longo de crescimento conhecida como interfase (I). A interfase em células que se dividem possui três subfases (G_0 , G_1 , S e G_2) (FISICANET, 2012).

ocorre a divisão celular em duas células filhas diplóides (2n). Após a mitose, a célula pode entrar na fase G₀, na qual fica em repouso, ou reiniciar outro ciclo (WARD, 2002). A ciclina é responsável, em grande parte, pelo controle do crescimento das plantas, através da formação de células associada ao ciclo celular (MIRONOV et al., 1999). Qi e John (2007) expõem que este tipo de crescimento celular é bastante importante, pois a diferenciação dos tipos de células em plantas se encontra sob um controle autônomo.

As expansinas (EXPA2) são proteínas de afrouxamento da parede celular vegetal que se ligam a interface entre as microfibrilas e polissacarídeos, facilitando a extensão da parede celular, hemicelulose, turgescência e outros componentes (BUDZINSKI et al., 2010). Diversos pesquisadores observaram que a expansina desempenha um papel importante numa variedade de eventos como, a polinização, amolecimento do fruto, o desenvolvimento radicular, crescimento celular, a germinação de sementes, abscisão, as respostas ao estresse e o parasitismo (COSGROVE et al., 1997; FLEMING et al., 1997; BRUMMELL et al., 1999; ZANG e HASENSTEIN, 2000; CHOI et al., 2006).

A α -galactosidase (α GAL) é conhecida como a única enzima capaz de hidrolisar resíduos de galactose a partir de paredes celulares de polissacarídeos por clivagem (SMITH et al., 1996). Sua capacidade de liberar hidratos de carbono, galactolipídeos e glicoproteínas a partir de componentes da parede celular durante a expansão celular, senescência e amadurecimento de frutos tem sido identificado na literatura (BUCKERIDGE e REID, 1994 e ZHA et al., 2012). Sua atividade enzimática e expressão gênica têm sido observadas em pólen, sementes e plântulas (BUCKERIDGE e REID, 1994; FEURTADO et al., 2001; KIM et al., 2002 e LIMA et al., 2004).

A β -manosidase é conhecida por hidrolisar oligomananas (MO e BEWLEY, 2002). No entanto, ainda conforme os mesmos, não têm sido clonados e nem sequenciado nada em relação à β -manosidase, resultando em poucas informações sobre esta enzima associado a sua atividade em relação à germinação e mobilização de galactomanano. Alguns autores têm relatado a atividade desta enzima em endospermas isolados do mutante de tomate gib-1, onde aumenta em resposta a giberelina (ISHIMIZU et al., 2004). A sua presença foi notada em sementes de outras espécies, como tomate (*Solanum lycopersicum*) (MO e BEWLEY, 2002 e 2003) e aspargos (*Asparagus officinalis*) (WILLIAMS et al., 2001).

A atividade da endo- β -mananase (MAN) em sementes tem sido relatada em várias espécies endospérmicas antes e depois da protrusão da radícula. Embora a degradação da manana seja iniciada pela atividade da MAN, o principal papel desta enzima no enfraquecimento da parede celular e do endosperma é controverso por alguns autores (GONG et al., 2005; HOLDSWORTH et al., 2008). Contudo, Iglesias-Fernández et al. (2011) relatam um consenso entre autores, onde, a MAN é necessário para o enfraquecimento do endosperma, mas não é suficiente para permitir a conclusão da germinação.

4.9. Estudos de expressão gênica em sementes

A pesquisa na área da biologia molecular associada ao controle de qualidade de sementes tem evoluído rapidamente e novas técnicas têm-se mostrado úteis na obtenção de classes distintas de marcadores moleculares (VASCONCELOS et al., 2010). Estes auxiliam na elucidação dos fatores que afetam a qualidade, a identificação e preservação do material genético, permitindo o monitoramento de todo processo produtivo. Contudo, ainda são escassos os trabalhos voltados a expressões de genes durante o processo germinativo nas principais espécies vegetais.

Pesquisas têm sido desenvolvidas para detectar as diversas reações metabólicas que envolvem síntese e degradação de moléculas durante o desenvolvimento, a germinação e a deterioração de sementes (JOSÉ et al., 2009). Estudos afirmam que análises do acúmulo de materiais de reserva por meio de marcadores moleculares, durante a fase de maturação das sementes, podem fornecer indícios da qualidade de sementes (VENGLAT et al., 2011).

Assim, tecnologia como o uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real é empregada em estudos da expressão gênica, uma vez que as quantidades de mRNA convertidos em cDNA e amplificados na reação podem ser monitoradas a cada ciclo pela fluorescência emitida durante a reação (LOGAN et al., 2009). Com a finalização de cada ciclo, cada par de “primers” sintetizam a sequência complementar, aumentando de uma forma exponencial enquanto as sequências mais longas acumulam-se de

uma forma linear, desde que as quantidades de DNA de partida estejam presentes em quantidades limitantes (ARGYROPOULOS et al., 2006).

5. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Análise Sementes do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas – Campus de Botucatu empregando-se sementes de café (*Coffea arabica* L.), cultivar Catuaí Amarelo, colhidas no ano de 2011 e cedidas pela EPAMIG – Machado-MG. Foi determinado o teor inicial de água pelo método de estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas, utilizando duas subamostras de 25 sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem média, na base úmida. Logo após, as sementes foram acondicionadas em saco de polietileno conforme descrito por Braghini e Fazuoli (2007) e armazenadas em câmara de circulação de ar a temperatura de 10 °C, para manter a qualidade fisiológica das sementes, até o início das avaliações.

5.1. Curva de embebição em água

A curva de embebição de sementes de café foi elaborada mediante avaliações diárias do(s) peso (massa/fresco(s)) de cada uma dessas após acondicioná-las em substrato de papel umedecido com água destilada, modo idêntico ao teste de germinação.

Foram empregadas quatro repetições, com 25 sementes cada, com auxílio de uma balança digital com precisão (de 0,001 g).

5.2. Crescimento do embrião de sementes de café embebidas em água e em ácido abscísico (ABA) [1000 μ M]

O crescimento do embrião das sementes de café foi avaliado aos 1, 3, 6 e 9 dias de embebição em água e em solução de ABA conforme descrito no item 5.3.. Para tanto, em cada período de embebição 10 embriões foram isolados, com o auxílio de uma lâmina e mensurados com um paquímetro digital.

5.3. Germinação em água e em ácido abscísico

Os testes de germinação foram realizados após a remoção do pergaminho aderente às sementes de café e posterior assepsia com hipoclorito de sódio a 1% durante cinco minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente e dispostas em placas Petri (9,0 x 1,5 cm), entre substrato de papel "Germitest" umedecidas com água destilada ou solução de ácido abscísico (ABA) da Sigma Aldrich[®], na concentração de 1000 μ M, em quantidades equivalentes, em mililitros, a 2,5 vezes o valor do peso seco do papel.

Para obtenção da solução do ácido abscísico foram diluídos 0,0607 g de ABA em 0,5 mL de hidróxido de potássio. Logo após, a solução de ABA foi diluída em 230 mL de água pura e autoclavada, sob agitador magnético e o pH ajustado para 7,0 com adição de 1N de HCl em pH/íon meter 450 da Corning. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes e acondicionadas em câmara de germinação, tipo BOD, a 30 °C com ausência de luz. A contagem das sementes germinadas foi realizada diariamente, considerando-se as com protrusão de radícula com, no mínimo, um milímetro. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Neste período de observações foram feitas fotos das sementes embebidas, com auxílio de um analisador de imagens modelo LAS V3.7 (Leica Application Suisse) em sistema computadorizado acoplado a um microscópio estereoscópio modelo M125.

5.4. Estudos moleculares das sementes de café durante os períodos de embebição em água e ácido abscísico

Foram isolados aos 1, 3, 6 e 9 dias, três repetições de 50 embriões e 50 regiões endospermáticas micropilares de sementes de café embebidas em água e em ácido abscísico, este na concentração de 1000 μM , como descrito no teste de germinação. As amostras biológicas foram acondicionadas em tubos plásticos, tipo “ependorf”, congelados sob nitrogênio líquido e armazenados em “deep freezer” a uma temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, foi efetuada a maceração dos embriões, com o auxílio de um conjunto de almofariz e pistilo.

5.4.1. Extração de RNA

Para a extração do RNA foi utilizado o “kit” – NucleoSpin RNA Plant[®] da Macherey-Nagel. Conforme descrito no protocolo, em capela, foram transferidos aproximadamente 100 mg do material macerado, 350 μL de tampão de extração e 3,5 μL de β -mercaptoethanol (β -ME) para um microtubo de 1,5 mL. Logo em seguida, as amostras foram homogeneizadas com auxílio de um agitador “Vortex”, transferidas para filtros NucleoSpin Filter[®] acoplados a tubos coletores de 2 mL e centrifugadas por um minuto a 11.000 rpm, para redução da viscosidade.

Foram adicionados 350 μL de etanol 70% nos filtrados de cada amostra e transferidas para colunas de NucleoSpin RNA Plant[®] acoplados a tubos coletores de 2 mL e centrifugadas a 30 segundos à 11.000 rpm. Em seguida as colunas de filtração foram acondicionadas a novos tubos coletores. Para cada coluna de filtração, foram adicionados 350 μL de Membrane Desalting Buffer[®], centrifugadas por um minuto a 11.000 rpm até a membrana da coluna de filtração apresentar-se seca. Foram adicionados no centro da

membrana de sílica da coluna de filtração 95 µL de DNase reaction mix[®] e deixados em repouso, à temperatura ambiente, por 15 minutos.

As colunas de filtração foram submetidas à lavagem com 200 µL de tampão e centrifugadas por 30 segundos a 11.000 rpm. Acondicionadas em novos tubos coletores, as colunas de filtração foram submetidas a uma segunda lavagem adicionando 600 µL de tampão RA3 e centrifugadas por 30 segundos a 11.000 rpm. Após o descarte da solução do tubo coletor, foi adicionado 250 µL de tampão em colunas de NucleoSpin RNA Plant[®] e centrifugado por dois minutos a 11.000 rpm até secar completamente a membrana. Transferidas as colunas de NucleoSpin RNA Plant[®] para micro tubos de 1,5 mL, foram adicionados 40 µL de água RNase-free nas colunas de NucleoSpin RNA Plant[®] e centrifugadas por um minuto a 11.000 rpm para obtenção do RNA extraído.

Após a extração de RNA, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific) e seus resultados expressos em ng/µL. A verificação da integridade das amostras de RNA foi realizada mediante avaliação em gel de agarose 1,0% em cuba de eletroforese a 60 volts em 45 minutos.

5.4.2. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, foi utilizado o kit ProtoScript[®] da New England Biolabs. Conforme o protocolo descrito no kit, foi realizado um mix para cada amostra biológica, com concentrações de 1000 ng de RNA, um microlitros dos primers d(T)₂₃VN[®] com 5 µM de concentração, um microlitro de Randon[®] com concentração de 6 µM e água livre de nucleasse variável para obtenção de volume total de oito microlitros. As amostras foram incubadas em termociclador a 70 °C por cinco minutos. Logo após, em gelo, foram adicionados 10 µL de AMV Reaction Mix[®] e dois microlitros de AMV Enzyme Mix[®]. Para o controle negativo, a AMV Enzyme Mix[®] foi substituída por água livre de nucleasse.

As amostras de reação foram incubadas em termociclador a 25 °C, por 5 minutos, e a 42 °C, por uma hora. Para inativação da enzima, a temperatura do termociclador foi elevada para 80 °C, por cinco minutos. A quantificação do cDNA foi realizada em

espectrofotômetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific) e seus resultados expressos em ng/ μ L. As amostras foram conservadas em freezer a -20 °C.

