



**MODELO FUNCIONAL DE
DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE
CAFEIRO (*Coffea arabica* L.)**

WAGNER TOMPSON ESTANISLAU

2002

WAGNER TOMPSON ESTANISLAU

**MODELO FUNCIONAL DE DESENVOLVIMENTO DE
SEMENTES DE CAFEIRO (*Coffea arabica* L.)**



Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Prof^a: Maria Laene Moreira de Carvalho.

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

2002

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos
Técnicos da Biblioteca Central da UFLA**

Estanislau, Wagner Tompson

Modelo funcional de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) / Wagner Tompson Estanislau. -- Lavras : UFLA, 2002.

125 p. : il.

Orientadora: Maria Laene Moreira de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Café. 2. Semente. 3. Desenvolvimento. 4. Germinação. 5. Tolerância à
dessecação. 6. Citoesqueleto. 7. Western Blotting. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD-633.7321

WAGNER TOMPSON ESTANISLAU

**MODELO FUNCIONAL DE DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE
CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 15 de janeiro de 2002.

Prof. Dra. Édila Villela de Resende Von Pinho

UFLA

Prof. Dr. Renato Delmondez de Castro

UFLA

Prof. Dr. Rubens Jose Guimarães

UFLA

Prof^a: Maria Laene Moreira de Carvalho

UFLA

(Orientadora)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade.

Ao Departamento de Agricultura e em especial o Setor de Sementes pela oportunidade e liberdade para realização do trabalho de pesquisa.

A Prof^a. Maria Laene Moreira de Carvalho pelos ensinamentos, amizade e confiança que me foram concedidos durante a realização do meu trabalho.

Ao Dr. Renato Delmondez de Castro pela orientação, dedicação, amizade e confiança e por ter acreditado no nosso trabalho e esforço.

Aos Professores: Renato Mendes Guimarães, João Almir, Dr. Antônio Parede, Prof^a. Èdila Von Pino e Dr^a. Maria das Graças pelo convívio, amizade e confiança.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

Ao Dr. Moacir de Souza Dias J. pela amizade, compreensão e dedicação no período de graduação.

Aos amigos, colegas de trabalho e funcionários do Setor de Sementes da UFLA, funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de república e curso: Paulo Rogério "Palelo", Graziella "Grá", Elisa, Helen, Kalinka, Sidney "Baliado", Tárique "Machine", Guilherme "Pica-Pau", Túlio "Delspina", Reginaldo, Juliano "Djou", Maurício "Fino", Luizinho, Lisandro, Zé Roberto, Paula, Ebert, Andréia, Dona Elza, pelo convívio, Hélia, Vita e Dona Maria, pela ajuda e amizade durante essa etapa.

A todos que deram sua parcela de contribuição para que este trabalho se realizasse.

A Deus,

“Tenha sempre Deus em sua mente e ele guiará o seu caminho”

OFEREÇO

**Aos meus pais, Olympio e Maria, pelo amor,
esforço e estímulo para que eu sempre me realize...
meus irmãos Wilde, Wallace e Viviane, dos quais
tenho muito orgulho. À minha avó, Maria das
Virgens (Dona Marica) *in memoriam*.
Minha sincera gratidão.**

DEDICO.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1. Desenvolvimento de sementes.....	5
2.2. Ciclo celular e crescimento.....	9
2.3. Semente de cafeeiro.....	11
2.4. Tolerância à dessecação.....	16
3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	24
CAPÍTULO 2 - Organogênese e Germinabilidade Durante o Desenvolvimento de Sementes de Cafeeiros.....	36
1 RESUMO.....	36
2 ABSTRACT.....	37
3. INTRODUÇÃO.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. Marcação das plantas, ramos e caracterização dos frutos.....	40
4.2. Determinação do conteúdo de água.....	42
4.3. Germinação.....	42
4.4. Dados meteorológicos.....	43
4.5. Procedimento estatístico.....	43
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	44
5.1. Floração e desenvolvimento dos frutos.....	45
5.2. Teor de água.....	48
5.3. Matéria seca.....	49

5.4. Caracterização dos frutos.....	51
5.5. Análise morfológica.....	53
5.6. Germinação.....	59
6. CONCLUSÕES.....	61
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	62

**CAPÍTULO 3 - Aquisição de Tolerância à Dessecação Durante o
Desenvolvimento de Sementes de Cafeeiros.....**

1. RESUMO.....	65
2. ABSTRACT.....	66
3. INTRODUÇÃO.....	67
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	70
4.1. Marcação de plantas, ramos e caracterização dos frutos.....	70
4.2. Métodos de secagem.....	71
4.3. Determinação do conteúdo de água.....	72
4.4. Germinação.....	72
4.5. Procedimento estatístico.....	73
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
5.1. Teor de água nos frutos.....	74
5.2. Germinação.....	76
6. CONCLUSÕES.....	82
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	83

**CAPÍTULO 4 - β -Tubulina e Citoesqueleto Microtubular no
Desenvolvimento de Sementes de Cafeeiro.....**

1. RESUMO.....	87
2. ABSTRACT.....	88
3. INTRODUÇÃO.....	89

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	91
4.1. Marcação de plantas, ramos e caracterização dos frutos.....	91
4.2. Detecção de β -tubulina.....	92
4.2.1. Extração de proteínas.....	92
4.2.2. Determinação da concentração protéica.....	93
4.2.3. Eletroforese e eletrotransferência (western blotting).....	93
4.2.4. Imunodeteccão quimiluminescente da β -tubulina.....	94
4.3. Visualização do citoesqueleto microtubular.....	95
4.3.1. Preparo do material.....	95
4.3.2. Imunodeteccão citoquímica da β -tubulina (citoesqueleto).....	96
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	97
6. CONCLUSÕES.....	105
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	106
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110

RESUMO

ESTANISLAU, Wagner Tompson. **Modelo funcional de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)** Lavras: UFLA, 2002. 113 p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia)*.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar os processos de histodiferenciação e organogênese em relação aos eventos físicos e fisiológicos do desenvolvimento e maturação de sementes de cafeeiro (Cv. Acaia Cerrado MG-1474). Os frutos foram colhidos do terço superior das plantas entre a antese e 255 dias após a antese (DAA). As análises morfológicas e anatômicas relacionadas a organogênese foram feitas por meio de microscopia estereoscópica, que permitiu a identificação dos diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento do fruto e sementes. Foi possível observar que o desenvolvimento inicial do fruto ocorre em função do desenvolvimento e crescimento do tecido nucelar do ovário, que irá constituir o perisperma. O avanço do crescimento do fruto acontece em função da degradação gradual da porção interna do perisperma (Pi) que cede espaço ao crescimento gradual do endosperma e embrião. A porção externa (Pe) do perisperma persistiu após a completa degradação da Pi e crescimento do endosperma, correspondendo ao espermoderma ou 'película prateada' observada em frutos/sementes maduros. Os parâmetros testados foram: o conteúdo de água e matéria seca do fruto, sementes e embrião; germinação *in vitro* de embriões excisos; germinação de sementes em câmara de germinação e tolerância à dessecação de embriões e sementes. Os embriões adquiriram capacidade germinativa a partir dos 150 DAA, quando já apresentavam formato cotiledonar, coincidindo com a fase de acúmulo crescente de matéria seca e perda de umidade. No entanto, as sementes germinaram somente a partir dos 210 DAA, quando o endosperma apresentou-se solidificado. A germinação máxima das sementes foi alcançada na fase verde-cana e cereja do fruto aos 225 DAA. As sementes adquiriram tolerância à dessecação também a partir dos 210 DAA, dependendo do estágio de desenvolvimento do fruto e do método de secagem aplicado. As análises do padrão de acúmulo de β -tubulina por meio de "Western Blotting" e das configurações do citoesqueleto microtubular por meio de detecção imunocitoquímica, permitem a caracterização dos processos de divisão e expansão celular durante a histodiferenciação e organogênese. A análise completa de todos os dados permitiu a identificação das diferentes fases do desenvolvimento e a elaboração de um modelo funcional de desenvolvimento para o fruto e sementes de cafeeiro.

*Comitê Orientador: Dr.^a Maria Laene Moreira de Carvalho - UFLA (Orientadora), Dr. Renato Delmondez de Castro, Dr. Renato Mendes Guimarães.

ABSTRACT

ESTANISLAU, Wagner Tompson. **A functional model of coffee (*Coffea arabica* L.) seed development.** Lavras: UFLA, 2002. 113 p. (Dissertation – Masters degree in Crop Science)*.

The objective of the present study was to characterize the processes of histodifferentiation and organogenesis in relation to physical and physiological events during development and maturation of coffee seeds (cv. Acaia Cerrado 1747). Fruits were harvested from the upper third part of the plants, between 0 and 255 days after anthesis (DAA). The morphological and anatomical analysis related to organogenesis were carried out using stereoscopic microscopy, which allowed the identification of the different tissues and characterization of the different developmental stages of the fruit and seeds. It was observed that initial fruit growth was due to growth and development of the ovary nucellus into a transient perisperm tissue. As fruit growth progressed, the internal portion of the perisperm (Pi) was gradually degraded giving space for the gradual growth of endosperm and embryo, resulting in growth of the seed itself. The external portion of the perisperm (Pe) persisted upon the completion of Pi degradation and endosperm growth, and corresponded to the spermodermis or 'silver skin' that is observed in mature fruits/seeds. The physical and physiological parameters tested along development were seed water content and dry matter of fruits, seeds and excised embryos, *in vitro* germinability of excised embryos, germinability of seeds in germination cabinets, and desiccation tolerance excised embryos and seeds. Embryos acquired germinability from 150 DAA onwards, when they have reached the cotyledonary shape, coinciding with the phase of dry matter accumulation and water loss. Seeds, however, would germinate only from 210 DAA onwards, time when the endosperm appeared solid and with relatively high levels of accumulated dry matter. Maximum seed germination was achieved when fruits reached the yellow and cherry stages at 225 DAA. Seeds acquired desiccation tolerance also from 210 DAA onwards, which appeared to be dependent on the stage of development and drying method applied. The analysis of β -tubulin accumulation by means of western blotting coupled to the analysis of the microtubular cytoskeleton configurations by means of immunocytochemistry and fluorescence microscopy, allowed the characterization of cell division and expansion during histodifferentiation and organogenesis. The complete analysis of all data allowed the identification of the different phases of development and construction of a functional model for coffee fruit and seed development.

*Guidance Committee: Dr.^a Maria Laene Moreira de Carvalho - UFLA (Major Professor), Dr. Renato Delmondez de Castro, Dr. Renato Mendes Guimarães.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

A importância sócioeconômica da cultura do cafeeiro tem sido historicamente destacada no cenário nacional, sendo uma atividade geradora de empregos e fixadora de mão-de-obra no campo.

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos—USDA, a estimativa de produção na nova safra brasileira 2001/2002 é de 33,7 milhões de sacas, sendo 23 milhões de café arábica e 10,7 milhões de robusta. A área plantada foi avaliada em 2,5 milhões de hectares e o número de pés de café em 5,7 bilhões, sendo que 25% desse total, ainda não chegou ao estágio de produção. O que mais chama a atenção é o volume de café arábica, insuficiente para as necessidades brasileiras de exportação e consumo. A estimativa oficial brasileira é de 26,7 milhões de sacas para a próxima safra 2001/2002 e de 31,1 milhões de sacas para a atual safra 2000/2001 (Carvalhães, 2001).

Dentre as muitas espécies de cafeeiros existentes no mundo, duas se destacam economicamente: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre. Aproximadamente, 70% do café comercializado no mundo é do tipo arábica (*C. arabica* L.), e 30 % é do tipo robusta (*C. canephora* Pierre) (Rena et al., 1986). O café representa uma fonte considerável de divisas para o desenvolvimento econômico do Brasil, principalmente para Minas Gerais, que é o Estado de maior importância na produção de *Coffea arabica* L., sendo responsável por 50% da produção brasileira, sendo que cerca de 340 milhões de mudas são formadas e plantadas a cada ano no Estado (Floriani, 2000). Segundo Mendes et al., (1995), a região do sul de Minas Gerais é responsável por 50% da produção do Estado.

