



MARINA CHAGAS COSTA

**STUDIES ON THE FEASIBILITY OF CRYOPRESERVATION
OF *Coffea* sp. SPECIES**

**LAVRAS - MG
2024**

MARINA CHAGAS COSTA

**STUDIES ON THE FEASIBILITY OF CRYOPRESERVATION OF *Coffea*
sp. SPECIES**

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

Pesq. Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

**LAVRAS - MG
2024**

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

Costa, Marina Chagas.

Studies on the feasibility of cryopreservation of *Coffea* sp.
species / Marina Chagas Costa. - 2024.

114 p. : il.

Orientador(a): Stella Dellysette Veiga Franco da Rosa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Criogenia. 2. Nanopartículas. 3. Eletroforese de enzimas. I.
Rosa, Stella Dellysette Veiga Franco da. II. Título.

MARINA CHAGAS COSTA

**STUDIES ON THE FEASIBILITY OF CRYOPRESERVATION OF *Coffea*
sp. SPECIES**

**ESTUDOS SOBRE A VIABILIDADE DA CRIOPRESERVAÇÃO DE *Coffea* sp.
ESPÉCIES**

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

APROVADA em 14 de dezembro de 2023.

Dr. Luciano Coutinho Silva	UFPB
Dra. Lilian Padilha	Embrapa Café
Dra. Michele Valquiria dos Reis	UFLA
Dra. Heloisa Oliveira dos Santos	UFLA

Pesq. Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

**LAVRAS - MG
2024**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar pelo melhor caminho, por me dar sabedoria, força e esperança para seguir os meus sonhos.

Ao meu pai, Tarcísio, por sempre me apoiar em todas as minhas decisões e ser o meu exemplo de ser humano.

À minha mãe, Adelaide, por contribuir com a minha evolução, me ensinando a ser paciente e uma pessoa melhor.

Aos meus irmãos, Mariana, Gabriela e Álvaro, por todo amor e carinho.

Aos meus avós, Maria Aparecida, Maria Leonor, Sebastião e Haroldo, o meu agradecimento pelas orações e por estarem sempre ao meu lado. Como sou privilegiada por crescer tendo vocês comigo!

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, mesmo com a distância física.

À Universidade Federal de Lavras, por todas as oportunidades e suporte. Essa instituição me tornou a profissional que sou hoje e me abriu diversas portas.

À minha orientadora pesquisadora da Embrapa, Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, por me ensinar e incentivar sempre, não me deixando desistir e sempre me apoiando. Sem você eu jamais seria o que sou hoje, obrigada pelos conselhos e pela amizade.

A todos os membros do grupo de orientados da pesquisadora Sttela, por toda ajuda e amizade, em especial à Stefânia, Ana Luiza e Fernando, pelas constantes ajudas. Sem vocês eu jamais poderia concluir esse trabalho.

Aos professores, pesquisadores e funcionários do Setor de Sementes, pela disponibilidade, ajuda e conhecimentos transmitidos.

Às pesquisadoras Lilian Padilha, da Embrapa, e Juliana Schenk Martinati, pela ajuda durante a realização das pesquisas e auxílio durante a condução dos testes.

Às pesquisadoras da Embrapa Instrumentação, Maria Alice Martins e Elaine Cristina Paris pela ajuda na condução dos testes com os pergaminhos de café e as nanopartículas.

Aos pesquisadores Poliana Fernanda Giachetto e Felipe Rodrigues, da Embrapa Agricultura Digital, por toda a ajuda com as análises dos transcritos, em especial à Poliana, por me ensinar tanto sobre bioinformática.

Ao Dr. Thomas Lubberstedt, pela oportunidade de trabalho no seu grupo de pesquisa e por disponibilizar as ferramentas necessárias para a conclusão de parte da tese na *Iowa State University*. Agradeço também à sua orientada Ann Murithi, pelos ensinamentos, ajuda e amizade.

Ao meu namorado, Darren, por todo apoio e paciência durante essa reta final.

À toda a equipe do Programa de Pós-Graduação e do Departamento de Agricultura, pela ajuda, atenção e colaboração. Em especial à Marli, por estar sempre disponível para nos ajudar.

Às agências de fomento Capes e CNPq, à Embrapa e ao Consórcio Café, por permitirem que esse trabalho fosse realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

RESUMO

Para garantir a sustentabilidade da cafeicultura a longo prazo, é fundamental que a diversidade genética seja preservada. Porém, sementes do gênero *Coffea* sp possuem baixa longevidade quando conservadas *ex situ*, colocando em risco a variabilidade genética existente. A criopreservação é uma alternativa que vem sendo amplamente pesquisada para espécies que produzem sementes intermediárias e recalcitrantes, sendo que para *Coffea arabica* já é conhecido um protocolo de criopreservação seguro para o armazenamento das sementes. O objetivo principal deste trabalho foi explorar novas técnicas utilizadas durante a criopreservação e compreender o comportamento da espécie *Coffea arabica* durante o processo, visando obter um protocolo seguro para criopreservar sementes de *Coffea canephora*. O trabalho foi dividido em três estudos, sendo o primeiro sobre a investigação do uso da solução crioprotetora PVS2 em sementes do gênero *Coffea* sp, visando possibilitar a criopreservação de sementes de *Coffea canephora*. A solução de PVS2 não foi tóxica, porém, não protegeu as sementes dos danos do congelamento nos protocolos testados. Durante o estudo foi descoberta a importância do pergaminho na proteção das sementes durante o contato direto com o nitrogênio líquido. Quando analisados, os pergaminhos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* apresentaram diferente composição química e morfologia. No segundo estudo, foi investigado o uso de nanopartículas de hidroxiapatita e de óxido de ferro em diferentes concentrações nas sementes das espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* visando o uso destas durante o processo de criopreservação. Os resultados mostraram que as nanopartículas estudadas não são tóxicas quando utilizadas nas concentrações testadas e podem influenciar positivamente a qualidade das sementes, podendo ser usadas durante o processo de criopreservação. No terceiro estudo, foi feita a análise da expressão gênica de sementes criopreservadas de *Coffea arabica*, com o objetivo de melhor entender os mecanismos envolvidos na tolerância à ultrabaixas temperaturas durante o processo de criopreservação. De acordo com os resultados, sementes secadas em sílica gel até 17% de umidade possuem um sistema de sinalização mais eficiente aos estresses, resultado em maior sobrevivência após a criopreservação.

Palavras-chave: Criogenia. Nanopartículas. Eletroforese de enzimas. Transcriptoma.

ABSTRACT

To guarantee the long-term sustainability of coffee growing, genetic diversity must be preserved. However, seeds of the *Coffea* sp genus have low longevity when preserved ex-situ, putting the existing genetic variability at risk. Cryopreservation is an alternative that has been widely researched for species that produce intermediate and recalcitrant seeds, and for *Coffea arabica*, a safe cryopreservation protocol for seed storage is already known. The main objective of this work was to explore new techniques used during cryopreservation and to understand the behavior of the *Coffea arabica* species during the process, to obtain a safe protocol for cryopreserving *Coffea canephora* seeds. The work was divided into three studies, the first of which investigated the use of the PVS2 cryoprotectant solution in seeds of the *Coffea* sp genus, to enable the cryopreservation of *Coffea canephora* seeds. The PVS2 solution was not toxic, but it did not protect the seeds from freezing damage in the protocols tested. During the study, the importance of parchment in protecting seeds during direct contact with liquid nitrogen was discovered. When analyzed, the parchments of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* showed different chemical compositions and morphology. In the second study was investigated the use of hydroxyapatite and iron oxide nanoparticles in different concentrations in the seeds of the *Coffea arabica* and *Coffea canephora* species, to use them during the cryopreservation process. The results showed that the nanoparticles studied were non-toxic when used in the concentrations tested and could positively influence seed quality and be used during the cryopreservation process. In the third study, the gene expression of cryopreserved *Coffea arabica* seeds was analyzed to better understand the mechanisms involved in tolerance to ultra-low temperatures during the cryopreservation process. According to the results, seeds dried in silica gel at up to 17% moisture content have a more efficient stress signaling system, resulting in greater survival after cryopreservation.

Keywords: Cryogenics. Nanoparticles. Enzyme electrophoresis. Transcriptome.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	11
1	INTRODUÇÃO	11
	REFERÊNCIAS.....	13
	CAPÍTULO 2 ESTUDOS DE CRIOPRESERVAÇÃO COM VITRIFICAÇÃO CELULAR EM SEMENTES DE CAFÉ.....	16
1	INTRODUÇÃO	18
2	MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1	Colheita dos frutos e processamento das sementes de café.....	21
2.2	Local e condução dos experimentos.....	21
2.3	Criopreservação com vitrificação - Teste 1.....	22
2.3.1	Secagem das sementes	22
2.3.2	Vitrificação das sementes e imersão no nitrogênio líquido.....	22
2.3.3	Avaliações fisiológicas e determinação do teor de água das sementes.....	23
2.4	Criopreservação com vitrificação - Teste 2.....	23
2.4.1	Tratamento de vitrificação das sementes e imersão no nitrogênio líquido	24
2.4.2	Expressão eletroforética de isoenzimas	24
2.4.3	Delineamento experimental e análises estatísticas.....	24
2.5	Criopreservação com vitrificação - Teste 3.....	25
2.5.1	Tratamento de vitrificação das sementes e imersão no nitrogênio líquido	25
2.5.2	Delineamento experimental e análises estatísticas.....	25
2.6	Criopreservação de semente de <i>C. arabica</i> e <i>C. canephora</i> com e sem pergaminho – Teste 4	25
2.6.1	Caracterização química e determinação do teor de água dos pergaminhos	26
2.6.2	Espectroscopia na Região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	27
2.6.3	Análise termogravimetria dos pergaminhos (TGA/DTA)	28
2.6.4	Análise ultraestrutural dos pergaminhos em microscopia eletrônica de varredura	28
2.6.5	Delineamento experimental e análises estatísticas.....	28
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1	Criopreservação com vitrificação - Teste 1.....	30
3.2	Criopreservação com vitrificação - Teste 2.....	32
3.3	Criopreservação com vitrificação – Teste 3	39

3.4	Criopreservação de sementes com e sem pergaminho – Teste 4.....	43
4	CONCLUSÕES.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	CAPÍTULO 3 ESTUDOS EXPLORATORIOS DO USO DE NANOPARTÍCULAS ÓXIDO DE FERRO E HIDROXIAPATITA NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE CAFÉ.....	60
1	INTRODUÇÃO	62
2	MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1	Colheita dos frutos e processamento das sementes de café.....	64
2.2	Secagem das sementes	64
2.3	Tratamento das sementes em suspensão de nanopartículas.....	65
2.4	Determinação do teor de água e avaliações fisiológicas	65
2.5	Delineamento experimental e análises estatísticas.....	66
2.6	Composição elementar das sementes por meio de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva (MEV-EDS)	66
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
3.1	Avaliações Fisiológicas	67
3.2	Composição elementar das sementes por microscopia eletrônica de varredura e Espectroscopia por energia dispersiva (MEV-EDS).....	71
4	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	CAPÍTULO 4 ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN <i>COFFEA ARABICA</i> L. SEEDS SUBJECTED TO CRYOPRESERVATION.....	80
1	INTRODUCTION	82
2	MATERIAL AND METHODS	84
2.1	Harvesting and processing coffee fruits and seeds	84
2.2	Drying the seeds	84
2.3	Seed cryopreservation	84
2.4	Determination of water content and physiological evaluations.....	85
2.5	Experimental design and statistical analysis.....	86
2.6	Total RNA extraction and cDNA synthesis	86
2.7	Treatment with DNase and pool of samples for RNASeq analysis	86
2.8	Obtaining transcriptomes, identification, and DEGs analysis	87
2.9	Functional analysis	87

3	RESULTS AND DISCUSSION	89
3.1	Evaluating the physiological quality of seeds	89
3.2	Transcriptomic analysis	89
3.2.1	Classification in Gene Ontology Terms	91
3.2.2	Classification of DEGs into metabolic pathways	99
3.2.3	Signaling systems	101
4	CONCLUSIONS	104
	REFERENCES	106
	APÊNDICES	109

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Pertencente à família Rubiaceae, o gênero *Coffea* possui mais de 140 espécies descritas originárias do continente africano (DAVIS *et al.*, 2011; GUYOT *et al.*, 2020). Dentre essas espécies, apenas duas são cultivadas e de interesse econômico: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre. As demais espécies não possuem valor comercial, no entanto, são de grande valor em programas de melhoramento genético devido a enorme variabilidade genética (VAN DER VOSSSEN; BERTRAND; CHARRIER, 2015).

É fundamental que essa diversidade genética seja preservada para garantir a sustentabilidade da cafeicultura em longo prazo. O desenvolvimento e o lançamento de novas cultivares depende dessa diversidade mantida em bancos de germoplasma, como principais fontes para os programas de melhoramento genético (NASS *et al.*, 2008), na busca de genótipos mais adaptados, resistente às pragas e doenças, tolerantes aos estresses ambientais, além de plantas mais produtivas (DULLOO *et al.*, 2009).

Atualmente, a diversidade genética do gênero *Coffea* é conservada *in situ* e *in vivo*, como plantas vivas mantidas em coleções de germoplasma em campo. Entretanto, essa metodologia requer grandes extensões de terra e envolve altos custos de manutenção, além do fato de que as plantas permanecem vulneráveis ao ataque de pragas e doenças, desastres climáticos, erosão genética, o que pode subitamente dizimar toda a coleção (DUSSERT *et al.*, 2012).

Por outro lado, a baixa longevidade das sementes de café é um fator limitante para a conservação *ex situ* em longo prazo, colocando em risco a variabilidade genética existente. As sementes do gênero *Coffea* possuem diferentes graus de tolerância à dessecação, podendo ter comportamento recalcitrante ou intermediário, o que inviabiliza seu armazenamento em bancos de sementes convencionais (graus de umidades de $5 \pm 2\%$ e temperaturas de -18 a -20 °C) e, também, perdem rapidamente o vigor quando conservadas em câmaras frias e secas ($10-15$ °C e 45% de umidade relativa) (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990; ABDELNOUR-ESQUIVEL *et al.*, 1992; DUSSERT *et al.*, 1997; DUSSERT *et al.*, 2012).

Os bancos de sementes são instituições relativamente novas, uma vez que surgiram no século XX e foram legalizados após a Convenção sobre Diversidade Biológica de 1992. Esses bancos de sementes são considerados guardiões da biodiversidade, porém, não são apenas um reservatório de recursos naturais, pois envolvem conhecimentos específicos para garantir a qualidade das sementes armazenadas (PELLEGRINI; BALATTI, 2016). As sementes

consideradas intermediárias a recalcitrantes ainda não são armazenadas nesses bancos, permanecendo em riscos, sendo necessário o desenvolvimento de métodos alternativos para a conservação em longo prazo (BARBEDO; CENTENO; RIBEIRO, 2013).

Para espécies ortodoxas, uma alternativa viável de se conservar o germoplasma vegetal é em bancos de sementes a temperatura em torno de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (WALTERS, 2015). Entretanto, as recalcitrantes são sensíveis à dessecação e ao armazenamento em temperaturas negativas.

Uma alternativa para o armazenamento seguro de recursos genéticos de *C. arabica* por período prolongado é a criopreservação a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (FIGUEIREDO *et al.*, 2017; COELHO; ROSA, FERNANDES, 2017), que permite a conservação segura de recursos genéticos vegetais a longo prazo, oferecendo um *backup* para coleções atualmente mantidas em campo e armazenando materiais com genes que poderão ser importantes para solucionar desafios futuros (REED, 2017).

Um protocolo seguro foi desenvolvido e validado para a criopreservar sementes de *C. arabica* (COELHO *et al.*, 2017; COELHO; ROSA; FERNANDES, 2017; DUSSERT *et al.*, 1998, 2001, 2002, 2003; DUSSERT; ENGELMANN, 2006; FIGUEIREDO *et al.*, 2017, 2021; SOUZA *et al.*, 2024). Entretanto, para sementes de *C. canephora*, ainda existem muitas dúvidas sobre o comportamento durante a criopreservação, e a técnica ainda necessita de ajustes em cada etapa do processo. Essas sementes têm tolerância menor quando comparadas às de arábica, dificultando a adequação de métodos para cada etapa do processo de criopreservação, devido sua maior sensibilidade a dessecação e a temperaturas abaixo de zero (PAMMENTER; BERJAK, 2014).

Ajustar uma metodologia em cada etapa do processo de criopreservação, como a desidratação, preparo, resfriamento e reaquecimento, é crucial para o sucesso da técnica, garantindo a sobrevivência das sementes após a imersão segura no nitrogênio líquido. Por meio de estudos avançados associados à criogenia, técnicas envolvendo nanotecnologia (*nanowarming*), a vitrificação celular e o encapsulamento (*encapsulation-dehydration*), a criopreservação de diferentes explantes de espécies vegetais tem sido possível (COELHO *et al.*, 2015, 2017, 2018, 2019; COELHO; ROSA; FERNANDES, 2017; FIGUEIREDO *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2016; MORAIS, 2023; PINTO *et al.*, 2016). Assim, o objetivo deste trabalho foi explorar novas técnicas e a análise de bases moleculares ligadas às respostas ao processo de criopreservação, visando a obtenção de protocolo seguro para a conservar sementes de *C. canephora*.

REFERÊNCIAS

- ABDELNOUR-ESQUIVEL, A. *et al.* Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. **CryoLetters**, Cambridge, v. 13, n. 5, p. 297-302, 1992.
- BARBEDO, C.J.; CENTENO, D.C.; RIBEIRO, R.C.L.F. Do recalcitrant seeds really exist? **Hoehnea**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 583-593, 2013.
- 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**, v. 50, n. 6, p. 483–491, 2015.
- COELHO, S. V. B. *et al.* Cryopreservation in *Coffea canephora* Pierre seeds: Slow and fast cooling. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 6, p. 588–597, 1 nov. 2018.
- COELHO, S. V. B. *et al.* Cryopreservation of “*Coffea canephora*” Pierre ex A. Froehner seeds: importance of drying rate and moisture content. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 8, p. 1335–1342, 1 ago. 2019.
- COELHO, S. V. B. *et al.* Tolerância de sementes de *Coffea arabica* L. a temperaturas sub zero. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 41, n. 3, p. 312–321, 1 maio 2017.
- COELHO, S. V. B.; ROSA, S. D. V. F.; FERNANDES, J. S. Cryopreservation of coffee seeds: A simplified method. **Seed Science and Technology**, v. 45, n. 3, p. 638–649, 2017.
- DAVIS FLS, A. P. *et al.* Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, p. 357-377, 2011.
- DULLOO, M. E. *et al.* Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. **Crop Science**, v. 49, n. 6, p. 2123-2138, 2009.
- DUSSERT, S. *et al.* Basis of coffee seed sensitivity to liquid nitrogen exposure: Oxidative stress or imbibitional damage? **Physiologia Plantarum**, v. 119, n. 4, p. 534–543, dez. 2003.
- DUSSERT, S. *et al.* Biologie de la conservation des semences de caféiers: aspects fondamentaux et conséquences pratiques: une revue. **Cahiers Agricultures**, Les Ulis, v. 21, n. 2-3, p. 106-114, 2012.
- DUSSERT, S. *et al.* Cryopreservation of *Coffea* (Coffee). In: TOWILL, L. E.; BAJAJ, Y. P. S. (Eds.). **Cryopreservation of Plant Germplasm II**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002. p. 220–233.
- DUSSERT, S. *et al.* Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, v. 8, n. 1, p. 9–15, 19 mar. 1998.

- DUSSERT, S. *et al.* Quantitative estimation of seed desiccation sensitivity using a quantal response model: Application to nine species of the genus *Coffea* L. **Seed Science Research**, v. 9, n. 2, p. 135–144, 1999.
- DUSSERT, S. *et al.* Tolerance of coffee (*Coffea spp.*) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition, and cooling procedure. 2001.
- DUSSERT, S. *et al.* Variability in storage response within a coffee (*Coffea spp.*) core collection under slow growth conditions. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 16, n. 5, p. 344–348, Feb., 1997.
- DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. New determinants of coffee (*Coffea arabica* L.) seed tolerance to liquid nitrogen exposure. **Cryoletters**, v. 27, n. 3, p. 169–78, 2006.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour?: I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 9, p. 1167–1174, Sept., 1990.
- FIGUEIREDO, M. A. de *et al.* Estudos exploratórios para a criopreservação de sementes de *Coffea arabica* L. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 2, p. 150–158, 1 abr. 2017.
- FREITAS, R. T. de *et al.* Cryopreservation of *Coffea arabica* L. zygotic embryos by vitrification. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 44, n. 2, p. 445–451, 2016.
- GUYOT, R. *et al.* WCSdb: A database of wild *Coffea* species. **Database**, v. 0, 2020.
- MORAIS, P. I. C. **Advances in the cryopreservation of Coffea canephora seeds.** 2023. 67 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2023.
- NASS, L.L. *et al.* Pré-melhoramento de germoplasma vegetal. *In*: NASS, L. L. (Org). **Recursos genéticos vegetais.** Brasília: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, 2008. p. 683-716.
- PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. **International Journal of Plant Sciences**, v. 175, n. 1, jan. 2014.
- PELLEGRINI, P. A.; BALATTI, G. E. Noah's arks in the XXI century. A typology of seed banks. **Biodiversity and Conservation**, v. 25, n. 13, p. 2753–2769, 1 dez. 2016.
- PINTO, M. DE S. *et al.* Criopreservação de embriões zigóticos de cafeeiro: Desidratação e reidratação osmótica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 4, p. 380–389, 01 jul. 2016.
- REED, B. M. Plant cryopreservation: a continuing requirement for food and ecosystem security. **In Vitro Cellular and Developmental Biology.** New York LLC: Plant Springer 1, 2017.

SOUZA, A. C. *et al.* Steps of cryopreservation of coffee seeds: physiological responses and antioxidant systems. **Ciência Rural**, v. 54, n. 2, 2024.

VAN DER VOSSEN, H.; BERTRAND, B.; CHARRIER, A. Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review. **Euphytica**, Wageningen, v. 204, n. 2, p. 243-256, 2015.

WALTERS, C. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. **Planta**, Berlin, v. 242, n. 2, p. 397-406, 2015.

CAPÍTULO 2 ESTUDOS DE CRIOPRESERVAÇÃO COM VITRIFICAÇÃO CELULAR EM SEMENTES DE CAFÉ

RESUMO

A criopreservação é a técnica mais promissora para a conservação de recursos genéticos vegetais para espécies que produzem sementes recalcitrantes ou intermediárias, assim como as do gênero *Coffea*. O objetivo desse estudo foi investigar diferentes protocolos visando a criopreservação segura de sementes de *Coffea canephora* Pierre. No experimento foram realizados cinco testes utilizando sementes de *Coffea arabica* ou *Coffea canephora*. Foi estudado o efeito da exposição das sementes à plant vitrification solution 2 (PVS2) em diferentes tempos, variando de 0 a 240 minutos e a qualidade das sementes foram submetidas aos testes de tetrazólio e de germinação, onde foram avaliadas a viabilidade e porcentagem de protusão radicular, de plantas normais aos 30 dias e de plantas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias de germinação. Foi feita também a análise eletroforética das enzimas catalase (CAT), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) e esterase (EST). Durante a execução do trabalho foi constatada a importância do pergaminho durante o processo de criopreservação, sendo estudadas também, as características químicas, físicas e morfológicas dos pergaminhos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. Foi constatado que a solução de PVS2, em ambos os testes, não é tóxica para as sementes nos protocolos utilizados. Porém, essa solução não foi eficiente para protegê-las contra os estresses durante as etapas da criopreservação, resultando em baixíssima ou nenhuma sobrevivência após o processo. Foi possível observar a expressão das enzimas EST e CAT somente no tratamento controle e em sementes com imersão direta em nitrogênio líquido. Já para a enzima GOT, uma baixa intensidade de bandas foi observada somente nos tratamentos com imersão em PVS2 e/ou nitrogênio líquido. Foi constatado que a presença do pergaminho é essencial para a criopreservação segura de sementes do gênero *Coffea* e que há diferenças na constituição química e na morfologia dos pergaminhos das duas espécies estudadas, podendo ser uma chave para desenvolver um protocolo seguro de criopreservação para estas sementes.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L. *Coffea canephora*. Criogenia. Qualidade fisiológica. PVS2.

ABSTRACT

Cryopreservation is the most promising technique for conserving plant genetic resources for species that produce recalcitrant or intermediate seeds, such as those of the *Coffea* genus. The aim of this study was to investigate different protocols for the safe cryopreservation of *Coffea canephora* Pierre seeds. Five tests were carried out using *Coffea arabica* and *Coffea canephora* seeds. The effect of exposing the seeds to plant vitrification solution 2 (PVS2) at different times, ranging from 0 to 240 minutes, was studied and the quality of the seeds was subjected to tetrazolium and germination tests, which assessed viability and the percentage of root protrusion, normal plants at 30 days and plants with expanded cotyledonary leaves at 45 days of germination. Electrophoretic analysis of the enzymes catalase (CAT), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) and esterase (EST) was also carried out. During the work, the importance of parchment in the cryopreservation process was noted, and the chemical, physical and morphological characteristics of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* parchments were also studied. It was found that the PVS2 solution in both tests was not toxic to the seeds in the protocols used. However, this solution was not effective in protecting the seeds against stress during the cryopreservation stages, resulting in very low or no survival after the process. It was possible to observe the expression of the EST and CAT enzymes only in the control treatment and in seeds that were directly immersed in liquid nitrogen. As for the GOT enzyme, a low intensity of bands was observed only in the treatments with immersion in PVS2 and/or liquid nitrogen. It was found that the presence of parchment is essential for the safe cryopreservation of *Coffea* genus seeds, and that there are differences in the chemical constitution and morphology of the parchments of the two species studied, which could be a key to developing a safe cryopreservation protocol for these seeds.

Keywords: *Arabica coffee*. Cryogenics. Physiological quality. PVS2.

1 INTRODUÇÃO

A conservação em nitrogênio líquido, a criopreservação, é a técnica mais propícia para a conservação de recursos genéticos vegetais para as espécies que produzem sementes recalcitrantes ou intermediárias, como as do gênero *Coffea* (TRIGIANO; GRAY, 2011; BERJAK; PAMMENTER, 2014). Suas principais vantagens são a segurança, a estabilidade, a necessidade de pouco espaço e manutenção, a possibilidade de armazenamento por longos períodos e os custos menores (ENGELMANN, 2004; DULLOO *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2011).

A criopreservação consiste na forma de conservação de material biológico em nitrogênio líquido à -196 °C, ou em sua fase de vapor (-150 °C), pois, sob essas temperaturas não ocorrem reações metabólicas, garantindo assim, a viabilidade do material armazenado sem que haja modificações ou alterações genéticas por um período indeterminado (KARTHA, 1985; SANTOS, 2004).

O protocolo para criopreservação pode variar conforme o material biológico a ser utilizado, a espécie, e ainda entre as cultivares de uma mesma espécie (PANIS; SWENNEN; ENGELMAN, 2001; SANT *et al.*, 2008). A necessidade de ajustes no protocolo para cada material e a habilidade do tecido em sobreviver à desidratação e exposição a ultrabaixa temperatura são primordiais para alcançar o sucesso da técnica (BERJAK; PAMMENTER, 2007).

O principal desafio é evitar a formação de cristais de gelo intracelular, que podem causar a destruição das membranas (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005). Isso porque a água, ao congelar, forma estruturas irregulares e pontiagudas que, dependendo da extensão, perfuram membranas e as paredes celulares, causando a morte das células (WESLEY-SMITH *et al.*, 2015).

De acordo com vários autores (MAZUR, 2004; WESLEY-SMITH *et al.*, 2014), é provável que a formação de cristais de gelo em tecidos biológicos, que ocorre através da nucleação heterogênea e do congelamento de células hidratadas, seja iniciada por volta de -2 °C. Embora a nucleação homogênea ocorra a -40 °C, em temperaturas inferiores a -80 °C, a mobilidade molecular é ainda mais reduzida e o cristal de gelo não se forma (GONZALEZ-ARNAO *et al.*, 2008). Assim, na faixa de temperatura entre 0 a -80 °C, é onde a formação e o crescimento de cristais de gelo são possíveis. Durante o processo de criopreservação, as sementes são submetidas duas vezes a essas faixas de temperatura, no resfriamento e no

reaquecimento, antes e após a imersão no nitrogênio líquido, respectivamente (BERJAK; PAMMENTER, 2008).

A desidratação, o resfriamento e o reaquecimento dos materiais genéticos são as etapas que mais influenciam no processo de criopreservação de sementes e explantes de diferentes culturas, inclusive o café (COELHO; ROSA; FERNANDES, 2017).

A vitrificação tem se tornado uma das melhores técnicas para se prevenir a formação de cristais de gelo durante as etapas da criopreservação, reduzindo a possibilidade da ocorrência de danos nas membranas celulares, devido a redução da quantidade de água celular congelável (PANIS; LOMBARDI, 2005). A vitrificação pode ser alcançada com a redução da água congelável, intracelular ou extracelular, propiciando um estado vítreo, pela exposição de tecidos vegetais às misturas crioprotetoras concentradas e subsequente resfriamento muito rápido, geralmente por imersão direta no nitrogênio líquido (GONZALEZ-ARNAO *et al.*, 2008).