5.4.3. Desenho dos *primers*

Primers específicos de Actina (SGN-U618902), associados a processos dirigidos pelo citoesqueleto, foram desenhados utilizando sequência de mRNA de sementes de café (GILLIAND et al., 2003). Sequência de aminoácidos de quinase dependente de ciclinas (SGN-U607600), obtida de uma mistura de folhas, frutos, flores, raiz e calos de *Coffea arabica*, foi selecionada e utilizada para confecção dos *primers*. Regiões altamente específicas de α -expansina (GQ434002.1) relacionado ao crescimento celular e germinação de sementes (CHEN e BRADFORD, 2000) foram desenhadas utilizando sequência de mRNA do frutos de café conforme Budzinski et al. (2010).

A sequência de cDNA de α -galactosidase de sementes de café (L27992.1) obtida por Zhu e Goldstein (1994), foi utilizada para desenhar *primers* específicos associados com a hidrolisação de resíduos de galactose a partir de paredes celulares de polissacarídeos por clivagem (SMITH et al., 1996). *Primers* específicos foram desenhados usando sequência de cDNA de endo- β -mananase (AJ293305) de sementes de café durante a germinação (MARRACINI et al., 2001).

Para síntese dos oligonucleotídeos da β -manosidase, responsável por hidrolisar oligomananas (MO e BEWLEY, 2002), foi copiada a sequência de aminoácidos conforme Silva (2002), e convertida em sequência de nucleotídeos disponível *online* pelo programa European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/). Logo após, a sequência de β -manosidase foi submetida ao BLAST[®], disponível *online* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para alinhamento de sequências com alta homologia com outras β -manosidasas. Como controle interno foi utilizado *primers* de 18S para normalização (Tabela 1).

Para desenho dos *primers*, foram utilizadas sequências depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Sol Genomics Network (http://solgenomics.net/about/about_solanaceae.pl). Todas as sequências foram salvas em formato *Fasta* para o desenho dos *primers*.

O programa Primerquest (<http://biotools.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>), disponível *online* foi utilizado para o desenho dos *primers* (Tabela 2). Para tal, os seguintes parâmetros foram utilizados: tamanho em média de 19 pb; Temperatura de *Melting* (T_M) em média de 60 °C, quantidades de GC em torno de 55% e tamanho médio dos fragmentos amplificados entre 70 a 150 pb. Logo após os *primers* foram alinhados com sequências disponíveis *online* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar a eficiência dos mesmos.

Tabela 1. Genes (mRNAs) estudados no embrião e no endosperma micropilar durante a germinação de sementes de café.

Símbolo Gene	Nome do Gene	Relacionada a
<i>ACT</i>	Actina	Citoesqueleto ¹
<i>CDK</i>	Ciclina	Crescimento e formação de células associadas com o ciclo celular ²
<i>EXPA2</i>	α -Expansina	Crescimento celular e germinação ³
<i>αGAL</i>	α -Galactosidase	Hidrolisa resíduos de galactose a partir de paredes de celulares de polissacarídeos por clivagem ⁴
<i>LeMSide2</i>	β -Manosidase	Hidrolisa oligomananas ⁵
<i>βMAN</i>	Endo- β -Mananase	Enfraquecimento da parede celular e do endosperma ⁶
<i>18S</i>		Normalizador ⁷

¹Gilliland et al. (2003); ²Valadez-González et al. (2007); ³Chen e Bradford (2000); ⁴Zhu e Goldstein (1994); ⁵Mo e Bewley (2002); ⁶Marraccini et al. (2001); ⁷Kim et al. (2010).

Tabela 2. *Primers* específicos de embrião e endosperma micropilar de sementes de café utilizados para análises de PCR em tempo real.

Nome do Gene	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
Actina	TTGGCTCCCAGCAGCATGAA	TGCTGGAATGTGCTGAGGGA
Ciclina	TTTGGATTGGCCCGTGCCTT	AGCCAAGTACCACACGTCA
α -Expansina	TCGTGCAGGCATCGGTCAA	AAGAGCGACGGTCACTTGCT
α -Galactosidase	TCCATGGACGGTGC GACTTT	AAGAGGTCCAGCCCAAACCT
β -Manosidase	TTGGGCCGTGAAGTCGTGAA	AAGGCAGCAACCACTCTTGG
Endo- β -mananase	TCCTGGATACCAAGTGGGCA	AACATCATCTGTGCACCGTCGC
18S ribossomal	TGACGGAGAATTAGGGTTCG	CCTCCAATGATCCTCGTTA

5.4.4. Quantificação da expressão relativa por PCR em tempo real

Para a quantificação da expressão relativa dos genes-alvo e do normalizador foi utilizada a técnica de PCR em tempo real utilizando 0,4 μ l *primers Foward* e *Reverse* na concentração de 2,0 mM; 1,0 μ l de cDNA na concentração de 100 ng/ μ l e 10 μ l de EvaGreen[®] master mix, resultando em uma solução final de 20,0 μ l. Posteriormente as amostras foram incubadas em um termociclador óptico (Eco Real-Time) da Illumina[®] para avaliação da expressão dos genes em estudo.

Foram utilizadas três repetições biológicas e duas repetições técnicas para cada amostra. O controle negativo foi realizado com ausência de cDNA e adição de água livre de RNase. Tal procedimento foi adotado para certificar a ausência de qualquer tipo de contaminação. Para determinação do limite de detecção dos transcritos e da eficiência das ampliações para cada gene analisado, utilizaram-se quatro quantidades de cDNA: 100, 10, 1 e 0,1 ng.

A amplificação dos fragmentos foi realizada com um ciclo de 50 °C por 2 minutos, para iniciar a incubação, seguido de um período de desnaturação a 95 °C por 10 minutos. Logo após foram utilizados 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C e 30 segundos a 61°C. No final do processo foi realizada a curva de *Meting* a 95 °C, 55 °C e 95 °C em 15 segundos para cada temperatura, a fim de garantir especificidade dos *primers*.

Conforme Livak e Schmittgen (2001), a determinação da expressão gênica foi baseada pela reação exponencial da PCR pela expressão $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde QR representa o nível de expressão gênica, Ct representa o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial, ΔCt refere-se à diferença entre Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene controle e o $\Delta\Delta Ct$ representa a diferença entre o ΔCt da amostra de interesse e o ΔCt da amostra de referência (um dia de embebição). A eficiência dos *primers* foi calculada, permanecendo entre 1,96 a 2,00. Para efeito de cálculo foi considerada uma eficiência de 2,00. Posteriormente os dados foram analisados no programa *Sigma Plot*, obtendo uma representação gráfica e numérica do aumento da fluorescência ocorrido durante os ciclos da reação.

5.5. Análises estatísticas

O delineamento experimental foi em um esquema fatorial 3x2 (dias de embebição x tratamento com e sem hormônio), em três repetições biológicas. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O valor médio do teor de água das sementes de café foi 13,3%. Quando submetidas às sementes de café a embebição, verificou-se uma elevação em seu peso fresco até o terceiro dia (Fase I), onde se mantiveram relativamente constante até os nove dias (Fase II), para, então, após o décimo dia, tornaram-se novamente crescentes (Fase III), fato caracterizador da retomada do crescimento do eixo embrionário (Figura 2.). A curva de embebição das sementes de café obedeceu ao padrão trifásico como descrito por Bewley e Black (1994).

Camargo (1998) e Silva (2002) também observaram, com clareza, a existência das três fases da curva de embebição e a ocorrência da protrusão radicular das sementes de café ao nono dia de embebição. Silva (2002) relatou a existência de células endospermáticas de café com paredes muito espessas, que podem prolongar o período de absorção de água.

Do início ao terceiro dia de embebição em água foi verificado aumento significativo do comprimento do embrião, hipocótilo e dos cotilédones, das sementes de café, conforme a Figura 3. Quando 50% das sementes de café tiveram a protrusão da radícula, o comprimento do embrião foi de 5,02 mm, do hipocótilo cerca de 3,20 mm e dos cotilédones de 1,82 mm (Figura 3.).

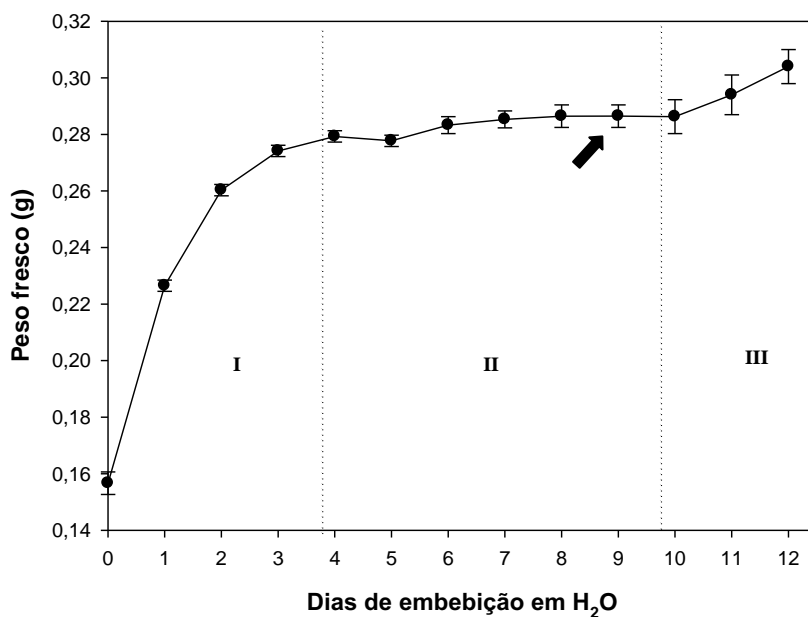


Figura 2. Dados médios (●) do peso fresco para curva de embebição durante a germinação de sementes de café e barras de erro indicam os desvios padrão. A seta indica 50 % da protrusão radicular.

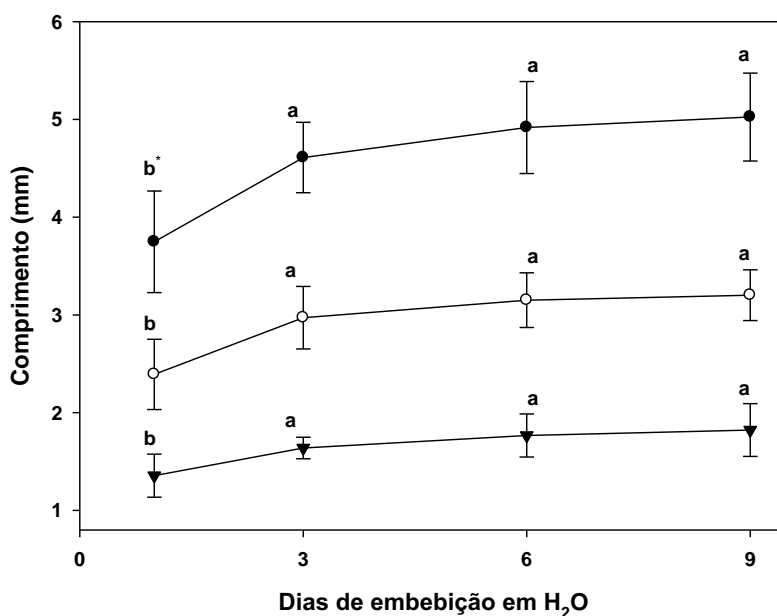


Figura 3. Comprimento do embrião (●), hipocótilo (○) e cotilédones (▼) de sementes de café embebedas em água. As barras de erro indicam os desvios padrão. * Médias seguidas pelas mesmas letras nos pontos não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Quando as sementes de café foram colocadas para embeber em solução de ABA, foi constatada uma inibição no crescimento dos embriões, hipocótilos e dos cotilédones (Figura 4.). No decorrer dos nove dias de embebição, foi observado uma estabilidade em média do crescimento do embrião (4,01 mm), hipocótilo (2,48 mm) e cotilédones (1,53 mm). Em todos os períodos de embebição em ABA não foi possível observar a protrusão da radícula das sementes de café.