A forma mais utilizada de propagação do cafeeiro é por meio de mudas, as quais podem ser “mudas de meio ano” ou “mudas de ano”. As sementes para a formação das mudas, no sul do Estado de Minas Gerais, são colhidas geralmente entre Junho e Agosto, dependendo das condições climáticas e estágio de maturação. No entanto, por causa da germinação lenta, geralmente as mudas de meio ano estão prontas para serem transferidas para o campo somente entre Janeiro e Março do ano seguinte, perdendo dessa forma três meses da época chuvosa, o que pode prejudicar significativamente o desenvolvimento inicial das plantas e estabelecimento da lavoura. No caso das mudas de um ano de idade, a transferência para o campo é feita no período ideal de plantio do ano seguinte, aproveitando o início do período chuvoso. Dessa forma, fica impossível obter mudas oriundas de sementes recém-colhidas, bem desenvolvidas e vigorosas para plantio dentro do mesmo ano de colheita das sementes. O armazenamento das sementes para adequação da época ideal de produção de mudas é problemático do ponto de vista da qualidade fisiológica, uma vez que as sementes de *Coffea spp.* são, em geral, menos tolerantes à dessecação e armazenamento, com tendência a serem mais “recalcitrantes”.

A semente de cafeeiro se caracteriza por ter uma germinação lenta e variável, conforme as condições de produção (Went, 1957). O potencial de germinação das sementes vai se moldando no decorrer do seu desenvolvimento, e se relaciona diretamente ao estágio de maturação da semente, por ocasião da colheita e subseqüentes fases de processamento, que incluem, despulpamento, degomagem, secagem e armazenamento. A baixa qualidade da semente pode inviabilizar a obtenção de mudas de cafeeiros uniformes com um desenvolvimento adequado e um padrão de qualidade desejado para o plantio.

Poucos trabalhos têm sido conduzidos para elucidar os mecanismos que regem os processos de floração e desenvolvimento do fruto, incluindo

embriogênese, formação do endosperma e maturação durante a formação das sementes de cafeeiros, além dos mecanismos atuantes durante a germinação.

Estudos por meio de análises moleculares, bioquímicas e imunocitoquímicas constituem ferramentas eficientes para a elucidação do padrão de atividade do ciclo celular e definição dos estágios de embriogênese e maturação, em relação aos eventos fisiológicos que ocorrem durante a formação de sementes *C. arabica* L.

Com este trabalho, teve-se como objetivo, caracterizar as diferentes fases do desenvolvimento de sementes de cafeeiro em relação à histodiferenciação e organogênese, germinabilidade, tolerância à dessecação, acúmulo de tubulina e configurações do citoesqueleto microtubular, estabelecendo assim um modelo funcional que permita um melhor entendimento dos mecanismos de desenvolvimento, conservação e germinação de sementes de cafeeiros.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

As sementes são unidades primárias de dispersão de plantas superiores contendo o potencial genético de uma determinada espécie. Elas dispõem de uma estrutura biológica complexa que, no decorrer do tempo, tem-se adaptado a diversos ambientes e passando, às vezes, por algum tipo de estresse. Apesar de não ser uma regra geral, as sementes possuem mecanismos, os quais permitem que as mesmas resistam a períodos de seca prolongados, a temperaturas extremas e ainda permaneçam viáveis por longos períodos, podendo até se estender por centenas de anos. Além disso, possuem ainda, mecanismos que controlam a germinação, para que essa ocorra em condições mais favoráveis. Essas características são fatores essenciais para preservação das plantas e conseqüentemente manutenção da variabilidade genética, constituindo um fascinante sistema para pesquisa biológica. Além disso, as sementes são importante fonte de alimento e nutrem mais de dois terços da população mundial.

As sementes se compõem de um ou mais tecidos de reserva de nutrientes, um embrião, além de estruturas encapsuladoras designadas para proteção e que podem também regular a germinação. São consideradas estruturas únicas, visto que a formação das mesmas requer o envolvimento de duas fases consecutivas dentro do ciclo de vida de uma planta; a fase esporofítica, na qual há a formação dos órgãos de reprodução, e a fase gametofítica, compreendendo a fusão desses órgãos de reprodução, a partir da qual, esses tecidos diferenciados se desenvolvem.

Os processos morfológicos e fisiológicos que acontecem durante o desenvolvimento e germinação já foram estudados e descritos para várias espécies (Comai & Harada, 1990; Bewley, 1997; Harada, 1997; Hilhorst et al.,

1998). As informações sobre os mecanismos que controlam esses processos, começaram a surgir a partir da década de 90, após a introdução das tecnologias biogenéticas e moleculares nesse campo de pesquisa (Galau et al., 1991; Bewley & Black, 1994; Goldberg et al., 1994; Koornneef & Karssen, 1994; Hilhorst, 1995; Kermodé, 1995; Harada, 1997; Raghavan, 1997). Desde então, as análises das mudanças no padrão de expressão de genes que acontecem durante a embriogênese e o desenvolvimento de sementes, e crescimento pós-germinativo, têm contribuído significativamente com evidências sobre os programas regulatórios que governam ambas as fases (Dure et al., 1981; Chlan & Dure, 1983; Dure, 1985). Dentro desse contexto, não há dúvidas de que nas últimas décadas houve um grande avanço no entendimento dos processos envolvidos no desenvolvimento e germinação, incluindo a dormência de sementes. Contudo, ainda é pouco o que se sabe sobre o conhecimento de muitos aspectos de importância primordial envolvendo a ciência de sementes. Conforme discutido por Karssen (1993), ainda são necessários estudos interdisciplinares dentro da ciência de sementes *strictu sensu*, para que se possa entender as funções e o comportamento das sementes. Para algumas espécies, esses estudos já ocorrem há alguns anos e estão avançados, mas para a maioria das espécies, incluindo o cafeeiro, as pesquisas são ainda incipientes.

2.1. Desenvolvimento de sementes

Em termos conceituais, o desenvolvimento de sementes pode ser dividido em dois períodos distintos, relacionados à formação do embrião, ou embriogênese (Comai & Harada, 1990; Harada, 1997; Bewley, 1997; Hilhorst, 1998). O primeiro período geralmente é definido como o da morfogênese, durante o qual se estabelece o plano no qual o embrião é formado. Isso acontece por meio de intensas divisões celulares e formação dos tecidos e partes embrionárias (West & Harada, 1993; Goldberg et al., 1994; Meinke, 1995;). O

segundo é o período subsequente de maturação do embrião e da semente. Esse período inclui a interrupção da formação dos tecidos e partes do embrião; o acúmulo de nutrientes de reservas; mudanças no tamanho, peso fresco e peso seco do embrião; supressão de germinação precoce; aquisição de tolerância à dessecação; dessecação e quiescência; e em muitas espécies, a indução de dormência (Koornneef & Karssen, 1994). A germinação e o crescimento pós-germinativo do embrião representam as fases durante as quais acontece a reativação dos processos metabólicos e morfogenéticos da semente quiescente (Bewley, 1997; Harada et al., 1998).

Tem sido questionado o fato de que a interrupção do desenvolvimento do embrião e da semente, durante a fase de maturação, se constitui numa condição imposta, não sendo necessária a formação de um embrião viável (Walbot, 1978). Por exemplo, ao contrário das plantas superiores, os embriões e sementes de plantas inferiores não passam por um período de interrupção do desenvolvimento e quiescência metabólica, de forma que nesses casos, os embriões e sementes também não passam por um período de dessecação, sendo intolerantes à dessecação. Isso implica que em plantas superiores, produtoras de sementes, processos relacionados à maturação, dormência e germinação foram incorporados ao longo do tempo, ao modo contínuo de desenvolvimento morfogenético das plantas inferiores. Dessa forma, os programas regulatórios que controlam a interrupção do crescimento e metabolismo durante o desenvolvimento do embrião, e que também controlam a reativação do crescimento e metabolismo durante a germinação, são de grande relevância e certamente envolverão a inativação e reativação dos eventos relacionados ao ciclo celular nas células embrionárias.

Antes da década de 20, não se encontram referências de trabalhos sobre maturação de sementes. A partir dessa data, alguns pesquisadores (Hatcher e Purvis, 1945; Grabe, 1956; Henson & Tauman, 1961; Leininger & Urie, 1964;

Aldrich, 1973;) começaram a se preocupar com esse assunto. Entretanto, somente nos últimos anos é que se tem procurado dar maior importância às pesquisas relacionadas à maturação de sementes.

Diversos estudos evidenciam que a semente atinge a maturidade fisiológica antes que ocorra o ponto de colheita determinado pelos padrões tradicionais e empíricos comumente utilizados (Azevedo, 1977). A definição do termo “maturidade fisiológica”, foi até bem pouco tempo bastante controversa. Popinigis (1975) e Delouche (1976), citam que a maturação se refere às alterações morfológicas, fisiológicas e funcionais, que ocorrem a partir da fecundação, prosseguindo até o momento em que as sementes estão em condições de colheita.

A maturidade fisiológica é definida como o momento em que a semente atinge seu máximo peso de matéria seca (Popinigis, 1977). No entanto, esse ponto nem sempre coincide com a máxima qualidade fisiológica, indicando o momento em que paralisa a translocação de fotoassimilados da planta, fase onde a semente ainda está com um teor de água relativamente elevado (Von Pinho, 1998). A devida compreensão do processo de maturação e maturidade torna-se cada vez mais importante. Apesar desses estudos, poucos trabalhos têm sido conduzidos com o objetivo de se entenderem os mecanismos moleculares e celulares atuantes durante a embriogênese e formação das sementes de cafeeiro, além daqueles durante a germinação. Nesse sentido, há uma deficiência de informações a respeito dos possíveis fatores que possam afetar ou definir a qualidade das sementes de cafeeiro durante o desenvolvimento, dessecação e armazenamento, em função do estado fisiológico do embrião, e que possivelmente também possam regular a germinação.

Para se entenderem ou elucidarem processos que regem o desenvolvimento da “semente de cafeeiro” e que conferem suas características peculiares, devem ser considerados fatores como a embriogênese e o

desenvolvimento da semente de cafeeiro como um todo, visto que a qualidade final da semente depende, em muitos casos, de fatores ativos ainda durante a formação do embrião assim como da própria semente.

A máxima porcentagem de germinação de sementes de soja, algodão, sorgo e trigo coincide com a maturidade fisiológica das mesmas (Delouche, 1976; Popinigis, 1977; Carvalho & Nakagawa, 1980). A porcentagem de germinação aumenta gradativamente até atingir o máximo, tendendo a decrescer de acordo com as condições, sob as quais as sementes são mantidas. Entretanto, existem espécies em que a germinação máxima é atingida antes, ou mesmo depois da maturidade fisiológica. Sementes de soja germinam aos 38 dias após a fecundação, algodão aos 22 dias, sorgo entre 5 e 10 dias e trigo começa a germinar até 5 dias após a fecundação.

Segundo Delouche (1976), para a maioria das espécies, o conteúdo de umidade no ovário ou no óvulo não fertilizado, está em torno de 70%. Após a fertilização, o conteúdo de umidade normalmente aumenta por alguns dias e logo decresce em seguida com o desenvolvimento da semente, até atingir um equilíbrio e se estabilizar com cerca de 14 a 20% de umidade na época da colheita.

Nos frutos de cevada, Harlan & Hope (1922), citam que a porcentagem de água durante seu desenvolvimento decrescia uniformemente até 42%, quando a deposição de matéria seca era interrompida e a taxa de perda de água era então acelerada.

Freqüentemente tem-se observado que a semente, em seu ponto de máxima matéria seca, apresenta-se com um conteúdo de umidade relativamente alto. Carvalho (1974) e Jacinto & Carvalho (1974), encontraram na maturidade da semente de algodão e soja teores de umidade de 56 a 58% respectivamente. Esses altos teores de umidade encontrados na semente por ocasião da maturidade

fisiológica dificultam a colheita e a secagem, de acordo com Delouche (1976) e Carvalho (1976).

De uma maneira geral, as alterações no tamanho da semente são assim descritas por Delouche (1976) e Azevedo (1977): verifica-se um aumento do tamanho, a partir da fertilização, até um ponto máximo sob condições de alta umidade, em torno de 40% em *Sorghum vulgares* L. e 80% em *Gossypium hirsutum* L. Quando o tamanho máximo é atingido, este sofre um decréscimo gradativo, à medida que a semente seca. Azevedo (1977), cita que o peso de matéria seca de diversas sementes cresce da fertilização até atingir o máximo, na maturidade fisiológica, a partir da qual, nota-se um decréscimo por causa da secagem da semente no campo.

2.2. Ciclo celular e crescimento

O crescimento depende de divisão assim como de expansão celular. A seqüência dos processos que acontecem durante a divisão celular é definida como ciclo celular, o qual depende da replicação ou duplicação de DNA, e leva a padrões específicos de organogênese e morfogênese, ou seja, diferenciação celular (Varela et al, 1975; Barlow, 1993). Considerando os aspectos citológicos e moleculares, o ciclo celular envolve o ciclo cromossômico, no qual a síntese e duplicação de DNA acontecem durante a intérfase, além do ciclo mitótico, o qual leva à divisão celular (Gunning & Steer, 1996). A padronização do ciclo de divisão celular leva a padrões configuracionais dos componentes do citoesqueleto, o qual, atuando como o “maquinário estrutural subcelular” é necessário para a citoquinese ou divisão celular, e crescimento.