O estado vítreo é, portanto, formado pela indução da água remanescente presente nas células a um estado amorfo, metaestável, não cristalino e altamente concentrado (ENGELMANN, 2011), o que confere propriedades mecânicas de um sólido embora não haja formação de estruturas cristalinas (PAMMENTER; BERJAK, 2014). A viscosidade alcançada com a vitrificação é tão alta que paralisa o movimento molecular e, conseqüentemente, evita que moléculas de água individuais se juntem para formar grandes cristais de gelo. Além disso, a baixa mobilidade molecular inibe as reações químicas e metabólicas, efetivamente colocando o sistema em estase, o que evita processos prejudiciais associados ao envelhecimento das sementes (BENSON, 2008).

Após a desidratação com os crioprotetores, o material, ao ser mergulhado em nitrogênio líquido, durante a passagem do estado líquido para sólido, atinge o estado vítreo em temperatura específica para cada tipo de material (SAKAI, 1990). Em decorrência da altíssima viscosidade, todas as reações químicas que requerem a difusão molecular deixam de ocorrer, permitindo que as células adquiram em estado de dormência e estabilidade ao longo do tempo (BURKE, 1986). Uma solução de vitrificação, a PVS2 (*Plant Vitrification Solution 2*), foi formulada para se obter uma proporção adequada entre os crioprotetores, para uso em diferentes sistemas (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990).

Com a recente descoberta da importância do pergaminho na tolerância de sementes de *C. arabica* à imersão no nitrogênio líquido, torna-se relevante investigar também, características físicas, biofísicas e químicas do pergaminho das duas espécies, para alcançar avanços para a obtenção de protocolos de criopreservação seguros para as sementes de *C. canephora*.

Assim, muito embora um protocolo de criopreservação para sementes de *C. arabica* tenha sido desenvolvido e validado (COELHO *et al.*, 2017; COELHO; ROSA; FERNANDES, 2017; DUSSERT *et al.*, 1998, 2001, 2002, 2003; DUSSERT; ENGELMANN, 2006; EIRA *et al.*, 2006; FIGUEIREDO *et al.*, 2017, 2021; SOUZA *et al.*, 2024), para sementes de *C. canephora*, a sobrevivência após o preparo e a imersão no nitrogênio líquido ainda é baixa e muitas vezes com resultados discrepantes (COELHO *et al.*, 2018, 2019; MORAIS, 2023). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a criopreservação de sementes de *C. canephora* com vitrificação, testando diferentes métodos de secagem e de preparo para a imersão no nitrogênio líquido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Colheita dos frutos e processamento das sementes de café

Frutos das espécies *C. canephora* Pierre, cultivar Aboatã, e de *C. arabica* L., cultivar Catuaí amarelo, foram obtidos em lavouras da Fazenda Experimental da Fundação Procafé, em Varginha, MG, nas safras 2019/2020 e 2020/2021. Frutos da espécie *C. arabica* L., cultivar Mundo Novo, foram obtidos em lavouras da Universidade Federal de Lavras, na safra 2019/2020.

Os frutos no estágio de maturação cereja foram seletivamente colhidos nos ramos médios das plantas e nas partes medianas destes ramos e, após a colheita, novamente selecionados para a retirada de impurezas, frutos verdes e sobremaduros, para a uniformização do estágio de maturação antes de serem descascados mecanicamente. As sementes foram desmuciladas por fermentação em água durante 24 horas para a espécie *C. arabica*, e durante 48 horas para a espécie *C. canephora*, em temperatura ambiente e, posteriormente, pré-secadas à sombra para a retirada da umidade superficial.

2.2 Local e condução dos experimentos

Após colheita e processamento, as sementes foram armazenadas em câmara fria e seca (15 °C e 45%UR), até a realização dos experimentos no Laboratório Central de Pesquisa em Sementes, do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

As sementes foram submetidas às avaliações iniciais, de determinação do teor de água inicial pelo método de estufa a 105 °C (BRASIL, 2009) e da qualidade fisiológica inicial, por meio do teste de germinação (BRASIL, 2009) e viabilidade de sementes no teste de tetrazólio (CLEMENTE *et al.*, 2011).

Trabalhos anteriores de criopreservação sem vitrificação das sementes de *C. canephora* resultaram em baixa sobrevivência, máxima de 43% de germinação (COELHO *et al.*, 2018; MORAIS, 2023). Assim, nos experimentos foram utilizadas técnicas de vitrificação, primeiramente em sementes de *Coffea arabica*, para, posteriormente, serem testadas nas sementes de *Coffea canephora*.

2.3 Criopreservação com vitrificação - Teste 1

2.3.1 Secagem das sementes

Sementes de *C. arabica*, cultivar Mundo Novo foram secadas em camada única sobre telas metálicas em caixas de acrílico do tipo gerbox, contendo 80 mg de sílica gel ativada em seu interior e abaixo das telas. No decorrer da secagem, a sílica foi trocada a cada 24 horas. Os recipientes foram mantidos em câmaras do tipo B.O.D, em temperatura constante de 25 °C. A perda de água durante a secagem foi monitorada por pesagens contínuas em balança de precisão de 0,001 g, até que as sementes atingissem os teores de umidade de interesse, de 17% e 37% (base úmida). Após atingirem os teores de água de interesse e antes da preparação para a imersão em nitrogênio líquido, as sementes foram submetidas aos testes fisiológicas, para avaliação dos efeitos da secagem, antes das etapas de vitrificação e criopreservação.

2.3.2 Vitrificação das sementes e imersão no nitrogênio líquido

Sementes sem pergaminhos foram imersas em *Loading Solution* (solução de carregamento, Sacarose 0,4 M + Glicerol 2 M) durante 120 minutos. Posteriormente, foram tratadas em solução PVS2 (*Plant Vitrification Solution 2*, Glicerol 30% + Etilenoglicol 15% + DMSO 15% + Sacarose 0,4 M) no gelo, em duas concentrações, padrão (sem diluição) e ½ força (diluída 50%), durante quatro tempos (30, 60, 120, 180 minutos). Após serem retiradas da solução PVS2, as sementes foram acondicionadas em sacos de filó e imersas em nitrogênio líquido, proporcionando resfriamento ultrarrápido, em velocidade aproximada de -200 °C/minuto (DUSSERT *et al.*, 2001).

Após retiradas do nitrogênio líquido, as sementes foram reaquecidas em banho-maria a 40 °C, por 2 minutos (DUSSERT *et al.*, 1998) e, posteriormente, secadas em papel toalha para a retirada superficial da solução de vitrificação e, então, colocadas na *Recovery Solution* (solução de descarregamento, Sacarose 1,2 M), durante 60 minutos. Após esses procedimentos foram lavadas em água corrente e submetidas às avaliações fisiológicas. Além desses tratamentos de vitrificação, foi também utilizado o protocolo de criopreservação de Coelho *et al.* (2017) para *C. arabica*, em que as sementes secadas em sílica gel até 17% bu foram diretamente imersas no nitrogênio líquido e reaquecidas em banho-maria por dois minutos. Como tratamento controle sementes imersas somente na *Loading e Recovery solution*, sem o PVS2, durante os mesmos tempos da vitrificação e sem imersão no nitrogênio líquido foram utilizadas.

2.3.3 Avaliações fisiológicas e determinação do teor de água das sementes

- a) Determinação do teor de água das sementes: realizada pelo método de estufa a 105 °C, durante 24 horas (BRASIL, 2009), com duas repetições de 10 sementes, e os resultados expressos em porcentagem com base no peso úmido das sementes.
- b) Teste de germinação: realizado com quatro repetições de 25 sementes de cada tratamento, semeadas em papel de germinação, umedecido com água em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. As sementes foram mantidas em germinador, em 30 °C, sendo a porcentagem de plântulas normais avaliada após 30 dias, segundo as prescrições das RAS (BRASIL, 2009). No teste de germinação determinou-se também a porcentagem de plântulas normais fortes aos 30 dias, sendo computadas como fortes aquelas que apresentavam alça hipocotiledonar com três centímetros ou mais, e porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias após a semeadura.
- c) Teste de tetrazólio: foram utilizadas quatro repetições de cinco sementes, as quais foram embebidas em água destilada por período de 48 horas, a 30 °C (CLEMENTE *et al.*, 2011). Após a embebição os embriões foram removidos com o auxílio de bisturi, evitando-se danos aos mesmos. Para a coloração os embriões foram imersos em solução de tetrazólio a 0,5%, na ausência de luz, por período de três horas, a 30 °C, quando foram avaliados, sendo os resultados expressos em porcentagem de sementes viáveis.

2.3.4 Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 x 4, sendo duas umidades das sementes, PVS2 com duas forças e quatro tempos de exposição à solução PVS2, com quatro repetições para cada tratamento. Foi realizada análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de *Skott-Knott*, a 5% de probabilidade.

2.4 Criopreservação com vitrificação - Teste 2

Sementes de *C. arabica*, cultivar Mundo Novo foram secadas da mesma forma descrita no primeiro teste, até 17% bu e após secagem foram submetidas à avaliação fisiológica e determinação da umidade, conforme já descrito.

2.4.1 Tratamento de vitrificação das sementes e imersão no nitrogênio líquido

Sementes sem pergaminho foram submetidas ao tratamento de vitrificação, adotando-se os tempos que propiciaram os melhores resultados no primeiro teste. Inicialmente as sementes foram imersas na solução de carregamento durante 240 minutos e, posteriormente, imersas em solução PVS2, durante 120 e 240 minutos, sempre mantidas em gelo. Em seguida, as sementes foram retiradas da PVS2, acondicionadas em sacos de filó e imersas no nitrogênio líquido (DUSSERT *et al.*, 2001). Após a retirada do nitrogênio líquido, as sementes reaquecidas em banho-maria a 40 °C por dois minutos (DUSSERT *et al.*, 1998) foram secadas em papel toalha para retirada da água superficial e colocadas na solução de descarregamento durante 240 minutos. Antes das avaliações, parte das sementes foi lavada em água corrente por 24 horas e outra parte foi avaliada sem lavagem. Utilizou-se também, sementes secadas em sílica gel até 17% bu e imersas diretamente no nitrogênio líquido (COELHO *et al.*, 2017).

2.4.2 Expressão eletroforética de isoenzimas

Para a análise bioquímica, foram utilizadas 10 sementes maceradas para cada tratamento. As amostras foram acondicionadas, identificadas e armazenadas em deep-freezer a -86 °C até a realização das análises eletroforéticas de isoenzimas. A metodologia proposta por Alfenas (2006) foi utilizada para extração, corrida eletroforética e revelação das isoenzimas catalase (CAT), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) e esterase (EST).

2.4.3 Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 x 2, sendo dois tempos de imersão em solução PVS2, sementes com e sem a lavagem em água corrente, e com e sem a imersão em nitrogênio líquido, com quatro repetições. Foi feita a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de *Skott-Knott*, a 5% de probabilidade.

A interpretação dos resultados obtidos para as isoenzimas nas análises bioquímicas foi realizada levando-se em consideração a presença/ausência e a intensidade das bandas nos géis.

2.5 Criopreservação com vitrificação - Teste 3

Sementes da cultivar Catuaí Amarelo IAC 62 foram secadas em sílica gel até o teor de água de 17% bu. Após secagem e antes da imersão no nitrogênio líquido, as sementes foram submetidas à avaliação fisiológica e à determinação do teor de água.

2.5.1 Tratamento de vitrificação das sementes e imersão no nitrogênio líquido

As sementes sem pergaminhos foram imersas em solução de carregamento durante 240 minutos e imersas em solução PVS2 por 120 ou 240 minutos, sempre mantidas em gelo. Após a imersão nas soluções de vitrificação, as sementes foram diretamente imersas em nitrogênio líquido, em sacos de filó. Após a retirada do nitrogênio, as sementes foram descongeladas em banho-maria, 40 °C por dois minutos (DUSSERT et al., 1998) e secadas superficialmente em papel toalha antes do descarregamento na *Recovery Solution* por 240 minutos. Sementes lavadas e não lavadas em água corrente por 24 horas foram avaliadas pelos testes fisiológicos e determinação do teor de água. Sementes com 17% bu, secadas rapidamente em sílica gel também foram utilizadas

2.5.2 Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 x 2, sendo dois tempos de imersão em solução PVS2, sementes com e sem a lavagem em água e, sementes com e sem a imersão em nitrogênio líquido, com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as medias comparadas pelo teste de *Skott-Knott*, a 5% de probabilidade.

2.6 Criopreservação de semente de *C. arabica* e *C. canephora* com e sem pergaminho – Teste 4

Nos três testes anteriores, de criopreservação com vitrificação de sementes de *C. arabica*, foi observado que em todos os tratamentos não houve sobrevivência das sementes. Nestes testes, foram utilizadas sementes sem os pergaminhos e, uma vez que o protocolo já validado prescreve a criopreservação com a manutenção dos pergaminhos, neste teste as sementes de *C. arabica* e de *C. canephora* foram utilizadas com e sem pergaminhos.

Sementes de *C. arabica*, cultivar Catuaí Amarelo IAC 62 foram secadas até 17% bu e de *C. canephora*, cultivar Apatã foram secadas até 20% bu, conforme já descrito. Uma parte das sementes foi mantida com pergaminho e outra parte teve os pergaminhos retirados manualmente, antes de serem imersas em nitrogênio líquido por 30 minutos, 24 horas e sete dias. Após a permanência no criotank, as sementes foram reaquecidas em banho-maria a 40 °C, por dois minutos (DUSSERT et al., 1998), secadas em papel toalha para retirada da água superficial e submetidas à avaliação da qualidade fisiológica, por meio dos testes descritos anteriormente. Além dessas avaliações, as seguintes determinações foram realizadas nos pergaminhos das sementes das duas espécies.

2.6.1 Caracterização química e determinação do teor de água dos pergaminhos

Foram utilizados pergaminhos de ambas as espécies com 40% de umidade e pergaminhos retirados de sementes criopreservadas com 17% de umidade para *C. arabica* e 20% de umidade para *C. canephora*.

- a) Determinação do teor de água: determinado utilizando-se balança Marte ID50 com massa de 1g de pergaminho à temperatura de 100 °C até massa constante. As análises foram realizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio/LNNA, da Embrapa Instrumentação - São Carlos/SP.
- b) Determinação do teor de cinzas: realizado segundo a norma NREL/TP 510-42618 para Biomassa, em cadinho previamente pesado com 1g de pergaminho. Em forno tipo Mufla seguiu-se a seguinte programação: temperatura ambiente até 200 °C a 10 °C/min., mantido por 120 minutos; temperatura de 200 °C até 650 °C a 10°C/min., mantido por 180 minutos; resfriamento até a temperatura ambiente. O teor de cinzas foi calculado após determinação do peso final.
- c) Determinação do teor de extrativos: realizado segundo a norma NREL com adaptações. A extração foi feita em água destilada e, também, em hexano. Utilizou-se 2g de pergaminho, alojados em aparato Soxhlet, contendo 120 mL do líquido e manteve-se em refluxo por seis horas. Após este tempo, o material foi recolhido e deixado em capela de exaustão para eliminação de resíduo de solvente. Posteriormente foi colocado em estufa a 70 °C até temperatura constante.
- d) Determinação do teor de lignina insolúvel: foi utilizado o procedimento descrito na norma TAPPI T13m-54. Os pergaminhos foram secos por 24 horas a 50 °C, colocado 1 g em béquer contendo 20 mL de solução de ácido sulfúrico 72% (m/m), sob agitação

em temperatura ambiente por 24 horas. O volume foi transferido para um balão de fundo redondo de 500 mL e adicionado de 306 mL de água destilada. A suspensão foi deixada sob refluxo por quatro horas. Logo após, fez-se uma filtração a vácuo usando-se um funil de vidro sinterizado previamente seco e pesado. O funil com a lignina insolúvel foi seco em estufa a 100 °C por 24 h e pesado.

- e) Determinação do teor de holocelulose (hemicelulose + α -celulose): foi utilizado o procedimento descrito na norma TAPPI T19m-54. Os pergaminhos foram secos por 24 horas em 50 °C, pesados 3g e transferidos para um erlenmeyer com 120 mL de água destilada, 1,0 mL de ácido acético e 2,5g de clorito de sódio, sob agitação a 70°C. Após uma hora, foram adicionados mais 1,0 mL de ácido acético e 2,5g de clorito de sódio e, depois de mais uma hora, esse procedimento foi repetido. Decorridas três horas, resfriou-se em banho de gelo por aproximadamente 30 minutos e, em um funil de placa sinterizada limpo e seco, a mistura foi filtrada, lavada com água destilada até pH neutro. O funil com a holocelulose foi seco em estufa a 100 °C por 24 h e pesado.
- f) Determinação do teor de α -celulose: foi utilizado o procedimento descrito na norma TAPPI T19m-54. Um grama da holocelulose seca foi transferida para um almofariz, adicionou-se 15,0 mL de solução NaOH 17,5% e triturou-se com um pistilo por oito minutos. Em seguida, foram adicionados mais 10 mL da solução e deixou-se a mistura em repouso por 20 minutos, quando foi adicionado 40 mL de água destilada, filtrada em funil de placa sinterizada e o material retido foi lavado com água destilada e seco em estufa a 100 °C.
- g) Teor de hemicelulose: foi determinado pela diferença entre os teores de holocelulose e de α -celulose.

2.6.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os ensaios por espectroscopia na região do infravermelho foram realizados com o objetivo de caracterizar os grupos químicos presentes nas amostras de pergaminhos de sementes de *C. arabica* e de *C. canephora*. Os espectros foram obtidos empregando a técnica de refletância total atenuada, a partir das amostras de pergaminhos secos colocados diretamente em um acessório tipo ATR Horizontal, acoplado em um equipamento Vertex 70 Bruker Optics, configurado para 32 varreduras de 4.000 a 400 cm^{-1} , e com resolução de 4 cm^{-1} .

A FTIR funciona como uma operação matemática, convertendo o interferograma (espectro no domínio do tempo: intensidade versus tempo) para o espectro final (espectro no domínio da frequência: intensidade versus frequência).

2.6.3 Análise termogravimetria dos pergaminhos (TGA/DTA)

Com intuito de investigar a estabilidade térmica das amostras de pergaminhos de *C. arabica* e *C. canephora*, foram realizados os ensaios de termogravimetria (TGA/DTA) no equipamento SDT 650 da TA Instruments. As condições dos ensaios foram: temperatura ambiente a 700 °C, com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, massa aproximada da amostra de 10 mg, atmosfera inerte com nitrogênio, com fluxo na balança e na amostra de 100 mL/min.

2.6.4 Análise ultraestrutural dos pergaminhos em microscopia eletrônica de varredura

Os pergaminhos foram imersos em solução fixativa Karnovsky modificado (glutaraldeído 25%, formaldeído 10% em tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7,2). Após imersão nessa solução, os pergaminhos foram armazenados em câmara fria a 10°C até a realização das análises em microscópio eletrônico de varredura (MEV). As amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,05M (três vezes de 10min.), pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por uma hora e posteriormente desidratadas em uma série ascendente de concentração de acetona (30, 50, 70, 90 e 100% por três vezes). Foi utilizado um aparelho de ponto crítico (BAL-TEC CPD 030) para fazer a desidratação final das sementes. As amostras obtidas foram montadas em suportes de alumínio, com fita de carbono de dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro em um aparelho de Sputter (BAL-TEC SCD 050) e observadas no microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. As imagens foram geradas pelo aparelho e registradas digitalmente, com aumentos variáveis, nas condições de trabalho de 20Kv e distância de trabalho entre 7 e 8 mm.

2.6.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Os dados das avaliações fisiológicas foram analisados separadamente para cada espécie, em esquema fatorial 2 x 3, sendo sementes com e sem pergaminhos e três tempos de imersão em nitrogênio líquido, com quatro repetições. Os dados das avaliações fisiológicas e de composição química foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de *Skott-Knott*, a

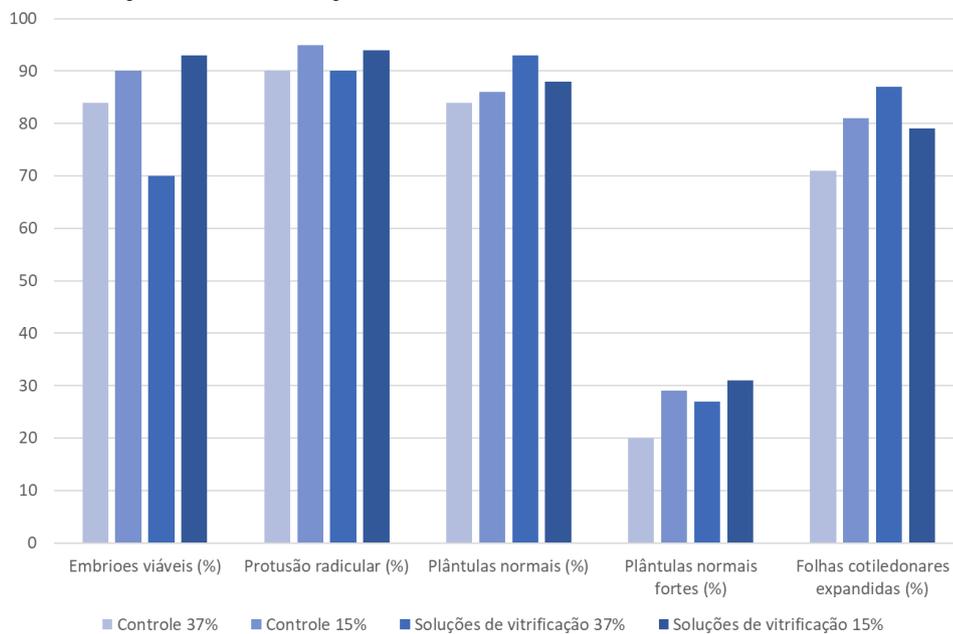
5% de probabilidade. Os resultados dos testes ultraestrutural, FTIR e TGA não foram analisados estatisticamente, mas às comparações entre as espécies *C. arabica* e *C. canephora*, foram feitas por interpretação visual.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Criopreservação com vitrificação - Teste 1

A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada antes da imersão em soluções de vitrificação e antes da criopreservação (controle) e após a imersão somente nas soluções de vitrificação (FIGURA1).

Figura 1 - Porcentagem de sementes viáveis, protusão radicular, plântulas normais, plântulas normais fortes e plântulas com folhas cotilédonares expandidas de *Coffea arabica* com 37% e 15% de umidade no tratamento controle e no tratamento imersão somente nas soluções de vitrificação.



Fonte: Da autora (2023).

Na análise estatística dos dados da avaliação das sementes criopreservadas com 15% de umidade não houve efeito significativo dos fatores estudados, umidade, força e tempo de exposição da solução PVS2 nos resultados fisiológicos, exceto efeito isolado da força do PVS2 na viabilidade no teste de tetrazólio, sendo observado maior porcentagem de sementes viáveis em sementes tratadas com PVS2 com força total (TABELA 1).

Tabela 1 - Efeito da força de exposição à solução de PVS2 sobre a porcentagem de sementes de *Coffea arabica* viáveis no teste de tetrazólio.

Força do PVS2	Sementes viáveis (%)
Padrão	59 a
½ força	40 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Já as sementes secadas até 37% de umidade não sobreviveram em qualquer dos tratamentos, enquanto para as sementes secadas até 15% houve uma sobrevivência extremamente baixa, sem diferença significativa entre os tratamentos. Embora sem diferenças significativas, os dados são apresentados na Tabela 2, tendo em vista o caráter exploratório dos testes realizados.

Tabela 2 - Porcentagem de germinação de sementes de *Coffea arabica* secadas em diferentes umidades e expostas a solução de PVS2 em diferentes condições.

Tempo de exposição ao PVS2	Plântulas Normais (%)			
	PVS2		PVS2 (½ Força)	
	Umidade das sementes (% bu)			
	15	37	15	37
30 minutos	1	0	1	0
60 minutos	1	0	1	0
120 minutos	0	0	1	0
180 minutos	2	0	0	0

Fonte: Da autora (2023).

Para a criopreservação ser bem-sucedida é necessário que o material vegetal seja suficientemente desidratado antes de ser exposto ao nitrogênio líquido para evitar o congelamento e a formação de cristais de gelo intracelular (MATSUMOTO, 2017). Devido a isso, as sementes secadas até 37% provavelmente não sobreviveram à criopreservação, mesmo quando tratada com PVS2, que supostamente poderia reduzir a água intracelular, devido ao volume de água congelável ainda disponível nas células.

Os protocolos para a criopreservação podem variar de acordo com o tipo de material que irá ser criopreservado e cada etapa quando otimizada pode ter um impacto positivo na recuperação do material vegetal (REED, 2017). Na criopreservação, o teor de água é um fator crucial para o sucesso do armazenamento no nitrogênio líquido, pois em determinado nível, a água se expande ao congelar-se e forma cristais de gelo pontiagudos que podem danificar as

células causando morte celular (WESLEY-SMITH *et al.*, 2014). Entretanto, a secagem, obrigatória para a retirada da água congelável pode causar um estresse nas sementes recalcitrantes, causando danos ao metabolismo celular devido a produção acentuada de radicais livres (BERJAK; PAMMENTER, 2013).

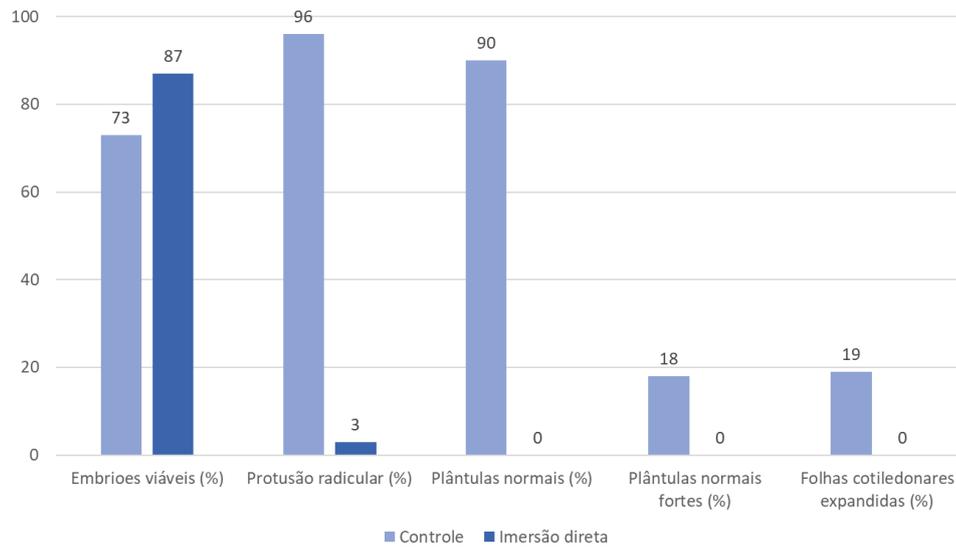
Em seu trabalho com ápices caulinares de *Lamprocapnos spectabilis* L. Fukuhara, uma planta perene ornamental, Kulus (2020) observou que a PVS2 quando utilizado em meia força não foi capaz de fazer uma desidratação eficiente das células, o que não permitiu a sobrevivência após a criopreservação. Pode ter ocorrido o mesmo nesse experimento, uma vez que, observando o resultado do teste de tetrazólio, é possível observar, embora baixa, uma maior viabilidade em embriões tratados com PVS2 com força total (TABELA 1).

Freitas *et al.* (2016) e Pinto *et al.* (2016) obtiveram sucesso na criopreservação de embriões de *C. arabica*. O primeiro trabalho utilizou a técnica de vitrificação, já o segundo testou a criopreservação de embriões em diferentes umidades. Apesar do sucesso da criopreservação de embriões, a criopreservação de sementes se mostra mais vantajosa, pois se ganha tempo já que não é necessário a extração dos embriões e o cultivo dos embriões, permitindo que o processo seja mais prático, rápido, necessitando de menos mão de obra e recursos.

3.2 Criopreservação com vitrificação - Teste 2

Foi avaliada a qualidade fisiológica das sementes antes da criopreservação (controle) e de sementes imersas diretamente no nitrogênio líquido, sem imersão na solução de PVS2 (FIGURA 2).

Figura 2- Porcentagem de sementes viáveis, protusão radicular, plântulas normais, plântulas normais fortes e plântulas com folhas cotiledonares expandidas de *Coffea arabica* no tratamento controle e no tratamento imersão direta em nitrogênio líquido.



Fonte: Da autora (2023).

Na análise de variância dos dados, houve interação significativa dos fatores lavagem em água corrente, imersão no nitrogênio líquido e tempo no de PVS2, para os resultados de sementes viáveis no teste de tetrazólio (TABELA 3). Sem a imersão no nitrogênio líquido, as sementes expostas as soluções de vitrificação apresentaram maior porcentagem de sementes viáveis no teste de tetrazólio, não havendo influência da lavagem em água corrente. Este resultado demonstra que a imersão em soluções de vitrificação não afetou a viabilidade das sementes, mas o nitrogênio líquido, sim. Já quando as sementes expostas as soluções de vitrificação e imersas no nitrogênio, a lavagem em água corrente foi prejudicial a viabilidade das sementes (TABELA 3).

Com relação à exposição a PVS2, o melhor resultado no teste de tetrazólio ocorreu nas sementes criopreservadas após exposição por 120 minutos, e não foram lavadas em água corrente. Já no tempo de exposição de 240 minutos, não houve diferença entre os tratamentos com ou sem lavagem em água corrente (TABELA 3).

Tabela 3 - Efeito da interação entre os fatores lavagem em água corrente e imersão em nitrogênio líquido ou tempo na PVS2 em sementes de *Coffea arabica* viáveis no sal de tetrazólio.