A mensuração direta do comprimento do embrião complementa a informação de que o eixo embrionário e os cotilédones contribuíram para o crescimento total do embrião, antes da protrusão da radícula. Silva (2002) relatou esta ocorrência em sementes de café como decorrente do potencial de pressão e a capacidade de extensão da parede celular. Silva et al. (2008) observaram, em estudos de microscopia, que o crescimento do eixo embrionário foi determinada pelo alongamento das células após nove dias de embebição. O fato coincide com o consenso geral de que o crescimento da radícula tem relação direta com as células de alongamento do eixo embrionário.

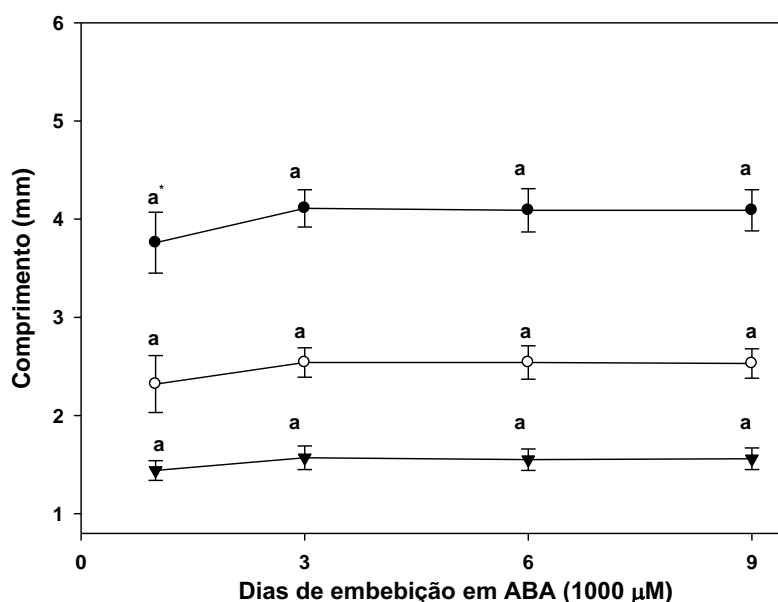


Figura 4. Comprimento do embrião (●), hipocótilo (○) e cotilédones (▼) de sementes de café embebedas em ABA. As barras de erro indicam os desvios padrão. * Médias seguidas pelas mesmas letras nos pontos não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Alguns pesquisadores relatam que o crescimento necessário para expansão das células da radícula e ruptura do endosperma micropilar depende do ambiente e são hormonalmente regulados por células do afrouxamento das paredes celulares mediados por proteínas e expansinas (COSGROVE, 2005; KNOX, 2008, VOEGELE et al., 2005).

Quando as sementes foram embebidas em solução de ABA após três dias, ocorreu uma inibição no crescimento total do embrião, coincidindo com a ausência da expansão das paredes celulares endospermáticas. Diversos pesquisadores, ao estudar a ação do ABA no crescimento do embrião, observaram inibição da expansão celular e a diminuição do potencial de crescimento em sementes de tomate, café e *B. napus* (SCHOPFER e PLACHY, 1985; TOOROP et al., 2000; SILVA et al., 2004 e SILVA et al., 2008).

Queiroz (2009) e Queiroz et al. (2012), ao avaliarem o crescimento de embriões de sementes de *Genipa americana* embebidas em 100 μ M de ABA, observaram um pequeno crescimento total dos embriões seguido de uma inibição do alongamento das células após 15 dias de embebição. Nik et al, (2011) relataram a importância da medição do comprimento do embrião, como auxílio a seleção de plântulas vigorosas.

O início da germinação das sementes de café embebidas em água foi observado ao quinto dia, conforme a Figura 5. Com nove e 11 dias de embebição, foram verificadas de 50% a 90% de germinação. Quando as sementes de café foram submetidas a tratamento de 1000 μ M de ABA, não ocorreu a germinação (Figura 5.). Selmar et al. (2002), confirmado por Bytof et al. (2007) relataram distintas hipóteses sobre a germinação de sementes de café devido às diferenças em seu estado metabólico.

No geral, as sementes de café germinam lentamente. Em condições ótimas é possível observar sementes germinadas a partir do quinto dia de embebição (SILVA, 2002). Silva et al., (2008) expõem que sementes de café pertence a um grupo que possuem elevadas quantidades de manano em seu material de reserva. Bewley e Black (1994) explanam que a hemicelulose é o principal componente das paredes celulares das sementes de café, podendo servir como reserva. Em trabalho semelhante com sementes de

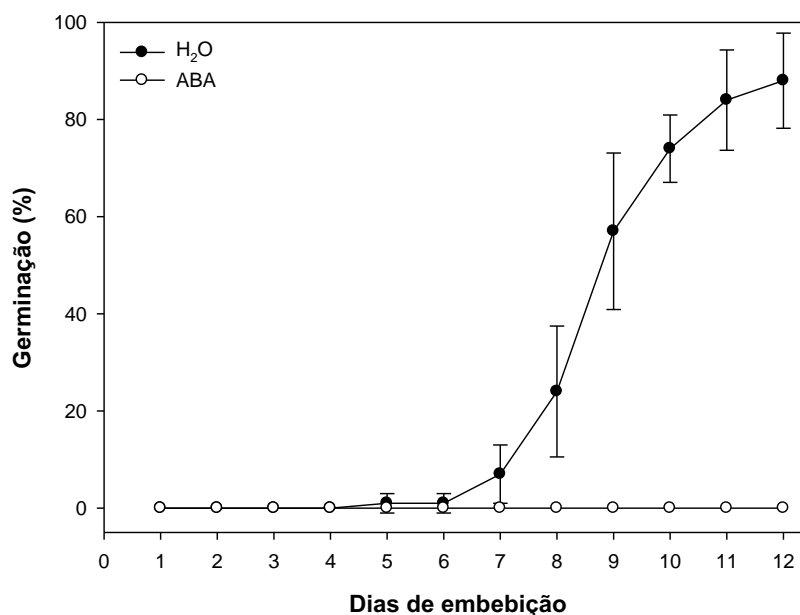


Figura 5. Germinação de sementes de café embebidas em água (●) e em ABA (1000 μ M) (○). Os pontos de dados são em média de quatro repetições de 25 sementes e as barras de erro indicam o desvio padrão.

café, Silva (2002) e Silva et al. (2008) observaram que as células da parede celular perderam a integridade coincidindo com a expansão da parede celular do endosperma.

A extensão da parede celular precedida conclusão da germinação, tornou-se visível com nove dias de embebição (Figura 6.). A expansão celular foi inibida quando as sementes foram embebidas em 1000 μ M de ABA. Após três dias de embebição, as sementes de café já compunha a Fase II da germinação, sem nenhuma protuberância visível na região micropilar endospermática. Aos seis dias de embebição foi possível observar a expansão das células da parede celular da região micropilar das sementes de café.

Silva et al. (2008) mostram que tipo de comportamento é devido a um mecanismo celular controlado na absorção de água. Em sementes de café, as células da parede celular do endosperma são mais espessas, levando um tempo maior para hidratar completamente (SILVA et al., 2004). Aos nove dias de embebição, percebeu-se uma protuberância na região micropilar endospermática, seguido da protrusão da radícula das sementes de café (Fase III). Toorop et al. (2000) comentam que o afrouxamento da região



Figura 6. Germinação de sementes de café durante nove dias de embebição em água.

micropilar do endosperma é mediada por enzimas hidrolíticas. Sliwinska et al. (2009) alegam que a germinação é acompanhado pelo aumento no conteúdo de DNA e que a expansão do eixo seguido da protrusão da radícula é devido a expansão das células.

Em solução de ABA foi observado que o potencial de crescimento do embrião e o afrouxamento das paredes celulares endospermáticas foram inibidos. Casos semelhantes foram observados em sementes de tomate (TOOROP et al., 2000), café (SILVA et al., 2008) e *Genipa americana* (QUEIROZ et al., 2012). No entanto, verificou-se que o ABA não influenciou na absorção de água das sementes (Fase I), pois as sementes de café apresentaram visualmente pouco e/ou quase nenhum afrouxamento das paredes celulares após os nove dias de embebição.

Foi observado que a normalização do cDNA de embriões de sementes de café embebidos em água com o 18S, apresentou uma variação de Ct 16,35 – 17,01. Quando submetidos à solução de ABA, foram obtidas variações de Ct 16,35 – 17,87, independentemente dos tratamentos avaliados (Figura 7.). Comportamento semelhante foi observado quando normalizado o cDNA da região micropilar endospermática com o 18S, conforme a Figura 8. Esses resultados podem ser atribuídos ao metabolismo semelhante de ambas as regiões estudadas serem próximas nas sementes de café.

Field et al. (1988) explanam que o gene 18S é uma parte do RNA ribossomal (rRNA) amplamente utilizado em análises moleculares para reconstruir a história evolutiva dos organismos. O 18S rRNA é o mais utilizado em estudos

filogenéticos e um importante marcador de alvo aleatório da PCR no rastreo da biodiversidade ambiental. Este normalizador está exposto a forças seletivas semelhantes em todos os seres vivos (MEYER et al., 2010).

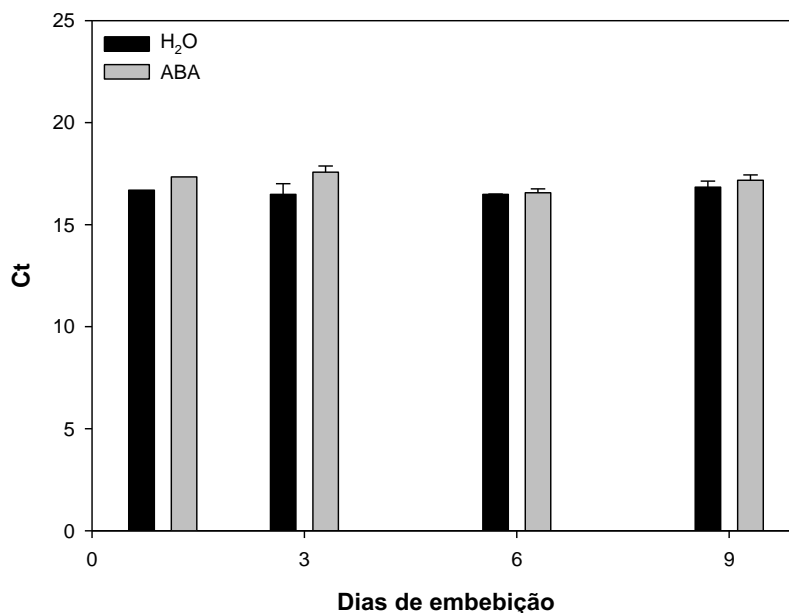


Figura 7. Ct do gene 18S em embriões de sementes de café embebidas em água e em ABA (1000 µM). As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de três repetições biológicas.