Os microtúbulos são os componentes principais do esqueleto celular ou citoesqueleto. Eles apresentam uma estrutura cilíndrica, sem ramificações, com cerca de 25 nm em diâmetro externo, e com um canal central aberto de cerca de 15 nm de diâmetro, sendo formados a partir de dímeros contendo um

polipeptídeo de α -tubulina e um de β -tubulina, cada um com peso molecular em torno de 50 a 55 kD e cerca de 450 aminoácidos. Os microtúbulos estão relacionados ao ciclo celular por meio de arranjos re-organizacionais e configuracionais distintos, tais como o arranjo cortical característico da intérfase, e os arranjos de prófase, fusos mitóticos e fragmoplasto, os quais são característicos da fase mitótica (Derksen et al., 1990; Goddard et al., 1994; Gunning & Steer, 1996).

Com base no padrão observado da síntese de DNA e configuração do citoesqueleto microtubular, estudos realizados por De Castro (1998) com sementes de tomate, permitiram definir três estágios distintos da embriogênese. Em comparação ao conceito geral de desenvolvimento embrionário e de sementes, definido em 2 fases, (Comai & Harada, 1990; Harada, 1997), a primeira fase do desenvolvimento embrionário em sementes de tomate mostrou-se como sendo a fase de estabelecimento do plano no qual o embrião é formado, havendo a formação dos tecidos e partes embrionárias. Essa fase é claramente definida como uma fase marcada por uma atividade intensa de síntese de DNA, uma rede abundante de citoesqueleto microtubular cortical e mitótico, e como resultado, muitas divisões celulares. A finalização da morfogênese acontece somente em uma segunda fase, quando então o acúmulo de nutrientes de reserva acompanha as mudanças na forma e tamanho do embrião, e quando também acontecem as principais mudanças relacionadas aos pesos fresco e seco. Dessa forma, essa segunda fase é marcada pela detecção apenas de citoesqueleto microtubular cortical abundante, o qual, na ausência de síntese de DNA e divisões celulares, leva ao crescimento do embrião por expansão celular. Nesse estágio, o embrião atinge sua forma final, coincidindo com a aquisição de peso seco máximo e aquisição da maturidade fisiológica. Em função disso, De Castro (1998) sugeriu que o processo de morfogênese não inclui necessariamente divisão celular e histodiferenciação, mas pode acontecer também somente como

resultado de expansão celular. Finalmente, a terceira fase, maturação, é marcada pela degradação completa do citoesqueleto microtubular, o qual então deixa de existir em embriões de sementes de tomate completamente maduras. A supressão de germinação precoce e indução de quiescência em embriões de sementes de tomate acontecem durante essa fase, mesmo sem que haja a dessecação “completa” das sementes. A maturação das sementes de tomate acontece dentro do fruto aquoso, de forma que a umidade das mesmas é mantida em torno de 50% (com base no peso fresco).

2.3. Semente de cafeeiro

Em decorrência da diferenciação das gemas das axilas das ramas, tem início a formação dos botões florais, os quais permanecem em dormência durante o período seco. A antese da flor só irá ocorrer com o advento do aumento da temperatura associado a condições hídricas favoráveis, dando início ao desenvolvimento dos frutos, culminando com a maturação completa (Rena & Maestri, 1985).

O “café” é uma espécie tropical de floração gregária, ou seja, todas as plantas individuais, numa certa extensão geográfica, florescem simultaneamente (Alvin, 1973). Todavia, o número de floradas é variável, desde poucas, nas regiões cafeeiras das latitudes médias, com época seca definida, até várias ao longo do ano, nas regiões equatoriais chuvosas (Capot, 1964). Assim, enquanto a região cafeeira do sul e sudeste do Brasil apresenta 2 a 3 floradas de intensidades decrescentes, na Costa Rica verificam-se até 12 ou 15 (Alvim, 1973). Esse hábito reprodutivo conduz a uma série de dificuldades práticas, umas relacionadas com colheitas parciais prolongadas, outras com controle efetivo de doenças (Browning, 1973) e/ou pragas, ou com a qualidade de grãos e sementes (Wormer, 1965; Cannell, 1974; Clowes e Wilson, 1974).

\ O período de desenvolvimento das sementes de cafeeiro é relativamente longo, em torno de 240 dias desde a floração até a maturação, sendo dependente das condições climáticas da região e da espécie. A distribuição das chuvas é um fator que pode influenciar sobremaneira o florescimento e conseqüentemente o período de formação das sementes. Alegre (1959) sugere que a precipitação anual ótima está entre 1200 e 1800 mm, mas o cafeeiro cresce e produz bem, tanto nas montanhas do Quênia, onde chove apenas 800 mm, como na Costa Rica e Índia, onde a precipitação é maior do que 2000 mm anuais. Há indicações de que o cafeeiro pode suportar um período de deficiência hídrica de até 150 mm, especialmente quando o mesmo não se estende até a fase de floração (Haarer, 1962; IBC, 1981). Os períodos secos são importantes para o crescimento da raiz, para a maturação dos ramos formados na estação chuvosa precedente, para a diferenciação floral e maturação dos frutos (Haarer, 1962).¹

\ O fotoperíodo é outro fator climático que pode influenciar no florescimento da planta de cafeeiro. Franco (1958) realizou o primeiro trabalho sobre fotoperiodismo em relação à indução floral no cafeeiro, concluindo que esta é uma planta de dias curtos. Alvin (1977) verificou que o comprimento do dia e a distribuição das chuvas são os principais fatores externos que controlam o florescimento do cafeeiro. Frederico & Maestri (1970) confirmaram a interferência do fotoperíodo e da distribuição de chuvas no desenvolvimento dos botões florais. Os autores abordaram que, após a diferenciação, os botões florais crescem até atingir um comprimento de 4 a 5 mm, quando entram em dormência, caso haja um período seco definido. O crescimento só é reiniciado sob condições naturais, depois de uma chuva de certa magnitude. Os botões florais passam então a crescer rapidamente, com a antese, dentro de 10 a 14 dias, conforme a região.

Além das condições climáticas durante a fase reprodutiva, o preparo e posterior armazenamento das sementes são, possivelmente, fatores que também

interferem na preservação da qualidade fisiológica e do poder germinativo das mesmas, visando a obtenção de mudas com crescimento e desenvolvimento adequado. Durante o beneficiamento dos frutos, após o despulpamento e degomagem, as sementes de café contêm cerca de 50% de umidade. Se elas secam um pouco mais, as sementes tendem a manter uma umidade constante em torno de 35 a 40%. As sementes nessa condição germinam 95% ou mais, mas perdem rapidamente a sua viabilidade (Carvalho & Monteiro Sales, 1956; Arcila-Pulgarin, 1976). Em razão dessa rápida perda do poder germinativo e das limitações da secagem natural à sombra, sendo esse um método tradicionalmente recomendado, têm sido estudados procedimentos alternativos de preparo e armazenamento de sementes.

Bacchi (1955, 1956, 1958) observou que a semente de café pode ser secada ao sol e se conserva bem quando o teor de água é mantido entre 10 e 12%. Posteriormente, Arcila-Pulgarin (1976) determinou que sementes de café podem ser secadas artificialmente sob temperatura de até 45°C e a um teor de água de 12 a 13%, sem ter sua viabilidade afetada. Parece importante que o teor de água das sementes não alcance valores inferiores a 9%, mas a razão da sua perda de viabilidade nessa condição ainda é desconhecida, podendo ser puramente física ou de natureza bioquímico-fisiológica (Sondahl & Sharp, 1979). Válio (1976) observou que a viabilidade pode ser estendida, quando a semente é conservada com teor de água de 40%. De um modo geral, em estudos efetuados por Camargo et al., (1993), Dias & Barros (1993) e Miranda et al., (1993) evidenciaram que, para conservação de sementes de café, são necessários valores relativamente altos para o teor de água nas sementes. Nesse sentido, vários métodos de conservação têm sido sugeridos na tentativa de manter as sementes com um grau de umidade superior a do equilíbrio com o ambiente, embora os métodos de armazenamento adequados para manutenção dessa umidade sejam, muitas vezes, difíceis e onerosos, inviabilizando a sua utilização

prática. Outro aspecto a ser considerado na conservação de sementes de café com altos teores de água (30 a 40%) é que essa condição favorece a atividade de microrganismos que contribuem para o agravamento da deterioração das sementes (Miranda & Valias, 1984).

Apesar da considerável importância econômica do "produto café", a semente de cafeeiro tem recebido pouca atenção da pesquisa no que diz respeito a sua qualidade e ao fato de constituir-se num carreador de todas as características genéticas de uma planta além de garantir a sua sobrevivência como espécie.

2.4. Tolerância à dessecação

A dessecação é considerada necessária para conclusão do ciclo de vida das sementes ortodoxas. É geralmente interpretada como uma adaptação estratégica para tornar a semente apta à sobrevivência durante o armazenamento, para garantir melhor disseminação das espécies e para prover tolerância às severas condições ambientais (Leopold, 1990). Esse padrão de desenvolvimento ocorre em sementes de espécies angiospermas, ortodoxas em relação a sua habilidade de resistir ao armazenamento com um reduzido conteúdo de umidade. Em contraste, sementes de outras espécies não podem sofrer uma secagem durante o desenvolvimento e maturação. Seu conteúdo de água deve permanecer alto durante todo o seu desenvolvimento, até a germinação; desse modo, já que não podem resistir à dessecação, são inaptas para o armazenamento por longos períodos de tempo. Esse grupo de sementes é chamado de "recalcitrantes" e incluem muitas espécies de árvores tropicais (Farrant et al., 1986, 1993).

Sementes recalcitrantes e ortodoxas diferem grandemente em sua ecologia e morfologia (Chin et al., 1989). Sementes recalcitrantes são primariamente originadas de árvores perenes dos trópicos úmidos, como algumas espécies do gênero *Coffea*, e o cacau; em alguns casos, de áreas

temperadas, como *Citrus*; enquanto a maioria das sementes ortodoxa vem de espécies anuais temperadas, adaptadas para campos abertos (Illy & Viani, 1995).

Sementes em desenvolvimento são usualmente incapazes de germinar, a menos que sejam secadas, embora embriões em desenvolvimento germinem precocemente num meio líquido, sem secagem. Isso indica que embriões isolados adquirem germinabilidade em estádios precoces do desenvolvimento (Bochicchio et al., 1994, 1996). De acordo com Bewley & Black (1985), a secagem superaria os obstáculos impostos ao embrião pelas estruturas circundantes ou por fatores hormonais.

No processo de secagem, o embrião da semente entra em um estado de quiescência, no qual, o metabolismo permanece nulo e/ou não-mensurável (Lynch & Clegg, 1986), até que condições favoráveis de umidade o reativem e induzam a germinação. Antes que as sementes sofram essa severa perda de água, elas adquirem a habilidade para tolerar a dessecação. Muitas sementes sofrem uma rápida transição entre uma fase de intolerância e de tolerância à dessecação, aproximadamente no meio do seu desenvolvimento e precedendo ou coincidindo com a deposição de reservas (Kermode & Bewley, 1989; Kermode et al., 1989; Hong & Ellis, 1992). Durante a germinação, a tolerância à dessecação é mantida por várias horas após o início da embebição. Antes da protrusão da radícula, as sementes podem resistir à extrema secagem, mas à medida que a germinação progride, esse tratamento torna-se altamente danoso e finalmente letal (Crèvecoeur et al., 1976; Sargent et al., 1981; Dasgupta et al., 1982; Senaratna & McKersie, 1986; Leprince et al., 1990).

Ainda não se pode afirmar que a tolerância à dessecação é desenvolvida antes ou em resposta à perda de água durante a maturação. De acordo com Bewley (1979), uma semente é tolerante quando sobrevive à rápida dessecação, suspendendo o metabolismo e revivendo após a reidratação.