Sementes viáveis		
(%)		
Lavagem água corrente	Com imersão no nitrogênio	Sem imersão no Nitrogênio
Com lavagem	66 Bb	90 Aa
Sem lavagem	88 Aa	94 Aa
Tempo na PVS2		
Lavagem água corrente	120 min	240 min
Com lavagem	75 Ba	81 Aa
Sem lavagem	96 Aa	85 Ab

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Os fatores tempo na PVS2, imersão em nitrogênio líquido e lavagem em água corrente foram significativos, porém, não houve interações significativas entre eles para a variável protrusão radicular. Sendo assim, maior protrusão radicular foi observada em sementes expostas a PVS2 por 120 minutos; em sementes que não foram imersas no nitrogênio líquido e; em sementes que foram lavadas em água corrente (TABELA 4).

Tabela 4 - Efeito do tempo de exposição na solução de PVS2, da imersão no nitrogênio líquido e da lavagem em água corrente sobre a protrusão radicular de sementes de *Coffea arabica*.

Protrusão Radicular	
(%)	
Tempo na PVS2	
120 minutos	54 A
240 minutos	41 B
Imersão no nitrogênio líquido	
Com imersão	15 B
Sem imersão	80 A
Lavagem em água corrente	
Com lavagem	53 A
Sem lavagem	42 B

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Na análise de variância dos dados de plântulas normais no teste de germinação, houve interação significativa entre os fatores tempo de exposição a PVS2 e imersão no nitrogênio líquido. A maior germinação, de 92,0%, foi observada em sementes que foram expostas a PVS2

por 120 minutos, sem a imersão em nitrogênio líquido. Já as sementes imersas ao nitrogênio líquido, independentemente do tempo de exposição a PVS2, apresentaram baixa ou nenhuma sobrevivência (TABELA 5).

Tabela 5 - Efeito do tempo de exposição na solução de PVS2 sobre a porcentagem de germinação e de plântulas normais fortes de *Coffea arabica*.

Plântulas Normais		
(%)		
Tempo na PVS2	Com imersão no nitrogênio	Sem imersão no nitrogênio
120	0 Ab	92 Aa
240	1 Ab	65 Ba

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Prudente *et al.* (2019) constataram redução gradativa na emergência de embriões de *Passiflora ligularis* com o aumento no tempo de exposição à solução de PVS2 sem imersão em nitrogênio líquido. Neste trabalho foram testados diferentes tempos de exposição à solução, sendo o tempo máximo de 120 minutos.

No presente trabalho, as sementes submetidas a qualquer tratamento de criopreservação não apresentaram plantas normais fortes, uma vez que não apresentaram sobrevivência. Sem a imersão no nitrogênio líquido, houve um percentual de 16% de plântulas normais fortes após lavagem em água corrente. (TABELA 6).

Tabela 6 - Efeito da interação entre lavagem em água corrente e imersão em nitrogênio líquido na porcentagem de plântulas normais fortes de *Coffea arabica*.

Plântulas normais fortes		
(%)		
Lavagem Água corrente	Com imersão no nitrogênio	Sem imersão no nitrogênio
Com lavagem	1 Ab	16 Aa
Sem lavagem	0 Ab	5 Ba

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Na análise dos dados de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, constatou-se interação tripla entre os fatores estudados, conforme dados das Tabelas 7 e 8. As sementes não criopreservadas (sem imersão no nitrogênio) e lavadas em água corrente após a exposição a soluções que induzem a vitrificação apresentaram porcentagens de plântulas com folhas cotiledonares expandidas superiores aos demais tratamentos, sendo o maior percentual, de 35%

nas sementes expostas à solução de PVS2 durante 120 minutos. Sem lavagem, estas sementes apresentaram 3 e 5% de plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 120 e 240 minutos de PVS2, respectivamente. Já as sementes expostas as soluções de vitrificação e imersas no nitrogênio líquido não apresentaram sobrevivência, sugerindo que não ocorreu o processo de vitrificação.

Tabela 7 - Efeito da interação entre o tempo de exposição à solução de PVS2 e a lavagem em água corrente, dentro de cada nível de imersão em nitrogênio líquido, sobre a porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas de *Coffea arabica*.

Plântulas com folhas cotiledonares expandidas (%)				
Tempo na PVS2	Com imersão no nitrogênio		Sem imersão no nitrogênio	
	Com lavagem*	Sem lavagem*	Com lavagem*	Sem lavagem*
120 minutos	0 Aa	0 Aa	35 Aa	3 Ab
240 minutos	1 Aa	0 Aa	11 Ba	5 Aa

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

*Lavagem em água corrente.

Fonte: Da autora (2023).

A imersão no nitrogênio líquido provocou a morte das sementes, independentemente do tratamento de vitrificação e de lavagem em água corrente (TABELA 8). Apenas as sementes submetidas à solução de PVS2 no menor tempo de exposição, de 120 minutos e lavadas antes das avaliações fisiológicas, apresentaram plântulas com folhas cotiledonares expandidas.

Tabela 8 - Efeito da interação entre a lavagem em água corrente após vitrificação e a imersão no nitrogênio líquido, dentro de cada nível de exposição na PVS2, sobre a porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas de *Coffea arabica*.

Plântulas com folhas cotiledonares expandidas (%)				
Imersão no nitrogênio	120 min na PVS2		240 min na PVS2	
	Com lavagem*	Com lavagem*	Com lavagem*	Com lavagem*
Com imersão	0 B	0 A	1 B	0 A
Sem imersão	35 A	3 A	11 A	5 A

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

A solução de PVS2 pode comprometer a viabilidade celular vegetal quando são expostas por longos períodos (BEKHEET *et al.*, 2020). No geral, as sementes que foram lavadas em água corrente, após a exposição a PVS2, apresentaram melhores resultados nos testes

fisiológicos, indicando que este pode ser uma alternativa para reduzir o efeito tóxico das soluções de vitrificação em maiores tempos de exposição.

Benelli *et al.* (2021) estudaram o uso de PVS2 em ápices caulinares de *Stevia rebaudiana* e concluíram que a solução afetou negativamente o potencial de crescimento dos brotos após 60 minutos de exposição e sugeriram a ocorrência de uma reação tóxica à exposição prolongada à solução. Os autores reforçam a importância de controlar as etapas de desidratação para evitar que ocorram lesões por toxicidade química ou até mesmo por estresse osmótico durante a desidratação química feita pela solução crioprotetora.

Os dois primeiros testes foram realizados para verificar os efeitos da vitrificação nas sementes de *Coffea arabica*. Nos testes realizados foi constatado que a exposição às soluções de vitrificação não causa danos às sementes, desde que realizada no menor tempo de exposição à solução de PVS2, de 120 minutos. Assim, na tentativa de melhor entender as causas de morte das sementes, realizou-se a expressão em gel de eletroforese, das isoenzimas catalase (CAT), glutamato oxaloacetato (GOT) e esterase (EST) (FIGURA 3).

Maior atividade da CAT foi observada nas sementes do tratamento controle, ou seja, antes de serem expostas à solução de PVS2 ou antes da criopreservação. Esse tratamento também foi o que resultou em sementes com melhor qualidade fisiológica. De acordo com Coelho *et al.* (2015), maior expressão da enzima CAT foi relacionada com a redução da qualidade fisiológica de sementes de café e Brandão Junior *et al.* (2002) também constataram o aumento da atividade e de bandas em sementes de café danificadas ou envelhecidas. Porém, no presente trabalho, a maioria dos protocolos testados para criopreservação resultaram em morte das sementes, o que pode explicar a falta de atividade da CAT na maioria dos tratamentos.

Observou-se também uma pequena expressão da CAT nas sementes que foram imersas diretamente em nitrogênio líquido, sem utilização do PVS2. Ressalta-se que esse protocolo foi o melhor encontrado para criopreservação das sementes de *C. arabica* L., de acordo com Figueiredo *et al.* (2017 e 2021), que encontraram germinação acima de 80,0% para essa espécie.

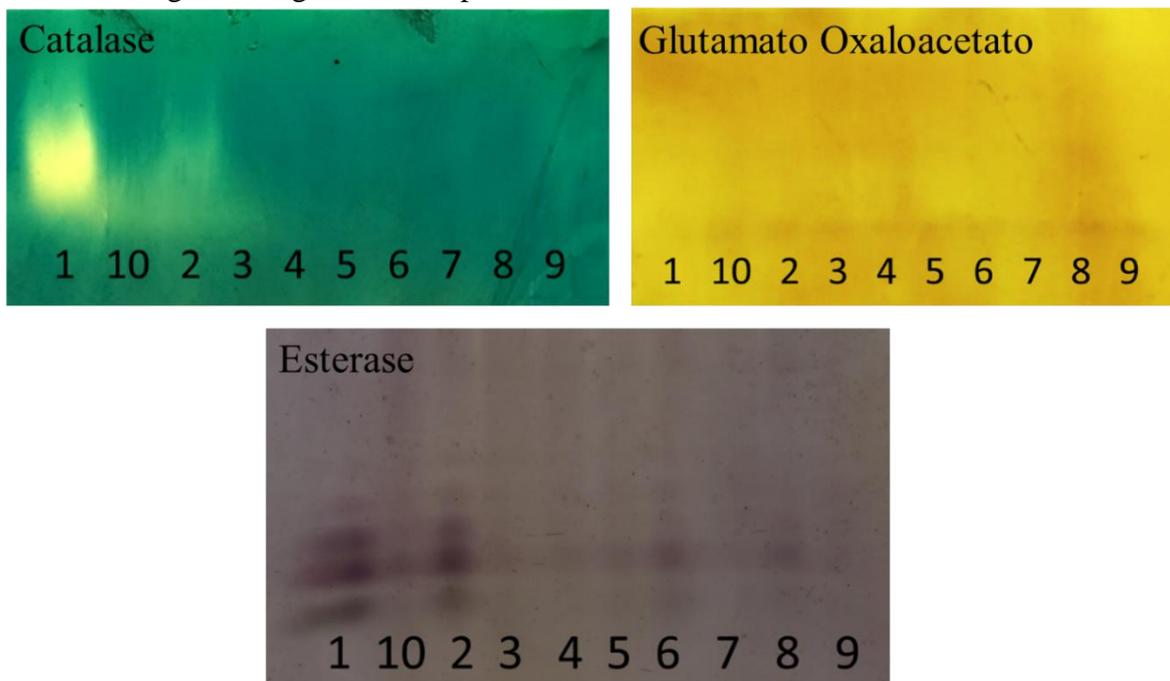
De acordo com Brandão Júnior *et al.* (2002), ocorre uma diminuição na atividade da CAT em sementes de café que apresentam menor desempenho fisiológico, resultante de dessecação. Em *C. canephora*, espécie estudada por Coelho *et al.* (2018), a CAT foi um bom marcador para acompanhar o vigor das sementes criopreservadas, sendo que aquelas com maior qualidade apresentam maior atividade da enzima. Coelho *et al.* (2017) constataram que a CAT pode ser utilizada como um marcador bioquímico para a tolerância ao resfriamento de café. A CAT, localizada nos peroxissomas e mitocôndrias, faz parte de um eficiente maquinário enzimático antioxidante das células, e está envolvida na proteção contra os danos provocados

pelo estresse oxidativo, pois quebra o H_2O_2 em O_2 e H_2O (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; GILL; TUTEJA, 2010; SAHU, 2017).

Foi observada atividade da enzima GOT nos tratamentos com imersão em PVS2 ou nitrogênio líquido, porém, em baixa intensidade. No tratamento controle, ou seja, nas sementes com maior qualidade fisiológica, correspondente à primeira banda no gel, não foi observada expressão dessa enzima, que é responsável por auxiliar no processo de germinação de sementes, pois fornece energia ao embrião em desenvolvimento por meio da oxidação de aminoácidos, para o ciclo de Krebs ou fazendo a redução de α -cetogluturato para a síntese de novos aminoácidos (TUNES *et al.*, 2010). A GOT também é utilizada para avaliar o grau de deterioração das sementes (FÁVARIS *et al.*, 2022). Nas sementes submetidas à criopreservação com sinais evidentes de deterioração e baixa ou nenhuma sobrevivência, ocorreu maior expressão dessa enzima.

Na expressão da enzima esterase, observou-se que ocorreu uma maior expressão nas sementes do tratamento controle e nas sementes imersas diretamente em nitrogênio líquido, ou seja, 1 e 2, respectivamente, assim como foi observado na catalase. A enzima EST participa das reações de hidrólise de ésteres e pode, também, atuar sobre os fosfolipídios de membrana (TAIZ; ZEIGER, 2009). Em seu trabalho com *C. canephora*, Coelho *et al.* (2018) observaram maior expressão da enzima EST nos tratamentos com maior porcentagem de germinação. O mesmo resultado foi observado nesse estudo, já que maior atividade da enzima EST foi observada em sementes que não foram submetidas à criopreservação e que não foram expostas à solução de PVS2 (tratamento controle), e em sementes que foram imersas diretamente no nitrogênio líquido. Nos demais tratamentos, a expressão da EST foi semelhante, sendo todos submetidos ao processo de criopreservação e vitrificação.

Figura 3 - Padrão eletroforético de isoenzimas em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas aos tratamentos: 1- Controle; 2- Imersão direta em nitrogênio líquido; 3- exposição a PVS2 durante 120 minutos e imersão em nitrogênio líquido; 4- exposição a PVS2 durante 120 minutos e sem imersão em nitrogênio líquido; 5- exposição a PVS2 durante 120 minutos, imersão em nitrogênio líquido e lavagem em água corrente por 24 horas; 6- exposição a PVS2 durante 120 minutos, sem imersão em nitrogênio líquido e lavagem em água corrente por 24 horas; 7- exposição a PVS2 durante 240 minutos e imersão em nitrogênio líquido; 8- exposição a PVS2 durante 240 minutos e sem imersão em nitrogênio líquido; 9- exposição a PVS2 durante 240 minutos, imersão em nitrogênio líquido e lavagem em água corrente por 24 horas; 10- exposição a PVS2 durante 240 minutos, sem imersão em nitrogênio líquido e lavagem em água corrente por 24 horas.



Fonte: Da autora (2023).

A análise do perfil enzimático tem sido empregada para associar aos resultados da qualidade fisiológica de sementes, na busca do entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de deterioração relacionados aos processos oxidativos causados pela exposição a baixas temperaturas (COELHO *et al.*, 2017).

3.3 Criopreservação com vitrificação – Teste 3

Antes de submeter as sementes aos tratamentos de criopreservação, a qualidade fisiológica inicial foi avaliada. As sementes apresentaram 81% de protrusão radicular, 70% de plântulas normais, 8% de plântulas normais fortes e 11% de plântulas com folhas cotiledonares expandidas.

Houve a interação significativa entre os três fatores estudados, nos dados de protrusão radicular (TABELAS 9 e 10), onde é possível observar os resultados para a variável protrusão radicular. Novamente fica evidente que o menor tempo de exposição à solução de PVS2 seguido de lavagem em água corrente proporciona melhor resultado, principalmente quando as sementes não são imersas no nitrogênio líquido. Maior protrusão radicular ocorreu nas sementes que não foram imersas em nitrogênio líquido, expostas a PVS2 por 120 minutos, com e sem a lavagem em água corrente e por 240 minutos com a lavagem em água corrente.

Tabela 9 - Efeito da interação entre o tempo de exposição à solução de PVS2 e a lavagem em água corrente, dentro de cada nível de imersão no nitrogênio líquido sobre a porcentagem de protrusão radicular de sementes de *Coffea arabica*.

Tempo na PVS2	Protrusão Radicular (%)			
	Com imersão no nitrogênio		Sem imersão no nitrogênio	
	Com lavagem	Sem lavagem	Com lavagem	Sem lavagem
120 minutos	1 Aa	0 Aa	66 Aa	70 Aa
240 minutos	5 Aa	1 Aa	64 Aa	40 Bb

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Tabela 10 - Efeito da imersão em nitrogênio líquido em cada nível de tempo de exposição a solução de PVS2 e lavagem em água corrente sobre as porcentagens de protrusão radicular de sementes de café.

Imersão no nitrogênio líquido	Protrusão Radicular (%)			
	120 minutos na PVS2		240 minutos na PVS2	
	Lavagem em água corrente			
	Com lavagem*	Sem lavagem*	Com Lavagem*	Sem lavagem*
Com	1 B	0 B	5 B	1 B
Sem	66 A	70 A	64 A	40 A

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

*Lavagem em água corrente.

Fonte: Da autora (2023).

Na análise dos dados de plântulas normais, houve apenas interação significativa entre tempo de exposição na solução de PVS2 e a imersão no nitrogênio líquido. A porcentagem de plântulas normais foi maior em sementes submetidas à solução de PVS2 sem imersão no nitrogênio líquido (TABELA 11). Não houve efeito significativo do fator lavagem em água corrente para plântulas normais.

Tabela 11 - Efeito da interação entre o tempo de exposição na solução de PVS2 e imersão no nitrogênio líquido sobre a porcentagem de plântulas normais de *Coffea arabica*.

Plântulas normais		
(%)		
Tempo no PVS2	Com imersão no nitrogênio	Sem imersão no nitrogênio
120 minutos	0 Ab	59 Aa
240 minutos	1 Ab	37 Ba

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Para a variável plântulas com folhas cotiledonares expandidas, a interação tripla também foi significativa. Nas Tabelas 12 e 13 observa-se o desdobramento de todos os fatores. Maior porcentagem foi observada em sementes que não foram criopreservadas, sendo que as expostas a PVS2 por 120 minutos apresentaram 21% de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, quando lavadas em água corrente. Já nas sementes expostas à solução por 240 minutos, não houve efeito significativo da lavagem em água corrente. Após a imersão no nitrogênio líquido, não há sobrevivência, independentemente do tempo na solução de PVS2 (TABELA 12) ou da lavagem em água corrente após a vitrificação (TABELA13).

Tabela 12 - Efeito da interação entre o tempo de exposição à solução de PVS2 e lavagem em água corrente, em cada nível de imersão em nitrogênio líquido na porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas de *Coffea arabica*.

Plântulas com folhas cotiledonares expandidas				
(%)				
Tempo n PVS2 (minutos)	Com imersão		Sem imersão	
	no nitrogênio		no nitrogênio	
	Com	Sem	Com	Sem
	lavagem	lavagem	lavagem	lavagem
120	0 Aa	0 Aa	21 Aa	8 Ab
240	0 Aa	0 Aa	8 Ba	13 Aa

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Tabela 13 - Efeito da interação entre imersão em nitrogênio líquido e lavagem em água corrente, dentro de cada nível de tempo de exposição a solução de PVS2 sobre a porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas de *Coffea arabica*.

Plântulas com folhas cotiledonares expandidas (%)				
Nitrogênio líquido	120 minutos na PVS2		240 minutos na PVS2	
	Com lavagem*	Sem lavagem*	Com lavagem*	Sem lavagem*
Com imersão	0 B	0 A	0 A	0 B
Sem imersão	21 A	8 A	8 A	13 A

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

*Lavagem em água corrente.

Fonte: Da autora (2023).

Em protocolos de criopreservação de tecidos multicelulares complexos, como as sementes, o resfriamento deve ser feito de forma rápida, o suficiente para evitar a formação de cristais de gelo que pode ocorrer na faixa de temperatura entre -2°C a -80°C . Da mesma forma, no mesmo intervalo de temperatura durante o reaquecimento, o estado vitrificado da água pode se converter ao estado cristalino, gerando danos físicos associados aos cristais de gelo. Assim como acontece com o resfriamento, quanto mais o tecido estiver exposto durante a etapa de aquecimento, maior a probabilidade de formação de cristais de gelo, sendo o reaquecimento rápido tão importante quanto o resfriamento rápido (COELHO; ROSA; FERNANDES, 2017; PAMMENTER; BERJAK, 2014).

De acordo com Wesley-Smith *et al.* (2014), quando expostas a temperaturas abaixo de zero, pode ocorrer a formação de cristais de gelo intracelular que podem causar a ruptura do sistema de membranas celulares o que irá causar a perda da semipermeabilidade e da compartimentalização das estruturas podendo ser letal para as células. As sementes de *C. arabica* submetidas à criopreservação que não sobreviveram ou apresentaram baixíssima sobrevivência tiveram danos visíveis e severos, como as rachaduras nos endospermas, ilustradas Figura 4.

Figura 4 - Ilustração dos danos nos endospermas das sementes de *Coffea arabica* L. sem pergaminho após imersão no nitrogênio líquido.



Fonte: Da autora (2023).

As sementes foram criopreservadas seguindo as etapas do protocolo proposto de Coelho *et al.* (2017), exceto as que tiveram seus pergaminhos retirados antes do tratamento com PVS2 e imersão no nitrogênio líquido. Os resultados obtidos evidenciam que a baixa sobrevivência das sementes nos testes realizados pode estar associada à ausência dos pergaminhos. Assim, surgiu a necessidade de investigar o efeito do pergaminho e sua relevância na proteção das sementes contra os provocados durante as etapas de resfriamento e reaquecimento, no teste 4.

3.4 Criopreservação de sementes com e sem pergaminho – Teste 4

Foi possível observar a interação significativa entre os fatores estudados tempo de imersão em nitrogênio líquido e presença ou ausência de pergaminho para o teste de tetrazólio em embriões de sementes de *Coffea canephora*. Sementes imersas em nitrogênio líquido por 30 minutos, com ou sem a presença do pergaminho, apresentaram maior porcentagem de sementes viáveis pelo teste de tetrazólio (TABELA 14).

Tabela 14 - Efeito do tempo de imersão em nitrogênio líquido e da presença do pergaminho sobre a porcentagem de sementes viáveis em sementes de *Coffea canephora*.

Tempo	Sementes viáveis (%)	
	Pergaminho	
	COM	SEM
30 minutos	65 Aa	58 Aa
24 horas	53 Ba	43 Bb
7 dias	40 Ca	45 Ba

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Para a espécie *C. arabica*, não houve interação significativa entre os fatores estudados ou do fator tempo de imersão no nitrogênio, mas sementes com e sem pergaminhos apresentaram diferenças significativas nos percentuais de protrusão radicular, plântulas normais e plântulas com folhas cotiledonares expandidas. Isso foi observado para a espécie *C. canephora*, em que as sementes criopreservadas com os pergaminhos apresentaram maior protrusão radicular aos 15 dias no teste de germinação, quando comparadas às sem os pergaminhos para ambas as espécies (TABELA 15).

As sementes com pergaminho apresentaram uma baixa porcentagem de plântulas normais, enquanto as criopreservadas sem pergaminho, não houve sobrevivência para *C. arabica* e houve baixíssima sobrevivência para *C. canephora*. Isso foi observado para a porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (TABELA 15). As sementes de *C. arabica* utilizadas neste teste foram colhidas na safra anterior e armazenadas, o que contribui para a baixa qualidade observada nos resultados.

Tabela 15 - Efeito do pergaminho sobre a porcentagem de protrusão radicular (PR), plântulas normais (PN) e plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC) de sementes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* criopreservadas.

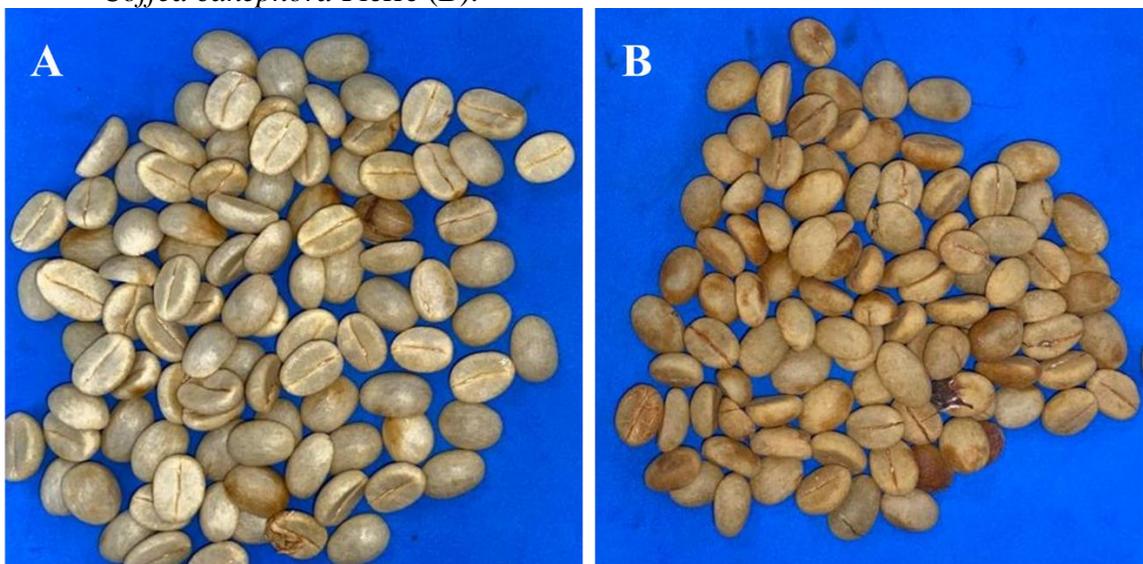
<i>Coffea arabica</i>			
Pergaminho	PR (%)	PN (%)	FC (%)
Com	80 A	19 A	8 A
Sem	0 B	0 B	0 B
<i>Coffea canephora</i>			
Pergaminho	PR (%)	PN (%)	FC (%)
Com	8 A	7 A	5 A
Sem	3 B	3 B	1 B

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

A presença do pergaminho é essencial para que as sementes sobrevivam ao processo de criopreservação, e essa evidência traz a necessidade de compreender melhor o papel do pergaminho na proteção das mesmas, bem como os efeitos nas sementes de *C. arabica* e de *C. canephora*. Durante os experimentos, foi possível constatar diferenças físicas visíveis entre os pergaminhos dessas espécies. Em *C. arabica*, o pergaminho apresenta uma coloração mais clara e recobre a semente por completo, enquanto em *C. canephora* possuem coloração mais escura e não recobrem completamente as sementes, apresentando pequenas aberturas (FIGURA 5).

Figura 5 - Aparência das sementes com pergaminhos das espécies *Coffea arabica* L. (A) e de *Coffea canephora* Pierre (B).

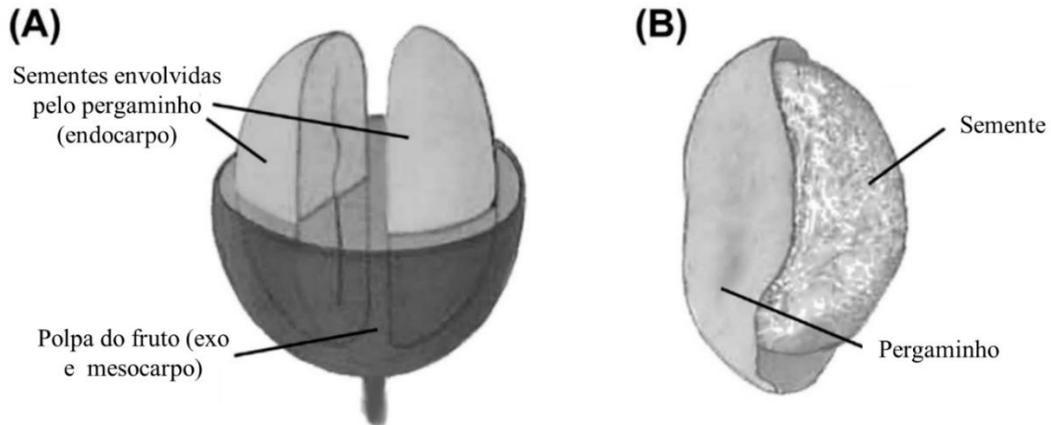


Fonte: Da autora (2023).

Muito se sabe a respeito das diferenças na tolerância à dessecação dessas espécies, com níveis distintos de umidade a que cada semente, é capaz de sobreviver (COELHO *et al.*, 2018, 2019; COELHO; ROSA; FERNANDES, 2017; DUSSERT *et al.*, 1998, 1999, 2002; EIRA *et al.*, 2006; FIGUEIREDO *et al.*, 2017, 2021), dificultando o estabelecimento de protocolo de criopreservação para sementes de *C. canephora*, o que ainda não foi possível.

O pergaminho está localizado entre a polpa do fruto e a semente, e é morfológicamente denominado de endocarpo (KLEINWÄCHTER; BYTOF; SELMAR, 2015), conforme ilustrado na Figura 6.

Figura 6 - Morfologia do fruto e semente de café. (A) Ilustração do fruto maduro. (B) Ilustração da semente de café e pergaminho.



Fonte: Adaptado de Kleinwächter *et al.* (2015).

3.4.1 Caracterização química e determinação do teor de água dos pergaminhos

Nos resultados da caracterização química, foram encontradas diferenças significativas, apenas na porcentagem de extrativos e de lignina. Os pergaminhos de *C. canephora* apresentam menor porcentagem de extrativos, porém, maior porcentagem de lignina (TABELA 16). A lignina é o polímero mais abundante no mundo vegetal, sendo composta por cadeias aromáticas de fenil-propano e tendo como principal função atuar como uma cola para selar as lacunas entre celulose e hemicelulose no tecido, promovendo um revestimento que irá resultar em maior rigidez, resistência a pressão, impermeabilidade à água e pouca elasticidade (KRZYZANOWSKI *et al.*, 2023; SHAH *et al.*, 2022).

Tabela 16 - Caracterização química de pergaminhos das espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.

	<i>C. arabica</i> (%)	DP	<i>C. canephora</i> (%)	DP
Umidade	10.735 A	0.982	9.745 A	0.091
Extrativos	3.344 A	0.288	1.271 B	0.024
Lignina	24.653 B	0.691	25.908 A	0.176
Holocelulose	70.655 A	3.033	68.626 A	2.146
Celulose	38.835 A	3.34	37.133A	4.845
Hemicelulose	31.790 A	3.033	31.492 A	2.146
Cinzas	0.92 A	0.066	0.91 A	0.075
Total	110.227		106.46	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Em estudos com sementes de soja, foi observado a relação direta entre a resistência a danos mecânico e o teor de lignina no tegumento das sementes, sendo que, quanto maior o teor de lignina, maior a resistência das sementes aos danos mecânicos. Valores maiores que 5% de lignina no tegumento de sementes de soja exerce maior impacto na resistência aos danos mecânicos (MENEZES, 2008).

