



**CRISTIANE CARVALHO PEREIRA**

**CULTURA DE EMBRIÕES E GERMINAÇÃO DE SEMENTES  
DE DIFERENTES NÍVEIS DE QUALIDADE PARA A  
PRODUÇÃO DE MUDAS DE CAFÉ**

**LAVRAS - MG  
2017**

**CRISTIANE CARVALHO PEREIRA**

**CULTURA DE EMBRIÕES E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE DIFERENTES  
NÍVEIS DE QUALIDADE PARA A PRODUÇÃO DE MUDAS DE CAFÉ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Pesq. Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa  
Orientadora

**LAVRAS-MG  
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Pereira, Cristiane Carvalho.

Cultura de embriões e germinação de sementes de diferentes níveis de qualidade para a produção de mudas de café / Cristiane Carvalho Pereira. - 2017.

44 p.

Orientador(a): Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa.

.  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Produção de mudas. 2. Qualidade de sementes. 3. Cultura de embriões. I. Rosa, Sttela Dellyzete Veiga Franco da. . II. Título.

**CRISTIANE CARVALHO PEREIRA**

**CULTURA DE EMBRIÕES E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE DIFERENTES  
NÍVEIS DE QUALIDADE PARA A PRODUÇÃO DE MUDAS DE CAFÉ**

**EMBRYO CULTURE AND GERMINATION OF SEEDS OF DIFFERENT LEVELS  
OF QUALITY FOR COFFEE SEEDLINGS PRODUCTION**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de abril de 2017.

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa  
Dr. Renato Mendes Guimarães  
Dr. Carlos Henrique Siqueira de Carvalho

EMBRAPA  
UFLA  
EMBRAPA

Pesq. Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa  
Orientadora

**LAVRAS-MG  
2017**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG), em especial ao Setor de Sementes pela oportunidade concedida para realização desse trabalho.

Agradeço a pesquisadora da Embrapa Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, pela melhor orientação que eu poderia ter tido, pela paciência, amizade, dedicação e por todos os ensinamentos e conselhos durante todos esses anos.

Aos professores e pesquisadores do Setor de Sementes, pelos conhecimentos transmitidos e disposição em colaborar sempre.

Ao amigo e companheiro de pesquisa Luís Felipe pela amizade, companheirismo, convivência e, principalmente por possibilitar a realização deste trabalho.

Ao grupo de orientados da pesquisadora Sttela, que além de fundamental ajuda na execução dos experimentos, me trouxe amizades que nunca vou esquecer. Em especial à Ana Cristina, Lucas e Ricardo, que tornaram possível a realização deste trabalho, através de muita ajuda e dedicação.

À Marcella Nunes e Aline pela orientação desde o princípio, paciência, ensinamentos dedicados, incentivos e amizade.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Ufla, pelo auxílio com o desenvolvimento do experimento de cultura de embriões.

À banca examinadora, pela avaliação deste trabalho.

Ao apoio financeiro da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À Fundação Procafé (Programa Integrado de Apoio à Tecnologia Cafeeira) pelo fornecimento das sementes.

Aos funcionários do Departamento de Agricultura e do Setor de sementes, pela ajuda na execução das atividades.

À Marli, secretária da pós-graduação do Departamento de Agricultura, pela atenção e colaboração de sempre.

À minha família, em especial os meus pais Eunice e Dehon, minha irmã Gabrielle e meus avós, meu infinito agradecimento, por ter investido e acreditado sempre na educação e me incentivado a seguir os caminhos do conhecimento, capaz de transformar as pessoas

sempre para melhor, por acreditarem sempre em mim, pelas orações, ensinamentos e conselhos, pelo amor e atenção dedicados em todos os momentos.

Às amigas Marcela e Madeleine por acrescentarem tanta alegria aos meus dias. Saber que vocês estavam sempre ao meu lado me deu forças para continuar em qualquer situação. Agradeço do fundo do meu coração.

Às amigas Tatiana, Stefania e Ana Cristina, que entraram em minha vida durante esse percurso, e cada uma com seu jeitinho especial proporcionaram inúmeros momentos de alegria.

Aos meus amigos Leandro, Andreísa Flores, Andreísa Fabri, Ana, Talieisse, Thaís, Maria Alice e Dennis pela presença em todos os momentos de dificuldade, descontração, diversão e estudos.

Às minhas queridas amigas que fiz no programa ciência sem fronteiras, Michele, Natália, Yumi e Ju, que mesmo longe fazem parte dos meus dias, sempre com palavras de conforto e estímulo.

Aos amigos do setor de sementes, companheiros de estudos, pesquisa e de muitos momentos de alegria.

A todos os meus amigos, pelos momentos e pelo apoio.

A todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

Mas, principalmente à Deus, pela presença constante em minha vida, por proporcionar tantas oportunidades maravilhosas e por colocar em meu caminho pessoas incríveis.

## RESUMO

A qualidade de sementes de café é influenciada por vários fatores, tais como as operações pós-colheita de secagem, beneficiamento e armazenamento que podem ocasionar danos ao tecido vegetal. Em pesquisas recentes, tem sido confirmado que o endosperma é mais sensível ao processo de deterioração do que o embrião, sendo que este pode germinar e formar uma plântula normal quando isolado da semente. O uso de antioxidantes pode melhorar o desempenho de sementes submetidas a estresses pela remoção de radicais livres presentes nas células do tecido vegetal de sementes deterioradas. Neste contexto, dois estudos foram realizados objetivando-se investigar a formação de mudas de café a partir de sementes com baixos níveis de qualidade. Foram utilizados lotes de diferentes níveis de qualidade de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí amarelo IAC 62 obtidos de sementes recém colhidas e de sementes submetidas ao envelhecimento acelerado por quatro dias. No primeiro estudo, sementes inteiras e fracionadas foram imersas em água catódica, ácido ascórbico, água destilada e uma parte foi avaliada sem embebição. Foi realizado o teste de germinação, onde foram avaliadas a porcentagem de protrusão radicular, de plântulas normais e folhas cotiledonares expandidas, o teste de emergência e avaliações de crescimento das mudas, por meio do diâmetro médio do caule, comprimento do hipocótilo e massa seca das plântulas. Sementes de café fracionadas tem pior desempenho fisiológico do que sementes inteiras, principalmente as de qualidade mais baixa. O efeito do tratamento antioxidante no desempenho fisiológico das sementes foi variável com o fracionamento e o nível de qualidade. No segundo estudo, foi realizado o cultivo *in vitro* de embriões de café a partir de sementes com diferentes níveis de qualidade. Para embebição das sementes foram utilizados o ácido bórico e os embriões extraídos foram tratados com água catódica, ácido ascórbico e água destilada. Foi realizada a contagem de presença de folha e de raiz aos 15 dias, de germinação aos 30 dias e a medição do tamanho do hipocótilo e da raiz aos 120 dias. A adição de ácido bórico na água de embebição de sementes proporciona plântulas mais vigorosas após a cultura dos embriões e dispensa o uso de tratamento antioxidante. Na ausência de ácido bórico na água de embebição de sementes, o uso de água catódica melhora o desempenho fisiológico dos embriões. O uso do ácido ascórbico pode beneficiar o desempenho fisiológico de sementes, mas é prejudicial à cultura dos embriões. É possível formar plântulas de café a partir do cultivo de embriões extraídos de sementes de baixa qualidade.

**Palavras-chave:** Deterioração; *Coffea arabica*; Água catódica, Ácido Bórico

## ABSTRACT

The quality of coffee seeds is influenced by several factors, such as post-harvesting operations of drying, processing and storage that can cause damages to the plant tissue. In recent research, it has been confirmed that the endosperm is more sensitive to the deterioration process than the embryo, which can germinate and produce a normal seedling, when isolated from the seed. The use of antioxidants can improve the performance of seeds subjected to stresses by removing free radicals present in the damaged seeds. In this context, the studies were carried out with the aim of investigating the formation of coffee seedlings from seeds with low levels of quality. It was used seeds of different quality levels of *Coffea arabica* L., Catuaí amarelo IAC 62, obtained from freshly harvested seeds and submitted to aging for four days. In the first study, the whole and fractionated seeds were immersed in cathodic water, ascorbic acid, distilled water and one part was evaluated without imbibition. The germination test was carried out, in which was evaluated the percentage of root protrusion, normal seedlings and expanded cotyledon leaves. Simultaneously the emergence test and growth evaluations of the seedlings, by means of the stem diameter, hypocotyl length and dry weight were evaluated. Fractionated coffee seeds have worse physiological performance than whole seeds, mainly the lower quality seeds. The effect of the antioxidant treatment on the physiological performance of the seeds was variable with the fractionation and quality level. In the second study, coffee embryos were cultured *in vitro* using different quality levels obtained by the same way. For the imbibition of the seeds it was used boric acid and distilled water and the embryos extracted were treated with cathodic water, ascorbic acid and distilled water. It was counted leaf and root presence at 15 days, germination at 30 days and hypocotyl and root size were measured at 120 days. The addition of boric acid in seed imbibition water provides more vigorous seedlings after embryo culture and does not require the use of antioxidant treatment. In the absence of boric acid in seed imbibition water, the use of cathodic water improves the physiological performance of the embryos. The use of ascorbic acid may benefit the physiological performance of seeds, but is harmful to the culture of embryos. It is possible to form coffee seedlings from the cultivation of embryos extracted from low quality seeds.

**Keywords:** Deterioration; *Coffea arabica*; Cathodic Water, Boric Acid

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Efeito do uso de sementes inteiras e fracionadas e do tratamento antioxidante, no desempenho fisiológico de sementes de café com dois níveis de qualidade.....25
- Tabela 2 - Efeito de níveis de qualidade no desempenho fisiológico de sementes de café inteiras e fracionadas, e submetidas a diferentes tratamentos antioxidantes.....26
- Tabela 3 - Efeito do uso de sementes inteiras e fracionadas e do tratamento antioxidante, no desempenho fisiológico de mudas de café produzidas com sementes de diferentes níveis de qualidade. ....27
- Tabela 4 - Efeito de níveis de qualidade no desempenho fisiológico de mudas de café produzidas com sementes inteiras e fracionadas, e submetidas a diferentes tratamentos antioxidantes.....28
- Tabela 5 - Diâmetro médio do caule, altura média e porcentagem de emergência de mudas de café produzidas de sementes fracionadas e inteiras, com dois níveis de qualidade.....28
- Tabela 6 - Altura média de mudas de café produzidas de sementes de diferentes níveis de qualidade e submetidas ao tratamento antioxidante.....29
- Tabela 7 - Porcentagem média de presença de raiz e de folha aos 15 dias, e comprimento de hipocótilo e raiz, aos 120 dias, de plântulas de café oriundas de embriões extraídos de sementes com diferentes níveis de qualidade, após diferentes preparos e tratados com diferentes antioxidantes.....30
- Tabela 8 - Porcentagem média de presença de raiz e de folha aos 15 dias, e comprimento de hipocótilo e raiz, aos 120 dias, de plântulas de café oriundas de embriões extraídos de sementes com diferentes níveis de qualidade, após diferentes preparos e tratados com diferentes antioxidantes.....31
- Tabela 9 - Germinação, aos 30 dias, de embriões extraídos de sementes de café com dois níveis de qualidade e submetidas a diferentes preparos de extração.....32
- Tabela 10 - Germinação, aos 30 dias, de embriões extraídos de sementes de café por meio de dois preparos e tratados com diferentes antioxidantes.....33
- Tabela 11 - Germinação, aos 30 dias, de embriões extraídos de sementes de café com dois níveis de qualidade e tratados com diferentes antioxidante.....33