A tolerância à dessecação é uma característica quantitativa, conseguida progressivamente. Sementes secadas lentamente, por vários dias, continuam a metabolizar e desenvolver-se até que um nível crítico de umidade seja alcançado, portanto, pode-se esperar um aumento gradativo do nível de tolerância durante esse processo de secagem. Assim, a avaliação da tolerância à dessecação, após a secagem lenta, não corresponderá necessariamente ao estágio de desenvolvimento em que se encontrava a semente antes do início da secagem. A capacidade de germinação também é um atributo adquirido progressivamente. Embora a secagem lenta, em estágio apropriado, pareça acentuar a germinação em diversas espécies de sementes (Kermode et al., 1989), fatores adicionais têm sido observados em algumas espécies. Durante a secagem lenta, sementes recalcitrantes avançam no processo de germinação, o que conseqüentemente acentua a destruição de mecanismos de tolerância à dessecação, conduzindo à perda da viabilidade em conteúdos de água maiores do que o material rapidamente seco (Farrant et al., 1985; Berjak et al., 1989). Além disso, outros processos deletérios, relacionados com a perda de água, podem estar presentes em conteúdos intermediários de água, como por exemplo, o descontrole dos processos metabólicos que conferem viabilidade ou da ausência de sistemas antioxidantes (Côme & Corbineau, 1996). Em teores de água marcadamente menores, que podem ser atingidos por uma secagem muito rápida, de eixos excisos, são simplesmente uma conseqüência da desidratação, sendo atingida tão rapidamente que o período durante o qual as reações deletérias, que ocorrem em conteúdos de água intermediários são minimizadas (Pammenter et al., 1991; Berjak & Pammenter, 1997; Pritchard & Manger, 1998).

Não há padrão de secagem rápida para tecido sensível à dessecação, mas há um limite inferior de teor de água, no qual o tecido não sobrevive, sendo esse limite maior em sementes recalcitrantes quando comparados aos das sementes ortodoxas e intermediárias (Pammenter et al., 1991; Berjak et al., 1993;

Pammenter et al., 1993; Pritchard & Manger, 1998). Foi sugerido que a secagem rápida impede, ou não dá tempo para que os processos de recuperação, como reestruturação de membranas, se estabeleçam, sendo necessário mais tempo para os reparos na reidratação (Oliver & Bewley, 1997). As diferentes respostas para a taxa de secagem de sementes recalcitrantes e ortodoxas em desenvolvimento enfatizam a diferença fundamental entre elas.

Existe uma considerável variabilidade na fisiologia pós-colheita de sementes recalcitrantes, tanto dentro, como entre espécies. Dentro de uma espécie, a variação pode ocorrer de colheita a colheita, ou dentro de uma única colheita (Berjak et al., 1996; Finch-savage & Blake, 1994). O conteúdo água e o tamanho do embrião podem variar entre as estações (Finch-Savage, 1996; Berjak et al., 1996). Há também diferentes taxas de perda de água no material recalcitrante, as quais variam de espécie para espécie, e com o estágio de desenvolvimento do eixo embrionário da semente (Berjak & Pammenter, 1997). Uma característica adicional das sementes recalcitrantes é que elas se mantêm metabolicamente ativas, ao contrário das sementes ortodoxas, passando do processo de desenvolvimento diretamente para o de germinação, sem que ocorra um estágio de quiescência ou dormência. Essa atividade pode ser detectada por meio de técnicas de ultraestrutura (Berjak et al., 1989; Berjak et al., 1993), análises bioquímicas (Corbineau et al., 1999) ou pela medida direta da respiração (Farrant et al., 1997).

Estudos ultraestruturais de tecidos, após dessecação, têm revelado que membranas celulares são um dos principais locais de injúrias. Dessecação imposta a embriões de *Phaseolus vulgaris* em estágio imaturo de desenvolvimento, intolerantes à dessecação, induziu um colapso de membranas, em contraste com células de embriões tolerantes, nos quais as membranas mantiveram sua integridade (Desgupta et al., 1982).

Na maioria das espécies, o crescimento e desenvolvimento das sementes é paralisado no final da maturação, sendo essa fase marcada pela redução no conteúdo de água, que, provavelmente, é resultante da desconexão entre a semente e a planta-mãe. Nessa fase de amadurecimento, a semente sofre uma adaptação estratégica para tornar-se apta a tolerar as severas condições ambientais, garantindo assim a melhor sobrevivência das espécies durante o armazenamento e disseminação (Leopold, 1990; Guimarães, 2000). Em outras espécies recalcitrantes, as sementes resistem à dessecação, devendo seu conteúdo de água permanecer alto durante todo o seu desenvolvimento e maturação.

A aquisição de tolerância à dessecação ocorre durante a maturação, antes que as sementes sofram uma severa queda no seu conteúdo de água. Porém, não se pode afirmar se a tolerância é adquirida antes ou em resposta à perda de água. Segundo Sanhew e Ellis (1996), a maturidade fisiológica e a secagem após a maturidade não são pré-requisitos para a germinação, mas a tolerância à rápida secagem é desenvolvida em resposta à perda de água após a maturidade.

As sementes de cafeeiro foram inicialmente classificadas por Roberts (1973) como recalcitrantes, ou seja, perdem mais rapidamente a viabilidade quando armazenadas com grau de umidade reduzido e em ambientes com temperaturas relativamente baixas. Ellis et al., (1990) observaram que essas sementes apresentavam características tanto do comportamento ortodoxo, no qual estão incluídas a maioria das espécies, como recalcitrante, e sugeriram a sua inclusão numa nova categoria chamada intermediária.

As sementes de cafeeiro foram recentemente classificadas como intermediárias, isto é, são relativamente tolerantes à dessecação na fase pós-colheita, mas não resistem à remoção de água em níveis tão baixos quanto às sementes ortodoxas. Essas sementes, de origem tropical, podem também ser

sensíveis ao frio, mesmo no estado desidratado (Ellis et al., 1990; Hong e Ellis, 1995). Abdelnour et al., (1992) trabalharam com embriões zigóticos desidratados de sementes de cafeeiros e obtiveram 95 % de sobrevivência quando submetidos à técnica de criopreservação. Essa técnica é definida como conservação de material biológico em nitrogênio líquido a -196°C , ou com o nitrogênio em sua fase vapor a -150°C .

Segundo Eira et al., (1999), sementes de diversas espécies de *Coffea* apresentaram um comportamento diverso com relação à tolerância à desidratação e baixa temperatura, mas entre cultivares de *C. arabica* L. não foram observadas diferenças. Sementes de *C. arabica* e *C. congensis* apresentaram maior sobrevivência à -20°C com grau de umidade de 0,12 Kg/kg, *C. canephora* em 0,13 Kg/kg, *C. dewevrei* em 0,14 Kg/kg e *C. racemosa* em 0,15 Kg/kg. As sementes de *C. liberica* não sobreviveram quando expostas a -20°C em quaisquer dos níveis de umidade testados. Sementes de *C. arabica* e *C. racemosa* com 0,20 Kg/kg sobreviveram a criopreservação, embora danos por desidratação tenham sido observados. Assim, a sugestão de comportamento intermediário entre ortodoxo e recalcitrante sugerido para sementes de *Coffea* spp. pode ser substanciado.

Amorim et al., (1977) citaram que a perda do poder germinativo da semente de café é devida às alterações impostas à estrutura e a organização das membranas celulares, com conseqüente perda da permeabilidade seletiva, ocasionada por temperaturas extremas altas ou baixas, por variação na umidade do ar e por injúrias.

Brandão Júnior (2000) cita que sementes de cafeeiro apresentam um aumento no nível de tolerância à dessecação com a evolução do desenvolvimento, e sementes colhidas de frutos no estágio verde apresentam maior sensibilidade à dessecação.

A semente de cafeeiro se caracteriza por ter uma germinação lenta e variável quanto à porcentagem de germinação (Went, 1957), o que pode estar relacionado ao estágio de maturação, aos mecanismos que regem o processo de maturação da semente e aos processos de pós-colheita como secagem e armazenamento, conforme observado em outras espécies (Bewley & Black, 1994). Posteriormente, Franco (1970) verificou que o processo de germinação de sementes de café, em condições favoráveis de temperatura e umidade, pode ocorrer num intervalo de até quatro semanas. Já Guimarães (1995), concluiu que para acelerar o processo germinativo, as sementes devem ter o endocarpo removido. Rena & Maestri (1986) também afirmam que a presença do endocarpo nas sementes, principalmente sob baixas temperaturas, atrasam a germinação, sendo que a remoção do “pergaminho” e em temperatura de 32°C sementes maduras germinam em apenas 15 dias.

A semente de cafeeiro é pouco tolerante ao armazenamento após a dessecação (Bacchi 1955, 1958; Bendanã, 1962; Arcila-Pulgarin, 1976; Van der Vossen, 1979; Miglioranza, 1982; Araújo, 1988; Dias & Barros, 1993; Camargo et al., 1996). Isso inviabiliza o armazenamento de sementes de cafeeiro por períodos maiores. A manutenção da qualidade fisiológica possibilitaria a germinação e formação de mudas uniformes com qualidade apropriada para a comercialização e o plantio em anos posteriores ao de sua colheita, facilitando dessa forma o planejamento e redução dos custos na implantação de uma nova lavoura.

Existem diferenças marcantes nos níveis de sensibilidade à dessecação entre as espécies de *Coffea* spp., as quais podem ser atribuídas às relações filogenéticas, habitat de origem e/ou duração do estágio de desenvolvimento.

Diferenças na tolerância à dessecação podem também ser atribuídas à duração do período de maturação. No Brasil, o período entre o florescimento e o estágio dos primeiros frutos maduros, é em torno de 8 meses para *C. arabica* e

de 9 a 10 meses para *C. canephora* (Carvalho et al., 1991). Finch-Savage (1992) levantou a hipótese de que o procedimento recalcitrante é resultado de um término precoce do desenvolvimento, e dessa forma, a tolerância à dessecação nunca é alcançada pelas sementes.

3 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDELNOUR, A.; VILLALOBOS, V. ; ENGELMANN, F. Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. **Cryo-Letters**, Cambridge, v.13, p.297-302, 1992.

ALDRICH, S. R. Maturity measurements in corn and an indication that grain development continues after premature culting. **Agronomy Journal**, Madison, v.35, n.8, p.667-680, Aug. 1973

ALEGRE, C. Climats et caféies d'Arabie. **Agronomie Tropicale**, Paris, v.14, p.23-58, 1959.

ALVIN, P. T. Factores affecting flowering of coffee. In: SRB, A.M., ed. **Genes, enzymes and population**. Ney York: Plenum, 1973. p.193-202.

ALVIN, P. T. Factores affecting flowering of coffee. **Indian coffee**, Nova Dehli, v.41, n.6, p.218-224, June 1977.

AMORIM, H. V.; CRUZ, A. R.; DIAS , R. M.; GUTIERREZ, S. E.; TEIXEIRA, A. A.; MELO, M.; OLIVEIRA, G. D. de. Transformações e estruturais durante a deterioração da qualidade de café: In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1977, p.15-18.

ARAÚJO, R. F. **Influência do teor de umidade, da embalagem e do ambiente de armazenamento e conservação de sementes de café**. 1988.56p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ARCILA-PULGARIN, T. The effect of drying temperature on the germination of coffee seeds. **Canicafé**. Chinchina, v.27, p.98-91, 1976.

AZEVEDO, J. I. S. **Morfologia, maturação e produção de sementes**. Lavras, ESAL/DEMA, 1977. 20p.

BACCHI, O. Seca da semente de café ao sol. **Bragantia**. Campinas, v.14, p.225-236, 1955.

BACCHI, O. Novos ensaios sobre a seca da semente de café ao sol. **Bragantia**. Campinas, v.15, p.83-91, 1956.

- BACCHI, O. Estudos sobre a conservação de sementes de café. **Bragantia**, Campinas, v.17, p.261-170, 1958.
- BARLOW, P.W. The cell division cycle in relation to root organogenesis. In: (ORMROD, J.C. e FRANCIS, D., seeds). DORDRECHT, N.L. **Molecular and Cellular Biology of the Plant Cell Cycle**, Kluwer: Academic Publishers, 1993. p.179-199.
- BENDANÁ, F.E. Fisiologia de los semillas de café. **Turrialba**, Costa Rica, v.4, p.99-106, 1962.
- BERJAK, P. e PAMMENTER, N. W. Progresse in the understanding and manipulation of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds. In: ELLIS, R. M.; BLACK, M.; MURDOCH, A. J.; HONG, T. D. (eds.) **Basic and applied aspects of seed biology**. Dordrecht: Kluweeer Academic Publishers, 1997. p.689-703.
- BERJAK, P.; FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W. This bases of recalcitrant seed behaviour. In: TAYLORSON, R. B. (ed.) **Recent advances in the development and germination of seeds**. New York: Plenum Press, 1989. p. 89-108.
- BERJAK, P.; MYCOCK, D. J.; WESLEY-SMITH, J.; DUMET, D.; WATT, M. P. Strategies for *in vitro* conservation of hydrated germplasm. In: NORMAH, M. N.; NARIMAH, M. K.; CLYDE, M. M. (eds.). **In vitro conservation of plant genetic resources**. Kuala Lumpur, Malaysia: Percetakan Watan Sdn.Bhd, 1996. P.19-52.
- BERJAK, P.; VERTUCCI, C. W.; PAMMENTER, N. W. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristic of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds to *Camellia sinensis*. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.2, p.155-166, June, 1993.
- BEWLEY, J. D. Physiological aspects of desiccation tolerance. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto: v.30, p.195-238. 1979.
- BEWLEY, J.D. e BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. New York: Plenum Press, 1985. 367p.
- BEWLEY, J.D. e BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. 2.ed. Plenum Press, New York, 1994.