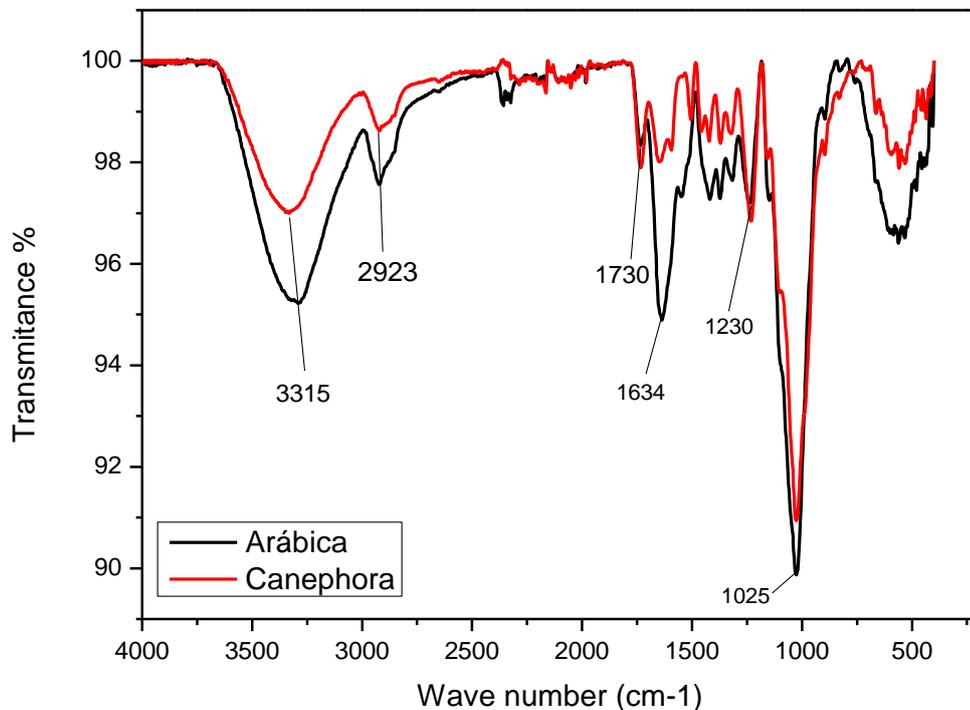
O conteúdo de lignina na parede da vagem de soja também desempenha um importante papel e está relacionado a qualidades físicas, sanitárias e fisiológicas das sementes. Isso se deve a lignina ser o terceiro componente principal da parede celular e a principal responsável pela manutenção da integridade e estruturação das fibras vegetais (KRZYZANOWSKI *et al.*, 2023). A Tabela 16 mostra que ambos os pergaminhos possuem um alto teor de lignina, o que nos leva a pressupor a sua importância durante o processo de criopreservação.

Para pergaminhos de *C. arabica*, o menor teor de lignina quando comparado com o de *C. canephora*, pode permitir a maior flexibilidade quando em contato com o nitrogênio líquido, permitindo a troca de calor e a integridade da semente e pergaminho durante o processo de criopreservação.

3.4.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho por transformada de Fourier spectroscopy (FTIR)

Os espectros de infravermelho dos pergaminhos de *C. arabica* e *C. canephora* são apresentados na Figura 7, onde é possível observar que as duas cultivares apresentam espectros muito semelhantes no que se diz a respeito aos grupos funcionais. A banda compreendida na região de 3414 a 3188 cm^{-1} está associada às deformações e estiramentos das ligações O-H. Essas ligações OH podem ser provenientes de água e celulose adsorvida ou celulose presente na estrutura dos pergaminhos (REIS *et al.*, 2020).

Figura 7 - Espectro de infravermelho (FTIR) de amostras de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.



Fonte: Da autora (2023).

O segundo pico em 2923 cm^{-1} é característico da deformação assimétrica da ligação C-H presente na celulose e hemicelulose, segundo Reis *et al.* (2020). Vibrações simétricas e assimétricas de C-H de carboidratos e cafeínas também ocorrem na região de 2852-2923 cm^{-1} (TAVARES *et al.*, 2012).

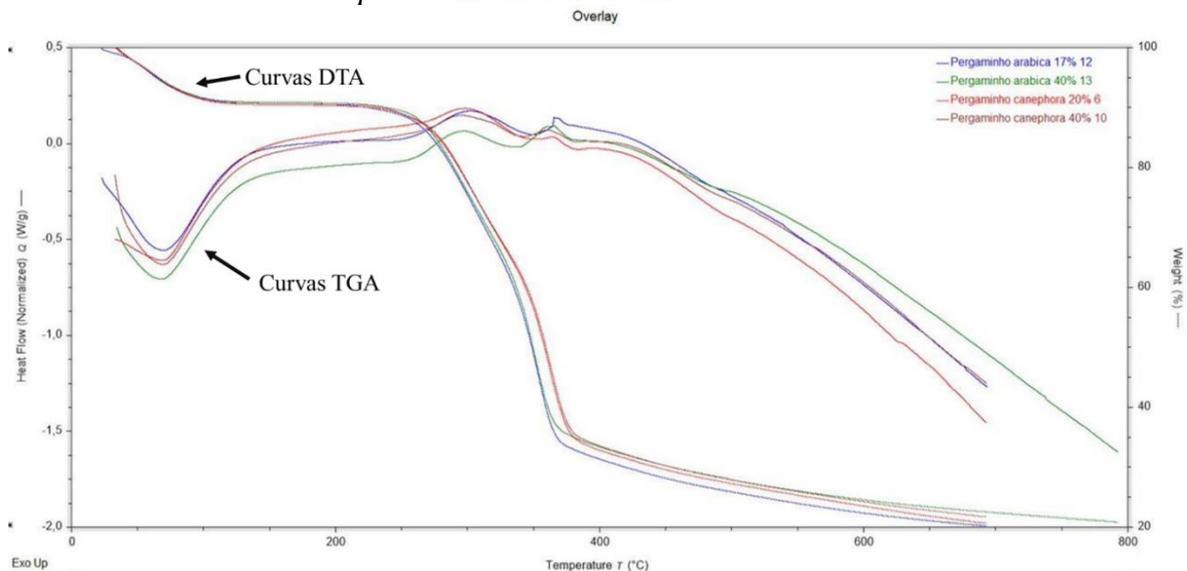
Em 1730 cm^{-1} ocorre o estiramento da ligação C=O do grupo *ether* presente na hemicelulose. Segundo Tavares *et al.* (2012), pode ocorrer também o estiramento vibracional C=O de carbonila de lipídeos, ésteres alifáticos e ácidos carboxílicos.

Em 1634 cm^{-1} ocorre o estiramento vibracional de C=C presente em aldeídos. Já em 1230 cm^{-1} estiramento das ligações C-H e C-O de grupos acetil presentes na lignina (REIS *et al.* 2020). Em 1025 cm^{-1} ocorre o estiramento vibracional da ligação C-O de álcoois em carboidratos (KEMSLEY; RUAULT; WILSON, 1995).

3.4.3 Análise termogravimétrica dos pergaminhos

A Figura 8 exibe as curvas termogravimétricas de pergaminhos de *C. arabica* e *C. canephora* com diferentes umidades. As curvas da Análise termogravimétrica (TGA) e Análise Térmica Diferencial (DTA) apresentam diferentes estágios de perda de massa, sendo o primeiro referente a perda de água e ocorrendo entre 25 e 130 °C. O segundo ocorre entre 130 e 220 °C e é caracterizado pela degradação da hemicelulose, o terceiro ocorre entre 220 e 350 °C onde acontece a degradação da celulose e de parte da hemicelulose e o último estágio ocorre a partir de 350 °C com a degradação da lignina (REIS *et al.*, 2020). AS curvas de ambas as espécies foram similares.

Figura 8 - Sobreposição das curvas termogravimétricas (TGA/DTA) de pergaminhos de *C. arabica* e *C. canephora* em diferentes umidades.



Fonte: Da autora (2023).

Não foi possível identificar diferenças entre os pergaminhos de *C. arabica* e *C. canephora* nas análises de FTIR e TGA/DTA.

3.4.4 Análise da ultraestrutura dos pergaminhos por MEV

Nas Figuras 9 e 10 são apresentadas as imagens capturadas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV), onde a ultraestrutura dos pergaminhos de *C. arabica* e *C. canephora* podem ser comparadas, evidenciando as diferenças morfológicas entre as espécies.

É possível observar que o pergaminho de sementes de *C. arabica* possui fibras separadas e mais grossas, enquanto o pergaminho de *C. canephora* possui fibras unidas e mais finas, apresentando uma superfície mais compacta. Pode-se afirmar que essas características morfológicas em *C. arabica* possibilitam um afrouxamento entre as fibras, permitindo sua expansão, quando o pergaminho é submetido aos altos gradientes de temperatura, ou seja, da temperatura ambiente até $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, no resfriamento, e vice-versa, no reaquecimento, durante o processo de criopreservação.

Já o pergaminho de *C. canephora*, pode sofrer rupturas em suas fibras unidas e compactas, permitindo a entrada do nitrogênio líquido e o contato direto com os endospermas das sementes, causando danos e levando-as à morte. Ressalta-se que o principal composto do endosperma é um polimanano, enquanto o pergaminho é composto principalmente de lignina e pentoses. Assim, o pergaminho de café possui uma estrutura que difere do endosperma, o que resulta em diferenças nas propriedades físicas.

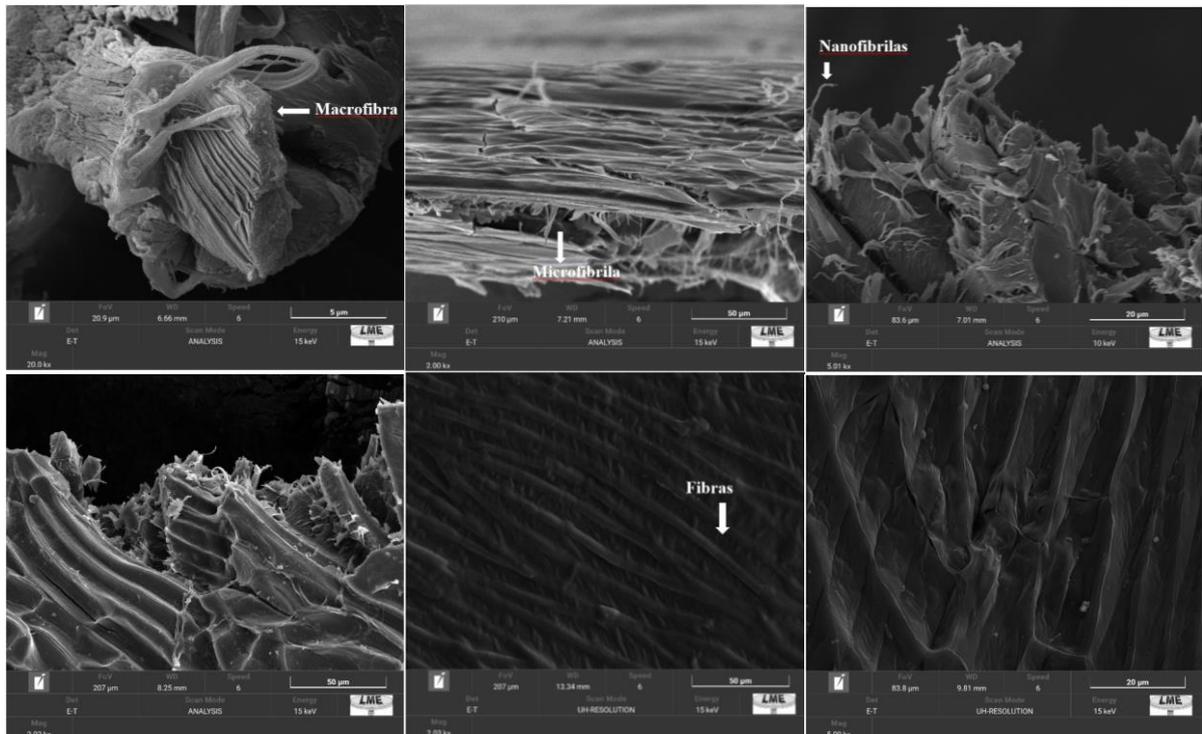
Benítez *et al.* (2019), em estudo sobre pergaminhos de café como fonte de fibra alimentar, determinaram que a xilose é o monossacarídeo predominante na fração de fibra alimentar do pergaminho. Além disso, a celulose foi determinada como o segundo polissacarídeo mais abundante nesses estudos. Os polissacarídeos pécnicos, compostos apenas por ácidos urônicos, são os menos abundantes (4% a 7% da composição do pergaminho) e a maior parte estava ligada à matriz celulósica. O teor de lignina do pergaminho também foi significativo (27–32%).

As fibras são compostas, basicamente, de celulose, hemicelulose e lignina (ILSTON, 1994), substâncias que se constituem em cadeias poliméricas que vão, desde longas, como é o caso da celulose, até menores como a lignina. As cadeias de celulose estão aglomeradas com hemicelulose e lignina amorfa. A estrutura física das fibras é constituída por células individuais, compostas de microfibrilas e dispostas em camadas de diferentes espessuras e ângulos de orientação. Esta característica pode ser observada nas imagens de microscopia eletrônica. Dessa forma, o que se chama de fibra, ou mais corretamente macrofibra, é, na verdade, um conjunto de células individuais, as chamadas microfibrilas, aglomeradas pela lamela intercelular. Já a fibra celulósica tem uma forma tubular com duas superfícies, uma interna em interface com o

lúmen e outra externa, formada pela parede primária da fibra. A parede celular é porosa, e os interstícios também contribuem para a superfície interna. (KOLSETH; RUVO, 1986).

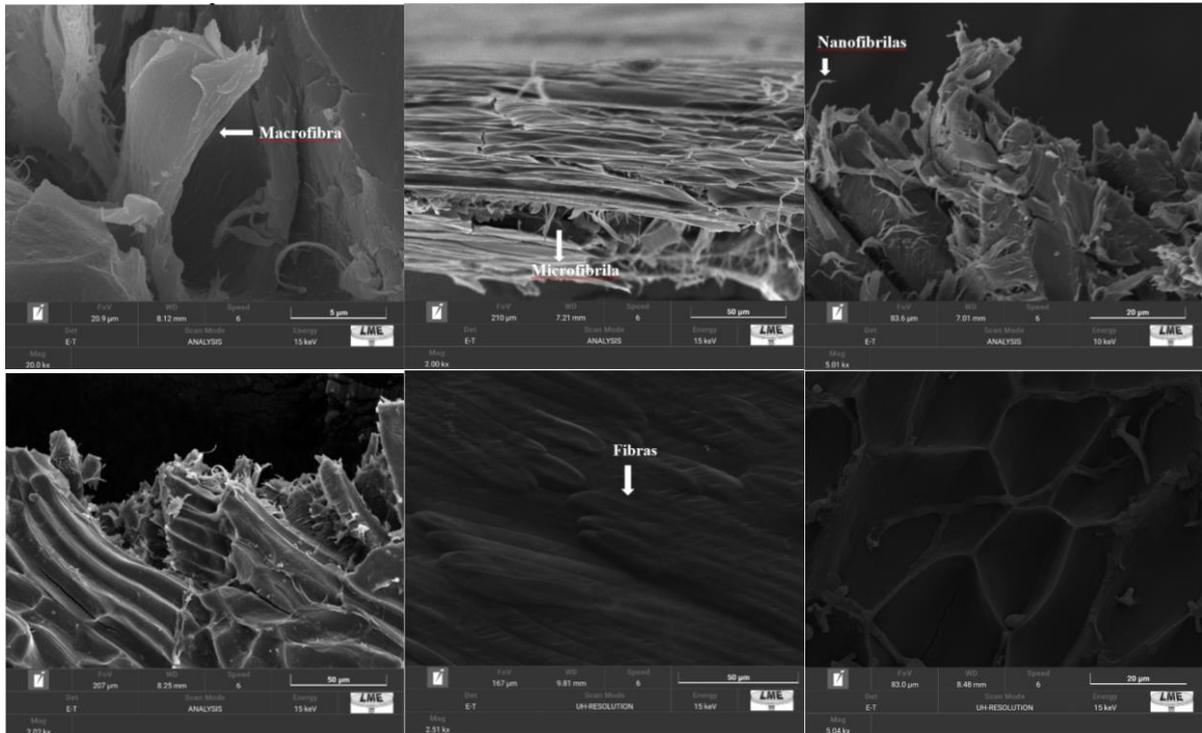
Segundo Woodstock (1988), sementes duras ou impermeáveis podem ser resultantes de uma organização compactada de microfibrilas de celulose na parede celular. Esta, por sua vez, pode ser impregnada com substâncias impermeáveis à água, tais como lignina, ceras, suberinas ou tanino.

Figura 9 - Microscopias eletrônicas de varredura (MEV) de pergaminhos de *Coffea arabica* e ultraestruturas observadas.



Fonte: Da autora (2023).

Figura 10 - Microscopias eletrônicas de varredura (MEV) de pergaminhos de *Coffea canephora* e ultraestruturas observadas.



Fonte: Da autora (2023).

O pergaminho, ou endocarpo, é a camada mais interna do fruto do café, é um tecido coriáceo, de cor branco-acinzentada ou branco-amarelada, de espessura aproximada de 0,5 a 2 mm, de textura flexível e resistente. É composto por fibras de paredes espessas e unidas entre si por substância que atua como cimento, composta de 5-6 camadas de células em posições cruzadas ou oblíquas, o que confere ao pergaminho uma enorme resistência (DEDECCA, 1957; RENA; MAESTRI, 1986). Devido a estas características e aos resultados dos testes anteriores, é possível supor que o pergaminho age como uma proteção física da semente, atuando e modificando as taxas de transferência de calor entre a amostra e o nitrogênio líquido durante a criopreservação, evitando assim, danos ao endosperma da semente.

Assim, de acordo com os resultados das análises químicas e a MEV, infere-se que as diferentes características dos pergaminhos de sementes de *C. arabica* e *C. canephora* influenciam em sua morfologia. Um dos fatores que podem influenciar o fato de o pergaminho de sementes de *C. canephora* não ser eficiente para a proteção física durante a criopreservação, é suas fibras serem unidas e compactas, ricas em lignina, ou seja, pouco flexíveis, o que resulta em aberturas que possibilitam o contato dos endospermas com o nitrogênio líquido, causando os danos fatais às sementes, comprometendo sua sobrevivência, porém, vale ressaltar, que as

sementes das espécies *C. arabica* e *C. canephora* possuem diferentes graus de tolerância a dessecação.

4 CONCLUSÕES

A solução Plant Vitrification 2 (PVS2) não é tóxica para as sementes de *Coffea arabica* e de *Coffea canephora*, porém, não é eficiente na crioproteção das mesmas durante as etapas da criopreservação, nas concentrações e tempos de exposição testadas.

A presença do pergaminho nas sementes de *Coffea arabica* e de *Coffea canephora* é primordial na crioproteção durante a criopreservação, porém, não é o único fator garantindo a sobrevivência.

Os pergaminhos de *Coffea arabica* e de *Coffea canephora* possuem diferentes composições químicas e características ultraestruturais, o que explica, em parte, as diferenças na sensibilidade à criopreservação.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C. *et al.* **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. 627 p.
- BEKHEET, S. A. *et al.* Cryopreservation of shoot apices and callus cultures of globe artichoke using vitrification method. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 18, n. 1, 1 dez. 2020.
- BENELLI, C. *et al.* Two advanced cryogenic procedures for improving *Stevia rebaudiana* (Bertoni) cryopreservation. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 1–12, 01 fev. 2021.
- BENITEZ, V. *et al.* Coffee parchment as a new dietary fiber ingredient: Functional and physiological characterization. **Food Res. Int.**, v. 122, p. 105–113, 2019.
- BENSON, E. E. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 27, n. 3, p. 141-219, 2008.
- BERJAK P, PAMMENTER NW. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**. v. 101, n. 2, p. 213–228, 2008.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 478, p. 1-9, Nov. 2013.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Cryostorage of germplasm of tropical recalcitrant-seeded species: Approaches and problems. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 29-39, Jan., 2014.
- BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA: SDA. 395 p. 2009.
- BURKE, M. J. The glassy state and survival of anhydrous biological systems. *In*: LEOPOLD, A. C. (Ed.). **Membrane, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Cornell University Press, p. 358-364. 1986.
- CHEN, X.L. *et al.* Cryopreservation of in vitro-grow apical meristems of *Lilium* by dropletvitrification. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 397-403, Apr., 2011.
- CLEMENTE, A. C. S. *et al.* Preparo das sementes de café para à avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, 2011.
- CLEMENTE, A. C. S. *et al.* Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, 2011.
- COELHO, S. V. B. *et al.* Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 50, n. 6, p. 483–491, 2015.

COELHO, S. V. B. *et al.* Cryopreservation in *Coffea canephora* pierre seeds: Slow and fast cooling. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 42, n. 6, p. 588–597, 1 nov. 2018.

COELHO, S. V. B. *et al.* Cryopreservation of “*Coffea canephora*” Pierre ex A. Froehner seeds: importance of drying rate and moisture content. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 8, p. 1335–1342, 1 ago. 2019.

COELHO, S. V. B. *et al.* Tolerância de sementes de *Coffea arabica* L. a temperaturas sub zero. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 41, n. 3, p. 312–321, 01 maio 2017.

COELHO, S. V. B.; ROSA, S. D. V. F.; FERNANDES, J. S. Cryopreservation of coffee seeds: A simplified method. **Seed Science and Technology**, v. 45, n. 3, p. 638–649, 2017.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, 2014.

DEDECCA, D. M. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. typica Cramer. **Bragantia**, v. 16, n. único, p. 315–366, 1957.

DULLOO, M.E. *et al.* Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. **Crop Science**, v. 49, n. 6, p. 2123–2138, 2009.

DUSSERT, S. *et al.* Basis of coffee seed sensitivity to liquid nitrogen exposure: Oxidative stress or imbibitional damage? **Physiologia Plantarum**, v. 119, n. 4, p. 534–543, dez. 2003.

DUSSERT, S. *et al.* Cryopreservation of *Coffea* (Coffee). In: TOWILL, L. E.; BAJAJ, Y. P. S. (Eds.). **Cryopreservation of Plant Germplasm II**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002. p. 220–233.

DUSSERT, S. *et al.* Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, v. 8, n. 1, p. 9–15, 19 mar. 1998.

DUSSERT, S. *et al.* Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition, and cooling procedure. *Physiol Plant.*, 2001, v. 112, n. 4, p. 495–504.

DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. New determinants of coffee (*Coffea arabica* L.) seed tolerance to liquid nitrogen exposure. *Cartas criogênicas*, v. 27, n. 3, p. 169–78, maio./jun. 2006.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v. 40, n. 5, p. 427–433, Sept., 2004.

FÁVARIS, N. A. B. *et al.* Protein profile in arabica coffee seeds in electrophoresis gel: importance of freeze-drying. **Journal of Seed Science**, v. 44, 2022.

FIGUEIREDO, M. A. de *et al.* Estudos exploratórios para a criopreservação de sementes de *Coffea arabica* L. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 2, p. 150–158, 01 abr. 2017.

- FIGUEIREDO, M. A. *et al.* Physiological, biochemical, and ultrastructural aspects of *Coffea arabica* L. seeds under different cryopreservation protocols. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 45, 2021.
- FREITAS, R. T. de *et al.* Cryopreservation of *Coffea arabica* L. Zygotic Embryos by Vitrification. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 44, n. 2, p. 445–451, 2016.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010.
- GONZALEZ-ARNAO, M.T. *et al.* Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 1-13, 2008.
- ILLSTON, J. M. **Construction materials: their nature and behaviour**. Chapman e Hall. London: CRC,1994.
- KARTHA, K. K. Meristem culture and germplasm preservation. *In:* (Ed.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 115-134.
- KEMSLEY, E. K.; RUAULT, S.; WILSON, R. H. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section Discrimination between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* variant robusta beans using infrared spectroscopy. **Food Chemistry**. v. 54, p. 321-326, 1995
- KLEINWÄCHTER, M.; BYTOF, G.; SELMAR, D. Coffee Beans and Processing. *In:* **Coffee in Health and Disease Prevention**. Elsevier Inc., 2015. p. 73–81.
- KOLSETH, P., RUVO, A. **Paper structure and properties**. Stockholm: Marcel Dekker, 1986.
- KRZYŻANOWSKI, FC. *et al.* Importance of the lignin content in the pod wall and seed coat on soybean seed physiological and health performances. **Journal of Seed Science**, v. 45, p. e202345006, 2023.
- KULUS, D. Effect of bead composition, PVS type, and recovery medium in cryopreservation of bleeding heart ‘Valentine’—Preliminary study. **Agronomy**, v. 10, n. 6, 1 jun. 2020.
- MATSUMOTO, T. Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods reviews open access. **Resenhas em Ciência Agrícola**, p: 13-20, 2017.
- MAZUR, P. Principles of cryobiology. *In:* FULLER, B. J.; LANE, N.; BENSON, E. E. (Eds.). **Life in the frozen state**. 1st ed. Boca Raton: CRC Press. 2004. cap. 1, p. 3-65.
- MENEZES, M. **Aspectos genéticos associados à qualidade fisiológica de sementes de soja**. 2018. 122 Tese (Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.

- MORAIS, P. I. C. Advances in the cryopreservation of *Coffea canephora* seeds. 2023. 67 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) –Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2023.
- PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 21-28, Jan., 2014.
- PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: A cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, Limerick, v. 168, n. 1, p. 45–55, 2005.
- PANIS, B.; SWENNEN, R.; ENGELMAN, F. Cryopreservation of plant germplasm. In: International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 4., 2001, **Tampere: ISHS Acta Horticulturae**, v. 650, p. 79-86, 2001.
- PINTO, M. DE S. *et al.* Cryopreservation of coffee zygotic embryos: dehydration and osmotic rehydration. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 4, p. 380–389, jul. 2016.
- PRUDENTE, D. de O. *et al.* The cryoprotectant PVS2 plays a crucial role in germinating *Passiflora ligularis* embryos after cryopreservation by influencing the mobilization of lipids and the antioxidant metabolism. **Journal of Plant Physiology**, v. 239, p. 71–82, 1 ago. 2019.
- REED, B. M. **Plant cryopreservation: a continuing requirement for food and ecosystem security**. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. New York: PlantSpringer, 2017.
- REIS, R. S. *et al.* Characterization of coffee parchment and innovative steam explosion treatment to obtain microfibrillated cellulose as potential composite reinforcement. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 9, n. 4, p. 9412–9421, 1 jul. 2020.
- RENA, A.B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: RENA, A.B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, E.; YAMADA, T. (Ed.). **Cultura do cafeeiro: Fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1986. p. 13-85.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, Lisboa, v. 9, p. 30-33, 1990.
- SANT, R. *et al.* Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 107-111, 2008.
- SANTOS, I.R.I. **Criopreservação de eixos embrionários de espécies de *Citrus* usando encapsulamento e desidratação**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. (EMBRAPA-CERNAGEN. Documentos, 115). 23 p.
- SHAH, T. A. *et al.* **Composition and Role of Lignin in Biochemicals**. In: SAND, A.; TUTEJA, J. (Eds.). Lignin. Rijeka: IntechOpen, 2022.
- SOUZA, A. C. *et al.* Steps of cryopreservation of coffee seeds: physiological responses and antioxidant systems. **Ciencia Rural**, v. 54, n. 2, 2024.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

TAVARES, K. M. *et al.* Espectroscopia no infravermelho médio e análise sensorial aplicada à detecção de adulteração de café torrado por adição de cascas de café. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1164–1168, 2012.

TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. **Plant tissue culture, development and biotechnology**. London: CRC Press, 2011. 583 p.

TUNES, L. M. de *et al.* Perfil enzimático em sementes de cevada em resposta a diferentes concentrações salinas. **Interciencia**, v. 35, n. 5, p. 369–373, 2010.

WESLEY-SMITH, J. *et al.* Intracellular ice and cell survival in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*: An ultrastructural study of factors affecting cell and ice structures. **Annals of Botany**, v. 113, n. 4, p. 695–709, 2014.

WESLEY-SMITH, J. *et al.* Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*. **Annals of Botany**, London, v. 115, n. 6, p. 991-1000, 2015.

WOODSTOCK, L. W. Seed imbibition: a critical period for successful germination. **Journal Seed Technology**, Springfield, v. 12, n. 1, p. 1-15, 1988.