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Importância do café.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2</b>	<b>Características das sementes de café.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Tolerância à dessecação.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Germinação.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Sensibilidade dos endospermas.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b>Deterioração.....</b>	<b>12</b>
<b>2.4</b>	<b>Antioxidantes.....</b>	<b>13</b>
<b>2.5</b>	<b>Cultura de embriões de café.....</b>	<b>14</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Protocolo de embebição.....</b>	<b>16</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Aclimatização.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Obtenção do material vegetal e processamento dos frutos.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Níveis de qualidade das sementes.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3</b>	<b>Estudo do fracionamento das sementes para a formação de mudas.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Tratamento antioxidativo nas sementes.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Avaliações fisiológicas.....</b>	<b>20</b>
<b>3.4</b>	<b>Estudos da formação de mudas oriundas do cultivo <i>in vitro</i> de embriões zigóticos extraídos de café com diferentes níveis de deterioração.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Assepsia das sementes.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Extração e inoculação dos embriões.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Avaliações.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4.4</b>	<b>Aclimatização das plântulas.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5</b>	<b>Análise estatística dos resultados.....</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Estudo do fracionamento das sementes para a formação de mudas.....</b>	<b>23</b>
<b>4.2</b>	<b>Estudos da formação de mudas oriundas do cultivo <i>in vitro</i> de embriões zigóticos extraídos de café com diferentes níveis de deterioração.....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>34</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O agronegócio do café é parte importante da economia do país, sendo o grão uma das commodities de maior valor no mercado mundial. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo maior consumidor do produto, o que torna importante para o país a realização de pesquisas nas mais diversas áreas de produção do café.

O café é comumente propagado por meio de mudas produzidas por sementes, que possuem comportamento intermediário a recalcitrante com relação à tolerância à dessecação. Esta característica aliada à germinação lenta e desuniforme das sementes dificulta a produção de mudas com desejável padrão de qualidade, no momento ideal do plantio.

Em pesquisas recentes, tem sido confirmado que em sementes de café os endospermas possuem maior sensibilidade à deterioração e a estresses do que os embriões, sendo que estes podem germinar e gerar plântulas normais, mesmo quando isolados de sementes deterioradas (COELHO et al., 2015; DUSSERT et al., 2006 e FIGUEIREDO, 2016). A deterioração é um processo natural inerente à espécie, porém operações na pós-colheita, como o processamento, a secagem e o armazenamento podem causar danos, potencializando a degradação devido à formação de espécies reativas de oxigênio, que causam danos oxidativos nos tecidos vegetais. O uso de antioxidantes exógenos pode proteger ou aumentar o potencial antioxidante nas sementes, e conseqüentemente sua capacidade em remover radicais livres, seja por ação direta sob a semente ou aumentando a ação de antioxidantes endógenos.

O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de café é uma metodologia que pode auxiliar na antecipação da formação de mudas e da época de plantio. Esta metodologia baseia-se no fato de que os embriões podem ser retirados das sementes e transferidos para um meio de cultura, contendo nutrientes apropriados, em concentrações adequadas, onde se diferenciam posteriormente.

O objetivo neste trabalho foi investigar a produção de mudas de café a partir de sementes com diferentes níveis de qualidade, por meio da remoção de parte do endosperma e por meio da cultura de embriões isolados destas sementes.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância do café

O café é um dos produtos de maior importância no mercado mundial, sendo que o Brasil é o maior produtor e exportador mundial desta commodity, com uma produção de 49,64 milhões de sacas, segundo dados da CONAB (2016). A participação do café nas exportações do agronegócio brasileiro foi de 10,7% em 2015 (INFORME ESTATÍSTICO DO CAFÉ, 2016).

Com origem no continente africano e pertencente à família Rubiaceae, o gênero *Coffea* apresenta cerca de 100 espécies identificadas, com grande heterogeneidade entre si. As espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são as mais cultivadas (DAVIS et al., 2006).

*Coffea arabica* L. é a espécie mais importante do gênero, com uma produção de 83,2 % da produção total de café do país (CONAB, 2016). Dentro da espécie, uma das cultivares mais difundidas no Brasil é o Catuaí, resultante do cruzamento artificial de cafeeiros selecionados de ‘Caturra Amarelo’, de porte baixo, e ‘Mundo Novo’. Por apresentar qualidade de bebida superior tem sido utilizada em larga escala, além de ser uma planta com alta produtividade, rústica e comumente cultivada a livre crescimento (SOUZA et al., 2003).

### 2.2 Características das sementes de café

#### 2.2.1 Tolerância à dessecação

A espécie *Coffea arabica* é propagada geralmente por sementes, as quais apresentam sensibilidade à dessecação. A capacidade fisiológica das sementes em tolerar a dessecação pós-colheita é variável entre as espécies. Com relação a esta característica, as sementes podem ser classificadas como ortodoxas (tolerantes), recalcitrantes (não tolerantes) e intermediárias, as sementes de café apresentam comportamento intermediário a recalcitrante quanto a tolerância à dessecação, dependendo da espécie (ABREU et al., 2014; COELHO et al., 2015; ELLIS; HONG; ROBERT, 1990). As sementes ortodoxas são aquelas que podem ser armazenadas por maiores períodos de tempo, quanto mais secas e quanto menor for a temperatura de armazenamento, o que não ocorre no caso do café.

Sementes de café apresentam comportamento intermediário (ABREU et al., 2014; COELHO et al., 2015; ROSA et al., 2005; ROSA et al., 2011), pois além de não tolerarem a dessecação, também não toleram baixas temperaturas no armazenamento, o que dificulta a sua conservação. De acordo com resultados de estudos sobre a conservação de sementes de café, não é recomendado o seu armazenamento por um longo período (EIRA et al., 1999; ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990, 1991).

### **2.2.2 Germinação**

A propagação do café é feita geralmente por meio de mudas produzidas a partir de sementes. As mudas são produzidas em seis meses (mudas de meio ano) ou em doze meses (mudas de ano), por meio de semeadura em substrato apropriado. As mudas de meio ano são mais utilizadas em função do menor custo com insumos e mão de obra, por permanecerem por menos tempo no viveiro (GUIMARÃES et al., 1998).

Um grande problema na produção de mudas é que as sementes apresentam germinação lenta e desuniforme, além de baixo potencial de armazenamento, o que torna difícil a obtenção de mudas com elevado padrão de qualidade, no momento ideal ao plantio (ROSA et al., 2010).

A protrusão da radícula acontece quando a força exercida pelo embrião para romper a parede celular é maior que a força de resistência do endosperma (HILLHORST et al., 1998). O endosperma das sementes de café possui rigidez nas suas paredes celulares e essas precisam ser degradadas para que ocorra a protrusão radicular. Segundo Silva et al. (2004), este pode ser um dos motivos pelo qual o café possui germinação lenta e desuniforme. Embora não se saiba a verdadeira causa dessa germinação lenta, vários estudos apresentam justificativas, como a influência do endocarpo (pergaminho) (GUIMARÃES, 1995; RENA; MAESTRI, 1986; ROSA et al., 2007b; VÁLIO, 1976), a baixa absorção de água e O<sub>2</sub> (BENDAÑA, 1962; VÁLIO 1980), o balanço hormonal (SILVA et al., 2004; VÁLIO, 1976) e a presença de inibidores naturais (FRIEDMAN; WALLER, 1983a, 1983b; PEREIRA et al., 2002; ROSA et al., 2006, 2007a; WALLER et al., 1986).

### **2.2.3 Sensibilidade dos endospermas**

A semente de café é constituída por embrião, endosperma e um envoltório representado pelo espermoderma, também conhecido como película prateada. De acordo com resultados de diversas pesquisas (COELHO et al., 2015; DUSSERT et al., 2006, e FIGUEIREDO, 2016) existe maior sensibilidade dos endospermas do que dos embriões zigóticos à deterioração e susceptibilidade aos danos de processamento, secagem e armazenamento. Nestes trabalhos os embriões isolados das sementes apresentaram melhor desempenho fisiológico do que as sementes inteiras, principalmente quando as sementes apresentavam baixa qualidade fisiológica. Assim, essa maior sensibilidade do endosperma pode interferir diretamente nos resultados da germinação, ocasionando baixas porcentagens de plântulas normais.

### **2.3 Deterioração de sementes**

A deterioração das sementes é um processo inevitável e irreversível que afeta as características físicas, químicas, fisiológicas e de sanidade das sementes. As alterações causadas pela deterioração são de nível tanto bioquímico como citológico, físico e fisiológico, com início na maturidade fisiológica provocando uma inativação progressiva do metabolismo, causando assim a queda da qualidade e culminando com a morte da semente (MARCOS FILHO, 2005).

Manifestações de deterioração são associadas ao armazenamento, mas tem início na maturidade fisiológica e podem ser aceleradas nas etapas pós-maturidade. Sementes de café possuem comportamento intermediário a recalcitrante o que dificulta o armazenamento. Sementes recalcitrantes devem ser mantidas com elevado teor de água, e, conseqüentemente, em temperaturas acima de 0°C (BONJOVANNI; BARBEDO, 2008; PASQUINI et al., 2012; SERSHEN et al., 2012a; SMITH; BERJAK, 1995; WESLEY-SMITH et al., 2004), e para algumas sementes até a troca gasosa deve ser evitada (PASQUINI et al., 2012). Tais condições em que as sementes de café são armazenadas, muitas vezes promovem um elevado metabolismo (SERSHEN et al., 2012b), o que acelera o processo de deterioração das sementes.

A perda da viabilidade das sementes está associada ao aumento das espécies reativas de oxigênio (EROS) e peroxidação de lipídeos (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011;

OLIVEIRA et al., 2012). As EROS são formas reduzidas do oxigênio atmosférico que causam a oxidação de vários componentes celulares, podendo levar a morte da célula (VANDENABEELE et al., 2000).

A peroxidação de lipídeos de membranas ou de organelas intracelulares é um indicativo de estresse oxidativo, que ocorre devido a interação da EROS com ácidos graxos insaturados (SCANDALIOS, 1993). Os danos causados às membranas celulares pela peroxidação dos lipídeos causam mudanças metabólicas, destruição da membrana e perda do material intracelular (BEWLEY; BLACK 1994), levando à deterioração e conseqüentemente morte da célula.

A germinação lenta de sementes de café aliada à rápida perda do poder germinativo em função do processo de deterioração dificulta a obtenção de mudas no momento ideal do plantio para os produtores.