BEWLEY, J.D. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**, Rockeville, v.9, p.1055-1066, 1997.

BOCHICCHIO, A.; VERNIERI, P.; PULIGA, S.; BALDUCCI, F.; VAZZANA, C. Acquisition of desiccation tolerance by isolated maize embryos exposed to different conditions: the questionable role of endogenous abscisic acid. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.91, n.4, p.615-622, Aug. 1994.

BOCHICCHIO, A.; VERNIERI, P.; PULIGA, S.; BALDUCCI, F.; VAZZANA, C. Desiccation Tolerance in Immature Embryos of Maize: Sucrose, Raffinose and ABA-Sucrose Relation. IN: INTERNATIONAL WORKSHOP ON SEEDS: basic and applied aspects of seed biology, 5., 1995, Reading. **Proceedings...** Reading, UK.: University of Reading, UK., 1996. P.1-12.

BRANDÃO JÚNIOR, D, S. Marcadores da tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro. 2000, 144p. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BROWNING, G. Flower bud dormancy in *Coffea arabica* L. Studies of gibberellin in flower buds and xilem sap and of abscisic acid in flower buds in relation to dormancy release, **Journal of Horticultural Science**, London, 1973. v.48, p.29-41.

CAMARGO, D. M.; GROTH, D.; RAZERA, L. F. Armazenamento de sementes de café (*Coffea canefora* L. cv. Guarani) condicionadas em dois tipos de embalagens após secagem natural e artificial. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.15, n.1/2, p.87-95, jul./dez. 1993.

CAMARGO, R. DE; MENDES, A.N.G.; FRAGA, A.C. e GUIMARÃES, R. J. Efeito da temperatura e tempo de secagem sobre a germinação de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 22. Anais... Águas de Lindóia: MAARA/PROCAFÉ, 1996. p. 57.

CANNEL, M. G. R. Factors affecting arabica coffee bean size in Kenya. **Journal of Horticultural Science**, London, 1974. v.49, p. 65-76.

CAPOT, J. La polinization artificielle des caféies allogames et son rôle dans leurs amélioration. **Café, Cacao, Thé**, Nogent – sur – Marne, v.8, p.75-88, 1964.

CARVALHÃES, E. **Análise Semanal do Mercado de Café.** Newscoffee, Internet. 2001. Santos (SP). <http://www.newscoffee.com.br/read.asp?>

CARVALHO, A. e MONTEIRO SALLES, F. J. Comércio de sementes selecionadas de café. **Boletim de Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, v.31, n.356, p.7-17, 1956.

CARVALHO, N M. Maturação de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **Semente**, Brasília, 1974. p.4-7, c.0.

CARVALHO, N. M. Maturação de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Científica**, Jaboticabal, v.4, c.1, p.39-42, jan./jun. 1976.

CARVALHO, N. M. e NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção.** Campinas: Fundação Cargill, 1980. 326p.

CARVALHO, A.; MEDINA FILHO, H. P.; FAZUOLI, L. C.; GURREIRO FILHO, O.; LIMA, M. M. A. Aspectos genéticos do cafeeiro. **Revista Brasileira de Genética**, Brasília, v.14, n.1, p.135-183, 1991.

CHIN, H. F.; KRISHNA PILLAY, B.; STANWOOD, B.; STANWOOD, P. C. Seed moisture: recalcitrant vs. orthodox seeds. In: MCDONALD, M.B.; NELSON, C. J. (eds). **Physiology of seed deterioration.** Madison: Crop Science Society of America, 1989. p.15-22.

CHLAN, C.A. e DURE, L.I. Plant seed embryogenesis as a tool for molecular biology. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v.55, p.5-15, 1983.

CLOWES, M. St. J. e WILSON, J. H. Physiological factors influencing irrigation management of coffee in Rhodesia. **Rhodesia Agricultural Journal**. Salisbury, v.71, p53-55, 1974.

COMAI, L. e HARADA, J.J. Transcriptional activities in dry seed nuclei indicate the timing of the transition from embryogeny to germination. **Proceedings National Academic Science**, Washington, USA, v.87, p.2671-2674, 1990.

CÔME, D. e CORBINEAU, E. Metabolic damage related to desiccation sensitivity. In: QUÉDRAOGO, A. S.; POULSEN, K.; STUBSGAARD, F. (eds.) **Intermediate/recalcitrant tropical forest tree seeds.** Rome: IPGRI, 1996. p. 83-87.

CORBINEAU, F.; SALMEN-ESPÍNDOLA, L.; VINEL, D.; CÔME, D. Cellular and metabolic events associated with dehydration of recalcitrant *Arancaria angustifolia* embryos. In: ELLIS, R. M.; BLACK, M.; MURDOCH, A. J.; HONG, T. D. (eds.). **Basic and aspects of seed biology: proceedings of the fifth international workshop on seeds**, Kluwer: Academic Publishers, 1999. p. 715-721.

CREVECOEUR, M., DELTOUR, R.; BRONCHART, R. Cytological study on water stress during germination of *Zea mays*. *Planta*, Berlin, v.132, n.1, p.31-41, Jan. 1976.

DASGUPTA, J.; BEWLEY, J. D.; UEUNG, E. C. Desiccation-tolerant and desiccation-intolerant stages during the development and germination of *Phaseolus vulgaris* seeds. *Journal of Experimental Botany*, London, v.33, n.137, p. 1045-1057, Dec. 1982.

DE CASTRO, R.D. **A Functional Analysis of Cell Cycle Events in Developing and Germinating Tomato Seeds**. 1998. 110 p. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia de Sementes) Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

DEDECA, D. M. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. Var. *Typica* Cramer. *Bragantia*. Campinas v.16, n.23, p.315-366, dez., 1957.

DELOUCHE, W. G. **Seeds maturation**. Mississippi: Mississippi State University, Seed Tecnology Laboratory, 1976. 15p.

DERKSEN, J.; WILMS, F.H.A. e PIERSON, E.S. The plant cytoskeleton: its significance in plant development. *Acta Botanica Neerlandica*, Leiden, v.39, p.1-18, 1990.

DIAS, M.C.L. e BARROS, A.S. do R. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) em diferentes embalagens. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.15, p.197-202, 1993.

DURE, L.I. Embryogenesis and gene expression during seed formation. *Plant Molecular and Cell Biology*, Oxford v.2, p.179-197, 1985.

DURE, L.I.; GREENWAY, S.C. e GALAU, G.A. Developmetal biochemistry of cotton-seed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro protein synthesis. *Biochemistry*, Wasihington, v.20, p.4162-4168, 1981.

EIRA, M. T. S.; WALTERS, C.; CALDAS, L.; FAZUOLI, L. C.; SAMPAIO, J. B.; DIAS, M. C. Tolerance of *Coffea spp.* seeds to desiccation and low temperature. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v.11, n.2, p.97-105, 1999.

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.230, p.1167-1174, Sept. 1990.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. The effect of drying rate on viability retention of recalcitrant propagules of *Avicennia marina*. *South African Journal of Botany*, Pretoria, v.51, p.432-438, 1985.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. The increasing desiccation sensitivity of recalcitrant *Avicennia marina* seeds with storage time. *Plant Physiology*, Rockville, v.67, n.2, p.291-298, Feb. 1986.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Seed development in relation tolerance: a comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation-tolerant types. *Seed Science Research*, Wallingford, v.3, n.1, p.1-13, Mar. 1993.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; WALTERS, C. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. *Seeds Science Research*, Wallingford, v.7, p.135-144, 1997.

FINCH-SAVAGE, W. E.; BLAKE, P. S. Indeterminate development in desiccation-sensitive seeds of *Quercus robur* L. *Seed Science Research*, Wallingford, v.4, p.127-133, 1994.

FINCH-SAVAGE, W. E. Seed water status and survival in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: evidence for a critical moisture content. *Journal of Experimental Botany*, London, v.43, p.671-679, 1992.

FINCH-SAVAGE, W. E. Seed development in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: development of germinability and desiccation tolerance. *Seed Science Research*, Wallingford, v.2, p.17-22, 1992.

FINCH-SAVAGE, W. E. The role of developmental studies in research on recalcitrant and intermediate seeds. In: OUEDRAOGO, A. S.; POULSEN, K.L.;

STUBSGAARD, F. (eds.). **Intermediate/recalcitrant tropical forest tree seeds**. Rome: IPGRI, 1996. p.83-97.

FLORIANI, C.G. **Café – A certificação é o caminho**. Agrotec, Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Agropecuária – 2000. (IMA - Caderno Técnico, 01)

FRANCO, C. M. **Influence of temperature on growth of coffee plant**. New York: IBEC Research Institute, 1958. 21p. Bulletin, 16.

FRANCO, C. M. **Fisiologia do cafeeiro**. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1970. 70p.

FREDERICO, D. e MAESTRI, M. Ciclo de crescimento dos botões florais do café (*Coffea arabica* L.). **Revista Ceres**, Viçosa, v.17, p.171-181, 1970.

GALAU, G.A.; JAKOBSEN, K.S. e HUGHES, D.W. The controls of late dicot embryogenesis and early germination. **Physiological Plant**, London, v.81, p.280-288, 1991.

GODDARD, R.H.; WICK, S.M.; SILFLOW, C.D. e SNUSTAD, D.P. Microtubule components of the plant cell cytoskeleton. **Plant Physiological**, Bethesda, v.104, p.1-6, 1994.

GOLDBERG, R.B.; de PAIVA, G. e YEDEGARI, R. Plant embryogenesis: zygote to seed. **Science**, Washington, v.266, p.605-614, 1994.

GRABE, D. F. Maturity in smooth bromegrass. **Agronomy Journal**, Madison, v.48, n.6, p.253-256. Mar. 1956.

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

GUIMARÃES, R. M. **Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*, L.)**. 2000. 180 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GUNNING, B.E.S. ; STEER, M.W. **Plant cell biology, structure and function**. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts, 1996.

HAARER, A. E. **Modern coffee production**. London: Leonard Hill,. 1962. 495p.

HARADA, J.J. **Seed maturation and control of germination**. In: LARKINS, B. A. E VASIL, I. K.; DORDRECHT, N. L. **Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development**, Kluwer: Academic Publishers, 1997. p.545-592.

HARADA, J. J.; DIETRICH, R. A.; COMAI, L.; BADEN, C. S. Regulation of gene expression during seeds germination and postgerminative development. In: D. P. S., GOLDBERG, R. B., EDS. **Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes**, Plant Gene Research, New York, VERMA, USA: Spring-Verlag, 1998. v.5, p.26-39.

HARLAN, H. V. e HOPE, M. N. The germinationof barley seeds harvested at different stages of growth. **The Journal of Heredite**, Baltimore, v.13, c.1, p.72-75, jan/feb. 1922.

HATCHER, E. S. J. e PURVIS, D. N. On the behavoir in the field of small grain obtained by premature harvesting. **The Journal of Agricultural Science**, London, v.35, v.3, p.177-183, jul. 1945.

HENSON, P. R. e TAUMAN, L. A. Seed weights of varieties of birdsfoot trefoil as affecting seedlings growth. **Crop Science**, Madison, v.11, c.4, p.306, July/Aug. 1961.

HILHORST, H.W.M. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. **Seed Science Research**, Welligford, v.5, p.61-73, 1995.

HILHORST, H.W.M.; GROOT, S.P.C. e BINO, R.J. The tomato seed as a model system to study seed development and germination. **Acta Botanica. Neerlandia**, Leiden, v.47, p.169-183, 1998.

HONG, T. D. e ELLIS, R. H. Development of desiccation tolerance in Norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds during maturation drying. **Seed Science Research**, Wallingford, v.2, p169-172, June 1992.