CAPÍTULO 3 ESTUDOS EXPLORATORIOS DO USO DE NANOPARTÍCULAS ÓXIDO DE FERRO E HIDROXIAPATITA NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE CAFÉ

RESUMO

Inovações que utilizam a nanotecnologia vêm transformando a agricultura, apresentando muitos benefícios quando utilizadas no cultivo de plantas. Objetivando o uso de nanopartículas na criopreservação de sementes do gênero *Coffea* sp., neste estudo, foram investigados efeitos de nanopartículas na embebição e na germinação de sementes de café. Foram utilizadas sementes das espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. As sementes foram embebidas por 24h em dispersão das nanopartículas de hidroxiapatita (HA) e de óxido de ferro (FE), separadamente, nas concentrações de 1,0 mg/L, 1,5 mg/L, 2,0 mg/L e 2,5 mg/L, e em água destilada, sendo essas consideradas o tratamento controle. As sementes foram submetidas à avaliação fisiológica, por meio dos testes de tetrazólio e de germinação, onde foram avaliadas a porcentagem de protrusão radicular aos 9, 10, 14 e 15 dias após a semeadura, de germinação no estágio de seta aos 15 dias, de germinação aos 30 dias, de folhas cotiledonares aos 45 dias e de matéria seca de plântulas. Foi também realizada a espectroscopia por energia dispersiva (EDS) nas sementes, para avaliar a penetração das nanopartículas. Foi possível identificar a presença da nanopartícula de hidroxiapatita nas sementes por meio da EDS. Sementes de *C. arabica* apresentam melhor desempenho do que as de *C. canephora*, em todos os testes fisiológicos realizados. No teste de germinação no estágio seta, as sementes tratadas com ambas as nanopartículas tiveram comportamento semelhante, com exceção das embebidas em 2,5 mg/L de FE, que apresentaram resultado fisiológico inferior. Para a variável porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, os tratamentos com nanopartícula de HA apresentaram resultados superiores às sementes tratadas com a nanopartícula de FE. Com base nos resultados, as nanopartículas de HA e FE não são tóxicas para as sementes do gênero *Coffea* sp. nas concentrações testadas, podendo influenciar positivamente na qualidade delas, sendo assim, possível sua utilização durante o processo de criopreservação.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. *Coffea canephora*. Nanotecnologia. Qualidade fisiológica.

ABSTRACT

Innovations using nanotechnology have been transforming agriculture, with many benefits when used in plant cultivation. With the aim of using nanoparticles in the cryopreservation of seeds of the *Coffea* sp. genus, this study investigated the effects of nanoparticles on the soaking and germination of coffee seeds. Seeds of the *Coffea arabica* and *Coffea canephora* species were used. The seeds were soaked for 24 hours in a dispersion of hydroxyapatite (HA) and iron oxide (FE) nanoparticles, separately, at concentrations of 1.0 mg/L, 1.5 mg/L, 2.0 mg/L and 2.5 mg/L, and in distilled water, which was considered the control treatment. The seeds were subjected to physiological evaluation using the tetrazolium and germination tests, which assessed the percentage of root protrusion at 9, 10, 14 and 15 days after sowing, germination at the arrow stage at 15 days, germination at 30 days, cotyledonary leaves at 45 days and seedling dry matter. Energy dispersive spectroscopy (EDS) was also carried out on the seeds to assess the penetration of the nanoparticles. It was possible to identify the presence of the hydroxyapatite nanoparticle in the seeds using EDS. *C. arabica* seeds performed better than *C. canephora* seeds in all the physiological tests carried out. In the seta stage twinning test, the seeds treated with both nanoparticles performed similarly, except for those soaked in 2.5 mg/L FE, which showed inferior physiological results. For the variable percentage of seedlings with expanded cotyledonary leaves, the HA nanoparticle treatments showed better results than the seeds treated with the FE nanoparticle. Based on the results, HA and FE nanoparticles are not toxic to seeds of the *Coffea* sp. genus at the concentrations tested and can have a positive influence on their quality, making it possible to use them during the cryopreservation process.

Keywords: *Coffea arabica*. *Coffea canephora*. Nanotechnology. Physiological quality.

1 INTRODUÇÃO

Nanotecnologia é considerada a ciência que trabalha com partículas, materiais, dispositivos e processos que existem na faixa de nanômetros, sendo consideradas como nanopartículas as partículas com dimensões que não ultrapassem 100 nm (GUBIN *et al.*, 2005).

As inovações tecnológicas vêm transformando a agricultura, e dentro destas, a nanotecnologia ocupa um lugar de destaque (ALAM; SULTANA; IQBAL, 2015), e tem se tornado uma importante ferramenta, podendo ser utilizada como estimulantes de crescimento, fertilizantes e atuando como fitossanitários. Essas partículas podem entrar facilmente no sistema da planta em comparação a materiais a granel devido ao fato de conseguirem penetrar a barreira celular (JANMOHAMMADI; SABAGHINIA, 2012).

O grande interesse de pesquisadores na nanotecnologia está na descoberta de suas propriedades físicas e químicas incomuns, relacionados à expressão dos chamados efeitos de tamanho quânticos, ou seja, à medida que o tamanho diminui há o aumento da fração dos átomos de superfície, causando mudanças das propriedades químicas e físicas das partículas (GUBIN *et al.*, 2005).

A interação de nanopartículas com plantas ainda não foi completamente estudada, tendo relatos diferentes e conflitantes sobre a absorção, translocação, acumulação, biotransformação e toxicidade em diferentes espécies (ALMUTAIRI; ALHARBI, 2015).

A técnica de *nanowarming*, ou seja, o uso de nanopartículas na etapa de reaquecimento de tecidos vitrificados, de forma rápida e uniforme, por meio da qual é possível o reaquecimento em taxas de 100 °C/minuto vem sendo muito utilizadas na criopreservação (MANUCHEHRABADO *et al.*, 2017). Uma vez incorporadas nos tecidos, as nanopartículas podem ser facilmente aquecidas pela utilização de um campo magnético com radiofrequências alternadas (PANKHURST *et al.*, 2009).

Experimentos realizados na área médica, utilizando tecidos animais, demonstraram que esta técnica de aquecimento inovadora pode aumentar as taxas de aquecimento em pelo menos uma ordem de magnitude em relação ao aquecimento convencional e que não depende de tamanho da amostra (PANKHURST *et al.*, 2009; MANUCHEHRABADO *et al.*, 2017). A técnica consiste em imergir o tecido de interesse em suspensão de nanopartículas magnéticas antes da imersão no nitrogênio líquido. Após a criopreservação, o tecido criopreservado é aquecido por meio da transmissão de energia de radiofrequência, para ativá-los. As nanopartículas atuam como aquecedores microscópicos, aquecendo o tecido que os rodeia (MANUCHEHRABADO *et al.*, 2017).

O estudo de nanopartículas revelou também uma vasta diversidade de benefícios quando aplicado no cultivo de plantas (NGO *et al.*, 2014; SALAMA, 2012; MIHAELA; DORINA, 2007), se mostrando uma tecnologia promissora para a agricultura.

Maghsoodi *et al.* (2020) listou em seu estudo, os benefícios do uso de nanopartículas de hidroxiapatita (HA). De acordo com o autor, essa nanopartícula é capaz de fornecer fósforo e cálcio, reduzir os efeitos negativos de metais pesados e o aumento do crescimento em resposta ao aumento da concentração de cálcio nas células da planta. Além desses benefícios, a nanopartícula de HA também pode ser usada para transportar outros elementos e moléculas para o interior das células Marchiol *et al.* (2019).

Além das propriedades magnéticas, as nanopartículas de óxido ferro (FE) podem ser utilizadas para substituir o fertilizante ferro tradicional. Rui *et al.* (2016) observaram em seu trabalho, que a nanopartícula de ferro foi capaz de aumentar a biomassa e o teor de clorofila em plantas de amendoim, além de auxiliar na redução das atividades de enzimas antioxidantes resultando em um melhor desenvolvimento vegetal.

Visando os possíveis benefícios do uso de nanopartículas de HA e de FE na criopreservação, o objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos na qualidade fisiológica de sementes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Colheita dos frutos e processamento das sementes de café

Frutos de *C. canephora* Pierre, cultivar Apoatã, e de *C. arabica* L., cultivar Catuai Amarelo IAC 62 foram colhidos na Fazenda Experimental da Fundação Procafé, em Varginha (MG), nas safras de 2019/2020 e 2020/2021. Frutos da espécie *C. arabica* L., cultivar Mundo Novo, foram obtidos em lavoura da Universidade Federal de Lavras, na safra 2019/2020.

Os frutos no estágio de maturação cereja foram seletivamente colhidos nos ramos médios das plantas e nas partes medianas destes ramos. Após a colheita, os frutos foram selecionados para uniformização do estágio de maturação e descascados mecanicamente.

As sementes foram desmuciladas por fermentação em água durante 48 horas para a espécie *C. canephora* e durante 24 horas para a espécie *C. arabica*, em temperatura ambiente e posteriormente pré-secadas à sombra para a retirada da umidade superficial.

Após o processamento, as sementes foram armazenadas em câmara fria e seca, no Laboratório Central de Pesquisa em Sementes, do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras (MG), até a realização dos experimentos.

Inicialmente, as sementes foram submetidas à determinação do teor de água pelo método de estufa a 105 °C (BRASIL, 2009), aos testes de germinação (BRASIL, 2009) e de tetrazólio (CLEMENTE *et al.*, 2011).

2.2 Secagem das sementes

As sementes foram secadas até os teores de água de 17% (*C. arabica*) e 20% (*C. canephora*), base úmida (bu), em camada única sobre as telas metálicas das caixas de acrílico do tipo gerbox, contendo 80 mg de sílica gel ativada em seu interior e abaixo das telas. No decorrer da secagem, a sílica era trocada a cada 24 horas. Os recipientes foram mantidos em câmaras do tipo B.O.D, em temperatura constante de 25 °C. A perda de água durante a secagem foi monitorada por pesagens contínuas em balança de precisão de 0,001 g, até que as sementes atingissem os teores de água de interesse.

2.3 Tratamento das sementes em suspensão de nanopartículas

Foram utilizadas as nanopartículas de HA ($\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$) dispersas em água e de FE (óxido de ferro II e III - Fe_2O_3) dispersas em tolueno, ambas adquiridas da Sigma-Aldrich Co. De acordo com as informações do fabricante, o tamanho das nanopartículas de HA era em torno de <200 nm e as de FE possuíam o tamanho de 10 nm. Nos teores de água específicos para a criopreservação de cada espécie, 17% bu *C. arabica* e de 20% bu para *C. canephora*, as sementes foram embebidas nas suspensões das nanopartículas. Foram utilizadas soluções das nanopartículas, nas concentrações de 0, 1, 1,5, 2 e 2,5 mg/L.

As sementes foram colocadas para embeber nas suspensões descritas anteriormente durante 24 horas e, posteriormente, foram submetidas aos testes fisiológicos para avaliação da qualidade.

2.4 Determinação do teor de água e avaliações fisiológicas

- a) Determinação do teor de água das sementes: realizada pelo método de estufa a 105 °C, durante 24 horas (BRASIL, 2009), com duas repetições de 10 sementes, com os resultados expressos em porcentagem com base no peso úmido das sementes.
- b) Teste de germinação: realizado com quatro repetições de 15 sementes para cada tratamento, semeadas em papel de germinação, umedecido com água em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco e colocadas em caixas de acrílico do tipo gerbox. Os recipientes foram mantidos em câmaras do tipo B.O.D, em temperatura constante de 30 °C. Foi avaliada a protrusão radicular aos 9, 10, 14 e 15 dias após a semeadura e a germinação no estágio de seta, aos 15 dias após a semeadura (ROSA *et al.*, 2010). Após as avaliações de 15 dias, as sementes foram transferidas para folhas de papel de germinação, umedecidas com água em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco e foram mantidas em germinador, em temperatura constante de 30 °C e a porcentagem de plântulas normais foi avaliada aos 30 dias, segundo as prescrições das RAS (BRASIL, 2009). No teste de germinação determinou-se também a porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias após a semeadura e a matéria seca das plântulas.
- c) Matéria seca de plântulas: os eixos hipocótilo-radícula das plântulas normais foram isolados, acondicionados em sacos de papel e secados em estufa de circulação de ar a 60 °C, durante quatro dias ou até peso constante. Após esse período foi determinada a

massa seca de raízes e de partes aéreas total por plântula, sendo os resultados expressos em miligramas.

- d) Teste de tetrazólio: as avaliações foram feitas com 48 e 144 horas da semeadura em papel de germinação umedecido com água em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco e colocadas em caixas de acrílico do tipo gerbox, com quatro repetições. Os recipientes foram e mantidos em câmaras do tipo B.O.D, em temperatura constante de 30 °C. Os embriões foram removidos com o auxílio de bisturi, evitando danos aos mesmos e, em seguida, imersos em solução de tetrazólio a 0,5% e mantidos na ausência de luz por três horas em 30 °C. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes viáveis.

2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x5, sendo duas espécies, dois tipos de nanopartículas e cinco concentrações de nanopartículas, com quatro repetições para cada tratamento. Foi feita a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de *Tukey*, a 5% de probabilidade.

2.6 Composição elementar das sementes por meio de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva (MEV-EDS)

As sementes foram analisadas em um microscópio JEOL 6510, na Embrapa Instrumentação em São Carlos (SP) para avaliar a presença das nanopartículas. Para a análise, a semente foi aplicada sobre uma fita carbono em um *stub* metálico e, em seguida, recobertas com carbono usando um metalizador Leica SCD 050.

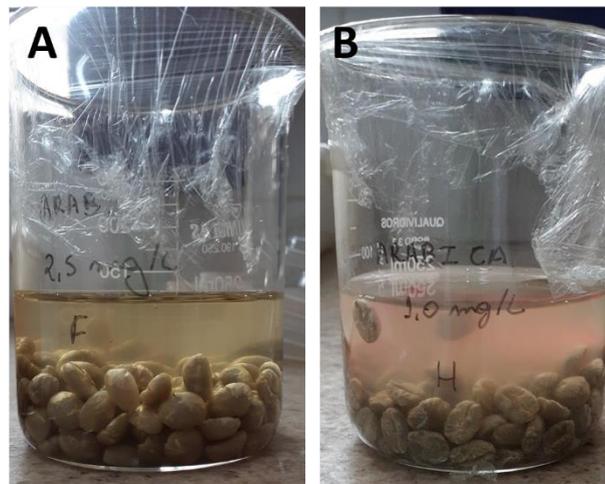
Essa análise permite mapear através da microscopia eletrônica de varredura a composição elementar das sementes, tendo como resultado imagens destacando todos os elementos encontrados na amostra separadamente, permitindo constatar se há ou não a presença de elementos que compõe as nanopartículas utilizadas durante os testes e assim identificar a presença no interior das sementes. Um feixe de elétrons de alta energia de partículas carregadas é lançado sobre a amostra de trabalho causando a excitação das partículas e através do espectro de emissão da amostra torna-se possível identificar os elementos contidos, uma vez que cada elemento possui uma estrutura atômica única (VIEIRA *et al.*, 2021).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliações Fisiológicas

As sementes foram embebidas em 100 ml das dispersões das nanopartículas de HA e de FE nas concentrações 1, 1,5 , 2 e 2,5 mg/L e em água sendo essa considerada o tratamento controle com a ausência de nanopartículas (FIGURA 1).

Figura 1 - Embebição das sementes em dispersão de nanopartículas. (A) Embebição em nanopartículas de ferro. (B) Embebição em nanopartículas de hidroxiapatita.



Fonte: Da autora (2023).

Na análise de variância dos dados, houve efeito significativo da espécie, para todos os testes fisiológicos, porcentagem de germinação no estágio seta, de plântulas normais fortes, de plântulas com folhas cotiledonares expandidas e de massa seca de raiz por plântula. As sementes da espécie *C. arabica* L. apresentaram melhor desempenho em todas as avaliações (TABELAS 1, 2 e 3).

Tabela 1 - Porcentagens de sementes viáveis no teste de tetrazólio (EV), protrusão radicular aos 9, 10 e 14 dias (PR9, PR10 e 14) dias de sementes de café tratadas com as nanopartículas.

Espécie	SV (%)	PR9 (%)	PR10 (%)	PR14 (%)
<i>Coffea arabica</i>	99 a	75 a	90 a	93 a
<i>Coffea canephora</i>	93 b	36 b	49 b	68 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Tabela 2 - Porcentagens de protrusão radicular aos 15 dias (PR15), germinação no estágio seta, plântulas normais (PN) e plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC) de sementes de café tratadas com as nanopartículas.

Espécie	PR15 (%)	Seta (%)	PN (%)	FC (%)
<i>Coffea arabica</i>	93 a	88 a	86 a	90 a
<i>Coffea canephora</i>	71 b	53 b	78 b	58 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Tabela 3 - Massa seca da parte aérea total (MSPAt), massa seca da parte aérea por plântula (MSPAp) e massa seca da raiz total (MSRt), de plântulas de sementes de café tratadas com as nanopartículas.

Espécie	MSPAt (g)	MSPAp (g)	MSRt (g)
<i>Coffea arabica</i>	0,2775 a	0,0530 a	0,0601 a
<i>Coffea canephora</i>	0,1433 b	0,0408 b	0,0430 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Na análise dos resultados da porcentagem de germinação no estágio seta aos 15 dias após a semeadura, houve interação significativa dos fatores concentração e espécie (TABELA 4). Sementes tratadas com nanopartículas de FE, na concentração de 2,5 mg/L, apresentaram menor porcentagem de germinação que os demais tratamentos, enquanto os outros apresentaram desempenhos semelhantes.

Tabela 4 - Efeito de nanopartículas em diferentes concentrações sobre a porcentagem de germinação no estágio seta de sementes de café.

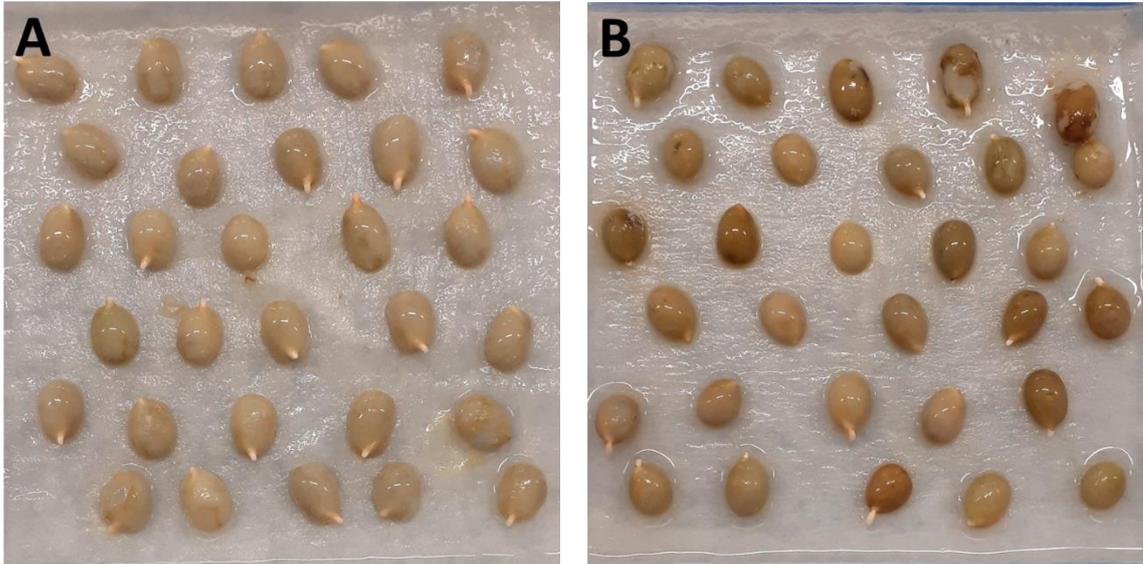
Concentração (mg/L)	Hidroxiapatita	Ferro
0,0	69 a A	69 a A
1,0	77 a A	75 a A
1,5	75 a A	65 a A
2,0	60 a A	75 a A
2,5	79 a A	58 b A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

A Figura 2 mostra sementes tratadas com 2,5 mg/L de HA no estágio seta aos 15 dias após a semeadura. Nesse estágio, a radícula surge em forma de seta e essa característica dá nome a avaliação (ROSA *et al.*, 2010).

Figura 2 - Protrusão radicular de sementes tratadas com nanopartículas de Hidroxiapatita 15 dias após a semeadura. (A) *C. arabica*, (B) *C. canephora*.



Fonte: Da autora (2023).

Resultados benéficos do uso de nanopartículas de HA foram observados por Marchiol *et al.* (2019). Os autores utilizaram nanopartículas de HA em concentrações de 2 a 2000 mg/L e observaram que estas concentrações não alteram a porcentagem de germinação de sementes de *Solanum lycopersicum* L, porém, o alongamento da raiz foi afetado de maneira benéfica quando as sementes foram expostas a altas concentrações de nanopartículas de HA, sendo o melhor resultado observado na concentração de 500 mg/L.

A interação entre espécies e nanopartículas foi significativa para o número plântulas com folhas cotiledonares expandidas e para massa seca de raiz por plântula. Sementes de *C. arabica* L. tratadas com nanopartículas de HA e de FE apresentaram maior número de plântulas com folhas cotiledonares expandidas. Foi observado também uma menor porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas de sementes de *C. canephora* Pierre tratadas com a nanopartícula de FE.

Tabela 5 - Porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas de sementes de café, tratadas com as nanopartículas.

Espécies	Hidroxiapatita	Ferro
<i>Coffea arabica</i>	88 Aa	93 Aa
<i>Coffea canephora</i>	64 Ba	53 Bb

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

A nanopartícula de FE utilizada tem como solvente o tolueno, um dos quatro componentes do BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos). Este solvente pode ser tóxico

para humanos e plantas em níveis moderados (NEWMAN; REYNOLDS, 2005), o que pode explicar a queda de qualidade das sementes quando expostas a dispersões de nanopartículas de FE na maior concentração utilizada (TABELA 4).

Bala *et al.* (2014) também constataram o efeito benéfico do uso de nanopartículas de HA em seu trabalho com sementes de grão-de-bico (*Cicer arietinum*), observando que a germinação foi melhor na presença da nanopartícula e que houve um maior crescimento das mudas e maior vigor, e melhores resultados na concentração de 1000 mg/L. De acordo com os autores, a possível razão para esse efeito benéfico é o aumento da atividade de giberelinas e ao efeito da nanopartícula de HA como fertilizante.

Resultados contrastantes foram encontrados por Emam *et al.* (2022). Os autores avaliaram o efeito de nanopartículas de HA em sementes de rabanete (*Raphanus sativus*), tomate (*Solanum lycopersicum*), trigo (*Triticum aestivum* L.) e pepino (*Cucumis sativus* L.) em concentrações que variavam de 10 a 500 mg/L. Os autores observaram a inibição da germinação em todas as espécies e uma relação direta da inibição com o aumento da concentração da nanopartícula.

Sementes de *C. arabica* tratadas com nanopartículas de FE apresentaram também menor peso de massa seca de raiz por plântulas quando comparadas aos demais tratamentos. O maior peso foi observado em sementes de *C. canephora* tratadas com nanopartículas de FE (TABELA 6).

Tabela 6 - Massa seca de raiz por plântula de sementes de café tratadas com as nanopartículas.

Espécies	Hidroxiapatita	Ferro
<i>Coffea arabica</i>	0,0113 Aa	0,0108 Ba
<i>Coffea canephora</i>	0,0111 Ab	0,0136 Aa

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

O tratamento de sementes utilizando nanopartículas de FE foi também estudado por Mazhar *et al.* (2022) que concluíram que essas nanopartículas podem ser capazes de melhorar os atributos de crescimento e rendimento de plantas de linho (*Linum usitatissimum* L.) e diminuir os efeitos negativos do estresse hídrico. Resultados semelhantes foram observados por Dola *et al.* (2022) quando aplicaram nanopartículas de FE em plantas de soja.

As diferenças entre as espécies, quanto aos resultados após os tratamentos com as nanopartículas podem também estar relacionadas às diferentes tolerâncias à dessecação. As sementes do gênero *Coffea* apresentam diferentes níveis de tolerância a dessecação. Dussert *et*

al. (1999) investigaram sensibilidade à dessecação de nove espécies do gênero, entre elas *C. arabica* e *C. canephora*. Os autores constataram que apesar de ambas as espécies se encaixarem na categoria de tolerância intermediária à dessecação, há diferentes espectros de tolerância e em sementes de *C. arabica* há o declínio da viabilidade apenas quando elas atingem o teor de 0,109 gH₂O.g⁻¹ (base seca). Para *C. canephora*, o declínio da viabilidade acontece 0,170 gH₂O.g⁻¹ (base seca), sendo um teor de água maior quando comparado com os resultados encontrados em *C. arabica*.

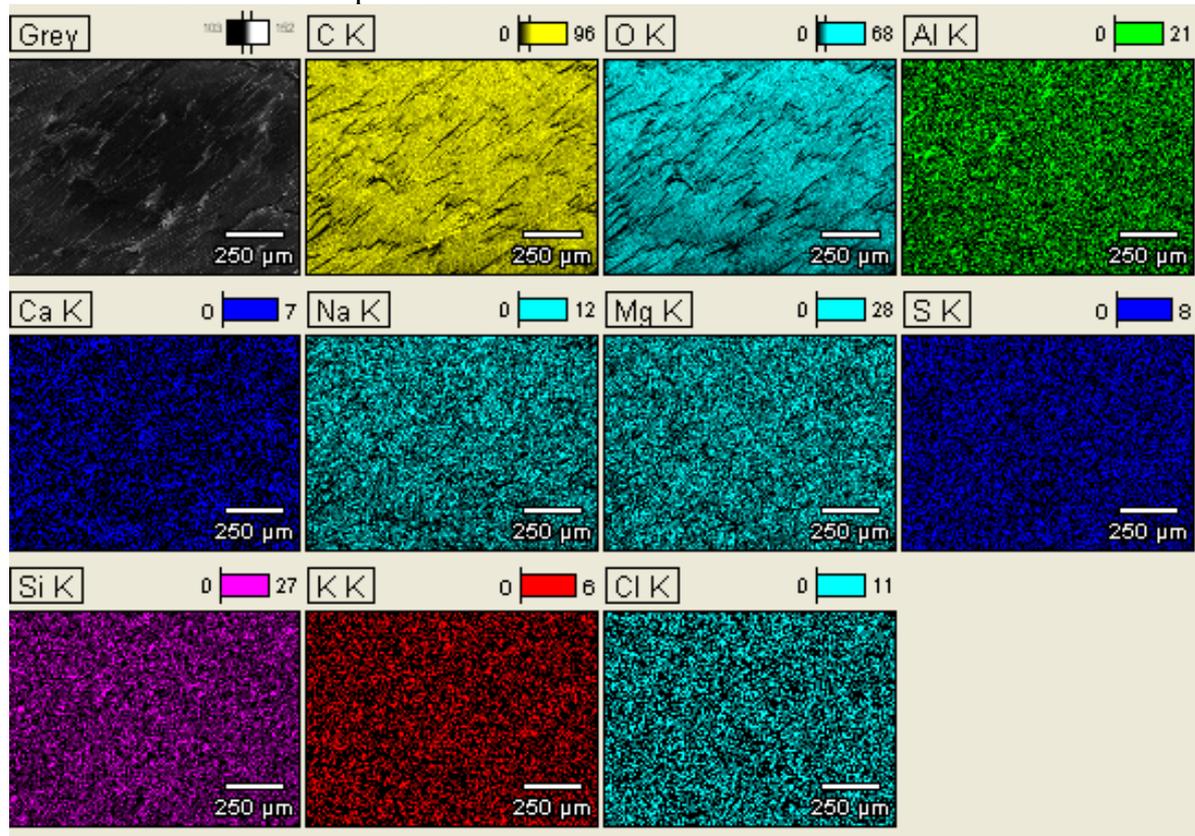
Observando os trabalhos de Coelho *et al.* (2018) e Coelho *et al.* (2017) com criopreservação de sementes de *C. canephora* e *C. arabica*, respectivamente, pode-se confirmar a maior sensibilidade das sementes de *C. canephora* à dessecação. Em ambos os trabalhos, os autores testaram protocolos semelhantes para a criopreservação das sementes de interesse e obtiveram sucesso apenas para as de *C. arabica*, alcançando alta sobrevivência após a germinação. Já para o trabalho com sementes de *C. canephora*, apesar de seguir o mesmo protocolo, a sobrevivência alcançada após a criopreservação foi de 40%.

Sendo assim, as diferenças na qualidade fisiológica das sementes encontradas nesse trabalho, entre as espécies estudadas, podem estar relacionadas aos diferentes níveis de tolerância à dessecação, uma vez que *C. arabica* é mais tolerante que *C. canephora* e ambas as sementes passaram pelo processo de secagem, sendo as de *C. arabica* secadas até 17% bu e as de *C. canephora* até 20% bu.

3.2 Composição elementar das sementes por microscopia eletrônica de varredura e Espectroscopia por energia dispersiva (MEV-EDS)

A composição elementar das sementes foi analisada por meio da espectroscopia por energia dispersiva (EDS). Na Figura 3 é apresentado o mapeamento microscópico de MEV-EDS, onde se observa os elementos encontrados nos componentes químicos em sementes de *C. arabica* antes de serem tratadas com as dispersões de nanopartículas, ou seja, o tratamento controle, sem a presença de nanopartículas. As imagens geradas pelo MEV-EDS permitem mapear a composição elementar das sementes, fornecendo imagem de cada elemento encontrado separadamente devido a estrutura atômica única deles (VIEIRA *et al.*, 2021).

Figura 3 - Mapeamento microscópico de MEV-EDS de sementes de *Coffea arabica* antes da imersão em nanopartículas.