## **2.4 Antioxidantes**

No processo de deterioração de sementes ocorre a formação de radicais livres, que causam oxidação dos tecidos vegetais, resultando em danos às membranas celulares e a geração de subprodutos tóxicos (SCHWEMBER E BRADFORD, 2010). Os problemas causados pelas espécies reativas de oxigênio podem ser atenuados pela ação antioxidante, que pode ser proveniente de fontes naturais endógenas das sementes ou fontes exógenas de agentes redutores. A aplicação de antioxidantes exógenos pode exercer uma ação direta ou melhorar a atividade antioxidante endógena da semente (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011).

Em alguns estudos a água catódica, gerada pela eletrólise de uma solução contendo cloreto de cálcio e cloreto de magnésio, tem mostrado efeito antioxidante por meio do fornecimento de elétrons, neutralizando os radicais livres e reduzindo o seu ataque às células (HANAOKA, 2001; HANAOKA et al., 2004; HIRAOKA et al., 2004; SHIRAHATA et al., 1997). Ricaldoni (2016) ao investigar a ação antioxidante da água catódica em sementes de café obteve resultados positivos no desempenho fisiológico das sementes com baixa qualidade. Da mesma forma Pammenter et al. (1974) e Berjak (1978), trabalhando com sementes de milho envelhecidas e submetidas ao tratamento de proteção catódica observaram uma diminuição significativa da perda de viabilidade das sementes. Em estudos de secagem de sementes de café foi observada uma menor perda do conteúdo celular ao se utilizar o

tratamento com água catódica, além da contribuição para uma menor atividade de enzimas antioxidantes (FIGUEIREDO, 2016).

Outro antioxidante que apresenta aumento do vigor e prolonga o armazenamento de sementes pela remoção de espécies reativas de oxigênio, é o ácido ascórbico (SMIRNOFF, 2000). Brilhante et al. (2013) também verificaram melhoras na qualidade fisiológica de sementes de feijão de corda ao aplicar ácido ascórbico após o envelhecimento artificial e Kikuti et al. (2002) ao avaliar o uso de antioxidantes em sementes de café observou um aumento no desempenho das sementes após a colheita e após quatro meses de armazenamento.

## 2.5 Cultura de embriões de café

O cultivo *in vitro* pode ser definido como o cultivo de células, tecidos e órgãos isolados da planta mãe e cultivados em um meio artificial. Além de ser utilizado em diversas áreas de pesquisas, possui também uma série de aplicações, como produção em larga escala de embriões somáticos em biorreatores, produção de sementes artificiais, criopreservação, variação somaclonal e transformação genética (SANTANA-BUZZY et al., 2007). Essa técnica envolve uma série de etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até a fase de aclimatização.

Na cultura do cafeeiro tem sido realizados vários trabalhos de cultura de tecidos com diferentes objetivos. Porém, a eficiência da técnica apresenta limitações, principalmente, devido a contaminações, oxidação, baixa ou nula regeneração e problemas na aclimatização de plantas (LONDOÑO; OROZCO, 1986).

A terminologia “cultura de embriões” tem sido empregada para descrever os processos de crescimento e desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro*, independentemente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado (RAPPORT, 1957, citado por HU; FERREIRA, 1998).

A cultura de embriões pode auxiliar na antecipação da época de plantio, através da clonagem de plantas selecionadas (ANDRADE et al., 2001), além de possibilitar a recuperação de híbridos de cruzamentos incompatíveis, micropropagação e superação de dormência e esterilidade de sementes (HU; FERRERA, 1998). Além disso, o cultivo *in vitro* de embriões de café pode auxiliar na conservação do germoplasma da espécie (NAIDU, 1999).

O cultivo *in vitro* de embriões oferece sistema controlado para estudar os problemas nutricionais, fisiológicos e bioquímicos dos embriões em vários estádios de desenvolvimento (PASQUAL; PINTO, 1988). Do ponto de vista técnico, as duas considerações mais importantes na cultura de embriões são a composição do meio de cultura e a excisão do embrião, com a composição do meio e a preparação asséptica dos embriões variando entre as espécies (ANDREOLI, 1985).

O embrião está inserido dentro do endosperma do café em região estéril, o que facilita a sua assepsia, sendo necessária apenas a desinfestação da superfície da semente (ANDRADE et al., 2001). O índice de contaminação desse tipo de cultivo é muito baixo em relação às demais culturas *in vitro* (ILLG, 1986). O mais importante aspecto da cultura de embriões é a seleção do meio nutritivo correto, que estimule o desenvolvimento dos embriões. Com isso tem-se buscado novas alternativas de meios nutritivos, que se aproximem da composição do endosperma ou do saco embrionário, possibilitando assim, o cultivo de embriões em vários estádios de desenvolvimento (JESUS et al., 2011).

É necessário que se determinem as concentrações ótimas dos componentes do meio de cultura, como os macros e micronutrientes, sacarose e os reguladores de crescimento. Se o meio estiver deficiente em sacarose, formam-se plântulas disformes, com baixa probabilidade de sobrevivência, ou não ocorre a germinação dos embriões (JESUS et al., 2011).

O surgimento dos primórdios radiculares e foliares e o crescimento das raízes é estimulado pelos carboidratos presentes no meio de cultura (PASQUAL et al., 2001). Para a maioria das culturas e meios nutritivos a sacarose é a fonte de energia mais utilizada.

Embriões são geralmente cultivados com sucesso em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo sais e carboidratos e solidificado com ágar (ANDRADE et al., 2001; JESUS et al., 2011; NAIDU; SREENATH, 1999; PINTO, 2016), e não é necessário o uso de reguladores de crescimento, pois podem induzir a formação de calos (JESUS et al., 2011).

O cafeeiro produz substâncias fenólicas, fazendo-se necessário o uso de antioxidantes no meio de cultura como carvão ativado, PVP, ácido ascórbico e ácido cítrico (ANDRADE et al., 2001).

### 2.5.1 Protocolo de embebição

Antes da excisão dos embriões zigóticos as sementes são embebidas em água para amolecimento do endosperma, facilitando assim o processo de retirada. Em vários trabalhos foi utilizada água destilada como fonte para o amolecimento do endosperma de cafés antes da retirada do embrião zigótico para cultivo in vitro (ANDRADE et al., 2001; CARVALHO et al., 1998; PINTO et al., 2016). Freitas et al. (2016) utilizaram 0.5% de ácido bórico em agitação por 72 horas para embeber as sementes antes de extrair os embriões.

O ácido bórico tem diversas propriedades, desde micronutriente essencial para as plantas, antisséptico, bacteriostático, controle de bactérias, algas, fungos e insetos, e controle da biodeterioração (LLOYD, 1998).

Como fungicida ele impede o crescimento do fungo através da prevenção da formação de conídios ou esporos assexuados (WOODS, 1994). Em estudos in vitro o boro inibiu de forma efetiva *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* e *Monilinia laxa* (QIN ET AL., 2007, 2010; THOMIDIS; EXADAKTYLOU, 2010). Ele se mostrou efetivo também no manejo da sarna da macieira, causada pelo fungo *Venturia inaequalis*, uma das doenças mais importantes da maçã no mundo inteiro.

Nos insetos o ácido bórico age no estômago como um veneno ao ser ingerido, ou pelo consumo das ceras da superfície externa do inseto ao entrar e contato direto com o ácido bórico em pó, causando sua desidratação e levando à morte (COX, 2004; SEE et al., 2010; WOODS, 1994).

Os ácidos bóricos podem ser usados também como herbicidas através da dessecação da planta e os boratos pela interrupção da fotossíntese (COX, 2004). O boro é um dos elementos essenciais mais importantes para as plantas (WOODS, 1994) em pequenas concentrações, mas em grandes concentrações pode causar toxicidade, e os sintomas incluem queima das folhas, áreas mortas dentro dos frutos, das cascas e nos caules das plantas (NABLE; BAÑUELOS; PAULL, 1997).

Além disto o boro é responsável pelo aumento da concentração de compostos fenólicos. A deficiência de boro aumenta a atividade da enzima polifenol oxidase, que catalisa a oxidação de compostos fenólicos (CAMACHO-CRISTÓBAL; ANZELOTTI; GONZÁLEZ-FONTES, 2002; PFEFFER et al., 1998). Estudos envolvendo ascorbato e glutatona, que são importantes na remoção de espécies reativas de oxigênio da célula, mostraram uma queda de seus níveis em raízes e folhas sob condições de deficiência de Boro

(CAKMAK; RÖMHELD, 1997; LUKASZEWSKI; BLEVINS, 1996), os autores concluíram que a queda do crescimento da raiz estava relacionada com o metabolismo da ascorbato prejudicado pela deficiência de boro. Os níveis de glutathione aumentaram em plantas de girassol e de milho sob condições de estresse de alumínio ao aplicar boro, o que indica uma produção de antioxidantes estimulada por uma adequada nutrição por boro em plantas com estresse ao alumínio (RUIZ et al., 2006; CORRALES et al., 2008).

### 2.5.2 Aclimatização

A aclimatização é conceituada como sendo a fase da micropropagação, em que ocorre a transferência das mudas produzidas *in vitro*, para o ambiente natural, ou um ambiente de transição, como uma casa de vegetação ou telado (DEBERGH E MAENE, 1981). É um processo crucial para obtenção de mudas de qualidade obtidas por cultura de tecidos.

As plantas micropropagadas apresentam caules mais curtos e delgados, redução dos tecidos de suporte, maior quantidade de água nas células, folhas com cutícula mais fina e baixa funcionalidade dos estômatos (PASQUAL, 2000). As raízes são quebradiças e pouco funcionais e por haver poucas conexões vasculares entre raízes e brotações, com frequência não sobrevivem ao serem transferidas para o solo (GEORGE, 1996). Consequentemente são plantas que apresentam alta taxa de evapotranspiração e pouca capacidade fotossintética.

Existem poucos trabalhos que relatam os detalhes do procedimento de transplântio, aclimatização e das dificuldades e soluções encontradas durante esse processo. O sucesso da técnica de propagação *in vitro*, requer que as plantas que se desenvolvem heterotroficamente, sob condições de alta umidade (90-100%), posteriormente se adaptem, tornando-se autotróficas e cresçam sob condições de moderada ou baixa umidade. Tradicionalmente, a aclimatização *ex vitro* das plantas micropropagadas é realizada por meio do incremento progressivo na irradiância mantendo, inicialmente, alta umidade relativa, após o transplântio, com gradativa redução, até que a fase de endurecimento se complete, ou seja, até corrigir as alterações, ou anormalidades induzidas *in vitro*, o que inclui a transição do metabolismo heterotrófico para autotrófico e o estabelecimento de relações hídricas anormais, através da regulação da perda e da absorção de água (SMITH; PALTA; MCCOWN, 1986; WARDLE; DOBBS; SHORT, 1983).

Santos et al. (2014) ao aclimatizar mudas micropropagadas de *Coffea canephora* observaram uma maior sobrevivência e desenvolvimento vegetal ao utilizar um

sombreamento de 50% do que de 30% e ao avaliar o período de aclimatização não encontraram diferença entre os períodos de 30, 45 e 60 dias, sendo o de 30 o mais indicado por desenvolver mudas mais rápido.

O substrato é responsável por nutrir a planta e manter a estrutura de propagação, deve ser uniforme e apresentar boa capacidade de retenção de água, além de ser isento de pragas, patógenos e sementes de plantas daninhas. O substrato PlantMax® apresentou excelentes resultados em termos de pegamento e crescimento das mudas em diversos trabalhos (PEREIRA et al., 2007; RODRIGUES et al. 2005, ZEMKE et al., 2003).