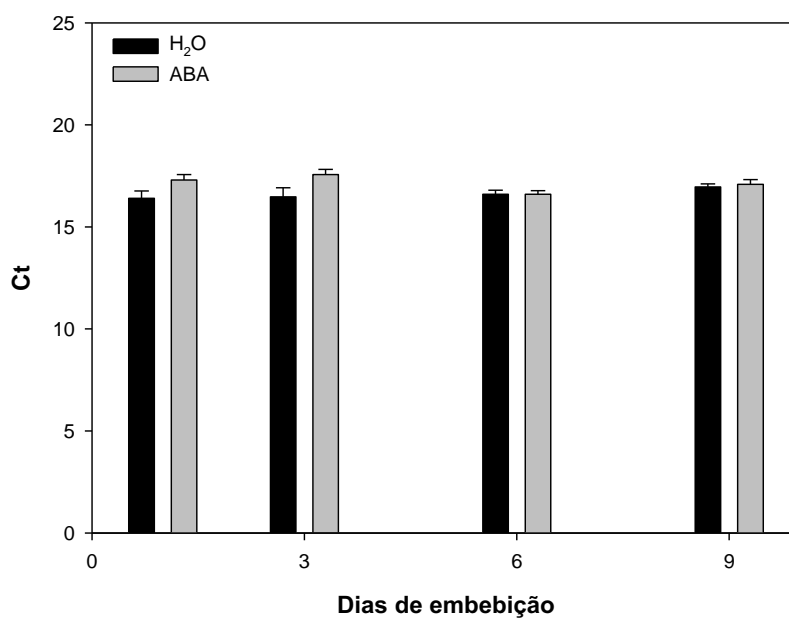


Figura 8. Ct do gene 18S em região micropilar de sementes de café embebidas em água e em ABA (1000 µM). As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de três repetições biológicas.

A expressão da enzima actina no embrião das sementes de café não aumentou significativamente nos três primeiros dias quando embebidas em água, o que, todavia, ocorreu aos seis dias, seguido de uma redução da quantificação relativa aos nove dias de embebição (Figura 9.). As sementes de café foram submetidas à solução de ABA, observou um aumento na expressão relativa do gene em estudo aos seis dias, não diferindo estatisticamente aos nove dias de embebição. Houve interação significativa entre as sementes embebidas em água e em solução de ABA durante todos os períodos de avaliação.

Carvalho e Recco-Pimentel (2007) comentam que a polimerização da actina é relativamente lenta em sua fase inicial, causando atrasos. A segunda etapa é conhecida como alongamento, correspondendo a uma fase exponencial de crescimento seguido de equilíbrio, correspondente a uma fase de manutenção da quantidade de filamentos. Entretanto, Alberts et al. (2006) explicam que nem sempre os monômeros de actina polimerizam os filamentos nas células, devido a pequenas proteínas, como a *timosina* e *profilina*, que se ligam aos monômeros no citosol, evitando que sejam

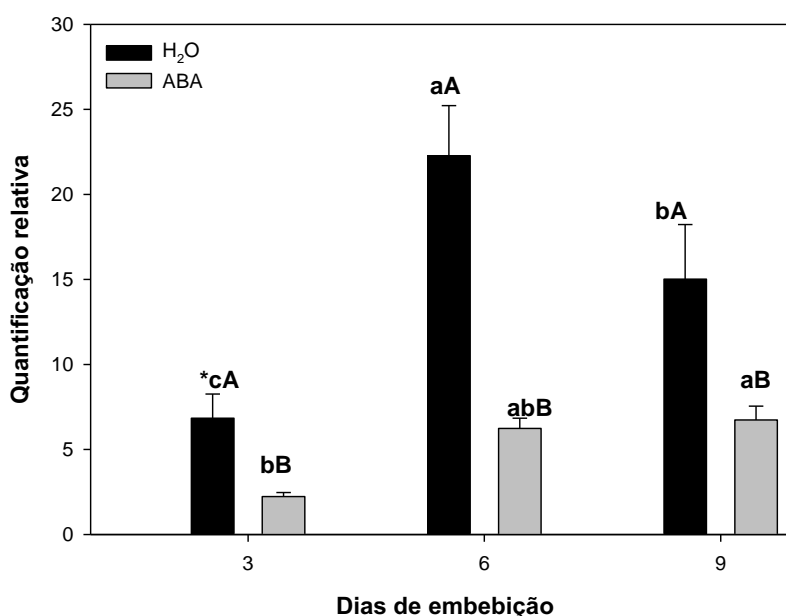


Figura 9. Expressão relativa do gene actina em embriões de sementes de café embebidas em água e em ABA (1000 µM). As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de três repetições biológicas. * Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas dentro de cada tratamento e maiúsculas entre os tratamentos nas barras, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

adicionados às extremidades dos filamentos de actina.

An et al., (1996), ao avaliarem a expressão conservada de actina em plantas de *Arabidopsis*, verificaram uma variabilidade na atividade da *ACT1-GUS* em tecidos vasculares jovens. Gilliland et al. (2003) observaram que a atividade do gene *ACT-7* na germinação de sementes mutantes de *Arabidopsis* foi tardia quando comparada com as de tipo selvagem. Li et al. (2005), ao analisarem a expressão da actina (GhACT) em distintos tecidos vegetais do algodão (*Gossypium hirsutum*), verificaram maior atividade na fibra, especialmente na fase de alongação das células.

A actina, em particular, é conhecida em níveis de expressão por aumentar a exposição de auxinas (KANDASAMY et al., 2001). O controle da germinação das sementes e o crescimento da raiz envolvem sinais hormonais, como ácido abscísico e ácido giberélico para germinação e auxina e citocinina para o crescimento da raiz (LOVEGROVE e HOOLEY 2000 e RASHOTTE et al., 2000). Li et al. (2005) propõem que especializadas expressões funcionais de genes de actina são necessários para o desenvolvimento adequado das células e do tipo de tecido que pode refletir a evolução divergente no desenvolvimento da planta.

A quantificação relativa da quinase dependente de ciclina apresentou uma estabilidade até o sexto dia, seguido de um aumento expressivo aos nove dias quando embebidas em água (Figura 10.). Para embriões embebidos em ABA, foi observado um aumento significativo na expressão da quinase dependente de ciclina nos três primeiros dias, seguido de um declínio nos dias posteriores (Figura 10.). Em todos os períodos de avaliação, verificou-se interação significativa entre os tratamentos.

Alberts et al. (2006) mostram que as ciclinas, que atuam mais cedo na fase G_1 (intervalo da fase M e início da fase S), unindo-se a outras proteínas de quinases dependentes de ciclina (Cdk) para formar G_1 -Cdk, que ajudam a conduzir a célula por G_1 em direção a fase S (replicação de DNA). No entanto, no final da mitose toda atividade de Cdk na célula está reduzida a zero devido à inativação S-Cdk no final da fase S e da M-Cdk no final da fase de mitose e citocinese (M). Assim, as Cdk permanecem inibidas durante maior parte de G_1 , acontecendo diversos mecanismos que previnem a sua reativação, incluindo a ligação de proteínas inibidoras (ALBERTS et al., 2006).

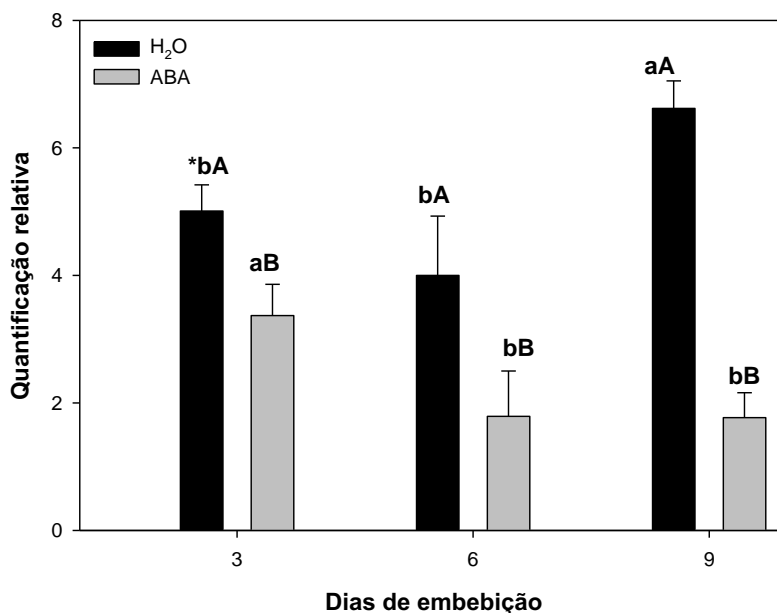


Figura 10. Expressão relativa do gene quinase dependente de ciclina em embriões de sementes de café embebidas em água e em ABA (1000 μ M). As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de três repetições biológicas. *Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro de cada tratamento e maiúsculas entre os tratamentos nas barras, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

De acordo com os resultados obtidos da curva de embebição e do crescimento do embrião das sementes de café, na fase I da germinação as ciclinas podem ter atuado mais cedo quando ligadas a outras Cdks. No entanto, durante a embebição, a fase II é alcançada pelas sementes de café quando a atividade das ciclinas é inibida por quase toda fase G₁, devido a mecanismos celulares que inibem sua reativação. Superada esta inibição, a enzima em estudo reativa seus mecanismos celulares, ocorrendo divisões e diferenciação celular (fase III). Verificou-se que na fase I o ABA não promoveu ação inibitória na absorção de água nas sementes. No entanto, foi observado um efeito inibitório na atividade da ciclina, promovendo um prolongamento na fase II coincidindo com a fase G₁, impedindo a ocorrência da divisão, crescimento e diferenciação celular.

Valadez-Gozález et al. (2007) explicam que o aumento da atividade da Cdk em plantas de café, ocorre sob condições de estresse independente de uma nova síntese proteica. Weinl et al., (2005) mostram que a Cdk é uma enzima

fundamental da progressão do ciclo celular e que tem sido envolvido como um regulador de respostas ao estresse.

Em plantas de tabaco os genes de ciclina tiveram elevadas expressões até os três dias do seu crescimento exponencial, diminuindo substancialmente na fase estacionária no quinto dia e não observando transcrições de *CdkB1* após o sétimo dia. Isto indica que as atividades das Cdk's apresentam limitante nas fases G₁/S, precoce em S e diminui após G₂/M (SORRELL et al., 2001).

Em contraste, Reichheld et al. (1999), em uma análise limitada de Cdk em tabaco, observaram níveis constantes ao longo do ciclo celular, enquanto a atividade de citocinese foi baixa no início da fase G₁, aumentando a transcrição nas fases G₁/S, um pico em S/G₂, declinando na mitose. Conforme Joubès et al. (1999), a expressão de Cdk está correlacionada com a capacidade das células se dividirem na fase M, elevando um nível de Cdk associado com uma atividade de citocinese relativamente baixa, contribuindo para um aumento na atividade de quinase.

Em arroz (*Oryza sativa*) transgênico a atividade da Cdk inibiu parcialmente a produção de sementes, indicando que a superprodução diminui a produção de células, inibindo a progressão do ciclo celular (BARRÔCO et al., 2006). Yang et al. (2011) ao avaliarem a expressão de Cdk em arroz (OsilCK6) em resposta a condições ambientais em diferentes tecidos, verificou que em tratamento com ABA, houve uma maior indução inicial; entretanto pareceu diminuir ao longo das horas avaliadas. Assim, o ABA promove uma ação inibidora nas enzimas de ciclina e uma baixa ação enzimática na maquinaria do ciclo celular e afetando significamente o crescimento e do desenvolvimento.

A quantificação relativa da α -expansina apresentou-se estável até os seis primeiros dias, seguido de um aumento significativo aos nove dias quando os embriões de sementes de café foram embebidos em água. Em solução de ABA, a expressão relativa da α -expansina reduziu-se, não diferindo entre si ao longo dos dias de embebição (Figura 11.). Quando observado cada período de embebição, verificou-se interação significativa em todos os tratamentos avaliados.