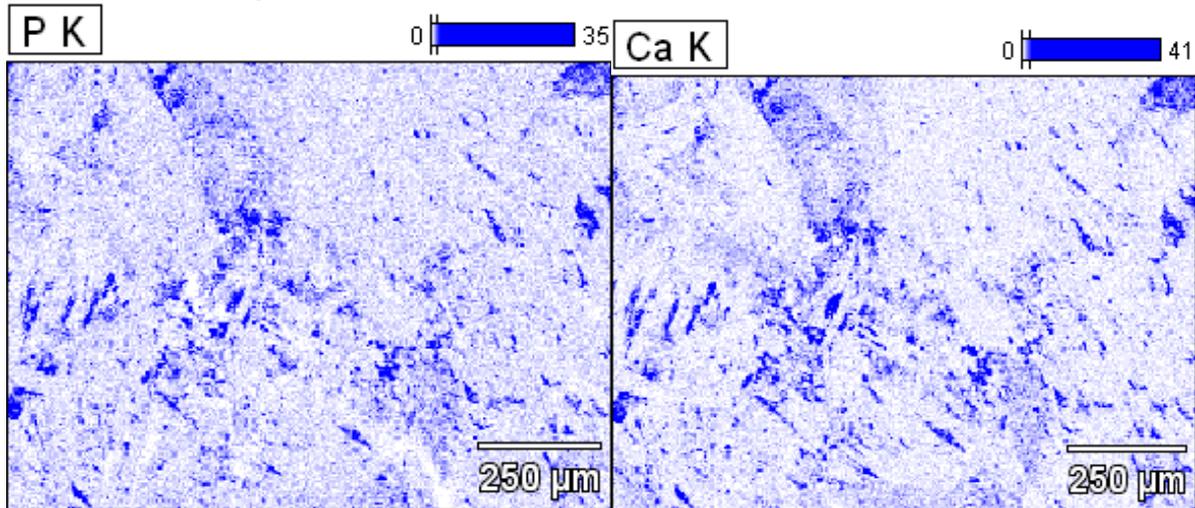
Fonte: Da autora (2023).

A composição química de sementes de café é complexa, pois varia de acordo com o local e sistema de produção. O principal componente químico de sementes de café são os carboidratos, mas também é possível observar em sua composição química proteínas, gorduras, taninos, cafeína e minerais (SAUD; SALAMATULLAH, 2021), sendo que as quantidades desses elementos variam em função do local e sistema de plantio.

Observa-se que em todos os tratamentos analisados, elementos constitutivos das nanopartículas não foram detectados nas sementes, apenas elementos da composição química de sementes de café.

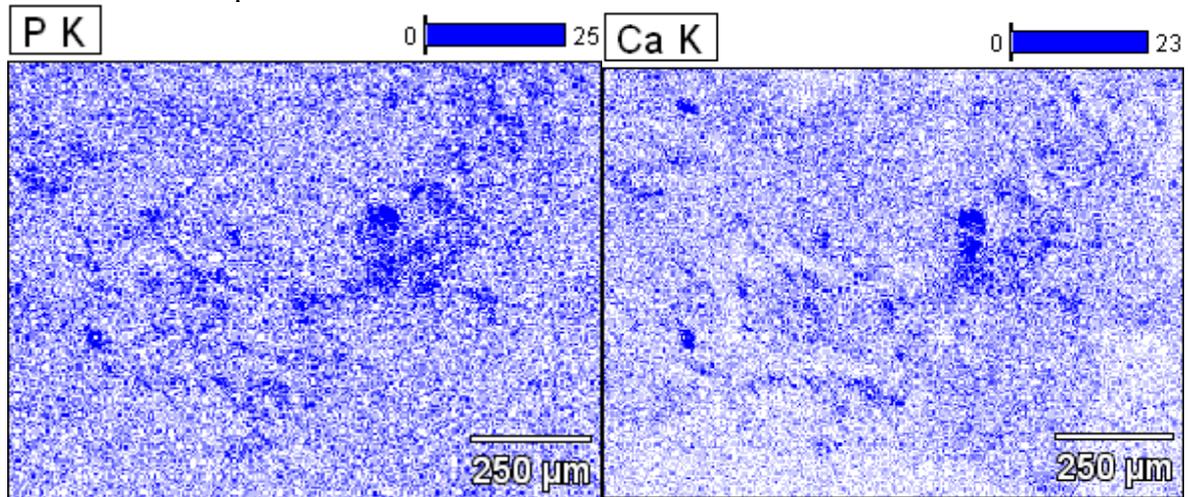
A nanopartícula de HA utilizada tem a composição elemental $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$. No mapeamento microscópico nas imagens das sementes de *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre imersas na dispersão com concentração de 1,5 e 2,5 mg/L geradas pelo EDS (FIGURAS 4, 5, 6 e 7) é possível observar que além dos elementos encontrados no tratamento controle (Figura 1), ocorre a presença do elemento Fósforo (P), com um padrão similar ao elemento Cálcio (Ca). Estes elementos estão presentes na composição da nanopartícula de HA e essas imagens confirmam que a nanopartícula está presente nas sementes.

Figura 4 - Mapeamento microscópico de MEV-EDS dos elementos (P) e Cálcio (Ca) em sementes de *Coffea arabica* tratadas com 1,5 mg/L de nanopartículas de hidroxiapatita.



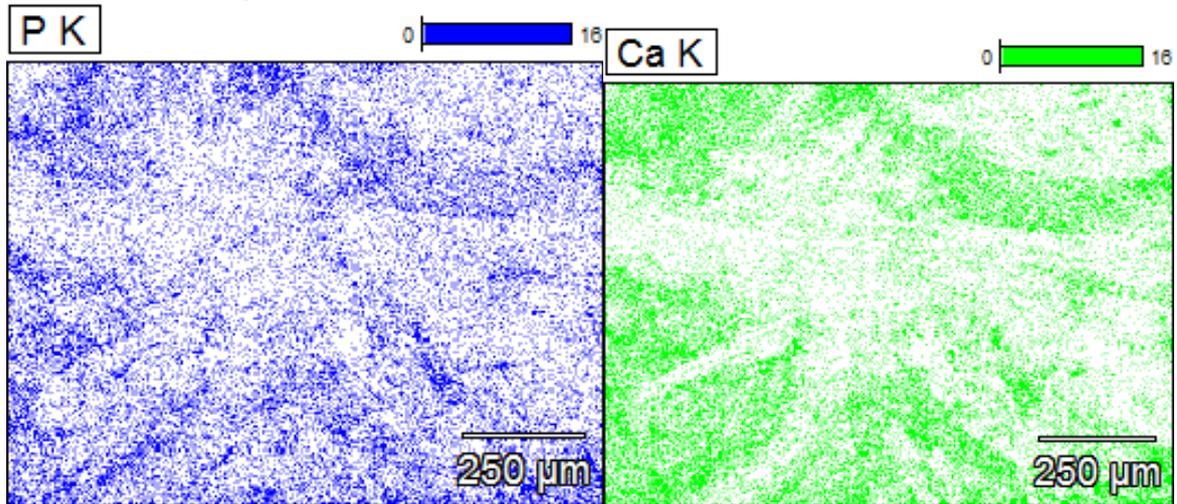
Fonte: Da autora (2023).

Figura 5 - Mapeamento microscópico de MEV-EDS dos elementos Fósforo (P) e Cálcio (Ca) em sementes de *Coffea canephora* tratadas com 1,5 mg/L de nanopartículas de hidroxiapatita.



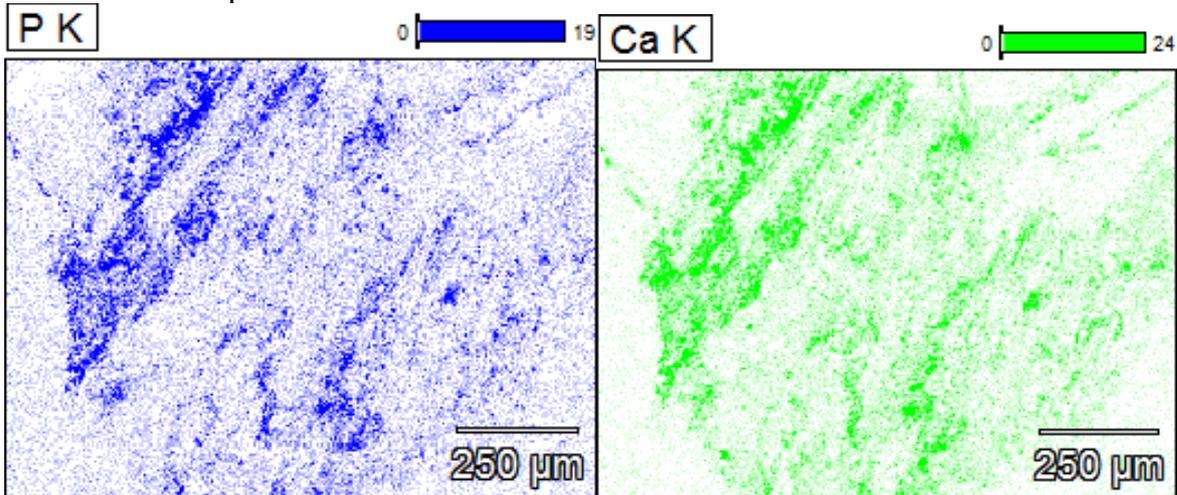
Fonte: Da autora (2023).

Figura 6 - Mapeamento microscópico de MEV-EDS dos elementos (P) e Cálcio (Ca) em sementes de *Coffea arabica* tratadas com 2,5 mg/L de nanopartículas de hidroxiapatita.



Fonte: Da autora (2023).

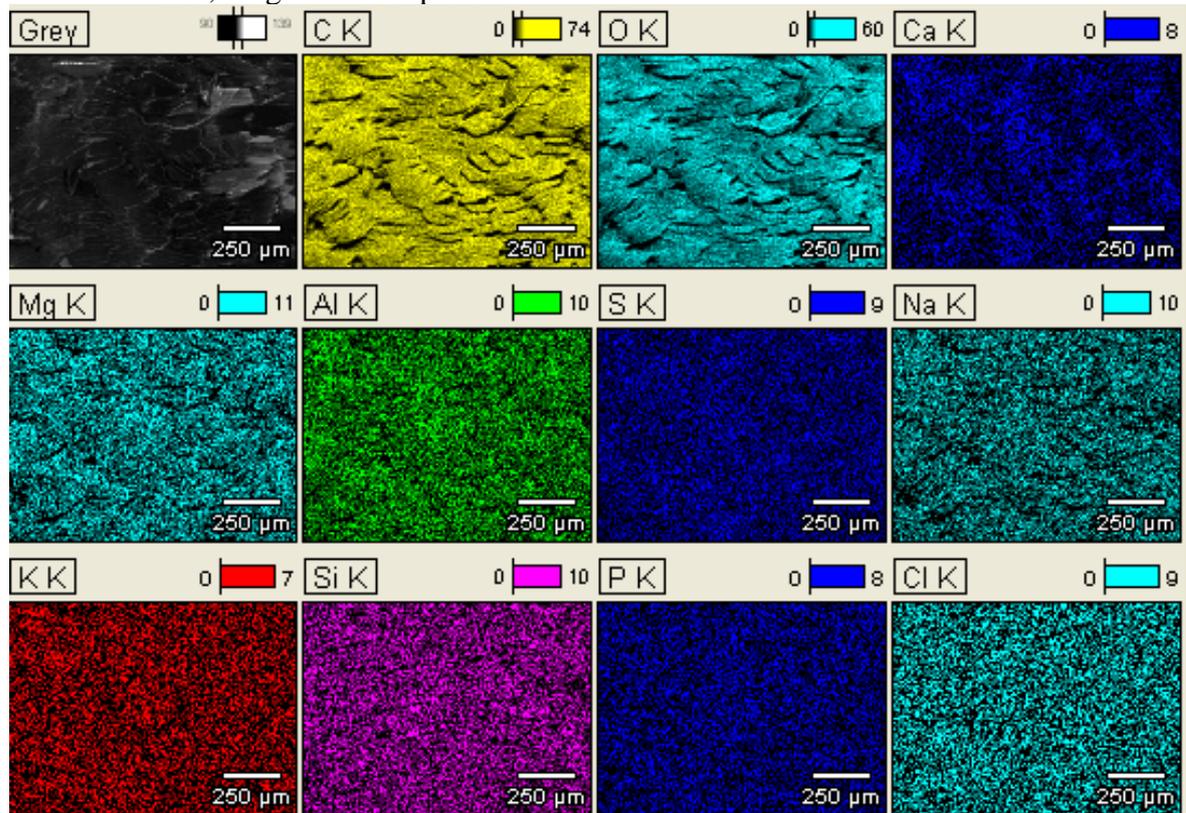
Figura 7 - Mapeamento microscópico de MEV-EDS dos elementos Fósforo (P) e Cálcio (Ca) em sementes de *Coffea canephora* tratadas com 2,5 mg/L de nanopartículas de hidroxiapatita.



Fonte: Da autora (2023).

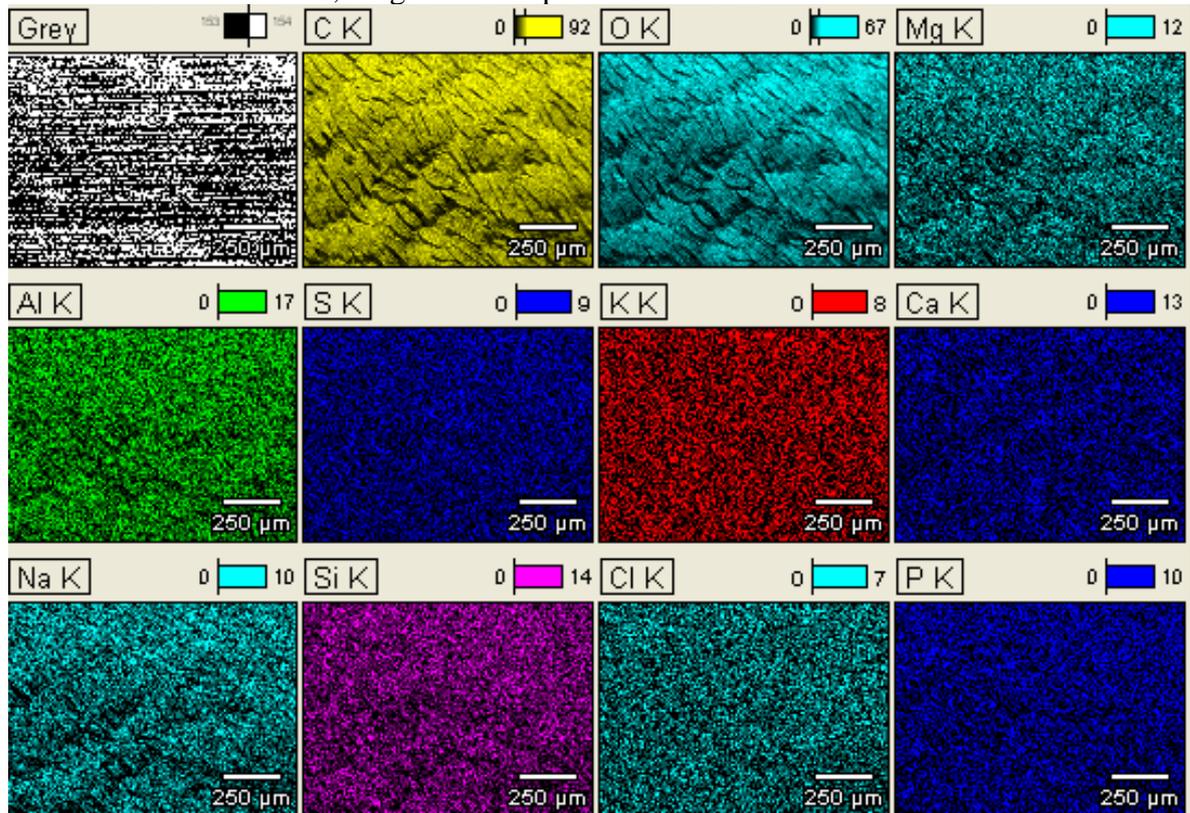
Já nas sementes tratadas com as nanopartículas de FE na concentração 1,5 mg/L não foi possível visualizar o elemento Ferro (Fe) (FIGURAS 8 e 9), o que indica que o tempo e concentração utilizados não foram suficientes para a sua penetração nas sementes.

Figura 8 - Mapeamento microscópico de MEV-EDS de sementes de *Coffea arabica* tratadas com 1,5 mg/L de nanopartículas de ferro.



Fonte: Da autora (2023).

Figura 9 - Mapeamento microscópico de MEV-EDS de sementes de *Coffea canephora* tratadas com 1,5 mg/L de nanopartículas de ferro.



Fonte: Da autora (2023).

O tolueno é um solvente apolar e possui uma baixa miscibilidade em água (POULSON; HARRINGTON; DREVER, 1999). A nanopartícula de FE estava envolta por tolueno e quando colocada em água tende a se atrair por pelas uma as outras, não se dispersando na água. Sendo assim, ocorre a aglomeração das nanopartículas, a dispersão se divide em duas fases e as sementes ficam presentes na fase composta pela água, enquanto as nanopartículas ficam presentes na fase composta pelo tolueno, o que pode ter impedido a nanopartícula de chegar até a superfície das sementes.

Os resultados deste estudo exploratório, sobre o uso de nanopartículas durante a embebição e a germinação das sementes de café, confirmaram a presença da nanopartícula de HA, não sendo esta, prejudicial ao desenvolvimento das plântulas nas condições investigadas. No entanto, maiores concentrações e tempos de embebição devem ser testados para agregar maior quantidade das nanopartículas nas sementes.

4 CONCLUSÕES

As nanopartículas de hidroxiapatita e de ferro não são tóxicas para as sementes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* nas concentrações testadas e podem ser testadas na criopreservação destas sementes.

A nanopartícula de hidroxiapatita influencia positivamente a qualidade fisiológica das sementes nas concentrações testadas, tendo melhor resultado quando utilizada na concentração 2,5 mg/L.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. J.; SULTANA, F.; IQBAL, M. T. Potential of iron nanoparticles to increase germination and growth of wheat seedling. **Journal of Nanoscience with Advanced Technology**, v. 1, n. 3, p. 14–20, 2015.
- ALMUTAIRI, Z. M.; ALHARBI, A. Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants. **Journal of Advances in Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 280–285, 2015.
- BALA, N. *et al.* Effect of Hydroxyapatite nanorod on chickpea (*Cicer arietinum*) plant growth and its possible use as nano-fertilizer. **Iranian Journal of Plant Physiology**, v. 4, n. 3, p. 1061–1069, 2014.
- BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA: SDA. 395 p. 2009.
- CLEMENTE, A. C. S. *et al.* Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, 2011
- COELHO, S. V. B. *et al.* Cryopreservation in *Coffea canephora* Pierre seeds: slow and fast cooling. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 6, p. 588–597, 1 nov. 2018.
- COELHO, S. V. B. *et al.* Tolerância de sementes de *Coffea arabica* L. a temperaturas sub zero. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 41, n. 3, p. 312–321, 01 maio 2017.
- DOLA, D. B. *et al.* Nano-iron oxide accelerates growth, yield, and quality of *Glycine max* seed in water deficits. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 9 set. 2022.
- DUSSERT, S. *et al.* Quantitative estimation of seed desiccation sensitivity using a quantal response model: Application to nine species of the genus *Coffea* L. **Seed Science Research**, v. 9, n. 2, p. 135–144, 1999.
- EMAM, S.; FARROH, K.; HAMAAD, R. Effect of hydroxyapatite and zinc oxide nanoparticles on the germination of some seeds. **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, F. Toxicology & Pest Control**, v. 14, n. 1, p. 271–281, 30 jun. 2022.
- GUBIN, S. P. *et al.* Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties. **Russian Chemical Reviews**, v. 74, n. 6, p. 539–574, 2005.
- IEIRA, M. E. M. *et al.* Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) acoplada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV): fundamentos e aplicações em produtos lácteos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e262101018622, 10 ago. 2021.
- JANMOHAMMADI, M.; SABAGHINIA, N. Effect of pre-sowing seed treatments with silicon nanoparticles on germinability of sunflower (*Helianthus annuus*). **Botanica Lithuanica**, v. 18, n. 1, p. 40–45, 2012.
- MAGHSOODI, M. R.; GHODSZAD, L.; ASGARI LAJAYER, B. Dilemma of hydroxyapatite nanoparticles as phosphorus fertilizer: Potentials, challenges and effects on plants. **Environmental Technology & Innovation**, v. 19, p. 100869, 2020.

MANUCHEHRABADI, N. *et al.* Improved tissue cryopreservation using inductive heating of magnetic nanoparticles. **Science Translation Medicine**, v. 9, n. 379, 2017.

MARCHIOL, L. *et al.* Influence of hydroxyapatite nanoparticles on germination and plant metabolism of tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Preliminary evidence. **Agronomy**, v. 9, n. 4, 27 mar. 2019.

MAZHAR, M. W. *et al.* Seed priming with iron oxide nanoparticles raises biomass production and agronomic profile of water-stressed flax plants. **Agronomy**, v. 12, n. 5, p. 982, 01 maio 2022.

MIHAELA R, DORINA E.C. TMA–OH coated magnetic nanoparticles internalizes in vegetal tissue. **Rom. Jour. Phys.** v. 52, p. 395-420, 2007.

NGO, Q. B. *et al.* Effects of nanocrystalline powders (Fe, Co and Cu) on the germination, growth, crop yield and product quality of soybean (Vietnamese species DT-51). **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 5, 2014.

PANKHURST, Q.A.; THANH, N. T. K.; JONES, S.K.; DOBSON, J. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **J. Phys. D Appl. Phys.**, v. 42, n. 22, 2009.

POULSON, S. R.; HARRINGTON, R. R.; DREVER, J. I. The solubility of toluene in aqueous salt solutions. **Talanta**, v. 48, n. 3, p. 633-641, 1999.

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

RUI, M. *et al.* Iron oxide nanoparticles as a potential iron fertilizer for peanut (*Arachis hypogaea*). **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. June. 2016, 2016.

SALAMA, H. M. H. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). **International Research Journal of Biotechnology** v. 3, n. 10, p. 190-197, 2012.

SAUD, S.; SALAMATULLAH, A. M. Relationship between the chemical composition and the biological functions of coffee. **Molecules**, v. 26, n. 24, p. 7634, 2021.

CAPÍTULO 4 ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN *Coffea arabica* L. SEEDS SUBJECTED TO CRYOPRESERVATION

RESUMO

O armazenamento de sementes de *Coffea arabica* em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ é uma alternativa segura para a conservação de recursos genéticos em longo prazo, porém, ainda não foi encontrado um protocolo adequado para sementes de *C. canephora*. O objetivo deste trabalho foi entender os mecanismos envolvidos na tolerância ou sensibilidade à temperatura ultrabaixa, durante a criopreservação de sementes de *C. arabica*, utilizando a análise de transcriptoma, para, posteriormente, aplicar esses conhecimentos em sementes de outras espécies. Foram utilizadas sementes de *C. arabica* criopreservadas após secagem em duas umidades e submetidas a dois tipos de secagem, sendo elas: sementes secadas em sílica gel até atingirem 20% de umidade (bu), sementes secadas em sílica gel até atingirem 17% de umidade (bu) e sementes secadas em soluções salinas saturadas até 17% de umidade (bu). As sementes foram avaliadas por meio de testes fisiológicos e da regulação da expressão gênica. Sementes criopreservadas após secagem em soluções salinas saturadas apresentam melhor qualidade fisiológica. Os perfis transcriptômicos das sementes submetidas aos três tipos de secagem foram comparados e foi observado um total de 5.903, 3.613 e 10.442 genes diferencialmente expressos (GDEs) identificados nas comparações Controle vs. Sílica17; Sílica17 vs. Sílica20; e Sílica 17 vs. soluções salinas, respectivamente. Foi possível identificar a expressão de genes envolvidos em diferentes mecanismos de resposta ao estresse, tais como *CesA*, *FER*, *COLD1* e genes relacionados as proteínas quinases. A expressão dos genes estudados quando relacionadas ao resultado da avaliação fisiológica de sementes sugerem que as que foram secadas em sílica gel até 17% de umidade (bu) possuem um sistema de sinalização ao estresse mais eficiente que os demais tratamentos, resultando em maior integridade e sobrevivência das sementes após a criopreservação.

Palavras-chave: Café arábica. Criogenia. Qualidade fisiológica. RNAseq. Bioinformática.

ABSTRACT

Storing *Coffea arabica* seeds in liquid nitrogen at -196°C is a safe alternative for the long-term conservation of genetic resources, but a suitable protocol for *C. canephora* seeds has not yet been found. The aim of this work was to understand the mechanisms involved in tolerance or sensitivity to ultra-low temperature during cryopreservation of *C. arabica* seeds, using transcriptome analysis, to later apply this knowledge to seeds of other species. *C. arabica* seeds cryopreserved after drying at two moisture contents and subjected to two types of drying were used: seeds dried in silica gel until they reached 20% moisture content (wb), seeds dried in silica gel until they reached 17% moisture content (wb) and seeds dried in saturated salt solutions until 17% moisture content (wb). The seeds were evaluated using physiological tests and gene expression regulation. Seeds cryopreserved after drying in saturated salt solutions showed better physiological quality. The transcriptomic profiles of the seeds subjected to the three types of drying were compared and a total of 5,903, 3,613 and 10,442 differentially expressed genes (DEGs) were identified in the comparisons Control vs. Silica17; Silica17 vs. Silica20; and Silica17 vs. saline solutions, respectively. It was possible to identify the expression of genes involved in different stress response mechanisms, such as *CesA*, *FER*, *COLD1* and genes related to protein kinases. The expression of the genes studied when related to the result of the physiological evaluation of the seeds suggests that those that were dried in silica gel to 17% moisture content (bu) have a more efficient stress signaling system than the other treatments, resulting in greater integrity and survival of the seeds after cryopreservation.

Keywords: Arabica coffee. Cryogenics. Physiological quality. RNAseq. Bioinformatics.

1 INTRODUCTION

The ability of an organism to survive drying and recover its functions after being rehydrated is known as desiccation tolerance (OLIVER; TUBA; MISHLER, 2000). The species of the *Coffea* sp genus with economic importance, *Coffea arabica* L. and *C. canephora* Pierre, are classified as intermediate in terms of their tolerance to desiccation and due to this characteristic, they have low longevity, which makes the preservation of germplasm in seed banks a challenge (ASHEBRE, 2016).

Cryopreservation, that is, storage in liquid nitrogen at -196°C , is a safe alternative for long-term storage of *C. arabica* seeds (COELHO; ROSA; FERNANDES, 2017). However, a safe protocol for the cryopreservation of *C. canephora* seeds has not yet been obtained, and there are still many doubts about the behavior of these during the stages for the safe immersion of the seeds in liquid nitrogen.

Drying the seeds, as well as exposure to ultra-low temperatures, influences cellular water relations, and there is a need to eliminate freezable water from the genetic material before immersion in liquid nitrogen, to avoid the formation of intracellular ice crystals during the process. In addition, tolerance to low temperatures and desiccation are seen to trigger similar responses and have similar regulatory mechanisms (VOLK, 2010).

Cryobiology is the branch of biology that studies the effects of low temperatures on cells, tissues, and living organisms, with cryopreservation as its focus. The main purpose of cryobiology is to understand the molecular and biological processes involved that allow plants tissues and organs to survive for long periods at low temperatures in liquid nitrogen (VOLK, 2010).

Understanding the genetic basis of the characteristics of interest is important (DEREEPER *et al.*, 2015) and transcriptome analyses can provide a better understanding of the behavior of seeds during desiccation and cryopreservation.

RNAseq identify on a large scale differentially expressed genes in cells, tissues, and living organisms, such as seeds, by comparing different processes. In this case, differential expression analysis allows the identification of the molecular mechanisms involved in metabolism and correlates them with the physiological quality of the seeds, since the global analysis of the gene response contributes to the identification and validation of genes that may be involved.

It is currently possible to cryopreserve *C. arabica* seeds successfully (COELHO; ROSA; FERNANDES, 2017), but despite many studies using different techniques (COELHO

et al., 2018, 2019; MORAIS, 2023), it has not yet been possible to obtain a protocol for cryopreserving *C. canephora* seeds safely. Therefore, the purpose of this work was to understand the molecular mechanisms involved in the tolerance or sensitivity of seeds to the ultra-low temperatures reached during the cryopreservation of *C. arabica*, using the RNAseq technique, to later apply this knowledge to seeds of other species, with a view to their cryopreservation.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Harvesting and processing coffee fruits and seeds

Fruits of the species *C. arabica* L., cultivar Catuaí amarelo IAC 62, were harvested at the stage of physiological maturity (cherry) from the Procafé Foundation Experimental Farm in Varginha (MG). The fruit was mechanically pulped, and the seeds were demucilated by fermentation in water for 24 hours at room temperature at the Central Seed Laboratory of the Universidade Federal de Lavras (UFLA). The seeds were then dried superficially in the shadow, in a single layer on a screen and the initial water content was determined.

After harvesting and processing, the seeds were stored in a cold and dry (15 °C and 45%RH) room in the Seed Sector until the physiological tests were carried out.

2.2 Drying the seeds

The seeds of *C. arabica* cultivar Catuaí amarelo IAC 62 were dried using different drying methods: drying in silica gel up to 20% moisture content (wb), drying in silica gel up to 17% (wb) and drying using saturated salt solutions up to 17% (wb).

For drying in silica gel, the seeds were placed in a single layer on metal screens in an acrylic gerbox containing 80 mg of activated silica gel inside and below the screens. During drying, the silica was changed every 24 hours. The containers were kept in growth chambers at a constant temperature of 25 °C. Water loss during drying was monitored by continuous weighing on a 0.001 g precision scale until the seeds reached the water content of interest, 17% or 20% (wet basis).

For drying in the saturated salt solutions, the seeds were placed in a single layer in the same container as before, and the solution was inside the plastic boxes, gerbox. The salts used were ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄) and sodium chloride (NaCl). Water loss was monitored during drying by constant weighing on a 0.001 g precision scale until the seeds reached the water content of interest, 17% (wet basis).