Durante a fase de aclimatização de plântulas de café, Pinto (2016) utilizou substrato comercial Topstrato® misturado a vermiculita na proporção de 1:1 em saquinhos plásticos para mudas de 10x20 cm.

Com relação a nutrição das mudas, Maciel (2011) concluiu que o fertilizante de liberação lenta Osmocote® promove mudas de cafeeiro de melhor qualidade quando produzidas a partir de embriogênese somática, exercendo um efeito positivo sob suas características agronômicas e nutricionais.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Colheita dos frutos e obtenção das sementes**

Frutos de café da safra 2015, da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo IAC 62 foram colhidos na Fazenda Experimental da Fundação Procafé, localizada em Varginha – MG. Foram colhidos os frutos no estágio de maturação cereja, selecionados nos ramos médios das plantas e nas partes medianas dos ramos.

Logo após à colheita os frutos foram transportados para Lavras - MG, onde foram processados para obtenção das sementes. Para isso, foram lavados para a retirada de impurezas, de frutos chochos, malformados e brocados e, posteriormente, despolidos mecanicamente.

Em seguida, as sementes foram desmuciladas por fermentação em água a 30°C, por 24 horas, lavadas em água corrente e submetidas à secagem em peneiras à sombra até atingirem um teor de água de 12%.

Para investigar a produção de mudas de café produzidas a partir de sementes com diferentes níveis de qualidade, dois estudos foram realizados. No primeiro, sementes

fracionadas e sementes inteiras, com diferentes qualidades foram utilizadas para a formação de mudas em saquinhos. No segundo estudo, foram avaliadas as plântulas produzidas *in vitro* a partir de embriões extraídos das mesmas sementes com diferentes níveis de qualidade.

### **3.2 Níveis de qualidade das sementes**

Os diferentes níveis de qualidade das sementes foram obtidos com o envelhecimento acelerado por períodos de quatro, seis, oito e dez dias e comparadas por meio do teste de germinação. A técnica do envelhecimento acelerado consiste em colocar as sementes em camada única e uniforme sobre telas e acondicioná-las em caixas do tipo gerbox contendo 40 mL de água, sob temperatura de 42°C, em câmara BOD, por determinado período de tempo. Para obtenção do nível de qualidade baixo nessa pesquisa foram utilizadas sementes envelhecidas por quatro dias. Para o nível alto foram utilizadas sementes sem envelhecimento acelerado, as quais foram colocadas no telado e acondicionadas em caixas do tipo gerbox contendo 40 mL de água destilada, em câmara BOD, sob temperatura de 25°C apenas para umedecimento das sementes.

### **3.3 Estudo do fracionamento das sementes para a formação de mudas**

As sementes de cada nível de qualidade foram avaliadas inteiras e com parte do endosperma removido. Para a obtenção das sementes com parte do endosperma removido, estas foram cortadas transversalmente com auxílio de um bisturi, sendo utilizadas as partes das sementes que continham os embriões. A decisão sobre este procedimento foi tomada após a realização de testes preliminares em laboratório retirando, em que foram removidos 50% e 75% dos endospermas e, em seguida, as sementes fracionadas foram avaliadas por meio do teste de germinação. De acordo com os melhores resultados obtidos nestes pré-testes, utilizou-se nesta pesquisa, as sementes fracionadas ao meio, descartando-se 50% dos endospermas restantes.

#### **3.3.1 Tratamento antioxidativo nas sementes**

As sementes fracionadas e as inteiras, dos diferentes níveis de qualidade, foram embebidas em água destilada, água catódica e ácido ascórbico, sendo colocadas entre papel de

germinação umedecido com os antioxidantes na proporção de 2,5 vezes o peso do papel (BRILHANTE et al., 2013), por um período de 48 horas. A outra parte das sementes não foi submetida à embebição.

O ácido ascórbico foi utilizado na concentração de 2g/L de água destilada (KIKUTI et al., 2002).

A água catódica foi produzida segundo metodologia descrita por Berjak, Sershen e Pammenter (2011), com modificações: 1L de solução contendo como eletrólitos 0,5 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 0,5 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , foi eletrolisada aplicando-se uma diferença de potencial de 60V, utilizando-se uma cuba horizontal, própria para corrida eletroforética. O conteúdo da solução foi dividido em duas porções iguais e a eletrólise realizada durante 1 hora, em temperatura ambiente, produzindo 500 ml de água anódica (oxidada), com pH próximo a 3-4, e 500 ml de água catódica (reduzida), com pH próximo a 11-12. O circuito foi completado utilizando-se uma ponte salina à base de ágar contendo cloreto de potássio. A água anódica foi descartada.

Após as sementes serem submetidas aos tratamentos, foram realizadas avaliações fisiológicas por meio do teste de germinação, determinação da massa seca de plântulas, emergência, índice de velocidade de emergência e análise de crescimento das mudas.

### 3.3.2 Avaliações fisiológicas

- **Teste de germinação das sementes:**

Foi realizado com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, semeadas em rolos de papel toalha do tipo "germitest" umedecidos com água destilada na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos de papel contendo as sementes foram acondicionados em germinador, regulado a 30°C, na presença de luz (BRASIL, 2009).

Aos 15 dias após à semeadura foi determinada a porcentagem de protrusão radicular, sendo computadas as sementes que apresentaram rompimento do endosperma e protrusão da radícula. Aos 30 dias foi determinada a porcentagem de plântulas normais, sendo estas as plântulas que apresentaram raiz principal e pelo menos duas raízes laterais saudáveis e normais. A porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas foi computada aos 45 dias.

- **Emergência das plântulas:**

O teste de emergência foi conduzido em câmara de crescimento vegetal com temperatura de 30°C e com 12 horas de luz. Como substrato foi utilizado o padrão para produção de mudas de café, composto por 70% de terra e 30% de esterco bovino, completado com fertilizantes químicos. Os recipientes utilizados foram sacos de polietileno, com dimensões de 22 cm de altura por 11 cm de largura. Foi semeada uma semente em cada saquinho e cada tratamento composto por 20 mudas, sendo quatro repetições por tratamento. As plântulas com cotilédones acima da superfície caracterizaram a emergência e foram contadas diariamente, até a estabilização, quando foi calculada a porcentagem de emergência ao final das mudas.

- **Análise de crescimento das mudas:**

Ao final do teste de emergência, as mudas foram retiradas dos saquinhos plásticos, lavadas em água corrente e avaliadas quanto ao crescimento por meio da medição do comprimento do hipocótilo (cm) e do diâmetro do caule (cm). Utilizou-se uma régua para as medições de comprimento e um paquímetro digital para as medições de diâmetro.

- **Massa seca de mudas:**

Após as avaliações de crescimento foi determinada a massa seca de plântulas. Para isso, a parte aérea das plântulas com folhas cotiledonares expandidas foi separada das raízes, com auxílio de um bisturi. Então, o material vegetal foi colocado em sacos de papel e submetido à secagem em estufa de circulação forçada de ar à 60°C por 4 a 5 dias ou até massa constante. A massa seca foi determinada em balança de precisão.

### **3.4 Estudo da formação de mudas oriundas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos extraídos de café com diferentes níveis de deterioração**

#### **3.4.1 Assepsia das sementes**

A assepsia das sementes oriundas dos diferentes níveis de qualidade foi realizada por embebição em formaldeído por 20 minutos, em agitação. Após esse período, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada autoclavada e colocadas em embebição por 72 horas em água destilada autoclavada e em solução de 0,5% de ácido bórico, constituindo dois

tratamentos de embebição. Antes da extração as sementes foram lavadas três vezes, novamente, em água destilada autoclavada.

### **3.4.2 Extração, tratamento antioxidativo e inoculação dos embriões**

Posteriormente à embebição das sementes, os embriões zigóticos foram extraídos em câmara de fluxo laminar em placas de petri com auxílio de uma pinça. Foram em seguida, submetidos aos tratamentos antioxidantes de ácido ascórbico na proporção de 2g por L de água destilada, água catódica e água destilada, embebidos por uma hora.

Os embriões foram então, inoculados em tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio MS autoclavado, suplementado com sacarose e solidificado com phytigel, com ph ajustado para 5,8 (FREITAS et al., 2016). Os tubos foram vedados com tampa de polipropileno, contendo um embrião por tubo, sendo 40 tubos por tratamento. Os embriões inoculados foram então, mantidos em câmara BOD, sob 25°C, com fotoperíodo de 16 horas de luz.

Após os embriões serem submetidos aos tratamentos, foram realizadas avaliações de germinação e análise de crescimentos das plântulas.

### **3.4.3 Avaliações**

- **Germinação *in vitro* dos embriões:**

Após 15 dias da inoculação, foram contados os embriões que desenvolveram folhas e raízes. Aos 30 dias foi avaliada a porcentagem de germinação dos eixos embrionários, considerando germinados os que apresentaram crescimento dos cotilédones e protrusão radicular.

- **Análise de crescimento das plântulas:**

Após quatro meses, quando as plântulas apresentaram crescimento adequado da parte aérea e do sistema radicular para serem aclimatizadas, foi realizada a medição do comprimento do sistema radicular (cm) e do comprimento do hipocótilo (cm).

### **3.4.4 Aclimatização das plântulas:**

Aos quatro meses, após análise de crescimento, foi feita a aclimatização das plântulas em câmara de crescimento vegetal, com fotoperíodo de 12 horas de luz, sob temperatura de 25°C. As plântulas foram transferidas para tubetes de polietileno contendo substrato comercial Tropstrato® ht e 7,5 g/L de fertilizante de liberação lenta Osmocote®, 15-9-12. Para manter as plântulas úmidas, os tubetes foram envolvidos com sacos plásticos, os quais tiveram as pontas cortadas a cada sete dias até que as plântulas se adaptassem ao ambiente de menor umidade relativa, quando os sacos plásticos foram totalmente retirados. Foi utilizado sombrite de 80%.

### **3.5 Análise estatística dos resultados**

No primeiro estudo foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2x2x3 (2 níveis de qualidade, 2 – sementes inteiras e fracionadas e 3 tratamentos antioxidantes), com duas repetições.

No segundo estudo de cultura de embriões foi realizada em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições de 10 embriões por parcela, em esquema fatorial 2x2x3, sendo 2 níveis de qualidade, 2 tratamentos com embebição em ácido bórico e em água e, 3 tratamentos antioxidantes).

Os dados foram submetidos à análise de variância, seguindo modelos matemáticos próprios para o delineamento empregado, utilizando-se o programa SISVAR® (FERREIRA, 2011). Os grupos de médias foram comparadas por meio do teste de *Scott-Knott*, ao nível de 5% de probabilidade.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Estudo do fracionamento das sementes para a formação de mudas**

De acordo com os resultados das análises de variâncias dos dados das avaliações fisiológicas (TABELA 1A, APÊNDICE), obteve-se interação tripla significativa entre os fatores níveis de qualidade, seccionamento das sementes e tratamentos antioxidantes.