Alguns pesquisadores descrevem que a expansina está envolvida em distintas etapas no desenvolvimento de tecidos vegetais e sobre sua atividade genética

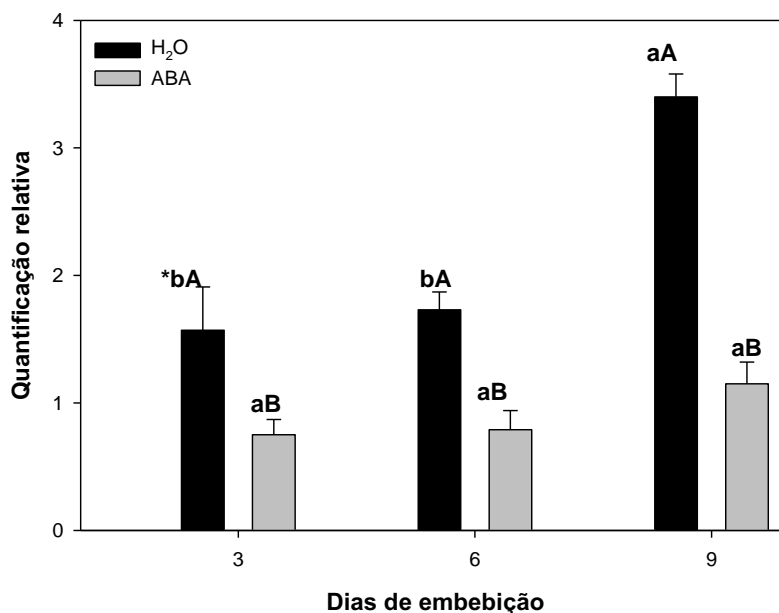


Figura 11. Expressão relativa do gene α -expansina em embriões de sementes de café embebidas em água e em ABA (1000 μ M). As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de três repetições biológicas. *Médias seguidas pela mesma letra minúscula dentro de cada tratamento e maiúscula entre os tratamentos nas barras não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

temporal e espacial (HAYAMA et al., 2006; ISHIMARU et al., 2006 e ASHA et al., 2007). Trivedi e Nath (2004) comentam que durante o desenvolvimento e amadurecimento os frutos de café passam por distintas mudanças físicas, com participação da expansina nestes processos e também, na preparação das paredes celulares para subsequente degradação por hidrólise.

Budzinski et al. (2010) observaram aumento significativo na expressão das expansinas *CaEXPA1* e *CaEXPA3* no período de rápida expansão do fruto e no desenvolvimento do perisperma do café. Em sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) foram notadas expressões das expansinas *LeEXP4*, *LeEXP8* e *LeEXP10* na região micropilar endospermática, na ponta da radícula e em ambos os tecidos, durante 40 horas de embebição antes da protrusão da radícula (CHEN e BRADFORD, 2000). Lizana et al. (2010) verificaram alta expressão da expansina *TaExpA6* em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) aos 12 dias seguido de um declínio aos 20 dias após a antese.

Após a expansão rápida das sementes embebidas em água durante nove dias, a expressão da α -expansina aumentou coincidentemente com o alongamento da região micropilar das sementes de café. A expressão significativa deste gene deve-se a interação do crescimento do embrião e do afrouxamento da parede celular durante a germinação antes da emissão da radícula, conforme a Figura 6. Chen e Bradford (2000) expõem que a α -expansina pode atuar também em diferentes componentes da parede celular. O aumento da expressão da α -expansina pode refletir em interações específicas entre a proteína e a composição da parede celular ao longo do desenvolvimento da maior parte dos tecidos (LIZANA et al., 2010).

Com relação aos embriões das sementes de café embebidas em solução de ABA, a baixa expressão da α -expansina deveu-se à inibição da germinação e impedimento do afrouxamento da região micropilar endospermática. Chen e Bradford (2000) propõem que em sementes de tomate a expressão foi afetada quando submetidas a tratamentos com 100 μ M de ABA, impedindo a emergência da radícula. No entanto, Chen et al. (2001) demonstraram que o ABA não bloqueia a expressão das expansinas *LeEXP8* ou *LeEXP10* até 24 horas de embebição.

Toorop et al. (2000) sugeriram que há uma segunda fase da germinação necessária para o enfraquecimento das paredes celulares e emissão da radícula, mas que o ABA atuaria na inibição desta segunda fase. Alternativa sugerida por Schopfer e Plach (1985) e Ni e Bradford (1992) é que o ABA pode agir no potencial de crescimento do embrião, abaixo do nível requerido, resultando na inibição do enfraquecimento das paredes celulares endospermáticas.

As análises de PCR em tempo real da enzima α -galactosidase revelaram uma quantificação relativamente alta no endosperma micropilar das sementes de café aos nove dias embebidos em água, não diferindo significativamente dos embriões das sementes embebidas por seis dias. Em solução de ABA não foram observadas diferenças significativas entre os períodos de avaliação, conforme a Figura 12. Foram observadas apenas interações significativas aos seis e nove dias de embebição em água e em ABA (Figura 12.).

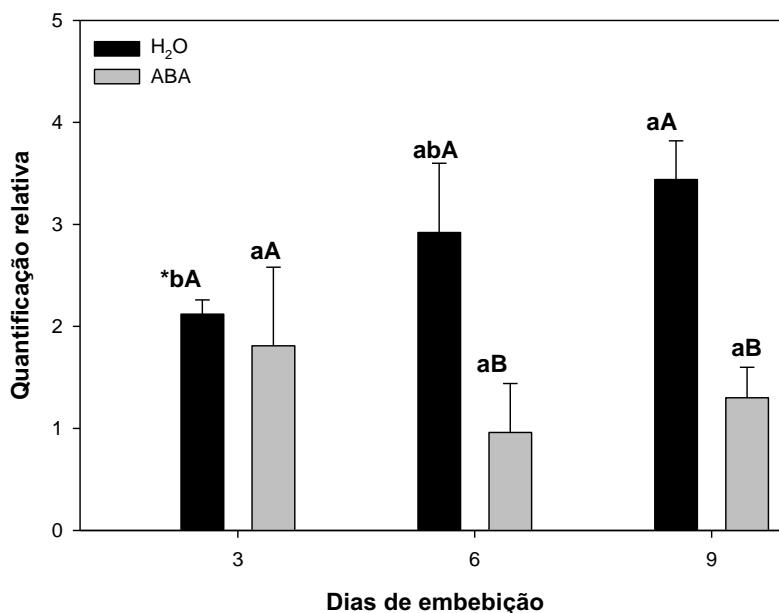


Figura 12. Expressão relativa do gene α -galactosidase da região micropilar do endosperma de sementes de café embebidas em água e em ABA (1000 μ M). As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de três repetições biológicas. *Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro de cada tratamento e maiúsculas entre os tratamentos nas barras não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

A baixa expressão da α -galactosidase quando as sementes foram embebidas em ABA pode ser atribuída a inibição do afrouxamento da região micropilar endospermática, seguido da ausência de germinação. O aumento nos valores expressos da α -galactosidase era esperado devido ao pequeno tamanho da região micropilar submetida a uma rápida expansão do embrião e do afrouxamento da parede celular, durante a germinação, quando embebidas em água ao longo dos períodos avaliados. No entanto, Feurtado et al. (2001) comentam que a α -galactosidase parece ser uma enzima constitutiva, cuja ação não é específica para a mobilização das reservas de galactomanano do endosperma durante a germinação.

Contraposto, em feno-grego (*Trigonella foenum-graecum* L.) a α -galactosidase é elevada na camada de aleurona durante a germinação (REID e MEIER, 1973). Blochl et al. (2008), ao estudar a degradação de sementes de ervilha, observaram a expressão da α -galactosidase durante a maturação. Zha et al. (2012) observaram a expressão do gene em estudo do néctar de 10 espécies de tabaco. Em sementes de

Platymiscium pubescens foi verificado um nítido aumento na expressão da α -galactosidase no eixo embrionário a partir de 48 horas de embebição em água (LIMA et al., 2004).

Burns (1990), De Veau et al. (1993) e Lazan et al. (2004) sugeriram que a enzima α -galactosidase pode hidrolisar paredes celulares de frutos em maturação. De acordo com Borges et al. (2001) esta enzima esta aparentemente ligada ao nível de embebição, uma vez que nas sementes de *P. pubescens*, quando submetidas a estresse hídrico, foi expressada mais tardiamente. Assim, as características principais da α -galactosidase ainda são pouco exploradas em plantas. Alguns trabalhos referidos a enzima durante e após a germinação (BEWLEY, 1997; FEURTADO et al., 2001; LIMA et al., 2004; LIMA et al., 2005 e MINIC, 2008) estão envolvidos na hidrolise da parede celular do endosperma associado com o galactomanano.

Com relação aos genes β -manosidase e endo- β -mananase, a expressão de ambos aumentam de forma temporal e semelhante na região micropilar endospermática das sementes de café durante a germinação. A expressão relativa do gene β -manosidase foi baixa no terceiro dia quando comparada a um aumento significativo com nove dias de embebição em água da região micropilar endospermática das sementes de café (Figura 13.). Considerando o gene endo- β -mananase, foi observada uma baixa quantificação relativa no terceiro dia, seguido de um aumento significativo aos nove dias quando embebidas em água (Figura 14.).

Quando as sementes foram embebidas em ABA foram observados efeitos parciais de inibição na expressão de ambos os genes estudados, em todos os períodos de avaliação (Figuras 13 e 14.). O efeito do ABA sobre a quantificação relativa da β -manosidase no endosperma micropilar foi muito pequena, mesmo após nove dias de embebição, não diferindo estatisticamente durante os três e seis dias de embebição (Figura 13.). A expressão relativa do gene endo- β -mananase no endosperma micropilar foi inibida parcialmente quando as sementes foram embebidas em ABA, não apresentando diferenças significativas entre os períodos de avaliação (Figura 14.).

Para ambos os genes em estudo foram observadas interações significativas entre os tratamentos durante os períodos de avaliação (Figuras 13 e 14.). Entretanto, quando avaliado o gene β -manosidase, no terceiro dia que as sementes foram

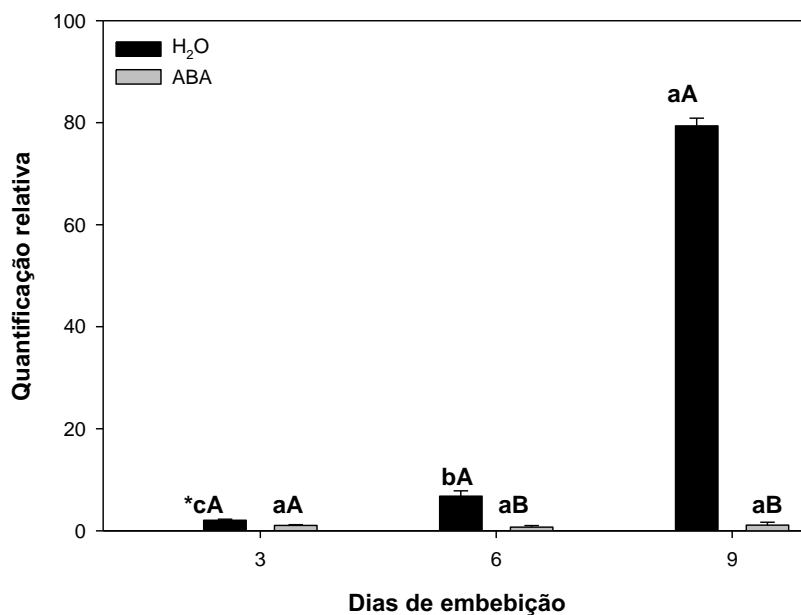


Figura 13. Expressão relativa do gene β -manosidase da região micropilar do endosperma de sementes de café embebidas em água e em ABA (1000 μ M). As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de três repetições biológicas. *Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro de cada tratamento e maiúsculas entre os tratamentos nas barras não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