HONG, T. D. e ELLIS, R. H. Interspecific variation in seed storage behaviour within two genera – Coffea and Citrus. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.23, n.1, p.165-181, 1995.

HOUK, W. G. Endosperm and perisperm of coffee with notes on the

morphology of the ovule and seed development. **American Journal of Botany**. Columbus, n.25, p.56-61. 1938.

ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee: the chemistry of quality**. London: Academic Press, 1995. 253p.

INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ. **Cultura do café no Brasil: manual de recomendações**. 4. Ed. Rio de Janeiro, IBC/GERCA, 1981. 503p.

JACINTO, J. B. C. e CARVALHO, N. M. Maturação de sementes de soja (*Glicine max* (1), Merrill). **Científica**, Jaboticabal, v.1, v.1, p.81-88, Jan./Jun. 1974.

KARSSSEN, C.M. Seed science: characteristics and objectives. In: CÔME, D. E CORBINEAU, F., (eds.). **Fourth International Workshop on Seeds: Basic and Applied Aspects of Seed Biology**, Angers: Université Pierre et Marie Curie, 1993. p.3-9

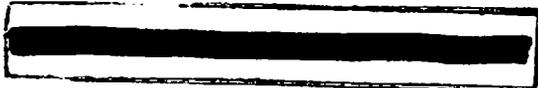
KERMODE, A.R. Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment. In: KIGEL, J. E GALILI, G. **Seed Development and Germination** (eds.). New York: Marcel Dekker, Inc., 1995. p. 273-332.

KERMODE, A. R.; BEWLEY, J. D. Development seeds of *Ricinus communis* L. When detached and maintained in an atmosphere of high relative humidity, switch to a germinative mode without the requirement for complete desiccation. **Plant Physiology**, Rockville, v.9, n.3, p.702-707, July 1989.

KERMODE, A. R.; OISHI, M. Y.; BEWLEY, J. D. Regulatory roles for desiccation and abscisic acid in seed development : a comparison of the evidence from whole seeds and isolated embryos. In: STANWOOD, P. C. AND MCDONALD, M. B. (eds.) **Seed moisture**. Madison: Crop Science of America, 1989. P.23-50. (CSSA Special Publication, 14).

KOORNNEEF, M. e KARSSSEN, C.M. Seed dormancy and germination. In: MEYEROWITZ, E.M. E SOMMERVILLE, C.R., (eds.). **Arabidopsis**, Cold Spring Harbor, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. p. 313-334,

LEININGER, L. N. e URIE, A. L. Development of safflower seed from fowerin to maturity. **Crop Science**, Madison, v.4, n.1, p.83-87, Jan./Feb. 1964.



LEOPOLD, A. C. Coping with desiccation. In: ALSCHER, R. G. AND CUMMING, J. R. (eds.) **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms.** New York: Wiley-Liss, 1990. p. 57-86.

LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P. C.; ATHERTON, N. M.; HENDRY, G. A. F. The role off free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, London, v.116, n14, p.573-580, Dec. 1990.

LINCH, R. M. e CLEGG, J. S. A study of metabolism in dry seeds of *Avena fatua* L. Evaluated by incubation with ethanol-1-14C. In: LEOPOLD, A. C. (ed.) **Membranes, metabolism and dry organisms.** Ithaca: Coenell University Press, 1986. p. 50-58.

MEINKE, D.W. Molecular genetics of plant embryogenesis. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.46, p.369-394, 1995.

MENDES, A. J. T.; Cytological observations in *Coffea*. IV. Embryo and endosperm development in *Coffea arabica* L. **Amererican Journal of Botany**. Columbus, n. 28, p.784-798, 1941.

MENDES, A. N. G.; ABRAHAO, E. J. E CAMBRAIA, J. F. **Recomendações técnicas para a cultura do cafeeiro no sul de Minas.** Lavras: UFLA, 1995. 76p.

MIGLIORANZA, E. **Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí) com diferentes teores de umidade, armazenadas em embalagens hermeticamente fechadas.** 1982. 78p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queirós, Piracicaba.

MIRANDA, J. M. e VALIAS, E. P. Estudo sobre conservação da viabilidade de sementes de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 11. 1984, Londrina, Resumos... Rio de Janeiro: Ministério da Indústria e do Comércio – IBC, 1984. p.160-161

MIRANDA, J. M.; CARVALHO, M. M. DE; CARVALHO, M. L. DE; VIEIRA, M. DAS GRAÇAS. Estudos de alguns fatores que influenciam a duração da viabilidade de sementes de café. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.15, n.1/2, p.215-220, jun./dez. 1993.

OLIVER, M. J.; BEWLEY, J. D. Desiccation-tolerance of plant tissues: A mechanism overview. **Horticultural Reviews**, New York, v.18, p.171-213,

1997.

PAMMENTER, N. W.; VERTUCCI, C. W.; BERJAK, P. Homeohydrous (recalcitrant) seeds: dehydration, the state of water and viability characteristics in *landolphia kirkii*. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, p.1093-1098, 1991.

PAMMENTER, N. W.; VERTUCCI, C. W.; BERJAK, P. Responses of dehydration in relation to non-freezable water in desiccation-sensitive and tolerant seeds. In: CÔME, D.; CORBMEAU, F. (eds.) **Fourth international workshop seeds: Basic and applied aspects of seed biology**. Paris: ASFIS, 1993. p. 867-872.

POPINIGIS, F. Qualidade fisiológica de sementes. **Sementes**, Brasília, v.1, n.1, p.65-80, dez. 1975.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1977. 289p.

PRITCHARD, H. W.; MANGER, K. R. A calorimetric perspective on desiccation stress during preservation procedures with recalcitrant seeds of *Quercus robur* L. **Cryoletters**, Cambridge, v.19, p.23-30, 1998. Supplement 1.

RAGHAVAN, V. **Molecular Embryology of Flowering Plants**. 5.ed. New York, Cambridge University Press, 1997. 690 p .

RENA, A. B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M. E YAMADA, T. **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, Potafos. 1986. 447p.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: RENA, A. B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M. E YAMADA, T. **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos. 1986. p.13-85.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seeds Science and Technology**, Zurich, v.1, n.3, p.499-514, 1973.

SANHEWE, A. J.; ELLIS, R. H. Seed development and maturation in *Phaseolus vulgaris*. I. Ability to germinate and to tolerance desiccation. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 47, n.300, p.949-958, Jul, 1996.

SARGENT, J. A.; MANDI, S. S.; OSBORNE, D. The loss os desiccation tolerance during germination: an ultrastructural and biochemical approach. **Protoplasma**, Vienna, v.105, p.225-229, 1981.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B. D. Loss of desiccation tolerance during seed germination: a free radical mechanism of injury. In: LEOPOLD, A. C. (ed.) **Membranes, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Cornell University Press. 1986. p.85-101.

SONDHAL, M. R.; SHARP, W. R. Research in *Coffea* spp. and applications of tissue culture methods. In: SHARP, W. R.; LARSEN, P. O.; PADDOCK, E. F.; RAGAHAVAN, **Plant cell tissue culture-principles and applications**.ed. Columbus, Ohio State University Press, 1979. V

VALIO, I. F. M. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo). **Journal of Experimental Botany**, London, v.27, n.100, p.983-991, Sept. 1976.

VAN DER VOSSSEN, H.A.M. Methods of preserving the viability of coffee seeds in storage. **Seed Science Technology**, Zurich, v.7, p.65-74, 1979.

VARELA, F.G.; MATURANA, H.R. e URIBE, R. Autopoiesis: the organization of living systems, its characterisation and a model. **Biosystems**, Limerick, v.5, p.187-196, 1975.

VON PINHO, E. V. R. **Tecnologia e produção de sementes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 75p.

WALBOT, V. Control mechanisms for plant embryogeny. In: CLUTTER M.E. **Dormancy and Developmental Arrest**, (ed.). New York, USA: Academic Press, Inc., 1978. p.113-116

WENT, F. W. The experimental control of plant growth. In: **INTERNATIONAL BIOLOGICAL AND AGRICULTURAL SERIES, Chronica Botanica**. 17., 1957. New York, USA: The Ronald, 1957. p.164-168.

WEST, M.A. e HARADA, J.J. Embryogenesis in higher plants: An overview. **Plant Cell**, Rockville, v.5, p.1361-1369, 1993.

WORMER, T. M. Some physiological problems of coffee cultivation in Kenya. **Café**, Lima, v.6, p.1-20, 1965.

CAPÍTULO 2

ORGANOGENESE E GERMINABILIDADE DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE CAFEZEIROS

(*Coffea arabica* L.).

1 RESUMO

ESTANISLAU, Wagner Tompson. Organogênese e germinabilidade durante o desenvolvimento de sementes de cafeeiros. (*Coffea arabica* L.). In._____. Modelo funcional de desenvolvimento de sementes de cafeeiros (*Coffea arabica* L.). 2002. Cap.2 Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras*.

Este trabalho foi idealizado com o objetivo de caracterizar a organogênese e os aspectos físicos e fisiológicos durante o desenvolvimento e maturação de sementes de cafeeiros (Cv. Acaia Cerrado MG-1474). Foram marcados ramos no terço superior das plantas dois dias após o início da florada. As sementes foram isoladas de frutos colhidos em diferentes estádios de desenvolvimento, entre a antese e 255 dias após a antese (DAA), e classificadas por coloração e tamanho. As análises morfológicas e anatômicas relacionadas a organogênese foram realizadas por meio de microscopia estereoscópica, que permitiu a caracterização dos diferentes estádios de desenvolvimento, com base na presença e/ou crescimento de perisperma, endosperma e embrião, avaliando-se também, o teor de água e conteúdo de matéria seca dos diferentes tecidos. Foi avaliada a germinabilidade de embriões isolados e sementes no decorrer do desenvolvimento. O crescimento inicial do fruto foi relacionado ao desenvolvimento do perisperma originado a partir do crescimento do tecido nucelar. Apesar de existirem variações no desenvolvimento inicial, há uma tendência de uniformização do tamanho dos frutos. A película prateada se resume a resquícios da camada externa do perisperma observado em frutos e sementes maduros. Os embriões adquirem germinabilidade a partir dos 150 DAA, quando já apresentam formato cotiledonar, o que coincide com a fase de acúmulo crescente de matéria seca e perda de umidade. As sementes germinam somente a partir dos 210 DAA, quando o endosperma se apresenta sólido. A germinabilidade máxima é alcançada na fase verde-cana e cereja.

*Comitê Orientador: Dr.^a Maria Laene Moreira de Carvalho - UFLA (Orientadora), Dr. Renato Delmondez de Castro, Dr. Renato Mendes Guimarães.

2 ABSTRACT

ESTANISLAU, Wagner Tompson. **Organogenesis and germinability in developing coffee (*Coffea arabica* L.) seeds.** In: _____. **A functional model of coffee (*Coffea arabica* L.) seed development.** 2002. Cap.2 Dissertation (Masters degree in Crop Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

The objective of the present study was to characterize organogênese, physical and physiological aspects during coffee (cv. Acaia Cerrado MG-1474) seed development and maturation. Fruits were harvested from branches marked at upper third part of the plants, between 0 and 255 days after the pollination (DAA) and classified in color and size. The morphological and anatomical analysis related to organogênese were done by means of estereoscopic microscopy, which allowed the characterization of the different stages of development, based on the growth and development of perisperm, endosperm and embryo tissues. It was also evaluated the water and matter contents of the isolated tissues. The initial growth of the fruits was due to the development of the nucellus tissue into perisperm. Although it was observed a significant variation in fruit size during development, there was a tendency of uniformization in terms of morphology, anatomy and fruit size as maturation was reached. The spermodermis or silver skin layer corresponded to the residues of the outer perisperm tissue that is present in mature fruit and seeds. Embryos acquire germinability from 150 DAA onwards, when they have reached the cotyledonary shape, coinciding with the phase of dry matter accumulation and water loss. Seeds, however, germinated only from 210 DAA onwards, time when the endosperm appeared solid and with relatively high levels of accumulated dry matter. Maximum seed germinability was achieved at when fruits reached the yellow and cherry stages.

*Guidance Committee: Dr.^a. Maria Laene Moreira de Carvalho - UFLA (Major Professor), Dr. Renato Delmondez de Castro, Dr. Renato Mendes Guimarães

3 INTRODUÇÃO

Sendo o cafeeiro uma cultura perene, a fase de implantação da lavoura é de suma importância e exige especial atenção por parte dos produtores, uma vez que falhas neste período podem prejudicar de forma irreversível a produtividade durante toda a vida útil da cultura. A aquisição de sementes e mudas de alta qualidade e o plantio em épocas adequadas são fatores de fundamental importância a serem considerados no que diz respeito à produtividade da cultura. A qualidade final da semente é uma consequência dos processos metabólicos que ocorrem durante a sua formação e processamento (Sanhewe & Ellis, 1996).