As comparações de médias das variáveis da qualidade fisiológica entre sementes fracionadas e sementes inteiras, bem como entre os tratamentos antioxidantes, são apresentados nas Tabelas 1 e 2. Observa-se para o nível mais alto de qualidade, que nas sementes inteiras a porcentagem de protrusão radicular foi estatisticamente igual à das sementes fracionadas, em todos os tratamentos antioxidantes, exceto nas sementes sem antioxidantes. Já para as sementes de qualidade mais baixa, os resultados de protrusão radicular foram inferiores nas sementes seccionadas, quando comparados às sementes inteiras.

Resultados diferentes foram encontrados para a porcentagem de germinação e de folhas cotiledonares expandidas, tanto no nível de qualidade alta como de baixa, independentemente do tratamento antioxidante utilizado (TABELA 1). Observa-se que o fracionamento proporcionou menores porcentagens de germinação e de plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias, indicando que a redução do volume do endosperma não diminuiu os efeitos da deterioração e pode ter provocado insuficiência de reservas de nutrientes para produzir uma plântula normal.

Semelhante ao observado nesta pesquisa, Silva, Vieira e Panobianco (2014), estudando técnicas para a superação de dormência de sementes de guanandi, encontraram resultados inferiores de germinação e de emergência em sementes cujos endospermas foram seccionados. Já em sementes de *Araucaria angustifolia*, que também possuem germinação lenta e desuniforme, o fracionamento das sementes acelerou o processo de germinação e proporcionou melhores resultados na contagem final de plântulas normais, quando comparados aos resultados em sementes inteiras (SOUZA; CARDOSO, 2003).

Em outro trabalho, com sementes fracionadas de uvaia (*Eugenia pyriformis*) foi possível obter alta porcentagem de plântulas normais, o que pode ser justificado pelo fato de semente desta espécie não possuírem endospermas (SILVA, 2003). Diferentemente destes trabalhos, na presente pesquisa, as sementes de café de baixa qualidade não se beneficiaram da retirada de parte dos endospermas.

Com relação aos efeitos dos antioxidantes na avaliação fisiológica (TABELA 1) observa-se em sementes inteiras, que não houve diferenças entre os tratamentos utilizados, tanto para sementes de alta quanto para a sementes de baixa qualidade, não sendo observadas diferenças nas porcentagens de protrusão radicular, de germinação e de plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias.

**Tabela 1** Efeito do uso de sementes inteiras e fracionadas e do tratamento antioxidante, no desempenho fisiológico de sementes de café com dois níveis de qualidade.

Nível de qualidade das sementes	Tratamento antioxidante	Protrusão radicular (%)		Germinação (%)		Folhas cotiledonares (%)	
		Fracionamento das sementes					
		Inteira	Fracionada	Inteira	Fracionada	Inteira	Fracionada
Alta	Ascórbico	94 aA	90 aA	87 aA	55 bB	77 aB	48 bA
	Catódica	94 aA	89 aA	91 aA	56 bB	87 aA	49 bA
	Destilada	94 aA	92 aA	88 aA	63 bA	86 aA	51 bA
	Sem	96 aA	88 bA	93 aA	25 bC	83 aA	18 bB
Baixa	Ascórbico	80 aA	81 bA	70 aA	19 bB	67 aA	8 bB
	Catódica	89 aA	84 bA	71 aA	13 bC	65 aA	7 bB
	Destilada	91 aA	70 bB	75 aA	21 bB	68 aA	14 bA
	Sem	90 aA	75 bB	74 aA	32 bA	64 aA	18 bA
CV (%)		2,85		5,77		5,97	

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knott*, ao nível de 5% de probabilidade.

Já nas sementes seccionadas, com desempenhos piores do que sementes inteiras, os efeitos dos tratamentos antioxidantes variaram de acordo com o nível de qualidade. Observa-se que, em sementes de mais alta qualidade, a embebição em água destilada ou nos antioxidantes ácido ascórbico e água catódica foi melhor do que o tratamento sem antioxidante, com maiores porcentagens médias de germinação e de plântulas com folhas cotiledonares expandidas. Por outro lado, nas sementes de mais baixa qualidade, ocorreu efeito contrário, tendo os tratamentos antioxidantes proporcionado piores resultados nestas variáveis, do que a embebição em água destilada ou sem embebição.

Em estudo sobre os efeitos da água catódica em sementes deterioradas de café, Ricaldoni (2016) também observou melhoria nos resultados da protrusão radicular, com o uso desta água como antioxidante exógeno. Outros autores já haviam verificado os benefícios da água catódica como tratamento antioxidante (BERJAK, 1978; BERJAK, SERSHEN e PAMMENTER, 2011; FIGUEIREDO, 2016; PAMMENTER et al., 1974) e de outros antioxidantes exógenos como o ácido ascórbico (KIKUTI et al., 2002; BRILHANTE et al., 2013) que obtiveram uma melhoria na qualidade fisiológica das sementes ao utilizarem antioxidantes exógenos como o ácido ascórbico e a água catódica.

Na Tabela 2, onde são apresentados os dados relativos aos os efeitos do nível de qualidade das sementes inteiras e fracionadas, submetidas aos tratamentos antioxidantes, observa-se que o envelhecimento acelerado foi eficiente na obtenção dos dois níveis de qualidade, uma vez que as sementes envelhecidas apresentaram menores porcentagens de

germinação e de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, apesar do tratamento antioxidante. Com exceção dos resultados de protrusão radicular para sementes inteiras, em que não houve diferenças significativas entre as sementes de mais alta e as de mais baixa qualidade, onde as sementes tratadas com antioxidantes apresentaram mesmo desempenho e, apenas as sementes sem antioxidantes de mais baixa qualidade tiveram menor protrusão.

**Tabela 2** Efeito de níveis de qualidade no desempenho fisiológico de sementes de café inteiras e fracionadas, e submetidas a diferentes tratamentos antioxidantes.

Fracionamento das sementes	Tratamento antioxidante	Protrusão radicular (%)		Germinação (%)		Folhas cotiledonares (%)	
		Nível de qualidade das sementes					
		Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa
Semente Inteira	Ascórbico	94 a	90 a	87 a	70 b	77 a	67 b
	Catódica	94 a	89 a	91 a	71 b	87 a	65 b
	Destilada	94 a	91 a	88 a	75 b	86 a	68 b
	Sem	96 a	90 b	93 a	74 b	83 a	64 b
Semente Fracionada	Ascórbico	90 a	81 b	55 a	19 b	48 a	8 b
	Catódica	89 a	84 b	56 a	13 b	49 a	7 b
	Destilada	92 a	70 b	63 a	21 b	51 a	14 b
	Sem	88 a	75 b	25 a	32 a	18 a	18 a
CV (%)		2,85		5,77		5,97	

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knott*, ao nível de 5% de probabilidade.

A formação das mudas com o uso de sementes fracionadas e sementes inteiras e do tratamento antioxidante foi investigada e de acordo com a análise de variância dos resultados da avaliação das mudas formadas foi constatada interação tripla significativa dos fatores nível de qualidade, fracionamento e antioxidante, apenas para massa seca de raiz e de parte aérea. Para os resultados de diâmetro e altura das mudas e porcentagem de emergência, houve interação dupla significativa entre nível de qualidade e fracionamento das sementes. Para a variável altura das mudas, houve também interação significativa entre o nível de qualidade e tratamento antioxidante nas sementes (TABELA 2A, APÊNDICE).

Na Tabela 3 observa-se que as sementes inteiras apresentaram maiores valores de massa seca de raiz e de parte aérea, do que as sementes fracionadas, independentemente do antioxidante utilizado e do nível de qualidade, com exceção das sementes fracionadas de qualidade mais alta, as quais apresentaram maiores massas secas de raiz quando foram tratadas com o ácido ascórbico e a água catódica. Este resultado confirma que o fracionamento das sementes de café, com a finalidade de reduzir o volume de endospermas

deteriorados, não favorece o desempenho das mudas, assim como foi também observado nas avaliações realizadas em laboratório, no teste de germinação das sementes.

Com relação ao uso de antioxidantes não houve diferenças significativas entre os tratamentos utilizados em sementes fracionadas, tanto para as sementes de mais alto, como para as de mais baixo nível de qualidade. Já para sementes inteiras de mais baixa qualidade, o ácido ascórbico foi melhor, promovendo maiores massas secas de raiz e parte aérea.

**Tabela 3** Efeito do uso de sementes inteiras e fracionadas e do tratamento antioxidante, no desempenho fisiológico de mudas de café produzidas com sementes de diferentes níveis de qualidade.

Nível de qualidade das sementes	Tratamento antioxidante	Massa seca de raiz (Mg)		Massa seca de parte aérea (Mg)	
		Fracionamento das sementes			
		Inteira	Fracionada	Inteira	Fracionada
Alta	Ác. ascórbico	25,0 aB	21,3 aA	318,5 aA	37,4 bA
	Catódica	31,2 aB	22,3 aA	176,0 aB	29,7 bA
	Destilada	47,4 aA	17,9 bA	364,1 aA	34,3 bA
	Sem	60,0 aA	14,6 bA	427,3 aA	27,3 bA
Baixa	Ác. ascórbico	70,1 aA	0,0 bA	428,8 aA	0,0 bA
	Catódica	45,4 aB	0,0 bA	300,0 aB	0,0 bA
	Destilada	32,9 aB	0,0 bA	194,2 aC	0,0 bA
	Sem	39,5 aB	0,0 bA	161,0 aC	0,0 bA
CV (%)		38,87		37,17	

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* ao nível de 5% de probabilidade.

Analisando o nível de qualidade, verifica-se que com relação à massa seca do sistema radicular, as mudas de sementes inteiras com alta qualidade apresentaram menor peso seco que as de baixa qualidade com o uso de ácido ascórbico (TABELA 4); e as mudas de sementes fracionadas com baixa qualidade apresentaram menor massa seca com o uso de água catódica. Já para massa seca da parte aérea houve diferença apenas entre a qualidade das sementes inteiras, em que o peso seco da parte aérea das mudas foi maior nas sementes de baixa qualidade sem antioxidantes.

**Tabela 4** Efeito de níveis de qualidade no desempenho fisiológico de mudas de café produzidas com sementes inteiras e fracionadas, e submetidas a diferentes tratamentos antioxidantes.

Fracionamento das sementes	Tratamento antioxidante	Massa seca de raiz (Mg)		Massa seca de parte aérea (Mg)	
		Nível de qualidade das sementes			
		Alta	Baixa	Alta	Baixa
Semente inteira	Ác. Ascórbico	25,0 b	70,1 a	318,5 a	428,8 a
	Catódica	31,2 a	45,4 a	176,0 a	300,0 a
	Destilada	47,4 a	32,9 a	364,1 a	194,2 b
	Sem	60,0 a	39,5 a	427,3 a	161,0 b
Semente fracionada	Ác. Ascórbico	21,3 a	0,0 a	37,4 a	0,0 a
	Catódica	22,3 a	0,0 b	29,7 a	0,0 a
	Destilada	17,9 a	0,0 a	34,3 a	0,0 a
	Sem	14,6 a	0,0 a	27,3 a	0,0 a
CV (%)		38,87		37,17	

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* ao nível de 5% de probabilidade.