2.3 Seed cryopreservation

After drying, the seeds were packed in tri-folded aluminum envelopes and immersed in liquid nitrogen. When they were removed, they were thawed in a water bath at 40 °C for two minutes (DUSSERT et al., 1998).

After rewarming, the seeds were subjected to water content determination, physiological tests, total RNA extraction, and cDNA synthesis (TABLE 1).

Table 1 - Description of the RNA samples extracted from coffee seeds for RNA Seq.

Samples	Description
1	Seeds dried in Silica to 20% moisture content with 2 minutes of reheating
2	Seeds dried in Silica to 20% moisture content with 4 minutes of reheating
3	Seeds dried in Silica to 20% moisture content with 6 minutes of reheating
4	Seeds dried in Silica to 17% moisture content with 2 minutes of reheating
5	Seeds dried in Silica to 17% moisture content with 4 minutes of reheating
6	Seeds dried in Silica to 17% moisture content with 6 minutes of reheating
7	Seeds dried in (NH ₄) ₂ SO ₄ to 17% moisture content with 2 minutes of reheating
8	Seeds dried in NaCl to 17% moisture content with 2 minutes of reheating
9	Untreated sample (Control)

Source: By the author (2023).

2.4 Determination of water content and physiological evaluations

- a) Determination of moisture content - carried out using the laboratory oven method at 105 °C for 24 hours (BRASIL, 2009), with two replicates of 10 seeds. The results were expressed as a percentage based on wet weight.
- b) Germination test - carried out with four replicates of 25 seeds from each treatment, sown on sheets of germination paper, moistened with water in an amount equivalent to 2.5 times the weight of the dry paper. The seeds were kept in a germinator at a constant temperature of 30 °C and the percentage of normal seedlings was assessed after 30 days, by the requirements of the RAS (BRASIL, 2009). The percentage of root protrusion at 15 days after sowing and the percentage of seedlings with expanded cotyledon leaves at 45 days after sowing was also determined.
- c) Tetrazolium test - carried out on four replicates of 10 seeds, soaked in distilled water for 48 hours at 30 °C (CLEMENTE *et al.*, 2011). After soaking, the embryos were removed using a scalpel to avoid damaging them. For staining, the embryos were immersed in 0.5% tetrazolium solution, in the absence of light, for a period of three hours, at 30 °C, when they were evaluated, and the results expressed as a percentage of viable embryos.

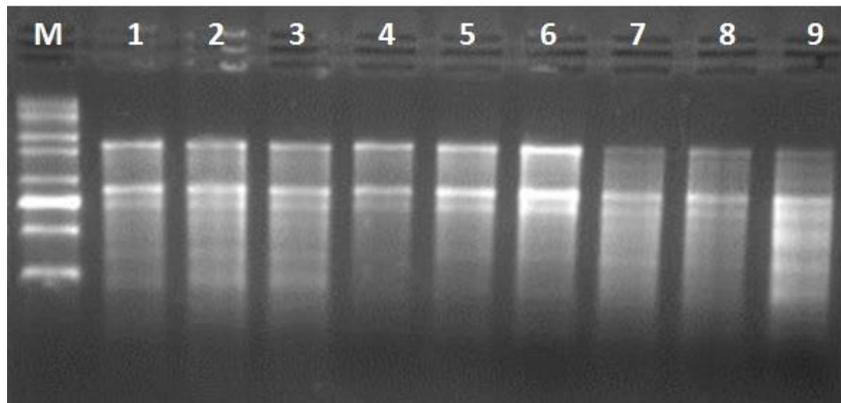
2.5 Experimental design and statistical analysis

The experiment was conducted in a completely randomized design. An analysis of variance was carried out on the physiological evaluation data and the means were compared using the *Scott-Knott* test at 5% probability.

2.6 Total RNA extraction and cDNA synthesis

50 g of seeds were macerated in porcelain crucibles using a pestil and immersed in liquid nitrogen until they reached the consistency of a fine powder for each sample. Total RNA was extracted according to the protocol suggested by Chang *et al.* (1993). Total RNA was quantified using a UV spectrophotometer model UV-1700 PharmaSpec (Shimadzu), measuring the absorbance of the samples at 230, 260, and 280nm. The integrity of the total RNA was checked by electrophoresis on a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide (FIGURE 1). All RNA samples were treated with DNase to remove all genomic DNA according to the manufacturer's recommendations (Promega). 2,000ng of total RNA was used for each DNase treatment (CHANG; PURYEAR; CAIRNEY, 1993).

Figure 1 - 1% denaturing agarose gel of samples 1 to 9 in Table 1. M= RNA molecular weight marker.



Source: By the author (2023).

2.7 Treatment with DNase and pool of samples for RNASeq analysis

After quantification, the samples were treated using the RQ1 RNase-Free DNase Kit (Promega), according to the specifications contained in the manufacturer's protocol, to remove any traces of genomic DNA that might remain in the samples after RNA extraction. To assess the integrity and quality of the samples, the treated RNA was subjected to denaturing agarose

gel electrophoresis, and the samples were quantified again. The sample pool for RNASeq analysis was made by adding equal amounts (in ng) of RNA according to Table 2. Once their integrity had been verified, the samples were sent for sequencing.

Table 2 - Samples of RNA extracted from coffee seeds for RNA Seq. The table lists the pools of samples 1 to 9 (TABLE 1) with their respective Abs 260/280 ratios and approximate concentrations.

Samples	Relationship _{260/280}	Approximate concentration
P1 (1+2+3)	1.85	70ng/uL
P1 (4+5+6)	1.82	70ng/uL
P3 (7+8)	1.82	70ng/uL
R (9)	1.70	65ng/uL

Source: By the author (2023).

2.8 Obtaining transcriptomes, identification, and DEGs analysis

All raw readings were stored on the HPC@ISU equipment at Iowa State University. First, quality control of the raw reads was done using the FASTQC algorithm (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

The *C. arabica* genome (Caturra red-Cara_1.0, GenBank assembly accession: GCA_003713225.1) available in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database was used in this study.

Salmon 1.1.0 was used to align the index transcriptomes to their respective reads. The resulting mapping files were imported and further analyzed using R statistical software.

DESeq2, a Bioconductor package running in R, was used to identify differentially expressed genes (DEGs). To create a DESeqDataset, the transcript abundance quantifier pipeline for DESeq2 was followed, importing the files created by Salmon, metadata, and the reference transcriptome. After the DESeqDataset object has been created, differential expression analysis is performed.

The adjusted p-value $P < 0.005$ was used and the Log2 Fold Change was used to select upregulated and downregulated genes.

2.9 Functional analysis

To investigate the biological functions of the DEGs, they were mapped to the Gene Ontology (GO) database (<http://geneontology.org/>) for biological processes (BP), molecular functions (MF), and cellular components (CC). Additionally, the DEGs were mapped to the

Plant Reactome database (<https://plantreactome.gramene.org/>) for biological pathways. DEGs from the most represented GO terms and Reactome pathways were discussed further. Significantly enriched GO terms for the DEGs also were identified using Fisher's Exact Test, with the false discovery rate (FDR) set at 0.05. The analyses were done using the OmicsBox tool (<https://www.biobam.com/omicsbox/>).

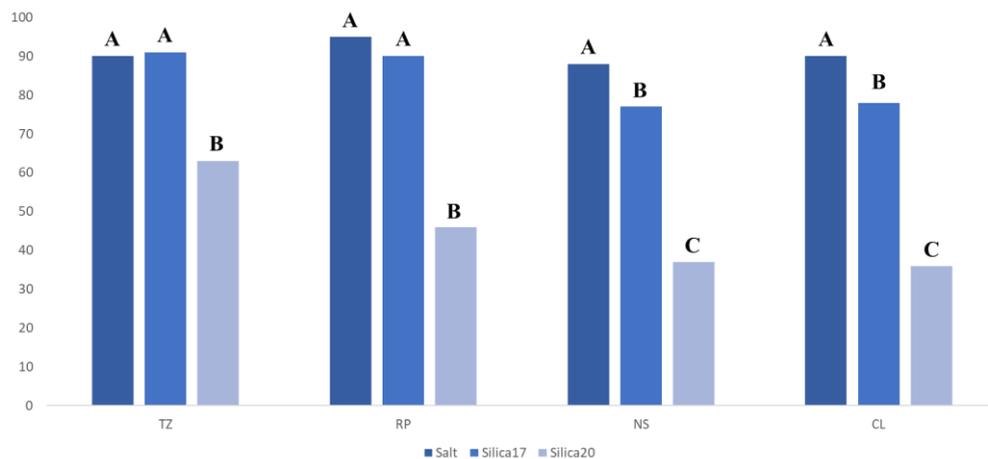
BUSCO v.5.4.7 (SIMÃO *et al.*, 2015) with the eudicots_odb10 dataset was used for the evaluation of the completeness of the resulting transcriptome, with default settings.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Evaluating the physiological quality of seeds

The viability of the cryopreserved seeds was influenced by the drying method and humidity, according to the results of the physiological tests shown in Figure 2. The best performance was observed in the treatment composed of seeds dried in the two saturated salt solutions at 17% moisture content (m.c.) and the lowest performance was observed in seeds dried in silica gel at 20% m.c.

Figure 2 - Effect of different dryings on the percentages of viable embryos in the tetrazolium salt (TZ), root protrusion (RP), normal seedlings (NS), and seedlings with expanded cotyledonary leaves (CL) of cryopreserved coffee seeds. Averages followed by the same letter do not differ statistically by the *Skott-Knott* test at the 5% probability level.



Source: By the author (2023).

3.2 Transcriptomic analysis

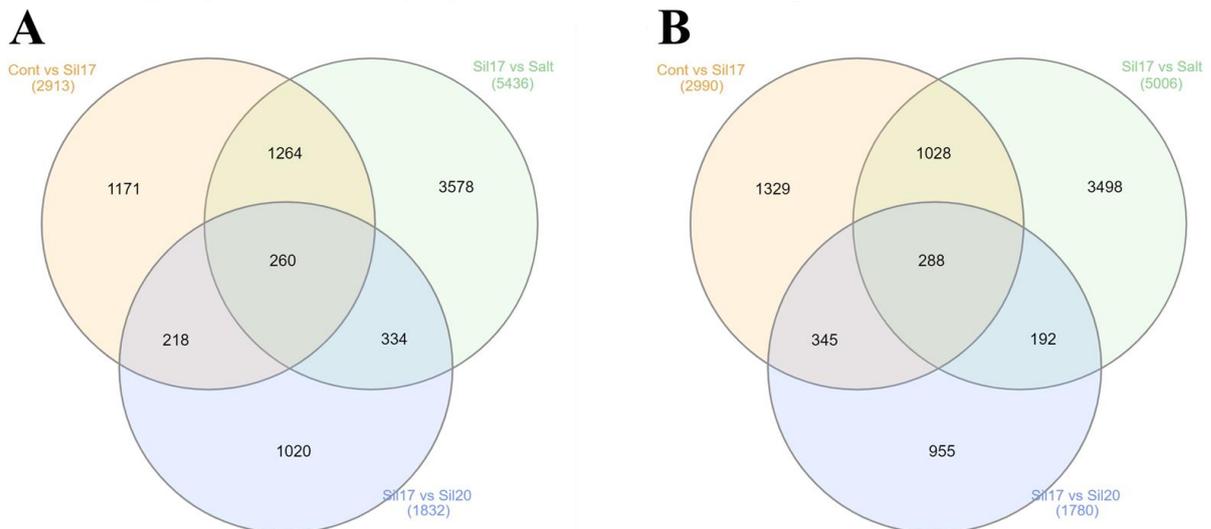
Four samples of *C. arabica* seeds (Control, Silica17%, Silica20% and Salt) were subjected to transcriptomic analysis to identify genes and metabolic pathways associated with tolerance or sensitivity to ultra-low temperatures during the seed cryopreservation process. A total of 12 libraries were sequenced (four treatments x three biological replicates) totaling 382,127,679 reads.

The result of BUSCO was C: 96.69% [S: 19.22%, D: 77.47%], F: 0.56%, and M: 2.75% (C, S, D, F, and M referring to Complete, Single, Duplicated, Fragmented and Missing). The result of BUSCO showed that almost all core genes of Eudicots were included in the

transcriptome obtained, suggesting that this data has an acceptable comprehensiveness for a reference transcriptome. The reason why most of the BUSCO evaluation results are filled with "D" and "C" may be that the reference transcriptome includes many isoforms of major single-copy genes.

To better investigate changes in gene expression during seed drying and immersion in liquid nitrogen, three comparison groups were established based on contrasting treatments and treatments with high survival after cryopreservation for differential expression analysis: Control vs. Silica17%; Silica17% vs. Silica20%; and Silica17% vs. Salts. In total, 5,903 (2,913 upregulated and 2,990 downregulated), 3,612 (1,832 upregulated and 1,780 downregulated) and 10,442 (5,436 upregulated and 5,006 downregulated) DEGs were identified in these groups, respectively, using the $P_{adj} < 0.005$ criterion. A total of 548 DEGs were shared between the three groups, of which 260 were upregulated and 288 downregulated). In addition, 2,500 (1,171 upregulated and 1,329 downregulated), 1,975 (1,020 upregulated and 955 downregulated) and 7,076 (3,578 upregulated and 3,498 downregulated) specific DEGs were found in Control vs. Silica17%, Silica 17% vs. Silica20% and Silica17% vs. Salts, respectively (FIGURE 3 A and B). The treatments were compared always using the Silica17% treatment as the reference, i.e. the best cryopreservation treatment (FIGURE 4).

Figure 3 - Venn diagrams showing the number of DEGs identified in the three comparison groups. (A) DEGs upregulated. (B) DEGs downregulated.



Source: By the author (2023).

By analyzing the Venn diagrams, it can be seen that the comparisons of Control vs. Silica 17 and Silica 17 vs. Silica 20 showed many upregulated and downregulated genes in common.

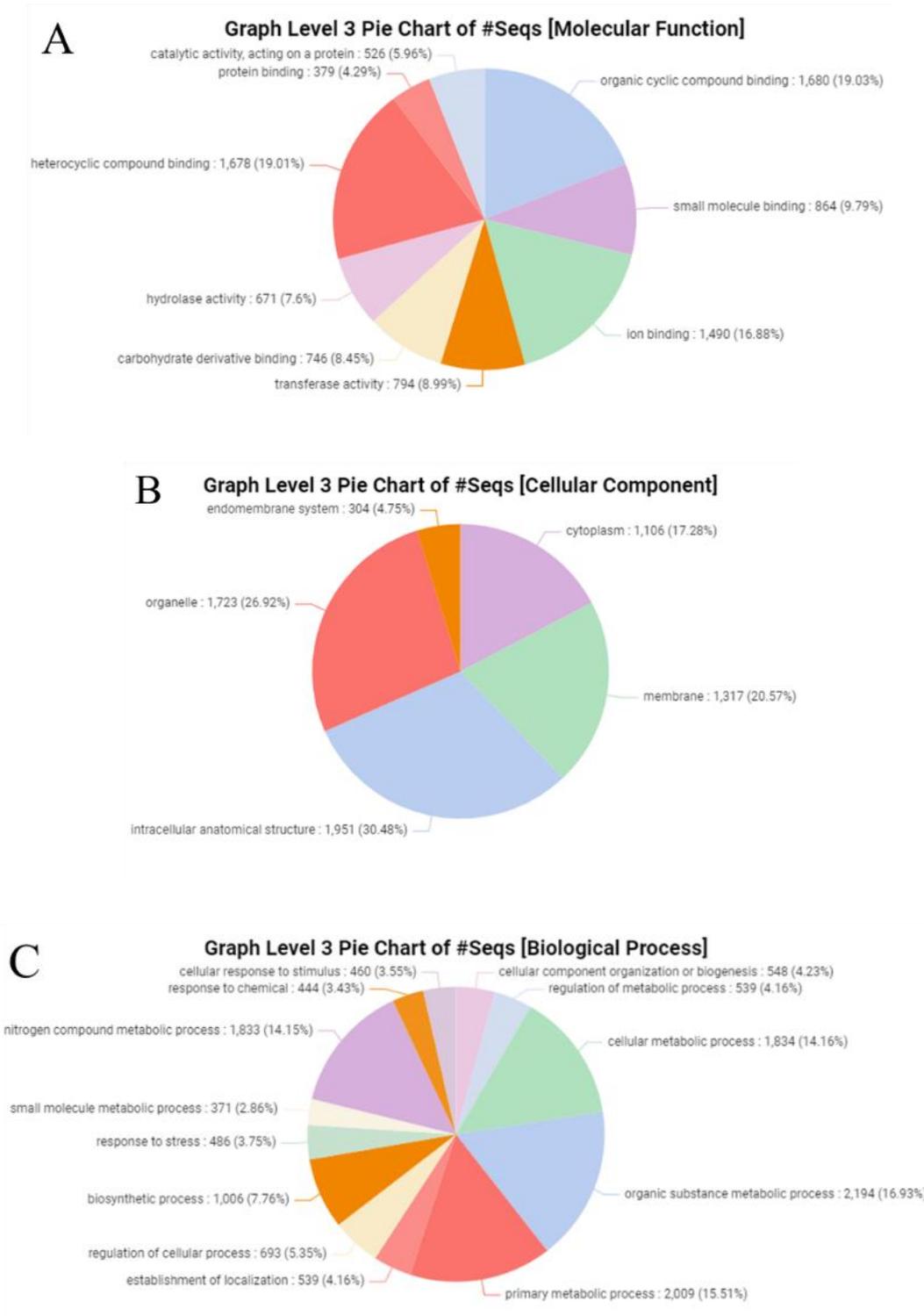
According to the results, the type of drying is capable of triggering different processes in the seeds. A greater number of DEGs were observed in the comparison between seeds dried in silica and salts up to 17% m.c. The comparison between seeds dried to 17% and 20% in silica showed a lower number of DEGs.

3.2.1 Classification in Gene Ontology Terms

To understand which processes were triggered in *C. arabica* L. seeds during drying and immersion in liquid nitrogen, the DEGs were classified in terms of the Gene Ontology (GO) hierarchy. According to the results, the DEGs were classified into three categories: Molecular Function (MF), Cellular Component (CC) and Biological Process (BP) (FIGURES 4 A, B, C, 5 A, B, C and FIGURE 6 A, B, C).

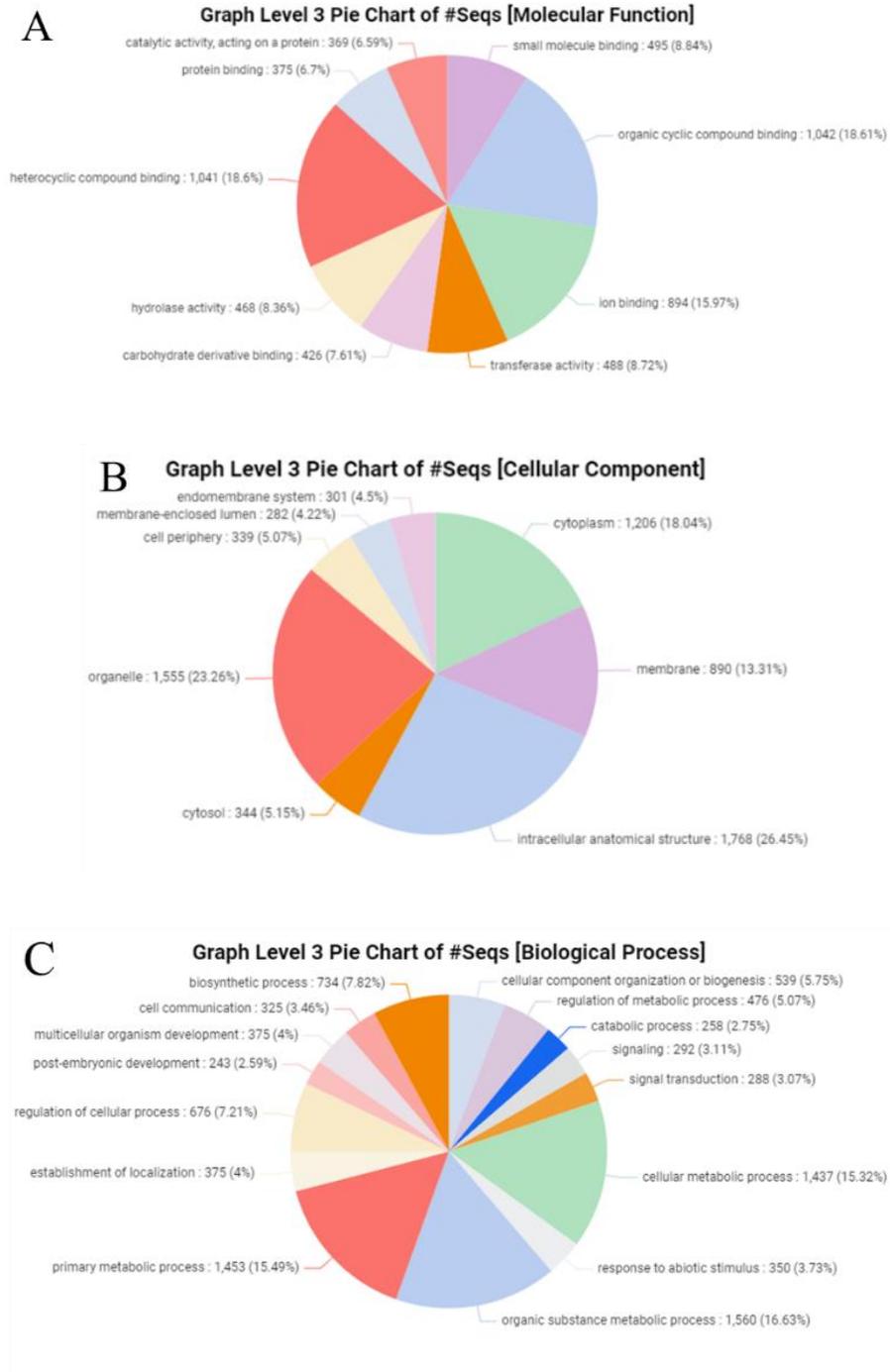
Within the MF category, DEGs were more involved, in all combinations, in Heterocyclic Compound Binding, Organic Cyclic Binding, and Ion Binding. In the CC category, DEGs were more involved in Intracellular anatomical structure, organelle, and membrane. In the BP category, DEGs were more involved in the organic substance process, primary metabolic process, and cellular metabolic process.

Figure 4 - Classification of DEGs in the Control vs. Silica17% comparison in terms of Gene Ontology (GO).



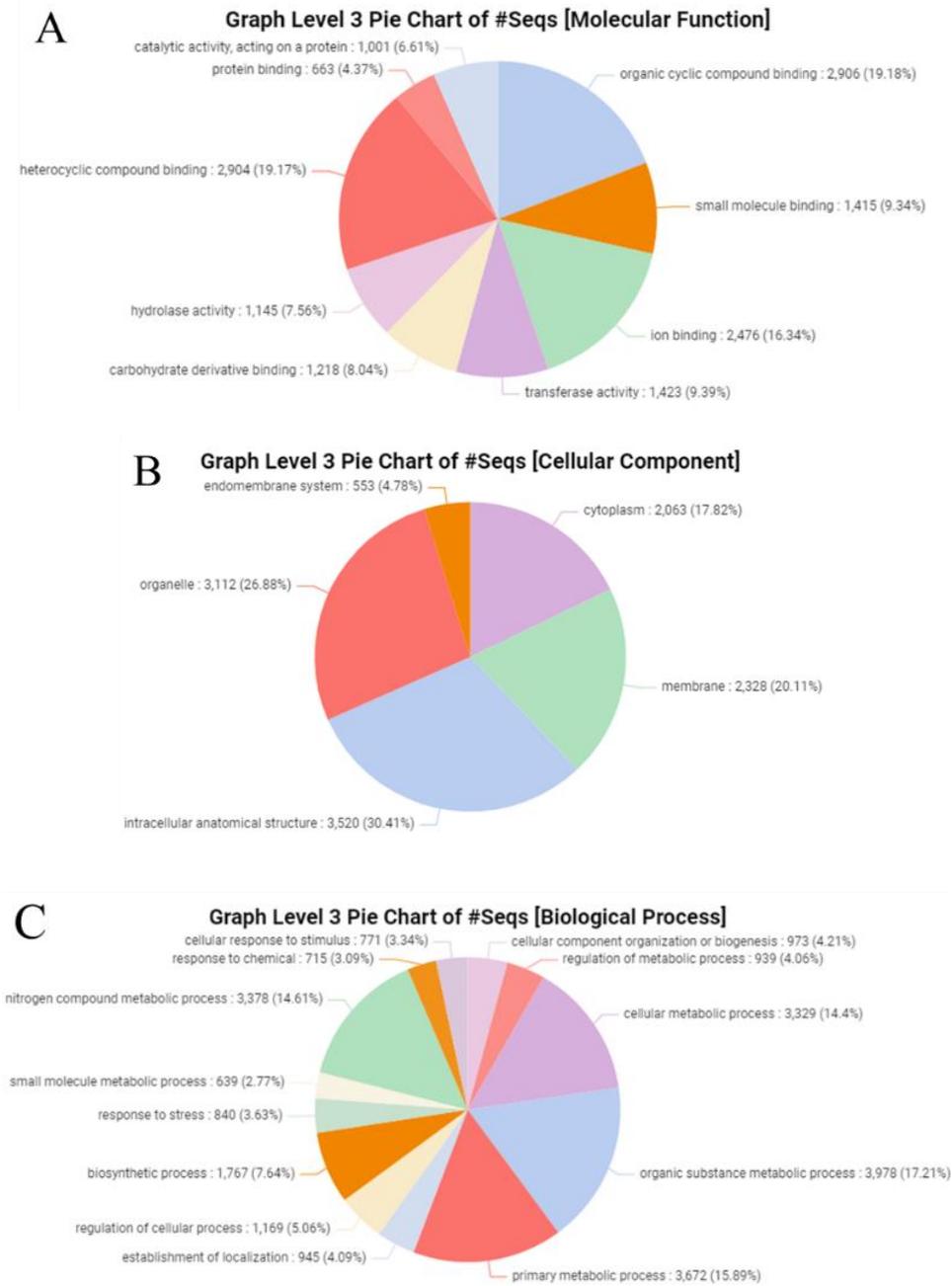
Source: By the author (2023).

Figure 5 - Classification of DEGs in the Silica17% vs. Silica 20% comparison in terms of Gene Ontology (GO).



Source: By the author (2023).

Figure 6 - Classification of DEGs in the Silica17% vs. Salt comparison in terms of Gene Ontology (GO).



Source: By the author (2023).

In search of a better understanding of the biological functions performed by DEGs, an enrichment analysis of GO terms was carried out using Fisher's test (TABLES 3, 4, and 5).

Table 3 - Top 10 GO terms significantly enriched in differentially expressed transcripts between Control vs. Silica 17% treatments (Fisher's enrichment analysis).

tag	GO ID	GO Name	GO Category	FDR	P-value
Under	GO:0140662	ATP-dependent protein folding chaperone	MF	6.14871E-15	1.00151E-17
Over	GO:0043531	ADP binding	MF	6.66704E-14	1.21369E-16
Under	GO:0003729	mRNA binding	MF	5.76920E-11	2.43216E-13
Over	GO:0004523	RNA-DNA hybrid ribonuclease activity	MF	4.79517E-9	3.67551E-11
Under	GO:0016887	ATP hydrolysis activity	MF	3.97199E-8	3.61539E-10
Under	GO:0003743	translation initiation factor activity	MF	2.95742E-7	2.97527E-9
Under	GO:0005524	ATP binding	MF	9.15936E-7	9.82895E-9
Under	GO:0003924	GTPase activity	MF	2.988935E-6	3.52245E-8
Over	GO:0090502	RNA phosphodiester bond hydrolysis, endonucleolytic	BP	4.358214E-6	5.34494E-8
Under	GO:0005730	nucleolus	CC	4.959179E-6	6.22451E-8

MF: Molecular function, BP: Biological process, CC: Cellular component.

Source: By the author (2023).

Table 4 - Top 10 GO terms significantly enriched in differentially expressed transcripts between Silica17% and Silica20% treatments (Fisher's enrichment analysis)

tag	GO ID	GO Name	GO Category	FDR	P-value
Over	GO:0044183	protein folding chaperone	MF	1,5364E-10	1,7398E-13
Over	GO:0005829	cytosol	CC	1,5875E-05	1,7293E-07
Over	GO:0006886	intracellular protein transport	BP	1,5785E-05	1,2293E-06
Over	GO:0006913	nucleocytoplasmic transport	BP	1,0228E-04	1,2680E-05
Over	GO:0140657	ATP-dependent activity	MF	5,9818E-04	1,9802E-05
Over	GO:0005840	ribosome	CC	9,0654E-04	3,2510E-05
Over	GO:0005198	structural molecule activity	MF	3,6985E-03	1,4794E-04
Over	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	BP	5,6611E-03	2,3425E-04
Over	GO:0045182	translation regulator activity	MF	7,2754E-03	3,1109E-04
Over	GO:0006457	protein folding	BP	8,5565E-03	3,8947E-04

MF: Molecular function, BP: Biological process, CC: Cellular component

Source: By the author (2023).