Na maioria das espécies, a formação de sementes segue um padrão em que o processo inicia dentro do saco embrionário diminuto, o qual, com algumas exceções, é geralmente da mesma forma, tamanho e arranjo. Apesar das similaridades iniciais, as sementes se desenvolvem de acordo com as especificações genéticas para cada espécie. De acordo com Mayer & Mayber (1989), as sementes passam por quatro estádios, iniciando pela formação até o estádio de sementes secas, que são: histodiferenciação que ocorre na fase de formação, a maturação que é o estádio em que a semente acumula o máximo de matéria seca, a dessecação e quiescência. Já autores como Comai & Harada (1990), Bewley (1997) e Hilhorst et al. (1998) afirmam que o desenvolvimento das sementes pode ser dividido em dois períodos distintos: a morfogênese e a fase de maturação do embrião e da semente, considerando dessecação e quiescência como eventos do processo de maturação. A elucidação dos mecanismos que regem os processos de embriogênese e formação do endosperma é fundamental para um melhor entendimento dos processos degenerativos em sementes que podem afetar sua germinação.

Os processos relacionados com as fases do desenvolvimento de sementes de cafeeiro são ainda parcialmente desconhecidos. Os dados existentes são limitados e oriundos de estudos conduzidos na década de 50, época em que os pesquisadores ainda não se dispunham de técnicas e equipamentos mais adequados a esse tipo de estudo. O presente trabalho foi proposto com o objetivo de caracterizar a organogênese e os aspectos físicos e fisiológicos do desenvolvimento e maturação de sementes de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) Cv. “Acaiá Cerrado MG-1474”.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas as sementes de *Coffea arabica* L., cultivar “MG-Acaia Cerrado 1474”, oriundas de plantas localizadas no campo experimental da UFLA (Universidade Federal de Lavras), Lavras, Minas Gerais, a 900 m de altitude. A lavoura foi instalada em março de 1997, sendo considerado seu 1º ano de carga comercial em 2000, com uma produção de 60 sc/ha. As adubações foram realizadas com base na análise do solo, conforme recomendações da 5ª Aproximação CFSEMG, (1999).

4.1. Marcação das plantas, ramos e caracterização dos frutos

Foram selecionadas 6 linhas de plantas com 40 plantas cada, com espaçamento de 2,0m por 0,6m. Os ramos foram marcados no terço superior das plantas. A marcação das flores foi realizada no 2º e 3º dias após o início da antese, considerando como padrão flores abertas e com pétalas ainda “presas” ao receptáculo floral, sendo eliminados botões florais e flores nas quais as pétalas já tinham se soltado do receptáculo floral, procurando dessa forma, uma uniformização do desenvolvimento dos frutos.

Os frutos foram colhidos em épocas diferentes de desenvolvimento, distinguidos com base no número de dias após a antese (DAA), e foram separados por peneiras de classificação: 16 a 32 meshes com diâmetros dos crivos em mm de: 6,35; 7,14; 7,94; 8,73; 9,53; 10,32; 11,11; 11,91; 12,70. Desta forma, os frutos foram classificados nos estádios: chumbinho, chumbo, verde, verde-cana e cereja (Scaranari, 1954; Caixeta, 1981) e posteriormente, nos estádios finais da maturação, foram separados e classificados considerando a coloração como verde, verde-cana e cereja conforme a Tabela 1. As sementes foram isoladas dos frutos manualmente por meio de estiletes.

TABELA 1 - Descrição dos tratamentos (estádios de desenvolvimento de frutos de cafeeiro em função de dias após a antese – DAA), durante o período de agosto de 1999 a julho de 2000. UFLA, Lavras, MG, 2001.

Dias após antese (DAA)	Estádio de desenvolvimento
90	Chumbinho
120	Chumbo
150	Chumbo
165	Verde
180	Verde
195	Verde a verde-cana
210	Verde-cana
225	Verde-cana a cereja
225	Cereja
255	Cereja

Uma vez isoladas dos frutos, uma parte das sementes foi utilizada para determinação do teor de água e para realização dos testes de germinação e outra parte para análise de microscopia. Foram considerados para essas análises os frutos oriundos da peneira mais expressiva, ou seja, aquela peneira em que continha uma maior porcentagem de frutos.

Os frutos foram caracterizados com relação à porcentagem de frutos retidos em cada peneira (16 a 32). Em cada época de coleta foi determinado: coloração dos frutos como verde, verde-cana e cereja, presença e crescimento do perisperma, como também, presença e crescimento do saco embrionário por meio de análise visual. A análise visual foi realizada por meio de lupa estereoscópica, após o corte dos frutos longitudinalmente e transversalmente na parte mediana, considerando como eixo o pedúnculo.

4.2. Determinação do conteúdo de água

As determinações do conteúdo de água dos frutos, sementes e embriões foram realizadas após a colheita em cada estágio de desenvolvimento de frutos frescos, seguindo os procedimentos prescritos nas RAS (Regras para Análise de Sementes) pelo método da estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 3$ por 24 horas (Brasil, 1992). Foram utilizadas três repetições de 10 frutos inteiros. Para determinação do conteúdo de água em sementes, essas foram isoladas do fruto, sendo removido ainda o endocarpo (pergaminho), usando-se 20 sementes por amostra. O mesmo procedimento foi utilizado para embriões, sendo os mesmos isolados das sementes com o uso de estiletos e pinças, sendo utilizados 20 embriões por amostra.

4.3. Germinação

O teste de germinação dos embriões isolados foi conduzido em meio de cultura *in vitro*, a partir do momento em que se conseguia extrair os embriões das sementes ainda em formação sem danificá-los. A extração foi efetuada com auxílio de estiletos e pinças sob condições assépticas em câmara com fluxo laminar. O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), com adição de 2% de GA₃ (giberelina). Os tubos de ensaio com o meio de cultura e os embriões foram acondicionados em câmara de crescimento, no laboratório de cultura de tecidos da Universidade Federal de Lavras. Foram considerados germinados aqueles embriões que apresentavam uma coloração esverdeada dos cotilédones e com um comprimento radicular maior que 1 mm.

A germinação das sementes foi conduzida extraíndo-as dos frutos, sendo a semeadura realizada em papel, na forma de rolo, umedecidos com um volume de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel. Foi utilizada a temperatura constante de 30°C, e as contagens foram realizadas de dois em dois dias, durante

30 dias. Foram consideradas germinadas, aquelas sementes que apresentavam protrusão radicular, com raiz maior que 1 mm.

4.4. Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos de temperatura, umidade relativa e precipitação, durante o período de coleta dos frutos e realização dos trabalhos, foram obtidos da Estação Meteorológica da UFLA, Universidade Federal de Lavras.

4.5. Procedimento estatístico

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, utilizando-se 3 repetições para cada época de coleta. Os dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes às condições climáticas registradas durante o período de realização do experimento estão indicados na Tabela 2. A temperatura variou de 26,6° C a 14,6° C e a umidade relativa média foi de 68% com uma precipitação média de 115,5 mm.

TABELA 2 - Dados médios de temperatura máxima, mínima e média (°C), precipitação pluviométrica (mm) e umidade relativa do ar (%) registrados durante o período de agosto de 1999 a julho de 2000. UFLA, Lavras, MG, 2001.

Época	Temperatura °C			Precipitação (mm)	Umi. Relativa (%)
	Máxima	Mínima	Média		
Mai./99	24,7	11,6	17,3	6,4	69,0
Jun./99	24,5	12,0	17,0	28,5	73,0
Jul./99	24,9	12,6	17,9	3,8	70,0
Ago./99	26,4	10,8	17,7	0,0	45,0
Set./99	25,5	13,5	20,4	22,4	56,0
Out./99	26,7	15,0	20,0	37,1	66,0
Nov./99	26,6	15,5	20,3	143,9	71,0
Dez./99	27,4	17,5	21,8	357,7	76,0
Jan./00	28,4	18,4	22,7	459,8	77,0
Fev./00	28,4	18,1	22,3	156,0	78,0
Mar./00	27,9	17,7	21,8	192,8	79,0
Abr./00	27,3	15,0	20,4	16,4	70,0
Mai./00	25,1	12,2	17,7	0,1	70,0
Jun./00	25,2	10,6	17,1	0,0	64,9
Jul./00	24,0	10,5	16,0	0,3	65,6
MÉDIA	26,2	14,1	19,4	95,0	68,7

Fonte: Estação meteorológica da Universidade Federal de Lavras, 2001.

5.1. Floração e desenvolvimento dos frutos

O estímulo para indução floral ocorreu durante um período curto de chuvas, entre os dias 8 e 16 de setembro, que sucedeu um período de estiagem ocorrido nos meses anteriores (Figura 1, Tabela 2). A abertura das flores ou antese se iniciou dia 18 de setembro, com uma duração em torno de 4 dias. Uma vez abertas, foi possível verificar o murchamento da corola das flores, seguido de escurecimento e queda durante esse período. Esse comportamento de florescimento em plantas de cafeeiro seguiu o mesmo padrão observado por Alvim (1984). Segundo o autor, sob condições normais, as gemas florais permanecem latentes por um período de seca, sendo capazes de iniciar imediatamente o crescimento, tão logo ocorra uma chuva. A abertura das flores acontece em seguida, podendo ser observada em um único dia em cafeeiro “robusta”, ou em vários dias em “arábica”, no qual, as flores comumente abrem nas primeiras horas da manhã e a corola começa a murchar no segundo dia.

Maestri & Barros (1977) afirmaram que a florada, na maioria das regiões cafeeiras ocorre após as primeiras chuvas e é seguida de um grande desenvolvimento vegetativo, com a planta concentrando toda a produção e/ou mobilização para o crescimento vegetativo. A reconstituição da folhagem, perdida durante a última colheita ou por ocasião do inverno, é importante para que ocorra uma boa carga de produção.

Nas condições do presente estudo, não se verificou crescimento dos frutos e nem crescimento vegetativo até os 60 DAA, período este caracterizado por uma estiagem prolongada (Tabela 2, Figura 1). Isso indica que os ovários fecundados, permanecendo num certo estado de latência, são capazes de suportar condições extremas de déficit hídrico, reiniciando o crescimento dos frutos, tão logo se estabeleçam condições de disponibilidade de água mais favoráveis. Segundo depoimento de agricultores, esse é um comportamento comumente

observado nas lavouras, mas que ainda não recebeu devida atenção por parte da ciência e pesquisa em café.

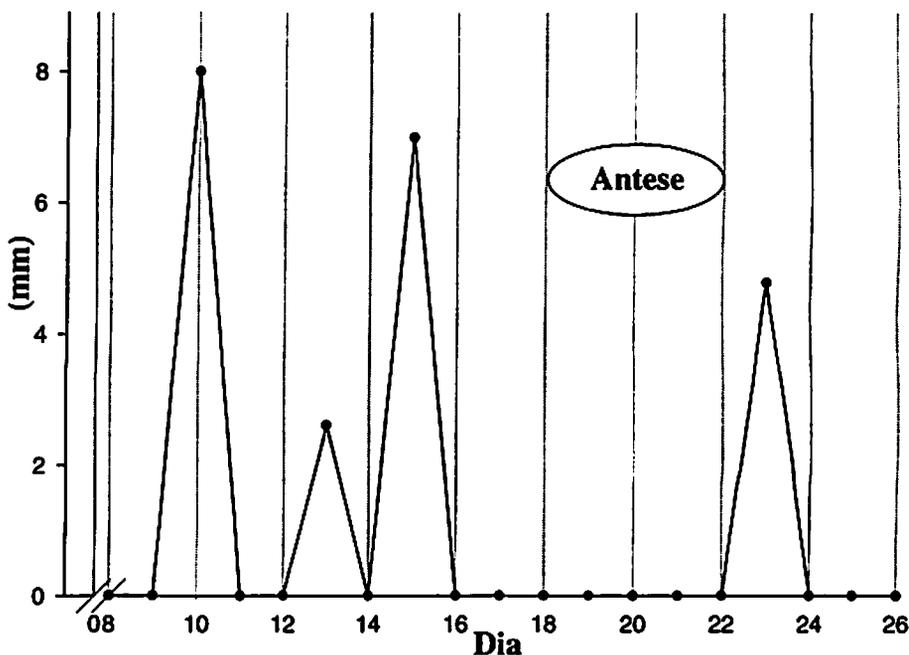


FIGURA 1 - Dados de precipitação do mês de setembro e o período de antese do cafeeiro. UFLA, Lavras – MG, 2001.