Para os resultados de diâmetro médio do caule, altura média e porcentagem de emergência das mudas constatou-se interação dupla significativa entre os fatores fracionamento e nível de qualidade das sementes (TABELA 5). As mudas produzidas com sementes inteiras foram melhores que as mudas de sementes fracionadas, independentemente do nível de qualidade destas sementes.

**Tabela 5** Diâmetro médio do caule, altura média e porcentagem de emergência de mudas de café produzidas de sementes fracionadas e inteiras, com dois níveis de qualidade.

Fracionamento das sementes	Diâmetro do caule (cm)		Altura do caule (cm)		Emergência (%)		
	Nível de qualidade das sementes						
	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa	
Semente Inteira	1,42 aA	1,39 aA	36,36 aA	37,47 aA	86 aA	69 bA	
Semente Fracionada	1,06 aB	0 bB	31,24 aB	0 bB	59 aB	4 bB	
CV (%)		16,00		15,69		14,77	

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram encontrados em trabalho com *Calophyllum brasiliense*, em que a emergência de sementes cortadas foi inferior à das sementes semeadas inteiras (SILVA; VIEIRA; PANOBIANCO, 2014). Não houve diferença entre as qualidades mais alta e mais baixa para sementes inteiras no diâmetro médio do caule e altura média das mudas.

O resultado de altura média das mudas também apresentou interação dupla significativa entre os fatores nível de qualidade das sementes e tratamento antioxidante (TABELA 6). Nestes resultados também fica evidente a diferença de qualidade fisiológica entre os lotes de sementes utilizados nesta pesquisa e, também o efeito diferenciado do tratamento antioxidante nas sementes, em cada nível de qualidade. Nas sementes de mais baixa qualidade não houve diferença entre os antioxidantes, enquanto para as sementes de mais alta qualidade o ácido ascórbico e a água destilada apresentaram melhores resultados na altura média das mudas. Da mesma forma Kituti et al. (2002) encontrou melhor vigor em sementes de café quando embebidas em água, ácido ascórbico e EDTA após secagem.

**Tabela 6** Altura média de mudas de café produzidas de sementes de diferentes níveis de qualidade e submetidas ao tratamento antioxidante.

Tratamento antioxidante	Altura média das mudas (cm)	
	Nível de qualidade das sementes	
	Alta	Baixa
Ác. Ascórbico	37,30 aA	17,92 bA
Catódica	29,53 aB	22,50 bA
Destilada	37,16 aA	18,52 bA
Sem	31,21 aB	16,00 bA
CV (%)	15,69	

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4.2 Estudos da formação de mudas oriundas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos extraídos de café com diferentes níveis de deterioração

De acordo com a análise de variância dos dados das avaliações da cultura de embriões foi constatada interação significativa entre os fatores, nível de qualidade das sementes, uso do ácido bórico no preparo das sementes e tratamento antioxidante nos embriões, para presença de raiz principal e de folhas cotiledonares, aos 15 dias e, comprimento do hipocótilo e da raiz, aos 120 dias (TABELA 3A, APÊNDICE). Observa-se que no nível de qualidade mais alto, o ácido bórico proporcionou melhores resultados do que a água, para a maioria das variáveis, quando se utilizou a água catódica e água destilada. No entanto, ao utilizar o ácido ascórbico como antioxidante, o uso da água e do ácido bórico proporcionaram comportamentos iguais para a maioria dos testes (TABELA 7).

Já, quando foram utilizadas sementes com nível de qualidade mais baixo, para a maioria das variáveis analisadas não houve diferenças entre o ácido bórico e a água, com exceção da água destilada, em que os comprimentos do hipocótilo e da raiz foram maiores quando se utilizou o ácido bórico no preparo das sementes, em comparação com o uso de água somente (TABELA 7).

Em alguns trabalhos foi demonstrado que o ácido bórico pode contribuir para o aumento da atividade de enzimas responsáveis pela remoção de EROs nas células (CAKMAK; RÖMHELD, 1997; CAMACHO-CRISTÓBAL; ANZELOTTI; GONZÁLEZ-FONTES, 2002; LUKASZEWSKI; BLEVINS, 1996; PFEFFER et al., 1998). Na presente pesquisa pode ser inferido que, na falta do ácido ascórbico e da água catódica, o ácido bórico pode ter agido como tratamento antioxidante nas sementes, visto que os embriões podem ter se beneficiado, durante o período de embebição.

No que se refere ao tratamento antioxidante, no nível de qualidade das sementes mais alto, a água catódica se destacou para todas as variáveis, tanto quando se utilizou água como o ácido bórico no preparo das sementes para a extração dos embriões (TABELA 7). No entanto, no preparo com ácido bórico, tanto a água catódica como a água destilada proporcionaram desempenhos fisiológicos das plântulas semelhantes, sendo que apenas no ácido ascórbico houve desempenho inferior.

**Tabela 7** Presença de raiz e de folha aos 15 dias, e comprimento de hipocótilo e raiz, aos 120 dias, de plântulas de café oriundas de embriões extraídos de sementes com diferentes níveis de qualidade, após diferentes preparos e tratados com diferentes antioxidantes.

Nível de qualidade das sementes	Tratamento antioxidante dos embriões	Presença de Raiz (%)		Presença de Folhas (%)		Hipocótilo (cm)		Raiz (cm)	
		Preparo das sementes							
		Água	Bórico	Água	Bórico	Água	Bórico	Água	Bórico
Alta	Ác Ascórbico	20 aB	30 aB	13 aB	3 aB	0,11 bB	0,32 aB	0,14 aA	0,59 aC
	Catódica	68 bA	93aA	63 bA	98 aA	0,52 bA	0,86 aA	0,98 bA	3,47 aA
	Destilada	15 bB	95 aA	25 bB	98 aA	0,11 bB	0,87 aA	0,15 bA	2,43 aB
Baixa	Ác Ascórbico	18 bB	43 aB	3 aB	15 aB	0,18 bC	0,44 aC	0,13 aB	0,96 aB
	Catódica	50 aA	35 aB	65 aA	33 bB	0,58 aB	0,63 aB	1,29 aA	1,21 aB
	Destilada	55 aA	73 aA	60 aA	55 aA	0,81 bA	1,03 aA	1,56 bA	2,95 aA
CV (%)		33,37		32		22,04		47,03	

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* ao nível de 5% de probabilidade.

Ressalta-se que a água catódica pode atuar como um antioxidante exógeno ou melhorando a atividade antioxidante endógena das sementes, na eliminação de espécies reativas de oxigênio (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011). Na presença do ácido bórico, sendo este, também, um antioxidante, a água catódica pode não ter propiciado o mesmo efeito, o que justifica os resultados semelhantes aos da água destilada. Contudo, na ausência do ácido bórico o efeito antioxidante da água catódica foi evidente, em comparação aos demais tratamentos.

Para o nível de qualidade mais baixo, os melhores resultados foram obtidos nos embriões que não foram tratados com antioxidantes e sim com água destilada, tanto para a embebição das sementes em água como em ácido bórico. Porém, quando as sementes foram embebidas em água, o uso da água catódica nos embriões proporcionou resultados semelhantes aos da água destilada. Mais uma vez observa-se que a água catódica pode não apresentar efeito na presença do bórico, porém como ela apresentou resultados semelhantes aos da água destilada, não se justifica o seu uso em sementes de baixa qualidade.

Conforme dados da Tabela 8, não foram observados na cultura de embriões, os diferentes níveis de qualidade das sementes que os originaram (TABELA 8), uma vez que para a maioria das variáveis os resultados foram estatisticamente iguais para os embriões extraídos de sementes de baixa e de alta qualidade. Este fato confirma que os embriões são mais sensíveis a deterioração do que os endospermas, o que corrobora os resultados encontrados em outras pesquisas (COELHO et al., 2015; DUSSERT et al., 2006).

**Tabela 8** Presença de raiz e de folha aos 15 dias, e comprimento de hipocótilo e raiz, aos 120 dias, de plântulas de café oriundas de embriões extraídos de sementes com diferentes níveis de qualidade, após diferentes preparos e tratados com diferentes antioxidantes.

Preparo das sementes	Tratamento antioxidante	Presença de Raiz (%)		Presença de Folhas (%)		Hipocótilo (cm)		Raiz (cm)	
		Nível de qualidade das sementes							
		Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa
Água	Ascórbico	20 a	18 a	13 a	3 a	0,11 a	0,18 a	0,14 a	0,13 a
	Catódica	68 a	50 a	63 a	65 a	0,52 a	0,58 a	0,98 a	1,29 a
	Destilada	15 b	55 a	25 b	60 a	0,11 b	0,81 a	0,15 b	1,56 a
Bórico	Ascórbico	30 a	43 a	3 a	15 a	0,32 a	0,44 a	0,59 a	0,96 a
	Catódica	93 a	35 b	98 a	33 b	0,86 a	0,63 b	3,47 a	1,21 b
	Destilada	95 a	73 a	98 a	55 b	0,87 a	1,03 a	2,43 a	2,95 a
CV (%)		33,37		32		22,04		47,03	

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* ao nível de 5% de probabilidade.

Para a maioria das avaliações realizadas, a presença de raízes e de folhas, bem como o comprimento das plântulas foram estatisticamente iguais nos dois níveis de qualidade das sementes que originaram os embriões, com exceção do uso da água catódica nos embriões de sementes embebidas em ácido bórico, em que os dois níveis permaneceram bem distintos para todos os testes realizados. A água catódica combinada com o ácido bórico pode ter apresentado um efeito negativo sob as sementes do nível de qualidade baixa.

Na análise de variância dos resultados da avaliação de germinação dos embriões, ou seja, os que desenvolveram folhas e raízes, as interações duplas entre todos os fatores foram significativas (TABELA 3A, APÊNDICE). Com o uso do ácido bórico no preparo das sementes para a extração dos embriões, foram obtidos melhores resultados de germinação do que sem, nos dois níveis de qualidade (TABELA 9). Comparando os embriões extraídos na ausência do ácido bórico (preparo em água), não houve diferença na porcentagem de germinação, porém na presença do bórico a germinação foi melhor nos embriões extraídos das sementes de mais alta qualidade.

Com base nos resultados de germinação, verifica-se que o uso do ácido bórico é necessário e benéfico para a cultura dos embriões. Nota-se que mesmo nos embriões extraídos de sementes de baixa qualidade, houve vantagem do uso do ácido bórico.

**Tabela 9** Germinação, aos 30 dias, de embriões extraídos de sementes de café com dois níveis de qualidade e submetidas a diferentes preparos de extração.

Nível de qualidade das sementes	Germinação dos embriões (%)	
	Preparo com água	Preparo com bórico
Alta	40 bA	87 aA
Baixa	40 bA	61 aB
CV (%)	27,92	

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* ao nível de 5% de probabilidade.

O uso da água catódica e da água destilada, como tratamento antioxidante nos embriões, resultaram em melhores porcentagens de germinação do que o ácido ascórbico, independentemente do preparo das sementes utilizado para a extração dos embriões (TABELA 10). A embebição das sementes em água ou em ácido bórico também proporcionaram mesma germinação, quando os embriões foram tratados em água catódica, enquanto que, com uso dos outros tratamentos antioxidantes, o ácido bórico propiciou maior germinação do que a água.