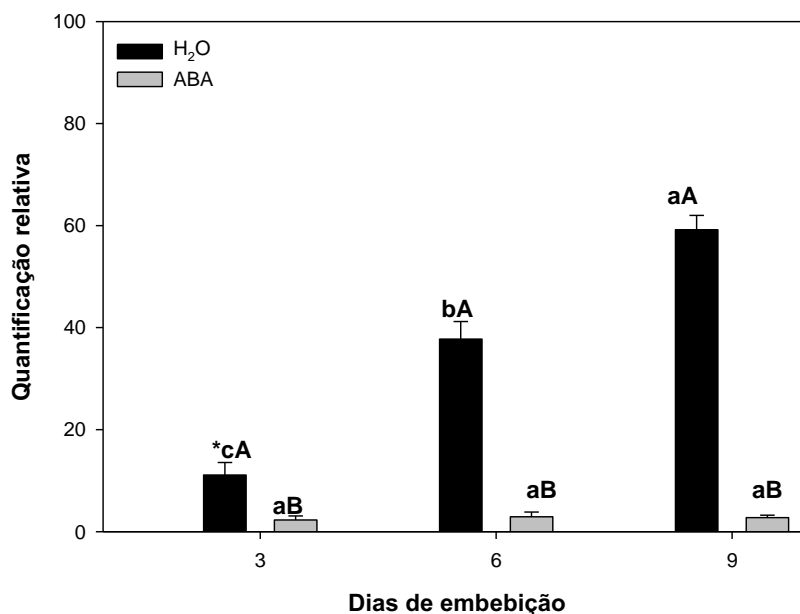


Figura 14. Expressão relativa do gene Endo- β -mananase da região micropilar do endosperma de sementes de café embebidas em água e em ABA (1000 μ M). As barras representam as médias e o erro indica o desvio padrão de três repetições biológicas. *Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro de cada tratamento e maiúsculas entre os tratamentos nas barras não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

submetidas à embebição em água e em ABA, não se verificou uma interação significativa entre os tratamentos.

Mo e Bewley (2002), em estudos com sementes de tomate, observaram expressões baixas da β -manosidase durante as primeiras 24 horas, seguido de um aumento significativo até às 60 horas de observação. Em trabalhos semelhantes, foi observado, durante 24 horas, que as sementes de tomates foram submetidas à embebição, a região lateral endospermática das sementes apresentava baixa quantificação relativa do gene endo- β -mananase e alta na região do endosperma micropilar (NONOGAKI et al., 2000).

Marraccini et al. (2001), ao avaliarem a expressão do gene endo- β -mananase durante a germinação de sementes de café, observou-se alta quantificação relativa aos 28 dias de embebição. De acordo com Mo e Bewley (2002) explanam que este aumento ocorre seguido de mudanças no embrião. Nonogaki et al., (2000); Ishimizu et al., (2004) e Tonini et al., (2006) comentam que as enzimas β -manosidase e endo- β -mananase estão envolvidas na degradação das paredes celulares por hidrólises durante a germinação.

Mo e Bewley (2002) referem o perfil do gene β -manosidase semelhante ao da endo- β -mananase. Em sementes de tomate (MO e BEWLEY 2003) e em sementes de café (MARRACCINI et al., 2001) a β -manosidase e a endo- β -mananase estão envolvidas na mobilização de manana das células das paredes celulares do endosperma durante a germinação.

Recentemente tem sido demonstrado que o alongamento das células embrionárias que propiciam uma força de expansão para complementar a germinação em sementes de *Arabidopsis thaliana*, ocorrendo em uma região proximal à radícula, abrangendo uma menor zona de transição entre hipocótilo-radícula (SLIWINSKA et al., 2009). Assim, têm sido sugeridos que o enfraquecimento da parede celular do endosperma envolve, provavelmente, vários tipos de enzimas hidrolíticas, necessárias para emergência da radícula (SÁNCHEZ e MIGUEL 1997; BEWLEY 1997; KUCERA et al., 2005; FINCH-SAVAGE e LEUBNER-METZGER, 2006; NONOGAKI et al., 2007 e HOLDSWORTH et al., 2008).

Em estudos com sementes de tomate 50 μM de ABA inibe parcialmente a expressão relativa da β -manosidase no endosperma micropilar, mesmo após 72 horas de embebição (MO e BEWLEY 2003). Também foi observado neste mesmo estudo que até 48 horas de embebição em 50 μM de ABA, não houve inibição da enzima endo- β -mananase no endosperma micropilar. No entanto, esta expressão relativa declinou cerca de 75% até as 72 horas de embebição.

Tonini et al. (2006) contam que a influência do ABA durante a embebição de sementes de *Sesbania virgata* ocorre pelo atraso na mobilização de reservas, assim como, uma inibição parcial da enzima endo- β -mananase durante a germinação. Conforme Toorop et al. (2000); Koornneef et al. (2002); Kucera et al. (2005) e Matilla e Matilla-Vázquez (2008), o ABA não afeta a ruptura da testa, pois inibe especificamente o enfraquecimento do endosperma e da ação antagonista das giberelinas em uma complexa rede integrando sinais ambientais.

7. CONCLUSÕES

A expressão dos genes associados com o crescimento do embrião, tais como ciclin, α -expansina e ciclina dependente de quinase, aumentou durante a germinação e ABA inibiu parcialmente a expressão destes genes. A expressão de β -manosidase e endo- β -mananase aumentou durante a embebição em água e ABA inibiu completamente a expressão. No entanto, α -galactosidase parece ter expressão mais constitutiva durante a germinação em água e é menos influenciada por ABA, em comparação com outras enzimas estudadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC: consumidor. Rio de Janeiro: Associação Brasileira da Indústria de Café. Disponível em: < <http://www.abic.com.br>>. Acesso em 28 set 2012.

ARGYROPOULOS, D.; PSALLIDA, C.; SPYROPOULOS, C.G. Generic normalization method for real-time PCR application for the analysis of the mannanase gene expressed in germinating tomato seed. **FEBS Journal**, Athens, Greece, v.273, p. 770-777, dec. 2006.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular**. 2º. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2006. 866p.

AN, Y.; HUANG, S.; MCDOWELL, J.M.; MCKINNEY, E.C.; MEAGHER, R.B. Conserved expression of the Arabidopsis ACT1 and ACT3 actin subclass in organ primordial and mature pollen. **The Plant Cell**, Athens, Georgia, v.8, p. 15-30, jan. 1996.

ASHA, V.A.S.; ANIRUDDHA, P.S.; PRAVENDRA, N. Multiple forms of α -expansin genes are expressed during banana fruit ripening and development. **Postharvest Biology and Technology**, v.45, p. 184-192, 2007.

BARRÔCO, R.M.; PERES, A.; DROUAL, A.; VEYLDER, L.; NGUYEN, L.S.L.; WOLF, J.; MIRONOV, V.; PEERBOLTE, R.; BEEMSTER, G.T.S.; INZÉ, D.; BROEKAERT, W.F.; FRANKARD, V. The cyclin-dependent kinase inhibitor Orysa; KRP1 plays an important role in seed development of rice. **Plant Physiology**, Ghent, Belgium, v.142, p. 1053-1064, nov. 2006.

BEWLEY, J.D. Breaking down the walls: a role for endo- β -mannanase in release from seed dormancy?. **Trends Plant Science**, v. 2, p. 464-469, 1997.

- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Development, germination and growth.** v.1, Berlim: Springer Verlag, 1978, 306p.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** 2º. ed. New York: PLENUM, 1994. 445p.
- BLOCHL, A.; PETERBAUER, T.; HOFMANN J.; RICHTER, A. Enzymatic breakdown of raffinose oligosaccharides in pea seeds. **Planta**, Vienna, Austria, v.228, p. 99-110, mar. 2008.
- BORÉM, F.M.; SALVA, T.J.G.; DA SILVA, E.A.A. In: BOREM, F.M. (Org.). **Anatomia e composição química do fruto e da semente do cafeeiro.** Pós-colheita do café, Lavras, 2008. p. 21-40.
- BORGES, E.E.L.; BORGES, R.C.G.; SOARES, C.P.B.; PERES, S.C.J.G.A. Crescimento e mobilização de carboidrato em embrião de sementes de fedegoso (*Senna macranthera* Irwin et Barnaby) durante a germinação. **Revista Cerne**, Lavras, v.7, n.1, 2001.
- BRAGHINI, M.T.; FAZUOLI, L.C. Armazenamento de sementes de café. **O Agrônomo**, Campinas, v.59, n.1, p.44-45, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília:MAPA/ACS, 2009. 395p.
- BRAZ, M.R.S.; ROSSETTO, C.A.V. Condicionamento fisiológico na germinação e no vigor de sementes armazenadas de café. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n.7, p. 1849-1856, out. 2008.
- BRIDSON, D.M.; VERDCOURT, B. **Flora of tropical east Africa: Rubiaceae. (Part2).** Cape Town: IZIKO MUSEUMS OF CAPE TOWN, 1988. p. 415-747.
- BRUMMELL, D.A.; HARPSTER, P.M.; CIVELLO, J.M.; PALYS, A.B.; BENNETT, P. Dunsuir, modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. **Plant Cell**, v.11, p.2203-2216, 1999.
- BUCKERIDGE, M.S.; REID, J.S.G. Purification and properties of a novel β -galactosidase or exo-(1,4)- β -D-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. **Planta**, v.192, p.502-511, 1994.
- BUDZINSKI, I.G.F.; SANTOS, T.B.; SERA, T.; POT, D.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, L.F.P. Expression patterns of three α -expansin isoforms in *Coffea arabica* during fruit development. **Plant Biology**, Londrina, PR, v.13, p. 462-471, feb./jul. 2010.
- BURNS, J.K. α and β -galactosidase activities in juice vesicles of stored Valencia oranges. **Phytochemistry**, v.29, p. 2425-2429, 1990.

BYTOF, G.; KNOPP, S.; KRAMER, D.; BREITENSTEIN, B.; BERGERVOET, J.H.W.; GROOT, S.P.C.; SELMAR, D. Transient occurrence of seed germination processes during coffee post-harvest treatment. **Annals of Botany**, Braunschweig, Germany, v.100, p. 61-66, may. 2007.

CAMARGO, R. **Condicionamento fisiológico de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1998. 118f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 1998.

CARVALHO, C.A.M.; GUIMARÃES, R.M. SILVA, T.T.A. Condicionamento fisiológico em matriz sólida de sementes de café (*Coffea arabica* L.) com e sem pergaminho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.34, n.1, p. 94-98, 2012.

CARVALHO, C.H.S. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília:EMBRAPA CAFÉ, 2008. 334p.

CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. **A célula**. 2º. ed. São Paulo: MANOLE, 2007. 380p.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4º. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5º. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590p.

CARVALHO, P.G.B.; BORGHETTI, F.; BUCKERIDGE, M.S.; MORHY, L.; FILHO, E.X.F. Temperature-dependent germination and endo- β -mannanase activity in sesame seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p. 139-148, 2001.

CHEN, F.; BRADFORD, K.J. Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. **Plant Physiology**, California, v.124, p. 1265-1274, nov. 2000.

CHEN, F.; DAHAL, P.; BRADFORD, K.J. Two tomato expansin genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination. **Plant Physiology**, California, v.127, p. 928-936, nov. 2001.

CHOI, D.; LEE, Y.; CHO, H.; LEE, Y. Expansins: expanding importance in plant growth and development. **Physiology Plant**, v.126, p.511-518, 2006.

CNCAFE: cafés do Brasil. São Paulo: Conselho Nacional do Café. Disponível em: <<http://www.cncafe.com.br>>. Acesso em 27 set 2012.

CONAB: levantamento de estoques privados de café do Brasil. Brasília. Companhia Nacional do Abastecimento. Disponível em:<<http://www.conab.gov.br>>. Acesso 28 out 2012.