Table 5 - GO terms significantly enriched in differentially expressed transcripts between Silica 17% and Sais treatments (Fisher's enrichment analysis).

tag	GO ID	GO Name	GO Category	FDR	P-value
Over	GO:0005635	nuclear envelope	CC	1,8794E-04	3,3000E-05
Over	GO:0023052	signaling	BP	1,6293E-02	3,9553E-03
Over	GO:0140104	molecular carrier activity	MF	1,2056E-02	2,8103E-03
Over	GO:0005730	nucleolus	CC	1,6192E-16	1,3535E-17
Over	GO:0016874	ligase activity	MF	1,4375E-06	1,6578E-07
Over	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	BP	1,8810E-02	4,7445E-03
Over	GO:0005854	nascent polypeptide-associated complex	CC	1,8810E-02	4,7226E-03
Over	GO:0005739	mitochondrion	CC	1,2141E-08	1,2599E-09
Over	GO:0016209	antioxidant activity	MF	2,4439E-04	4,3484E-05
Over	GO:0006520	amino acid metabolic process	BP	1,7950E-09	1,8553E-10

MF: Molecular function, BP: Biological process, CC: Cellular component.

Source: By the author (2023).

The functional analyses of the GOs revealed a series of genes, metabolic pathways, molecular functions, and biological processes that were altered as a result of the treatments.

However, when analyzing Table 3, it is possible to identify that the drying process significantly altered pathways responsible for molecular functions.

Tables 3 and 4 shows that the most enriched GO terms were related to chaperone proteins. Chaperone proteins, or molecular chaperones, have a crucial role in assisting other proteins, ensuring correct folding during or after synthesis, facilitating refolding after partial denaturation, and aiding translocation to their functional cellular locations. Some chaperones also act as proteases and many of them, especially heat shock proteins, increase in quantity in response to cellular stress, helping to neutralize the effects of protein denaturation caused by stressors (MACARIO; MACARIO, 2007).

Table 5 shows that the term signaling was significantly enriched. This function is related to the activation of genes in response to a stimulus, a process that begins with the signal, inducing the activation/deactivation of genes in a cascade, triggering a cellular response, which may be, in this case, the response to the stress suffered by the plants, as will be discussed later. It was also possible to observe that the term antioxidant activity was enriched, also showing that there was the expression of genes in different response routes to the stress suffered during cryopreservation.

When analyzing the TOP5 upregulated and downregulated DEGs (TABLE 6), it was possible to observe genes involved in different processes. According to the UniProt database, most of the genes are involved in response mechanisms to different stresses. Genes that are induced during stress conditions in plants can act as protectors of cells against stress, being responsible for producing metabolic proteins that are important for this protection and can also act in the regulation of genes that will translate stress-responsive signals (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006).

For the Silica17% vs Silica20% comparison, *CBL1* gene was downregulated. Studies with *Arabidopsis thaliana* L. show that overexpression of this gene is associated with greater tolerance to saline and drought conditions and less tolerance to freezing (CHEONG *et al.*, 2003). This gene is also associated with negative regulation of abscisic acid (ABA) responses (GUO *et al.*, 2002).

The *GPA1* gene was downregulated in the Silica17% vs. Silica20% combination. This gene regulates ABA signaling in the germination and development of young seedlings and acts as a reactive oxygen species (ROS) signaler to protect chloroplasts and cell membranes (JOO *et al.*, 2005; WARPEHA *et al.*, 2007).

As the *CBL1* and *GPA1* genes were downregulated in the Silica17% treatment, this indicates that they had the highest expression in the Silica20% treatment. This overexpression

is consistent with the physiological results, since this was the treatment with the lowest survival rate in cryopreservation, indicating that there was a low cooling tolerance and a high production of ROS which may have led to cell death.

The *RGGA* gene is directly related to ABA response, salt stress tolerance, and water stress tolerance (AMBROSONE *et al.*, 2015) and was upregulated in the Silica17% vs. Salts. The *PQT3* gene was also upregulated in this combination and Luo *et al.* (2016) found in their research that this gene acts as a negative regulator of oxidative stress, that is, greater expression of this gene means less oxidative stress in the plant.

By observing the downregulated DEGs from the Silica17% vs Salts combination, it was possible to observe the *ADC* gene, a gene that plays an important role in stress tolerance in plants as it is capable of repressing the accumulation of ROS in cells (WANG *et al.*, 2011).

ABA plays an important role during the adaptation of vegetative tissues to abiotic stresses such as cold and freezing and can regulate different genes that may be involved in tolerance to the stresses suffered by the seed (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006). This explains why many of the genes found in the TOP 5 combinations are related to ABA signaling and response.

Table 6 - TOP 5 DEGs upregulated e downregulated. (To be continued)

Combination	Tag	Name	log2FoldChange
Control vs. Silica17%	Up	PH, RCC1 and FYVE domains-containing protein 1-like (<i>PRAF1</i>)	10.83
Control vs. Silica17%	Up	phosphatidylinositol 4-kinase gamma 7-like (<i>PI4KG7</i>)	1010.61
Control vs. Silica17%	Up	replication factor C subunit 1-like (<i>RFC1</i>)	10.55
Control vs. Silica17%	Up	beta-galactosidase 9-like (<i>BGAL9</i>)	10.53
Control vs. Silica17%	Up	putative leucine-rich repeat-containing protein DDB_G0290503	10.39
Control vs. Silica17%	Down	arogenate dehydrogenase 1 (<i>TYRAAT1</i>)	-11.19
Control vs. Silica17%	Down	sec1 family domain-containing protein MIP3-like (<i>MIP3</i>)	-10.80
Control vs. Silica17%	Down	sphingoid long-chain bases kinase 2, mitochondrial-like (<i>LCKB2</i>)	-10.63
Control vs. Silica17%	Down	RAB11-binding protein RELCH homolog	-9.91
Control vs. Silica17%	Down	MACPF domain-containing protein CAD1-like (<i>CADI</i>)	-9.89
Silica17% vs. Silica20%	Up	autophagy-related protein 13b-like	10.93
Silica17% vs. Silica20%	Up	testis-expressed protein 2-like	10.63
Silica17% vs. Silica20%	Up	5'-nucleotidase SurE-like	10.42
Silica17% vs. Silica20%	Up	RING-H2 finger protein ATL67-like (<i>ATL67</i>)	10.33
Silica17% vs. Silica20%	Up	apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus-like	10.08
Silica17% vs. Silica20%	Down	phospholipid-transporting ATPase 2 (<i>ALA2</i>)	-11.25
Silica17% vs. Silica20%	Down	calcineurin-binding protein 1-like (<i>CBL1</i>)	-11.11
Silica17% vs. Silica20%	Down	MACPF domain-containing protein CAD1-like (<i>CADI</i>)	-11.09
Silica17% vs. Silica20%	Down	transcription initiation factor TFIID subunit 15-like (<i>TAF11</i>)	-11.04
Silica17% vs. Silica20%	Down	guanine nucleotide-binding protein alpha-1 subunit-like (<i>GPA1</i>)	-10.71

Table 6 - TOP 5 DEGs upregulated e downregulated. (Conclusion)

Combination	Tag	Name	log2FoldChange
Silica17% vs. Salts	Up	RGG repeats nuclear RNA binding protein A-like (<i>RGGA</i>)	13.61
Silica17% vs. Salts	Up	protein MEI2-like 4	12.43
Silica17% vs. Salts	Up	exocyst complex component EXO70B1-like (<i>EXO70B1</i>)	12.06
Silica17% vs. Salts	Up	CDK5RAP3-like protein	11.85
Silica17% vs. Salts	Up	E3 ubiquitin ligase PARAQUAT TOLERANCE 3-like (<i>PQT3</i>)	11.84
Silica17% vs. Salts	Down	phosphatidylinositol-3-phosphatase myotubularin-1-like (<i>MTMI</i>)	-12.38
Silica17% vs. Salts	Down	zinc finger CCCH domain-containing protein ZFN-like	-11.60
Silica17% vs. Salts	Down	probable carboxylesterase 15	-10.97
Silica17% vs. Salts	Down	arginine decarboxylase-like	-10.95
Silica17% vs. Salts	Down	fanconi-associated nuclease 1 homolog (<i>FANI</i>)	-10.76

Up: Upregulated; Down: Downregulated.

Source: By the author (2023).

3.2.2 Classification of DEGs into metabolic pathways

The DEGs identified between the three comparisons were mapped onto the metabolic pathways in the Plant Reactome Gramene Pathways database to identify the metabolic pathways involved in the responses observed in coffee seeds.

The 10 pathways with the highest number of DEGs are shown in Tables 7, 8, and 9.

Table 7 - Mapping of metabolic pathways by the Plant Reactome database of the Control vs. Silica17% comparison.

Pathways	Seqs number
ABA mediated signaling	23.0
Translation elongation	20.0
Cytosolic glycolysis	19.0
Plastid glycolysis	19.0
TCA cycle (plant)	16.0
Trehalose biosynthesis I	14.0
Cellulose biosynthesis	12.0
Brassinosteroid signaling	11.0
Starch biosynthesis	8.0
Gibberellin biosynthesis I (non C-3, non C-13 hydroxylation)	7.0

Source: By the author (2023).

Table 8 - Mapping of metabolic pathways by the Plant Reactome database of the Silica 17% vs. Silica 20% comparison.

Pathway	Seqs number
Translation elongation	11
Plastid glycolysis	11
Cytosolic glycolysis	8
Trehalose biosynthesis I	6
ABA mediated signaling	5
TCA cycle (plant)	4
Leucine biosynthesis	4
Vitamin E biosynthesis	3
Cellulose biosynthesis	3
Ascorbate biosynthesis	2

Source: By the author (2023).

Table 9 - Mapping of metabolic pathways in the Plant Reactome database of the Silica 17% vs. Salt comparison.

Pathway	Seqs number
Cytosolic glycolysis	31
Plastid glycolysis	31
Translation elongation	30
TCA cycle (plant)	28
ABA mediated signaling	24
Cellulose biosynthesis	18
Brassinosteroid signaling	12
Starch biosynthesis	12
Mevalonate pathway	11
Polyisoprenoid biosynthesis	11

Source: By the author (2023).

The ABA mediated signaling pathway is present in all three combinations but with different numbers of sequences. In the Control vs. Silica17% combination, this pathway stood out the most, with 23 sequences. The reason for this may be that the combination is between the seeds from the control treatment, that is, a seed that has not undergone the stress of drying and cryopreservation, and the seeds from the Silica17% treatment, which have been dried to 17% m.c. and immersed in liquid nitrogen.

As for the Silica17% vs. Silica20% combination, the pathway showed only five differentially expressed sequences. It is worth remembering that this was the combination with the lowest number of DEGs, leading us to conclude that the gene expression of the treatments was similar and that there may be more genes involved in the same pathway expressed equally in both treatments.

The Silica17% vs. Salts combination had the highest number of DEGs, so it was the combination in which the treatments were most contrasting. In this combination, although it wasn't the pathway with the most expressed sequences, the ABA mediated signaling pathway had 24 sequences (TABLE 9).

3.2.3 Signaling systems

During the cryopreservation process, the water content of the seeds is a crucial factor for the technique to be successful because the water contained inside the cells expands when exposed to low temperatures, resulting in freezing and the formation of sharp ice crystals that can cause damage and even cell death (WESLEY-SMITH *et al.*, 2014).

The plasma membrane and cell wall are structures that surround plant cells. The cell wall is responsible for protecting cells from environmental stresses and acts in cell differentiation and growth. The synthesis of cell wall constituents and their remodeling is related to the plasma membrane (LIU; PERSSON; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, 2015).

Plants have different mechanisms for surviving abiotic stresses, such as freezing. During freezing, the water balance inside and outside the cells is affected, causing physical stress and dehydration that will result in a change in turgor pressure. The generation of turgor is essential to maintain the integrity of the cell wall and dehydration outside the cell can cause deformation of the cell wall and affect the relationship with the plasma membrane. These changes in cell wall properties interfere with the function of cell wall integrity (CWI) sensors that are located in the plasma membrane and are responsible for triggering signals to maintain cell integrity and function (NOVAKOVIĆ *et al.*, 2018).

In their review work, Rui e Dinnyeny (2020) presented some cell wall integrity (CWI) signaling genes, such as genes related to cellulose biosynthesis, pheromones, kinases, leucines, and metacaspases.

Cell wall integrity has an important influence on tolerance to abiotic stress, so the cellulose synthesis mechanism plays an important role in the plant's response to stress (KESTEN; MENNA; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, 2017). Cellulase is the main structural component of the cell wall in plants during growth and the cell wall is responsible for providing the mechanical strength needed to tolerate the turgor pressure that occurs during abiotic stress, acting as one of the plant's first defense mechanisms to protect cells (WANG; MCFARLANE; PERSSON, 2016).

Freezing stress can alter cellulose synthase (*CesA*) gene expression in different ways in different species, depending on the cold treatment and developmental stage studied. High or low temperatures can have implications for membrane fluidity and cytoskeleton organization, which indirectly influences cellulose synthesis (WANG; MCFARLANE; PERSSON, 2016).

Maintaining the integrity of the cell wall is essential for seedling development and the *FER* gene can detect when the softening of the cell wall occurs, which will affect its integrity. When the plant undergoes some stress, this gene is responsible for triggering Ca^{2+} signaling pathways that can stiffen the cell wall, promoting the maintenance of CWI (FENG *et al.*, 2018; RUI; DINNENY, 2020).

Looking at the DEGs for the comparisons Control vs. Silica17% and Silica17% vs. Salt, it was possible to observe greater expression of the *CesA* gene in seeds dried in Silica up to 17% humidity for both combinations. The same pattern was observed for the *FER* gene in the same combinations, that is, greater expression was observed in the Silica17% treatments.

Like the *FER* gene, the *COLD1* gene also acts on Ca^{2+} signaling pathways. According to MA *et al.* (2015), this gene is responsible for interacting with the G protein, which are proteins widely known in plants to interact with guanine nucleotides, located in the plasma membrane, acting in Ca^{2+} signaling and low-temperature detection, being essential for cold tolerance in rice. It was possible to observe greater expression of the *COLD1* gene in seeds dried in silica up to 17% m.c. in the Control vs. Silica17% and Silica17% vs. Salt combinations. For the Silica17% vs. Silica20% combination, the *COLD1* gene was not differentially expressed.

Looking for more stress-signaling genes, a high number of differentially expressed genes related to protein kinases were found. It was possible to observe 249 differentially expressed genes related to these proteins in the Control vs. Silica17% combination, 444 in the

Silica17% vs. Salt combination, and 150 in the Silica17% vs. Silica20% combination. The family of protein kinases is among the largest families present in the plant genome and is responsible for catalyzing the phosphorylation of amino acids such as serine, threonine, and tyrosine, resulting in the regulation of the activity of target proteins, playing a very important role in the transmission of signals in plants (ROMERO-HERNANDEZ; MARTINEZ, 2022).

In the results of the expression of genes related to protein kinases, it was possible to observe their greater expression in seeds dried up to 17% m.c. in silica in the combinations Control vs. Silica17% and Silica17% vs. Salt, as was also observed for the *FER* and *CesA* genes, suggesting that the signaling system of seeds dried in silica up to 17% humidity was more efficient in dealing with the stresses caused by cryopreservation.

Unlike the results found previously, for the Silica17% vs. Silica20% combination, a greater number of *CesA*, *FER*, and protein kinase genes were differentially expressed for seeds dried in silica up to 20% m.c. Comparing these results with those found in the physiological tests shown in Figure 1, it can be inferred that despite the high expression of genes related to signaling processes, this was not enough for the seeds to survive cryopreservation.

Plants have complex perception and signaling mechanisms that are responsible for promoting an appropriate physiological response that will enable them to grow under stressful conditions (MCAINSH; TAYLOR, 2017). A plant's phenotype is determined by the expression of several genes and signaling mechanisms are capable of modulating the expression of these genes. Looking at the results found in this study, we can suggest that the greater expression of the genes studied in seeds dried in silica gel until they reached 17% m.c. (wb) indicates a more efficient system of perception and signaling to the stresses suffered during cryopreservation than that observed in the other treatments, due to the involvement of the *CesA*, *FER*, *COLD1* genes and genes related to protein kinases, resulting in greater integrity and survival of seedlings after cryopreservation.

4 CONCLUSIONS

The type of drying can influence genetic expression, influencing the behavior during cryopreservation of *Coffea arabica* L. seeds.

It was possible to observe a more efficient stress signaling system in seeds dried in silica gel up to 17% moisture content (wb).

ACKNOWLEDGEMENTS

The research reported in this paper is partially supported by the HPC@ISU equipment at Iowa State University, some of which has been purchased through funding provided by NSF under MRI grants number 1726447 and MRI2018594.

The authors would like to thank Embrapa and Consórcio Pesquisa Café for providing resources for the implementation of the project and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for granting the scholarship.

REFERENCES

- AMBROSONE, A. *et al.* The *Arabidopsis* RNA-binding protein AtRGGGA regulates tolerance to salt and drought stress. **Plant Physiology**, v. 168, n. 1, p. 292–306, 2015.
- ASHEBRE, K. M. The role of biotechnology on coffee plant propagation: **A Current topics paper**, v. 6, n. 5, 2016.
- BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA/DAS, 2009. 395 p.
- CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, n. 2, p. 113–116, 1993.
- CHEONG, Y. H. *et al.* CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 15, n. 8, p. 1833–1845, 01 ago. 2003.
- CLEMENTE, A. C. S. *et al.* Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, 2011.
- COELHO, S. V. B. *et al.* Cryopreservation in *Coffea canephora* pierre seeds: slow and fast cooling. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 6, p. 588–597, 01 nov. 2018.
- COELHO, S. V. B.; ROSA, S. D. V. F.; FERNANDES, J. S. Cryopreservation of coffee seeds: a simplified method. **Seed Science and Technology**, v. 45, n. 3, p. 638–649, 2017.
- DEREEPER, A. *et al.* The coffee genome hub: a resource for coffee genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D1028–D1035, 28 jan. 2015.
- DUSSERT, S. *et al.* Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, v. 8, n. 1, p. 9–15, 19 mar. 1998.
- DUTILLEUL, C. *et al.* Phytosphingosine-phosphate is a signal for AtMPK6 activation and *Arabidopsis* response to chilling. **New Phytologist**, v. 194, n. 1, p. 181–191, abr. 2012.
- FENG, W. *et al.* The FERONIA Receptor Kinase maintains cell-wall integrity during salt stress through Ca²⁺ signaling. **Current Biology**, v. 28, n. 5, p. 666- 675.e5, 5 mar. 2018.
- GUO, Y. *et al.* A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. **Developmental cell**, v. 3, n. 2, p. 233-244, 2002.
- JOO, J. H. *et al.* Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein α and β subunits in the *Arabidopsis* oxidative stress response to ozone. **Plant Cell**, v. 17, n. 3, p. 957–970, 2005.
- KESTEN, C.; MENNA, A.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, C. Regulation of cellulose synthesis in response to stress. **Current Opinion in Plant Biology**, [s.l.]: Elsevier, 2017.

- LIU, Z.; PERSSON, S.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, C. At the border: the plasma membrane-cell wall continuum. **Journal of Experimental Botany**; Oxford University Press, 01 mar. 2015.
- LUO, C. *et al.* PARAQUAT TOLERANCE3 is an E3 Ligase that switches off activated oxidative response by targeting Histone-Modifying PROTEIN METHYLTRANSFERASE4b. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 9, 1 set. 2016.
- MA, Y. *et al.* COLD1 confers chilling tolerance in rice. **Cell**, v. 160, n. 6, p. 1209–1221, 15 mar. 2015.
- MACARIO, A. J. L.; CONWAY DE MACARIO, E. Chaperone proteins and chaperonopathies. *In*: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress (Second Edition)**. New York: Academic Press, 2007. p. 438–444.
- MCAINSH, M. R.; TAYLOR, J. E. Cell signalling mechanisms in plants. *In*: **eLS**, [s.l.] Wiley, 2017. p. 1–9.
- MORAIS, P. I. C. ADVANCES IN THE CRYOPRESERVATION OF COFFEA CANEPHORA SEEDS. Lavras: **Universidade Federal de Lavras**, 2 maio 2023.
- NOVAKOVIĆ, L. *et al.* Hitting the wall—sensing and signaling pathways involved in plant cell wall remodeling in response to abiotic stress. **PlantsMDPI AG**, 01 dez. 2018.
- OLIVER, M. J.; TUBA, Z. D.; MISHLER, B. D. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**, v. 151, p. 85–100, 2000.
- PANIS, B.; SWENNEN, R.; ENGELMAN, F. Cryopreservation of plant germplasm. *In*: International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 4., 2001, **Tampere: ISHS Acta Horticulturae**, v. 650, p. 79-86, 2001.
- ROMERO-HERNANDEZ, G.; MARTINEZ, M. Plant kinases in the perception and signaling networks associated with arthropod herbivory. **Frontiers in Plant Science**, 2022.
- RUI, Y.; DINNENY, J. R. A wall with integrity: surveillance and maintenance of the plant cell wall under stress. **New Phytologist Blackwell Publishing Ltd**, 1 fev. 2020.
- THE UNIPROT CONSORTIUM. UNIPROT: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D523–D531, 2023.
- VOLK, G. M. Application of functional genomics and proteomics to plant cryopreservation; **Current Genomics**, v 11; p. 24-29, 2010.
- WANG, T.; MCFARLANE, H.E.; PERSSON, S. The impact of abiotic factors on cellulose synthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 2, p. 543-552, 2016.
- WARPEHA, K. M. *et al.* The GCR1, GPA1, PRN1, NF-Y signal chain mediates both blue light and abscisic acid responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 143, n. 4, p. 1590–1600, 2007.

WESLEY-SMITH, J. *et al.* Intracellular ice and cell survival in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*: An ultrastructural study of factors affecting cell and ice structures. **Annals of Botany**, v. 113, n. 4, p. 695–709, 2014.

WESLEY-SMITH, J. *et al.* Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*. **Annals of Botany**, London, v. 115, n. 6, p. 991-1000, 2015.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annu Rev Planta Biol.**, v. 57, p. 781-803, 2006.

APÊNDICES

CAPÍTULO 2 - RESUMOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA

Tabela 1 - Resumo da análise de variância dos resultados de sementes viáveis (SV) e plântulas normais (PN) de sementes de *Coffea arabica* L. em diferentes umidades, expostas à solução de PVS2 em diferentes forças e tempos (Teste 1).

FV	GL	Quadrados Médios	
		SV	PN
Força (F)	1	1389.5188*	0.2500
Umidade (U)	1	39094.6813*	12.2500*
Tempo (T)	3	171.4074	0.2500
F x U	1	1389.5188*	0.2500
F x T	3	275.4199	1.5833
U x T	3	171.4074	0.2500
F x U x T	3	275.4199	1.5833
Erro	48	172.1061	1.5833
CV (%)	-	53.08	287.61

Fonte: Da autora (2023).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância dos resultados de sementes viáveis (SV), protrusão radicular (PR), plântulas normais (PN), plântulas normais fortes (NF) e plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC) de sementes de *Coffea arabica* L. expostas à solução de PVS2 em diferentes tempos, nitrogênio líquido e lavagem em água corrente (Teste 2).

FV	GL	Quadrados Médios				
		SV	PR	PN	NF	FC
Tempo (T)	1	50.0000	1313.2813*	1378.1250*	28.1250	200.0000*
Nitrogênio Líquido (NL)	1	1800.0000*	34125.7813*	48828.1250*	800.0000*	1378.1250*
Água Corrente (AC)	1	1250.0000*	1069.5313*	3.1250	253.1250*	800.0000*
T x NL	1	12.5000	63.2813	1512.5000*	50.0000	253.1250*
T x AC	1	612.5000*	132.0313	12.5000	28.1250	312.5000*
NL x AC	1	612.5000*	175.7813	12.5000	200.0000*	703.1250*
T x NL x AC	1	0.0000	0.7813	28.1250	12.5000	378.1250*
Erro	24	85.4167	63.2813	63.0208	15.6250	31.7708
CV (%)	-	10.95	16.69	20.16	74.41	81.99

Fonte: Da autora (2023).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância dos resultados de protrusão radicular (PR), plântulas normais (PN), plântulas normais fortes (NF) e plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC) de sementes de *Coffea arabica* L. expostas à solução de PVS2 em diferentes tempos, nitrogênio líquido e lavagem em água corrente (Teste 3).

FV	GL	Quadrados Médios			
		PR	PN	NF	FC
Tempo	1	378.1250*	957.0313*	0.0000	38.2813
Nitrogênio Líquido	1	27028.1250*	18288.2813*	50.0000*	1188.2813*
Água Corrente	1	312.5000*	94.5313	50.0000*	38.2813
T x NL	1	703.1250*	1069.5313*	0.0000	38.2813
T x AC	1	450.0000*	19.5313	0.0000	175.7813*
NL x AC	1	112.5000	63.2813	50.0000*	38.2813
T x NL x AC	1	312.5000*	7.0313	0.0000	175.7813*
Erro	24	32.2917	27.3438	10.4167	30.9896
CV (%)	-	18.37	21.59	258.20	91.35

Fonte: Da autora (2023).

Tabela 4 - Resumo da análise de variância dos resultados de protrusão radicular (PR), plântulas normais (PN) e plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC) de sementes de *Coffea arabica* L. criopreservadas em diferentes tempos, com e sem pergaminho (Teste 4).

FV	GL	Quadrados Médios		
		PR	PN	FC
Tempo (T)	2	64.6667	144.6667	82.6667
Pergaminho (P)	1	38080.6667*	2242.6667*	352.6667*
T x P	2	64.6667	144.6667	82.6667
Erro	18	32.6667	93.7778	25.1111
CV (%)	-	14.35	100.18	130.72

Fonte: Da autora (2023).

CAPÍTULO 3

RESUMOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA

Tabela 1 - Resumo da análise de variância dos resultados de sementes viáveis (SV), protrusão radicular aos 9 dias (PR9), protrusão radicular aos 10 dias (PR10) e protrusão radicular aos 14 dias (PR14) de sementes de *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre tratadas com nanopartículas de óxido de ferro e hidroxiapatita em diferentes concentrações.

FV	GL	Quadrados Médios			
		SV	PR9	PR10	PR14
Espécie (E)	1	720.0000*	31336.8056*	33347.2222*	12920.1389*
Nanopartícula (N)	1	0.0000	281.2500	13.8889	86.8056
Concentração (C)	4	57.5000	508.6806	152.7778	100.6944
E x N	1	180.0000	86.8056	55.5556	3.4722
E x C	4	32.5000	390.6250	586.8056	420.1389
N x C	4	37.5000	289.9306	256.9444	17.3611
E x N x C	4	92.5000	407.9861	663.1944	38.1944
Erro	60	116.6667	290.5093	277.7778	230.3241
CV (%)	-	11.31	30.64	24.10	18.82

Fonte: Da autora (2023).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância dos resultados da protrusão radicular aos 15 dias (PR), plântulas no estágio Seta (SETA) e plântulas normais (PN) de sementes de *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre tratadas com nanopartículas de óxido de ferro e hidroxiapatita em diferentes concentrações.

FV	GL	Quadrados Médios		
		PR	SETA	PN
Espécie (E)	1	10125.0000*	25086.8056*	1388.8889*
Nanopartícula (N)	1	125.0000	281.2500	13.8889
Concentração (C)	4	107.6389	178.8194	161.4583
E x N	1	13.8889	420.1389	13.8889
E x C	4	454.8611	217.0139	321.1806
N x C	4	20.8333	689.2361*	126.7361
E x N x C	4	13.8889	498.2639	126.7361
Erro	60	212.9630	248.8426	210.6481
CV (%)	-	17.78	22.47	17.77

Fonte: Da autora (2023).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância dos resultados de plântulas normais fortes (NF), plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC) e matéria seca da parte aérea (MSPAt) de sementes de *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre tratadas com nanopartículas de óxido de ferro e hidroxiapatita em diferentes concentrações.

FV	GL	Quadrados Médios	
		NF	FC
Espécie (E)	1	586.8056	20586.8056*
Nanopartícula (N)	1	281.2500	281.2500
Concentração (C)	4	204.8611	517.3611
E x N	1	586.8056	1253.4722*
E x C	4	1784.7222*	309.0278
N x C	4	593.7500	315.9722
E x N x C	4	847.2222	246.5278
Erro	60	265.0463	269.6760
CV (%)	-	63.53	22.08

Fonte: Da autora (2023).

Tabela 4 - Resumo da análise de variância dos resultados da matéria seca da parte aérea (MSPAt), matéria seca da parte aérea por plântula (MSPAp), matéria seca de raiz (MSRt) e matéria seca de raiz por plântula (MSRp) de sementes de *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre tratadas com nanopartículas de óxido de ferro e hidroxiapatita em diferentes concentrações.

FV	GL	Quadrados Médios			
		MSPAt	MSPAp	MSRt	MSRp
Espécie (E)	1	0.3598*	0.0030*	0.0059*	0.0000*
Nanopartícula (N)	1	0.0049	0.0002	0.0000	0.0000*
Concentração (C)	4	0.0011	0.0003	0.0005*	0.0000
E x N	1	0.0044	0.0001	0.0000	0.0000*
E x C	4	0.0015	0.0002	0.0003	0.0000
N x C	4	0.0037	0.0002	0.0003	0.0000
E x N x C	4	0.0035	0.0003	0.0001	0.0000
Erro	60	0.0025	0.0002	0.0002	0.0000
CV (%)	-	23.93	28.43	27.13	13.61

Fonte: Da autora (2023).

CAPÍTULO 4

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Table 1 - Summary of the analysis of variance of the results of viable embryos (VE), root protrusion (RP), normal seedlings (NS) and seedlings with cotyledonary leaves (CL) of seeds of *Coffea canephora* Pierre, with different types of drying.

		VE	RP	NS	CL
Secagem	2	2769.27*	7800.67*	7621.33*	8294.08*
Error	29	88.22	66.09	65.84	79.29
CV (%)	-	11.69	10.88	12.48	13.67

Source: By the author (2023).