Verifica-se com os resultados de germinação, que com o uso do ácido bórico no processo de embebição do endosperma não se faz necessário o uso de antioxidantes nos embriões, e que o ácido bórico se mostrou mais eficiente do que a água, o que confirma o seu efeito antioxidante (CAKMAK; RÖMHELD, 1997; CAMACHO-CRISTÓBAL; ANZELOTTI; GONZÁLEZ-FONTES, 2002; LUKASZEWSKI; BLEVINS, 1996; PFEFFER et al., 1998) ou até pelo seu efeito fungicida (QIN et al., 2007, 2010; THOMIDIS; EXADAKTYLOU, 2010; WOODS, 1994), já que muitos embriões não germinaram devido à morte por contaminações.

**Tabela 10** Germinação, aos 30 dias, de embriões extraídos de sementes de café por meio de dois preparos e tratados com diferentes antioxidantes.

Tratamento antioxidante	Germinação (%)	
	Preparo com água	Preparo com bórico
Ác Ascórbico	19 bB	55 aB
Catódica	59 aA	75 aA
Destilada	43 bA	91 aA
CV (%)	27,92	

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* ao nível de 5% de probabilidade.

Analisando a germinação dos embriões, verifica-se que com a embebição em água destilada os resultados foram iguais em ambos os níveis de qualidade, enquanto que a embebição no ácido ascórbico e na água catódica, houve maior germinação dos embriões de sementes de mais alta qualidade (TABELA 11). Quanto aos antioxidantes, no nível mais alto de qualidade, os embriões embebidos em água catódica apresentaram maiores porcentagens de germinação e, no nível mais baixo de qualidade, a água destilada propiciou melhores resultados.

**Tabela 11** Germinação, aos 30 dias, de embriões extraídos de sementes de café com dois níveis de qualidade e tratados com diferentes antioxidantes.

Tratamento antioxidante	Nível de qualidade das sementes	
	Alta	Baixa
Ác Ascórbico	51 aB	23 bC
Catódica	80 aA	54 bB
Destilada	59 aB	75 aA
CV (%)	27,92	

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* ao nível de 5% de probabilidade.

Após a fase de crescimento dos embriões *in vitro*, as plântulas foram transferidas para a aclimatização, da maneira descrita em material e métodos. No entanto, as plântulas não sobreviveram à esta fase, o que pode ter ocorrido devido à insuficiência de intensidade luminosa no interior da câmara de crescimento devido ao uso de sombrite.

## 5 CONCLUSÕES

Sementes de café fracionadas tem pior desempenho fisiológico do que sementes inteiras, principalmente as de qualidade mais baixa.

O efeito do tratamento antioxidante no desempenho fisiológico das sementes foi variável com o fracionamento e o nível de qualidade.

A adição de ácido bórico na água de embebição de sementes proporciona plântulas mais vigorosas após a cultura dos embriões e dispensa o uso de tratamento antioxidante.

Na ausência de ácido bórico na água de embebição de sementes, o uso de água catódica melhora o desempenho fisiológico dos embriões.

O uso do ácido ascórbico pode beneficiar o desempenho fisiológico de sementes, mas é prejudicial à cultura dos embriões.

É possível formar plântulas de café a partir do cultivo de embriões extraídos de sementes de baixa qualidade.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, L. A. S. et al. Behavior of coffee seeds to desiccation tolerance and storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 4, p. 399-406, Oct./Dec. 2014.
- ANDRADE, L. M. C. O. et al. Cultura *in vitro* de embriões de *Coffea arabica*: influência de NAA e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.5, n.5, p. 1063-1070, set./out. 2001.
- ANDREOLI, C. Cultura de embriões. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1, 1985, Brasília. **Anais...** Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1986. p.25-28.
- BENDAÑA, F. E. Fisiología de las semillas de café: problemas relativos al almacenamiento, café. **Turrialba**, San José, v. 4, p. 99-106, Oct./Dec 1962.
- BERJAK, P. Viability extension and improvement of stored seeds. **South African Journal of Science**, Pretoria, v. 74, n. 10, p. 365, Oct. 1978.
- BERJAK, P.; SERSHEN, B. V.; PAMMENTER, N. W. Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 21, p. 187-203, May 2011.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.
- BRILHANTE, J. C. A et al. Ação do ácido ascórbico exógeno na qualidade fisiológica de sementes de feijão de corda envelhecidas artificialmente. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 985-994, jun. 2013.
- BONJOVANI, M. R.; BARBEDO, C. J. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp *affinis* (DC.) T.D. Penn. toleram temperatura sub-zero. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, p. 345-356, jun. 2008.
- CAKMAK, I.; RÖMHELD, V. Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. **Plant and Soil**, v. 193, p. 71-83, June 1997.
- CAMACHO-CRISTÓBAL, J. J.; ANZELOTTI D; GONZÁLEZ-FONTES, A. Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 997-1002, Dec. 2002.
- CARVALHO, G. R. et al. Efeito do ácido giberélico e benzilaminopurina no crescimento *in vitro* de embriões do cafeeiro cv. Acaiá. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 847-851, jun. 1998.

- COELHO, S. V. B et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, jun. 2015.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café**, Safra 2016 - Terceiro levantamento, setembro 2016. Brasília: Conab, v. 3, n. 3, p. 1-108, set. 2016.
- CORRALES, I.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Boron-induced amelioration of aluminium toxicity in a monocot and a dicot species. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 504-513, mar. 2008.
- COX, C. Boric acid and borates. **Journal of Pesticide Reform**, v. 24, p. 10-15, 2004.
- DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 152, n. 4, p. 465-512, Dec. 2006.
- DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A Scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, British Columbia, v. 14, p. 335-345, Apr. 1981.
- DUSSERT, S. et al. Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. **Physiologia Plantarum**, Poznan, v. 127, p. 192-204, June 2006.
- EIRA, M. T. S. et al. Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 11, p. 97-105, 1999.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behavior?: I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, Sept. 1990.
- \_\_\_\_\_. An intermediate category of seed storage behavior?: II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, p. 653-657, May 1991.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./Dec. 2011.
- FIGUEIREDO, M. A. de. **Secagem e resfriamento de sementes de *Coffea arabica* L. visando à criopreservação**. 2016. 198 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- FREITAS, R. T. et al. Cryopreservation of *Coffea arabica* L. Zygotic Embryos by Vitrification. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, Cluj-Napoca, v. 44, n. 2, p. 445-451, Jul. 2016

FRIEDMAN, J.; WALLER, G. R. Caffeine hazards and their prevention in germinating seeds of coffee (*Coffea arabica* L.). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 9, p. 1099-1106, Aug. 1983a.

\_\_\_\_\_. Seeds as allelopathic agents. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 9, p. 1107-1117, Aug. 1983b.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. **Practice**. 2<sup>nd</sup>. ed. Edington: Exegetics, Part 2, 1361p., 1996.

GUIMARÃES, R. J. **Formação de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.): efeitos de reguladores de crescimento e remoção do pergaminho na germinação de sementes e do uso de N e K em cobertura, no desenvolvimento de mudas**. 1995. 133 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

GUIMARÃES, R. J. et al. Efeitos da citocinina, giberelina e remoção do endocarpo na germinação de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.22, n.3, p. 390-396, jul. 1998.

HANAOKA, K. Antioxidant effects of reduced water produced by electrolysis of sodium chloride solutions. **Journal of Applied Electrochemistry**, Athens, v. 31, 1307-1313, Dec. 2001.

HANAOKA, K. et al. The mechanism of enhanced antioxidant effects against superoxide anion radicals of reduced water produced by electrolysis. **Biophysical Chemistry**, Saint Louis, v. 107, p. 71-82, Jan. 2004.

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**, Saint Louis, v.47, p. 169-183, 1998.

HIRAOKA, A. et al. Studies on the properties and real existence of aqueous solution systems that are assumed to have antioxidant activities by the action of 'active hydrogen'. **Journal of Health Science**, Tokyo, v. 50, n. 5, p. 456-465, Oct. 2004.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Interspecific variation in seed storage behavior within two genera – *Coffea* e *Citrus*. **Seed and Science Technology**, Los Baños, v. 23, p. 165-181, 1995.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA/CNPQ/CBAP, Brasília, DF, v. 2, p. 371- 393, 1998.

ILLG, R. D. Metodologia de seleção *in vitro* para resistência a fatores causadores de estresse. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. **Anais...** Brasília: ABCTP/ EMBRAPA, 1986. p.45-47.

INFORME ESTATÍSTICO DO CAFÉ. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/estatisticas> > Acesso em 5 de ago. 2016.

KIGEL, J.; GALILI, G. E. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: M. Dekker, 1995. 853 p.

JESUS, A. M. S. et al. Avaliação do efeito das concentrações de sacarose e dos estádios de desenvolvimento do fruto no cultivo in vitro de embriões de frutos de cafeeiro. **Revista ceres**, Viçosa, Brasil, v. 58 n. 6, p. 679-684, nov./dez. 2011.

KIKUTI, A. L. P. et al. Aplicação de antioxidantes em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) visando à preservação da qualidade. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 663-671, jul./ago. 2002.

LLOYD, J. D. Borates and their biological applications. **The International Research Group on Wood Preservation**. Doc IRG/WP 98-30178. IRG Secretariat Stockholm, Sweden, 1998. 25 p.

LUKASZEWSKI, K. M.; BLEVINS, D. G. Root growth inhibition in boron deficient or aluminum-stressed squash may be a result of impaired ascorbate metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 1135-1140, Nov. 1996.

LONDOÑO, L.; OROZCO, F. Métodos de propagación de cafetos mediante cultivo in vitro. **Cenicafé**, Manizales, v. 37, n. 4, p. 119-133, oct./dic.1986.

MACIEL, A. L. R. **Micropropagação do cafeeiro por embriogênese somática via biorreator de imersão temporária**. 2011. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in relation evaluation for seedling emergence vigor. **Crop Science**, Mississippi, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. (FEALQ. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 12). Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MURASHIGE T.; SKOOG F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 15, p. 473-479, July 1962.

NABLE, R. O.; BAÑUELOS, G. S.; PAULL, J. G. Boron toxicity. **Plant and Soil**, v. 198, p. 181-198, June 1997.

NAIDU, M. M.; SREENATH, H. L. In vitro culture of coffee zygotic embryos for germplasm conservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 55, p. 227-230, Dec. 1999.

OLIVEIRA, C. F. et al. Deterioração de sementes de espécies brasileiras de *Eugenia* em função da incidência e do controle de fungos. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, p. 520-532, 2011.

OLIVEIRA A. B. et al. Seed priming effects on growth, lipid peroxidation, and activity of ROS scavenging enzymes in NaCl-stressed sorghum seedlings from aged seeds. **Journal of Plant Interactions**, Turim, v. 7, n. 2, p. 151-159, June 2012.