COSGROVE, D.J. Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. **Plant Cell**, v.9, p. 1031-1041, 1997.

COSGROVE, D.J.; Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.6, p. 850-861, 2005.

DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Impact of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.55-81, 2006.

DE VEAU, E.J.I.; GROSS, K.C.; HUBER, D.J.; WATADA, A.E. Degradation and solubilisation of pectin by β -galactosidases purified from avocado mesocarp. **Physiology Plantarum**, v.87, p. 279-285, 1993.

EIRA, M.T.S.; SILVA, E.A.A; CASTRO, R.D.; DUSSERT, S.; WALTERS, C.; BEWLEY, J.D.; HILHORST, H.W.M. Coffe seed physiology. **Journal Plant Physiology**, Lavras, MG, v.18, n.1, p. 149-163, 2006.

EMBRAPA: publicações. São Paulo: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropécuaria. Disponível em: <[http:// www.sapc.embrapa.br/index.php/publicacoes/](http://www.sapc.embrapa.br/index.php/publicacoes/)>. Acesso em: 24 set. 2012.

FARIA, J.M.R. **Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds**. 2006. 136f. Thesis (Ph.D.)-Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2006.

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

FEURTADO. J.A.; BANIK, M.; BEWLEY, J.D. The cloning and characterization of α -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. **Journal of Experimental Botany**, Canada, v.52, n.359, p. 1239-1249, jun. 2001.

FIELD, K.G.; OLSEN, G.J.; LANE, D.J.; GIOVANNONI, S.J.; GHISELIN, M. T.; RAFF, E.C.; PACE, N.R.; RAFF, R.A. Molecular phylogeny of the animal kingdom. **Science**, v.239, p. 748-753, 1988.

FINCH-SAVAGE, W.E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and control of germination. **New Phytologist**, v.171, n.3, p.501-523, 2006.

FISICANET. Disponível em: <http://www.fisicanet.com.ar/biologia/informacion_genetica/ap02_ciclo_celular.php#.UP7gPh2_L9h>. Acesso em 28 dez 2012.

FLEMING, J.E.; ELLIS, R.H.; JOHN, P.; SUMMERFIELD, R.J.; ROBERTS, H. Developmental implications of photoperiod sensitivity in soybean (*Glycine max* [L] merr.). **International Journal of Plant Science**, v.158, p. 142-151, 1997.

- GILLILAND, L.U.; PAWLOSKI, L.C.; KANDASAMY, M.K.; MEAGHER, R.B. *Arabidopsis* actin gene ACT7 plays an essential role in germination and root growth. **The Plant Journal**, Georgia, Athens, v. 33, p.319-328, oct. 2003.
- GONG, X. BASSEL, G.W., WANG, A.; GREENWOOD, J.S.; BEWLEY, J.D. The emergence of embryos from hard seeds is related to the structure of the cell walls of the micropilar endosperm, and not to endo- β -mannanase activity. **Annals of Botany**, Ontario, Canada, v.96, p. 1165-1173, 2005.
- GROOT, S.P.C. **Hormonal regulation of seed development and germination in tomato. Studies on acid-abscisic and gibberellins-deficient mutants.** 1987. Thesis (Ph.D.).- Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 1987.
- GROOT, S.P.C.; KARSEN, C.M. Dormancy and germination of abscisic acid-deficient tomato seeds. **Plant Physiology**, v.99, p.952-958, 1992.
- HALMER, P.; BEWLEY, J.D.; THORPE, T.A. An enzyme to break down lettuce endosperm cell walls during gibberellins-and light-induced germination. **Nature**, v.258, p.716-718, 1975.
- HAYAMA, H.; SHIMADA, T.; FUJII, H.; ITO, A.; KASHIMURA, Y.; Ethylene regulation of fruit softening and softening-related genes in peach. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p. 4071-4077, 2006.
- HEALY, J.M.S.; MENGES, M.; DOONAN, J.H.; MURRAY, A.H. The *Arabidopsis* D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact *in vivo* with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled. **The Journal of Biological Chemistry**, Cambridge, USA, v.276, n.10, p. 7041-7047, 2000.
- HILHORST, H.W.M.; GROOT, S. P. C.; BINO, R.J. The tomato seed as a model system to study seed development and germination. **Acta Botanica Neerlandica**, v.47, p.169-183, 1998.
- HOLDSWORTH, M.J.; BENTSINK, L.; SOPPE, W.J.J. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. **New Phytologist**, Holland, UK, v.179, p.33-54, 2008.
- IAC: cultivares IAC. Campinas: Instituto Agronômico de campinas. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/cafe/>>. Acesso em: 24 set. 2012.
- ISHIMARU, M.; SMITH, D.L.; GROSS, K.C.; KOBAYASHI, S. Expression of three expansin genes during development and maturation of kyoho grape berries. **Journal of Plant Physiology**, Osaka, Japan, v.164, p. 1675-1682, 2006.
- ISHIMIZU, T.; SASAKI, A.; OKUTANI, S.; MAEDA, M.; YAMAGISHI, M.; HASE, S. Endo- β -mannosidase, a plant enzyme acting on N-glycan. Purification, molecular cloning,

and characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, Tokyo, Japan, v. 270, n. 37, p. 38555-38562, june. 2004.

JOSÉ, A.C.; LIGTERINK, W.; DAVIDE, A.C.; SILVA, E.A.A.; HILHORST, H.W.M. Changes in gene expression during drying and imbibitions of desiccation sensitive *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) Spreng. seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, MG, v.31, n.1, p. 270-280, jan. 2009.

JOUBÈS, J.; PHAN, T.; JUST, D.; ROTHAN, C.; BERGOUNIOUX, C.; RAYMOND, P.; CHEVALIER, C. Molecular and biochemical characterization of the involvement of cyclin-dependent kinase a during the early development of tomato fruit. **Plant Physiology**, Paris, France, v.121, p. 857-869, nov. 1999.

KANDASAMY, M.K.; GILLILAND, L.U.; MCKINNEY, E.C.; MEAGHER, R.B. One plant actin isoform, ACT7, induced by auxin and required for normal callus formation. **The Plant Cell**, Athens, Georgia, v.13, p. 1541-1554, jul. 2001.

KIM, J.; KIM, D.; FOREST, F.; FAY, M.F.; CHASE, M.W. Molecular phylogenetics of *Ruscaceae sensu lato* and related families (Asparagales) based on plastid and nuclear DNA sequences. **Annals of Botany**, Surrey, UK, v.106, p.775-790, 2010.

KNOX, J.P. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, United Kingdom, v.11, p. 308-313, 2008.

KOORNNEEF, M.; BENTSINK, L.; HILHORST, H.W.M. Seed dormancy and germination. **Current Opinion in Plant Biology**, Wageningen, The Netherlands, v.5, p. 33-36, 2002.

KONTOS, F.; SPYROPOULOS, C.G., Production and secretion of α -galactosidase and endo- β -mannanase by carob (*Ceratonia siliqua* L.) endosperm protoplasts. **Journal Experimental Botany**, v.46, p.577-583, 1995.

KUCERA, B.; COHN, M.A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research**, Baton Rouge, Louisiana, v.15, p. 281-307, 2005.

LASHERMES, P.; ANDRADE, A.C.; ETIENNE, H. Genomics of coffee, one of the world's largest traded commodities. In: MOORE, H.; MING, R.(Orgs.). **Genomics of tropical crop plants**. Berlin: Springer, 2008, p. 203-226.

LAZAN, H.; NG, S.; GOH, L.; ALI, Z.M. Papaya β -galactosidase/galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening. **Plant Physiology Biochemical**, v.42, p.847-853, 2004.

LI, X.; FAN, X.; WANG, X.; CAI, L.; YANG, W. The cotton ACTIN1 gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation. **The Plant Cell**, Beijing, China, v.17, p. 859-875, mar. 2005.

LIMA, E.E.; REZENDE, S.T.; BORGES, R.C.G.; PEREZ, S.C.J.G.A. Caracterização de alfa-galactosidase em embrião e cotilédones de sementes de *Platymiscium pubescens* micheli, var. pubescens (tamboril-da-mata). **Revista Brasileira de Sementes**, Viçosa, MG, v.26, n.2, p. 82-90, jun. 2004.

LIMA, E.E.; REZENDE, S.T.; BORGES, R.C.G.; PEREZ, S.C.J.G.A. Caracterização de alfa galactosidase e sua relação com a germinação das sementes de *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae Caesalpioideae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v.29, n.4, p. 525-533, abril. 2005.

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

LIZANA, X.C.; RIEGEL, R.; GOMEZ, L.D.; HERRERA, J.; ISLA, A.; MCQUEEN-MASON, S.J.; CALDERINI, D.F. Expansin expression is associated with grain size dynamics in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Experimental Botany**, Chile, v.61, n.4, p. 1147-1157, jan. 2010.

LOGAN, J.; EDWARDS, K.; SAUNDERS, N. **Real-time PCR**: current technology and applications. Norfolk : Caister Academic Press, 2009. 284 p.

LOVEGROVE, I.I.; HOOLEY, I.I. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. **Trends Plant Science**, v.5, p. 102-110, 2000.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 12. v. São Paulo: Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 2005. 495p.

MARRACCINI, P.; ROGERS, W.J.; ALLARD, C.; ANDRÉ, M.; CAILLET, V.; LACOSTE, N.; LAUSANNE, F.; MICHAUX, S. Molecular and biochemical characterization of endo- β -mannanases from germination coffee (*Coffea arabica*) grains. **Planta**, Geneva, Switzerland, v.213, p. 296-308, april. 2001.

MATILLA, A.J.; MATILLA-VÁZQUEZ, M.A. Involvement of ethylene in seed physiology. **Plant Science**, v. 175, p. 87-97, 2008.

MEIRELES, R.C. **Efeito do hipoclorito de sódio e da embebição em água na germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L.)**. 2004. 67f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2004.

MEIRELES, R.C.; ARAUJO, E.F.; REIS, M.S.; SEDIYAMA, C.S.; SAKIYAMA, N.S.; REIS, L.S. Secafé: metodologia para acelerar a germinação das sementes de café. **Revista Brasileira de Sementes**, Viçosa, MG, v.29, n.3, p.90-96, jun. 2007.

MEYER, A.; TODT, C.; MIKKELSEN, N.; LIEB, B. Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights

into mollusk substitution rate heterogeneity. **BMC Evolutionary Biology**, Mainz, Germany, v.10, n.70, p. 1-12, 2010.

MINIC, Z. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. **Planta**, v.227, p. 723-740, 2008.

MIRONOV, V.; VEYLDER, L.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. Cyclin-dependent kinases and cell division in plants-the nexus. **The Plant Cell**, Zwijnaarde, Belgium, v.11, p. 509-521, april. 1999.

MO, B.; BEWLEY, J.D. β -mannosidase (EC 3.2.1.25) activity during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. Purification, cloning and characterization. **Planta**, Canada, v.215, p. 141-152, aug./feb. 2002.

MO, B.; BEWLEY, J.D. The relationship between β -mannosidase and endo- β -mannanase activities in tomato seeds during and following germination: a comparison of seed populations and individual seeds. **Journal of Experimental Botany**, Canada, v.54, n.392, p. 2503-2510, nov. 2003.

NI, B.R.; BRADFORD, K.J. Quantitative models characterizing seed germination responses to abscisic acid and osmoticum. **Plant Physiology**, v.98, p. 1057-1068, 1992.

NIK, M.M.; BABAELAN, M.; TAVASSOLL, A. Effect of seed and embryo size on early growth of wheat genotypes. **African Journal of Microbiology Research**, Zabol, Iran, v.5, n.27, p. 4859-4865, nov. 2011.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G.W.; BEWLEY, J.D. Germination-still a mystery. **Plant Science**, v. 179, p.574-581, nov./feb. 2010.