- PARISI, J. J. D. et al. Viability of *Inga vera* Willd. subsp. *Affinis* (DC.) T.D. Penn. embryos according to the maturation stage, fungal incidence, chemical treatment and storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, p. 70-76, 2013.
- PAMMENTER N. W.; ADAMSON J. H.; BERJAK P. Viability of stored seed: extension by cathodic protection. **Science**, Washington, v. 186, n. 4169, p. 1123-1124, Dec. 1974.
- PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; DUTRA, L. F. **Aplicações no melhoramento genético de plantas**. Curso de Pós-Graduação 'Lato Sensu' (Especialização) à distância: Cultura de Tecidos Vegetais: Tecnologia e aplicações. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 79 p.
- PASQUAL, M. **Propagação de plantas ornamentais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 80 p.
- PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P. Cultura de embriões. **Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas**, v. 9, p. 2-12, 1988.
- PASQUINI, S. et al. Seed storage in polyethylene bags of a recalcitrant species (*Quercus ilex*): analysis of some bio-energetic and oxidative parameters. **Acta Physiologia Plantarum**, Poznan, v. 34, n.1, Apr. 2012.
- PEREIRA, A. R. et al. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. acaia cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 332-336, mar./abr. 2007.
- PEREIRA, C. E. et al. Determinação de inibidores da germinação no espermoderma de sementes de café. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 306-311, 2002.
- PINTO, M. S. et al. Cryopreservation of coffee zygotic embryos: dehydration and osmotic rehydration. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 40, n. 4, p. 380-389, Aug. 2016.
- PFEFFER, H.; DANNEL, F.; RÖMHELD, V. Are there connections between phenol metabolism, ascorbate metabolism and membrane integrity in leaves of boron-deficient sunflower plants? **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 479-485, Nov. 1998.
- QIN, G. Z. et al. Crucial role of antioxidant proteins and hydrolytic enzymes in pathogenicity of *Penicillium expansum*. **Molecular & Cellular Proteomics**, Irvine, v. 6, p. 425-438, Mar. 2007.
- QIN, G. Z. et al. Inhibitory effect of boron against *Botrytis cinerea* on table grapes and its possible mechanisms of action. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 145-150, Mar. 2010.
- REIS, C. R. R. et al. Physiological quality of *Garcidia sepium* (Jacq.) Steud. (Leguminosae - Papilionoideae) seeds subjected to different storage conditions. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 36, p. 229-235, 2012.
- RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 26-40, jun. 1985.

RICALDONI, M. A. **Ação antioxidante da água catódica: estudos preliminares em sementes de café.** 2016. 47 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 1, n. 2, p. 499-514, 1973.

RODRIGUES, P. H. V. et al. Acclimatization of micropropagated *Heliconia bihai* (Heliconiaceae) plants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 3, p. 299-301, June 2005.

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

ROSA, S. D. V. F. et al. Inibição do desenvolvimento in vitro de embriões de *Coffea* por cafeína exógena. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 3, p. 177-184, dez. 2006.

ROSA, S. D. V. F. et al. Formação de mudas de *Coffea arabica* L., cv Rubi, utilizando sementes e frutos em diferentes estádios de desenvolvimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 349-356, abr. 2007a.

ROSA, S. D. V. F. et al. Pré-embebição acelera germinação e crescimento de plântulas e reduz cafeína exógena em sementes de cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 2, n. 1, p. 69-78, jan./jun. 2007b.

ROSA, S.D.V.F. et al. Staging coffee seedling growth: a rationale for shortening the coffee seed germination test. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.38, n.2, p.421-431, July 2010.

ROSA, S.D.V.F. et al. The effect of storage conditions on coffee seed and seedling quality. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 39, n. 1, p. 151-164, Apr. 2011.

RUIZ, J. M.; RIVERO, R. M.; ROMERO, L. Boron increases synthesis of glutathione in sunflower plants subjected to aluminum stress. **Plant and Soil**, v. 279, p. 25-30, Jan. 2006.

SANTANA-BUZZY, N. et al. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Chesterfield, v. 43, n. 6, p. 507-520, Aug. 2007.

SANTOS, M. R. A. et al. Acclimatization of micropropagated plantlets of *Coffea canephora*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Palmas, v. 5, n. 1, Feb. 2014.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 101, n. 1, Jan. 1993.

SCHWEMBER, A. R.; BRADFORD, K. J. Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, p. 4423-4436, Aug. 2010.

SEE, A. S. et al. Risk and health effect of boric acid. **American Journal of Applied Sciences**. v.7, n. 5, p. 620-627, May 2010.

SERSHEN, B. V.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Cryo-tolerance of zygotic embryos from recalcitrant seeds in relation to oxidative stress – a case study on two amaryllid species. **Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 169, p. 999-1011, July 2012a.

SERSHEN, B. V. et al. Rate of dehydration, state of subcellular organization and nature of cryoprotection are critical factors contributing to the variable success of cryopreservation: studies on recalcitrant zygotic embryos of *Haemanthus montanus*. **Protoplasm**, Hudson, v. 24, p. 171-186, Jan. 2012b.

SHIRAHATA, S. et al. Electrolyzed-reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Martinsried, v. 234, p. 269-274, May 1997.

SILVA, C. V. et al. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n.2, p. 213-221, jun. 2003.

SILVA, E. A. A. et al. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* L. cv. Rubi) seed germination. **Planta**, New York, v. 220, p. 251-261, Dec. 2004.

SILVA, R. C.; VIEIRA, E. S. N.; PANOBIANCO, M. Técnicas para superação da dormência de sementes de guanandi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 49, n. 9, p. 719-727, set. 2014.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: Metabolism and functions of a multifaceted molecule. **Current Opinion in Plant Biology**, Saint Louis, v. 3, p. 229-235, Dec. 2000.

SMITH, M.T.; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation tolerant and desiccation-sensitive seeds. In: G. Galili & J. Kigel (eds.). **Seed development and germination**. Marcel Dekker Inc., New York, p. 237-271, 1995.

SMITH; M. A. L.; PALTA, J. P.; MCCOWN, B. H. Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling, and greenhouse-grown Asian white birch. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 111, n.3, p. 437-442, May 1986.

SOUZA, F. F. et al. **Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia**. Porto Velho, 2003. 23 p.

SOUZA, M. M.; CARDOSO, E. J. B. N. Practical method for germination of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. ktze, seeds. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 2, p. 389-391, abr./jun. 2003.

THOMIDIS, T.; EXADAKTYLOU, E. Effect of boron on the development of brown rot (*Monilinia laxa*) on peaches. **Crop Protection**, Oxford, v. 29, n.6, p. 572-576, June 2010.

- VALIO, I. F. M. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 2, n. 100, p. 983-991, Sep. 1976.
- \_\_\_\_\_. Inhibition of germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo) by the endocarp. **Journal of Seed Technology**, East Lansing, v. 5, n. 1, p. 32-39, Jan. 1980.
- VANDENABEELE, J. D. S. et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 57 n. 5, p. 779-795, May 2000.
- VASIL, I. K.; THORPE, T. A. **Plant Cell and Tissue Culture**. Springer Science & Business Media, 2013. 594 p.
- WALLER, G. R. et al. Caffeine autotoxicity in *Coffea arabica* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES. **The science of allelopathy**, New York: J. Wiley, 1986. p. 243-263.
- WARDLE, K.; DOBBS, E. B.; SHORT, K. C. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Watsonville, v. 108, p. 386-389, 1983.
- WOODS, W.G. An introduction to boron: History, sources, uses, and chemistry. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 5-11, Nov. 1994.
- WESLEY-SMITH, J. et al. The influence of water content, cooling and warming rate upon survival of embryonic axes of *Poncirus trifoliata* L. **Cryo Letters**, Lewes, v. 25, p. 129-138, Feb. 2004.
- ZEMKE, J. M. et al. Avaliação de substratos para inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de videira micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1309-1315, nov. 2003.

### APÊNDICE – Tabela das Análises de Variância

**Tabela 1A** Resumo da análise de variância dos resultados de porcentagens de prostração radicular (PR), de plântulas normais (PN) e de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC) de sementes de café fracionadas e inteiras, com dois níveis de qualidade e submetidas a tratamento antioxidante.

FV	GL	Quadrados Médios		
		PR	PN	FC
Fracion. (F)	1	612,5000**	16653,1250**	18672,7813**
Qualidade (Q)	1	544,5000**	4232,0000**	4347,7813**
Antioxidante (A)	3	9,2083	47,2500*	110,8646**
F x Q	1	120,1250**	253,1250**	318,7813**
Q x A	1	18,0833	259,7500**	186,3646**
F x A	3	22,5833*	98,3750**	58,8646**
F x Q x A	3	31,3750*	306,8750**	232,3646**
Erro	16	6,2500	11,1875	9,0313
CV (%)	-	2,85	5,77	5,97

\*\* e \*: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

**Tabela 2A** Resumo da análise de variância dos resultados de diâmetro do caule (DM), altura do hipocótilo (AH), massa seca da raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA) e de porcentagem de emergência (E) de mudas de café produzidas de sementes fracionadas e inteiras, com dois níveis de qualidade e submetidas ao tratamento antioxidante.

FV	GL	Quadrados Médios				
		DM	AH	MSR	MSPA	E
Fracion. (F)	1	6,1276**	3626,3044**	0,0095**	0,6275**	16882,0313**
Qualidade (Q)	1	2,3582**	1816,1611**	0,0003	0,0137	10332,0313**
Antioxidante (A)	3	0,0507	30,4306	0,0000	0,0068	100,7813
F x Q	1	2,1606**	2093,7082**	0,0013**	0,0007	2719,5313**
Q x A	1	0,0181	63,9570*	0,0004*	0,0192**	109,1146
F x A	3	0,0239	18,8551	0,0001	0,0061	50,7813
F x Q x A	3	0,0441	19,6455	0,0005*	0,0120**	88,2813
Erro	16	0,0240	16,9893	0,0001	0,0034	64,8438
CV (%)	-	16,00	15,69	38,87	37,17	14,77

\*\* e \*: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

**Tabela 3A** Resumo da análise de variância dos resultados de porcentagem de presença de raiz (PR), de presença de folha (PF), de germinação (G), comprimento do hipocótilo (TM) e comprimento da raiz (TR) de plântulas de café oriundas de embriões extraídos de sementes com diferentes níveis de qualidade, após diferentes preparos e tratados com diferentes antioxidantes.

FV	GL	Quadrados Médios				
		PR	PF	G	TM	TR
Qualidade (Q)	1	752,0833	1518,7500**	2002,0833**	0,2596**	0,0394
Protocolo (P)	1	6768,7500**	1752,0833**	13668,7500**	1,1563**	18,0381**
Antioxidante (A)	3	5756,2500**	15508,3333**	4800,0000**	0,9218**	9,0672**
Q x P	1	2552,0833**	5002,0833**	2002,0833**	0,2041**	3,1904**
P x A	1	2031,2500**	1408,3333**	1075,0000*	0,1037**	1,4202*
Q x A	3	2639,5833**	1225,0000**	2558,3333**	0,2739**	3,7882**
Q x P x A	3	1589,5833**	3033,3333**	508,3333	0,0861**	2,2131**
Erro	16	271,5278**	197,9167**	252,0833	0,0140	0,3856
CV (%)	-	33,37	32,00	27,92	22,04	47,03

\*\* e \*: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.