NONOGAKI, H.; GEE, O.H.; BRADFORD, K.J. A germination-specific endo- β -mannanase gene is expressed in the micropilar endosperm cap of tomato seeds. **Plant Physiology**, California, v.123, p. 1235-1245, aug. 2000.

NONOGAKI, H.; CHEN, F.; BRADFORD, K.J. Mechanisms and genes involved in germination sensu stricto. In: BRADFORD, K.J.; NONOGAKI, H.(Orgs.). **Seed development, dormancy and germination**. Blackwell Publishing, Oxford, 2007, p. 264-304.

PEREIRA, C.E.; PINHO, E.V.R.V.; OLIVEIRA, D.F.; KIKUTI, A. L. P. Determinação de inibidores da germinação no endosperma de sementes de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, MG, v.24, n.1, p. 306-311, 2002.

POTOMATI, A. **Efeito do ácido abscísico sobre a mobilização de galactomanano e o desenvolvimento do embrião em sementes de *Sesbania marginata* Benth.** 2000. 60f. Dissertação (Mestre em Biologia Celular e Estrutural/Biologia Celular)-Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

- QI, R.; JOHN, P.C.L. Expression of genomic ATCYCD2;1 in *Arabidopsis* induces cell division at smaller cell sizes: Implications for the control of plant growth. **Plant Physiology**, Canberra, Australian, v.144, p. 1587-1597, july. 2007.
- QUEIROZ, S.E.E. **Mecanismo e controle da germinação de sementes de *Genipa americana* L.** 2009. 51f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal/Ciências Florestais)-Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2009.
- QUEIROZ, S.E.E.; SILVA, E.A.A.; DAVIDE, A.C.; JOSÉ, A.C.; SILVA, A.T.; FRAIZ, A.C.R.; FARIA, J.M.R.; HILHORST, H.W.M. Mechanism and control of *Genipa americana* seed germination. **Physiologia Plantarum**, Urutaí, Goiás, v.144, n.3, p. 263-276, mar. 2012.
- RASHOTTE, A.M.; BRADY, S.R.; REED, R.C. ANTE, S.J.; MUNDAY. G.K. Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 122, p. 481-490, 2000.
- REICHHELD, J.; VERNOUX, T.; LARDON, F.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. **Plant Journal**, v.17, p. 647-656, 1999.
- REID, J.S.G.; MEIER, H. Enzymatic activities and galactomannan mobilization in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). Secretion of α -galactosidase and β -mannosidase by the aleurone layer. **Planta**, v.112, p. 301-308, 1973.
- REIS, L.S.; ARAÚJO, E.F.; DIAS, D.F.S.; SEDIYAMA, C.S.; MEIRELES, R.C. Lercafê: Novo teste para estimar o potencial germinativo de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.1, p.9-16, 2010.
- RENA, A.B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: RENA, A.B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (Orgs.). **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1986. p. 13-85.
- REVISTACAFEICULTURA: história do café. São Paulo: Agência Impacto Patrocínio, LTDA. Disponível em: <<http://www.revistacafeicultura.com.br>>. Acesso em 25 set. 2012.
- RIESEBERG, L.H.; BAIRD, S.J.E.; GARDNER, K.A. Hybridization, introgression, and linkage evolution. **Plant Molecular Biology**, v.42, p.205-224, 2000.
- RUBIM, R.F.; VIEIRA, H.D.; ARAÚJO, E.F.; VIANA, A.P.; COELHO, F.C. Tratamento com hipoclorito de sódio para remoção do pergaminho e aceleração da germinação de sementes de café conilon. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32. n.4, p. 088-098, 2010.
- SANCHEZ, R.A.; DE MIGUEL, L. Phytochrome promotion of mannan-degrading enzyme activities in the micropylar endosperm of *Datura ferox* seeds requires the presence of the embryo and gibberellins synthesis. **Seed Science Research**, v.7, p.27-33, 1997.

SCHOPFER, P.; PLACHY, C. Control of seed germination by abscisic acid. III Effect on embryo growth potential (minimum turgor pressure) and growth coefficient (cell wall extensibility) in *Brassica napus* L. **Plant Physiology**, v.77, p. 676-686, 1985.

SELMAR, D.; BYTOF, G.; KNOPP, S. New aspects of coffee processing: the relation between seed germination and coffee quality. In: **Dix-neuvième Colloque Scientifique International sur le Café**. ASIC, Trieste, Paris, 2002. p. 14-18.

SGUAREZI, C.N.; BRACCINI, A.L.; SCAPIM, C.A.; BRACCINI, M.C.L.; DALPASQUALE, V.A. Avaliação de tratamentos pré-germinativos para melhorar o desempenho de sementes de café (*Coffea arabica* L.). II processo de umidificação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p. 162-170, 2001.

SILVA, E.A.A. **Coffee (*Coffea arabica* cv. *Rubi*) seed germination: mechanism and regulation**. 2002. 105f. Thesis (Ph.D.)-Wageningen Universiteit, 2002.

SILVA, E.A.A.; TOOROP, P.E.; AELST, A.C.V.; HILHORST, H.W.M. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. *Rubi*) seed germination. **Planta**, Wageningen, The Netherlands, v.220, p.251-261, mar./june. 2004.

SILVA, E.A.A.; TOOROP, P.E.; LAMMEREN, A.A.M.V.; HILHORST, H.W.M. ABA Inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* 'Rubi') seed germination. **Annals of Botany**, Wageningen, The Netherlands, v.102, p.425-433, april/may. 2008.

SLIWINSKA, E.; BASSEL, G.W.; BEWLEY, J.D. Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radical but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. **Journal of Experimental Botany**, Bydgoszcz, Poland, v.60, n.12, p. 3587-3594, jul. 2009.

SMITH, R.F.; WIESE, B.A.; WOJZYNSKI, M.K.; DAVISON, D.B.; WORLEY, K.C. BCM search launcher-an integrated interface to molecular biology database search and analysis services available on the world wide web. **Genome Research**, v.6, p. 454-462, 1996.

SOBESA: a história do café. Bahia: Copyright Sobésa. Disponível em: <<http://www.sobesa.com.br>>. Acesso em 26 set. 2012.

SORRELL, D.A.; MENGES, M.; HEALY, J.M.S.; DEVEAUX, Y.; AMANO, C.; SU, Y.; NAKAGAMI, H.; SHINMYO, A.; DOONAN, J.H.; SEKINE, M.; MURRAY, J.A.H. Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar bright yellow-2 cells. **Plant Physiology**, Cambridge, UK, v.126, p. 1214-1223, jul. 2001.

STARBUCKS: grãos blends preparo. São Paulo: Starbucks Corporation. Disponível em: <<http://www.starbucks.com.br>>. Acesso em: 24 set. 2012.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3º. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 722p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4º. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2009. 819p.
- TONINI, P.P.; LISBOA, C.G.S.; FRESCHI, L.; MERCIER, H.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C.; BUCKERIDGE, M.S. Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and endo- β -mannanase activity in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). **Trees**, São Paulo, SP, v.20, p. 669-678, sept. 2006.
- TOOROP, P.E.; VAN AELST, A.C.; HILHORST, H.W.M. The second step of the biphasic endosperm weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germination is under control of ABA. **Journal of Experimental Botany**, Wageningen, The Netherlands, v.51, n.349, p. 1371-1379. aug. 2000.
- TRIVEDI, K.P.; NATH, P. MaExp1, an ethylene-induced expansin from ripening banana fruit. **Plant Science**, v.167, p. 1351-1358, 2004.
- WATKINS, J.T.; CANTLIFFE, D.J.; HUBER, D.J.; NELL, T.A. Gibberellic acid stimulated degradation of endosperm in pepper. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.110, p. 61-65, 1985.
- WEINL, C.; MARQUARDT, S.; KUIJT, S.J.H.; NOWACK, M.K.; JAKOBY, M.J. HULSKAMP, M.; SCHNITTGER, A. Novel functions of plant cyclin-dependent kinase inhibitors, ICK1/KRP1, can act non-cell-autonomously and inhibit entry into mitosis. **Plant Cell**, v.17, p.1704-1722, 2005.
- WELBAUM, G.E.; MUTHUI, W.J.; WILSON, J.H.; GRAYSON, R.L.; FELL, R.D. Weakening of muskmelon perisperm envelope tissue during germination. **Journal Experimental Botany**, v.285, p. 391-400, 1995.
- WILLIAMS, H.A.; BEWLEY, J.D.; GREENWOOD, J.S.; BOURGAULT, R.; MO, B. The cell walls of the endosperm of *Asparagus officinalis* seeds during development and following germination. **Seed Science Research**, v.11, p.305-315, 2001.
- VALADEZ-GONZÁLEZ, N.; COLLI-MULL, J.G.; BRITO-ARGÁEZ, L.; MUÑOZ-SÁNCHEZ, J.A.; AGUILAR, J.Z.; CASTAÑO, E.; HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR, S.M. Differential effect of aluminum on DNA synthesis and CDKA activity in two *Coffea arabica* cell lines. **Journal of Plant Growth Regulation**, Yucatán, México, v.26, p. 69-77, feb. 2007.
- VASCONCELOS, M.; GONDIM, D.C.; GOMES, L.J.; SILVA-MANN, R. Expressão gênica diferencial de sementes de *Schinus terebinthifolius* Raddi. submetidas ao estresse combinado de temperatura e restrição hídrica. **Scientia Plena**, São Cristóvão, SE, v.6, n.12, dez. 2010.
- VENGLAT, P.; XIANG, D.; QIU, S.; STONE, S.L.; TIBICHE, C.; CRAM, D.; ALTING-MEES, M.; NOWAK, J.; CLOUTIER, S.; DEYHOLOS, M.; BEKKAOUI, F.; SHARPE,

A.; WANG, E.; ROWLAND, G.; SELVARAJ, G.; DATLA, R. Gene expression analysis of flax seed development. **BMC Plant Biology**, Canada, v.11, n.74, p. 1-14, 2011.

VOEGELE, A.; LINKIES, A.; MULLER, K.; LEUBNER-METZGER, G. Members of the gibberellins receptor gene family *GID1* (Gibberellin insensitive *DWARF1*) play distinct roles during *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana* seed germination. **Journal of Experimental Botany**, Freiburg, Germany, v.62, p. 189-196, 2005.

YANG, R.; TANG, Q.; WANG, H.; ZHANG, X.; PAN, G.; WANG, H.; TU, J. Analyses of two rice (*Oryza sativa*) cyclin-dependent kinase inhibitors and effects of transgenic expression of *OsilCK6* on plant growth and development. **Annal of Botany**, Saskatoon, Canada, v.107, p. 1087-1101, feb. 2011.

ZHA, H.; FLOWERS, V.L.; YANG, M.; CHEN, L.; SUN, H. Acidic α -galactosidase is the most abundant nectarin in floral nectar of common tobacco (*Nicotiana tabacum*). **Annals of Botany**, Shanghai, China, v.109, p. 735-745, jan. 2012.

ZHANG, N.; HASENSTEIN, K.H. Distribution of expansins in graviresponding maize roots. **Plant and Cell Physiology**, v.41, p.1305-1312, 2000.

ZHU, A.; GOLDSTEIN, J. Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffee bean α -galactosidase. **Gene**, New York, USA, v.140, p. 227-231, dec. 1994.

ZONTA, J.B.; ARAÚJO, E.F.; ARAÚJO, R.F.; REIS, M.S.; ZONTA, F.M.G. Teste lercafé para sementes de cafeeiro com diferentes teores de água. **Revista Brasileira de Sementes**, Viçosa, MG, v.32, n.1, p. 17-23, ago. 2010.