O crescimento dos frutos só foi reiniciado após os 60 DAA, coincidindo com, ou em resposta a um período de precipitações mais intensas e constantes em novembro, sendo acompanhado por um intenso desenvolvimento vegetativo.

Até aos 60 dias após a antese, foi somente observado o desenvolvimento dos ovários que atingiram em torno de 2 mm de diâmetro por 4 mm de comprimento. A partir deste ponto, pôde ser verificado o crescimento inicial do fruto (a partir de novembro), com o aumento da precipitação (Figura 2).

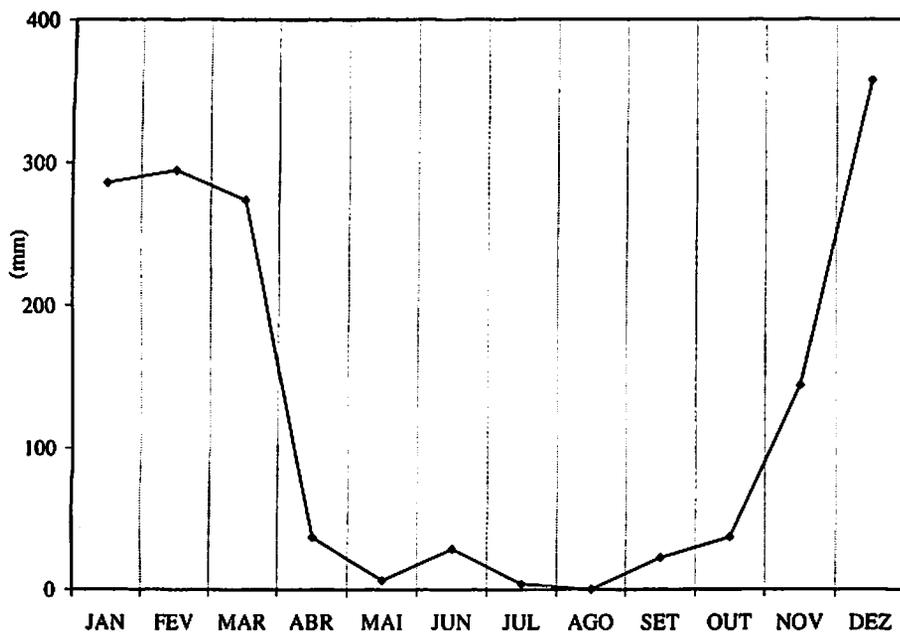


FIGURA 2 – Precipitação mensal acumulada entre janeiro e dezembro de 1999. UFLA, Lavras – MG, 2001.

O consumo da nucela durante a formação da semente ocorre na maioria das espécies. A nucela provê tecido para origem e nutrição do gametófito feminino. Parte dela permanece presa entre os integumentos à medida que o óvulo se desenvolve. Normalmente, nenhum crescimento ocorre, e a nucela é pelo menos parcialmente consumida, porque ela supre com substâncias nutritivas o saco embrionário em desenvolvimento. No entanto, em algumas espécies, ela passa por desenvolvimento adicional e contribui substancialmente com o tecido de reserva conhecido como perisperma. Exemplos de espécies que têm o perisperma desenvolvido são: beterraba (*Beta vulgaris*) e (*Euphorbia esula*) (Malavasi, 1997).

Wormer (1964) e Cannell (1971, 1974) acrescentam que, no desenvolvimento, durante o qual a matéria seca do fruto aumenta regularmente,

ao passo que a matéria fresca aumenta pouco, o crescimento do fruto de café compreende cinco fases: uma primeira fase, que compreende um período sem crescimento visível (fase chumbinho); a segunda, na qual há uma expansão rápida, após o que, o endocarpo endurece (pergaminho); a terceira fase ocorrendo a formação do endosperma, que ocorre durante a parte final da fase de expansão endosperma leitoso; Quarta fase na qual o endosperma endurece continuando até antes da maturação (granação) e a quinta fase sendo a maturação (cereja).

5.2. Teor de água

Como pode ser verificado na Figura 3, o conteúdo de água decresce e é distinto, tanto para fruto, como para semente e embrião, com o decorrer do desenvolvimento.

Essa variação do conteúdo de água nos diferentes tecidos durante o processo de maturação é variável com a espécie, cultivar e condições climáticas (Guimarães, 1999).

Apesar de o teor de água ser distinto para embriões, sementes e frutos na fase de desenvolvimento aos 120 DAA, no final do processo de maturação, o embrião e a semente possuem praticamente o mesmo teor de água, em torno de 50 %, e o fruto se diferencia, com umidade de 70 % em função da quantidade de mucilagem, característica dos frutos no estágio cereja.

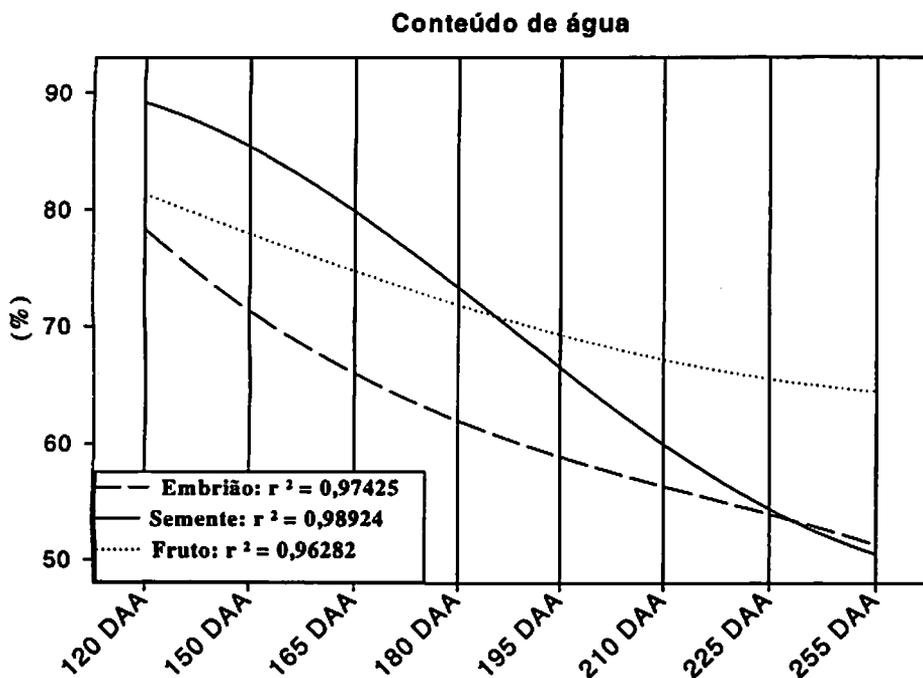


FIGURA 3 - Conteúdo de água do fruto, semente e embrião de cafeeiros durante o desenvolvimento, colhido em diferentes épocas. Valores expressos em porcentagem (%). UFLA, Lavras – MG, 2001.

5.3. Matéria seca

A matéria seca (Figura 4) é acumulada gradualmente durante o desenvolvimento tanto do fruto como da semente ou embrião. No caso das sementes, o máximo de matéria seca foi observado próximo aos 235 DAA, com ligeiro decréscimo posterior. Esse decréscimo de matéria seca da semente pode ser explicado pela interrupção da translocação de fotoassimilados da planta para a semente, e pelo consumo de substratos necessários ao processo de respiração, como supõe Carvalho & Nakagawa (1980), ou ainda, devido à deterioração comumente notada nas sementes que permanecem no campo após o período de

maturação fisiológica, conforme Delouche (1976). Verifica-se também um crescente acúmulo de matéria seca no fruto de um modo geral, podendo ser resultado da translocação, ou troca de fotoassimilados entre o fruto (polpa) e a semente, na qual, há um fluxo da semente para o fruto do que o contrário, uma vez porque o fruto está acumulando açúcares nessa fase.

O desenvolvimento da semente de cafeeiros é longo, em torno de 255 dias depois da fertilização, quando acima de 91% dos frutos se encontram no estágio cereja. A acumulação de matéria seca na semente começa de forma lenta, aos 195 DAA, seguido por um período de acúmulo mais rápido até atingir um máximo em torno dos 235 DAA (Figura 4). Este padrão de acúmulo de matéria seca não tem o mesmo comportamento considerando os tecidos separadamente, como embrião e fruto como um todo.

A análise da Figura 4 indica que o acúmulo de matéria seca dos frutos e das sementes é distinto. Enquanto a semente atinge o ponto máximo de acúmulo de matéria seca aos 235 DAA, o fruto ainda está acumulando matéria seca aos 255 DAA. Já o embrião, acumula a matéria seca até 235 DAA com um ligeiro decréscimo aos 255 DAA.

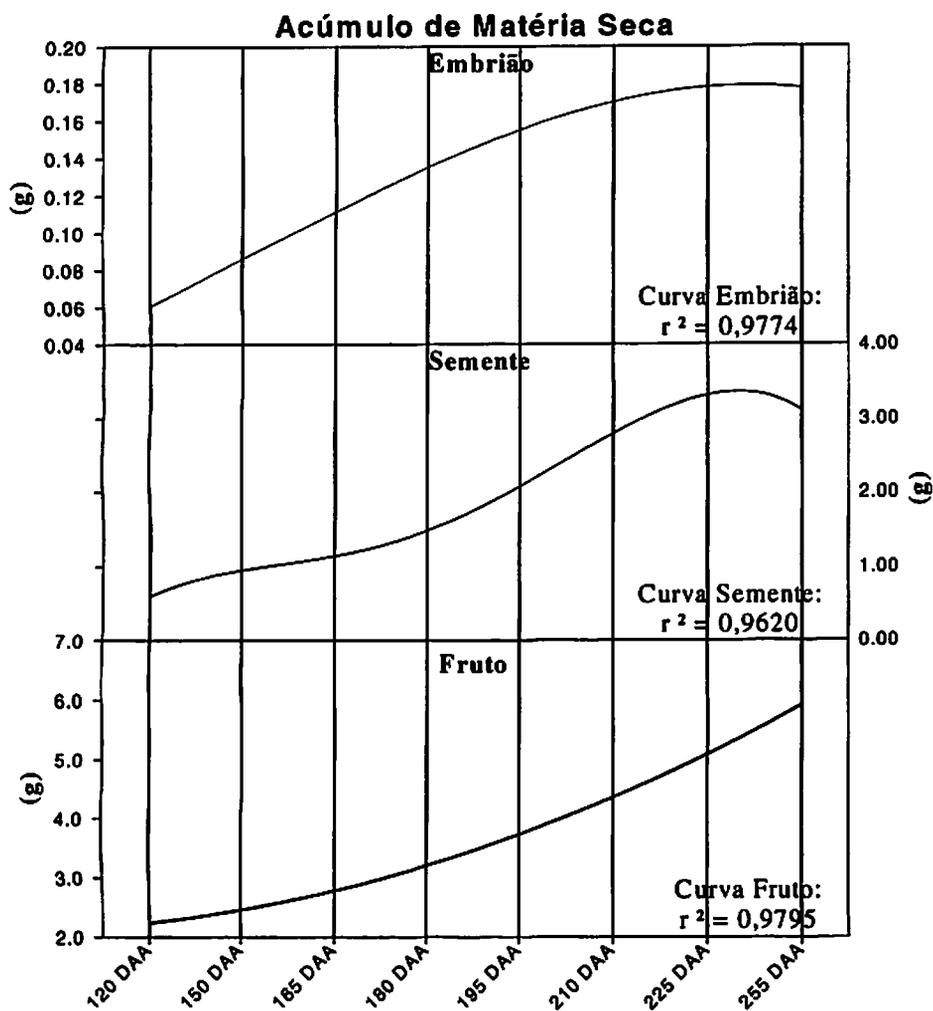


FIGURA 4 - Acúmulo de matéria seca do fruto, semente e embrião de cafeeiro durante o desenvolvimento. UFLA, Lavras – MG, 2001.

5.4. Caracterização dos frutos

Observando-se os dados da Figura 5, pode ser verificado que no início do desenvolvimento, há uma grande variabilidade com relação ao tamanho dos

frutos, que foram quantificados por meio de retenção em peneiras com diferentes diâmetros de crivos, o que é minimizado com o decorrer do desenvolvimento. Ao final do processo de maturação, 76,6% dos frutos estavam concentrados na peneira 32, indicando que, apesar da desuniformidade inicial de desenvolvimento, no final do processo de maturação, houve uma uniformização do tamanho dos frutos.

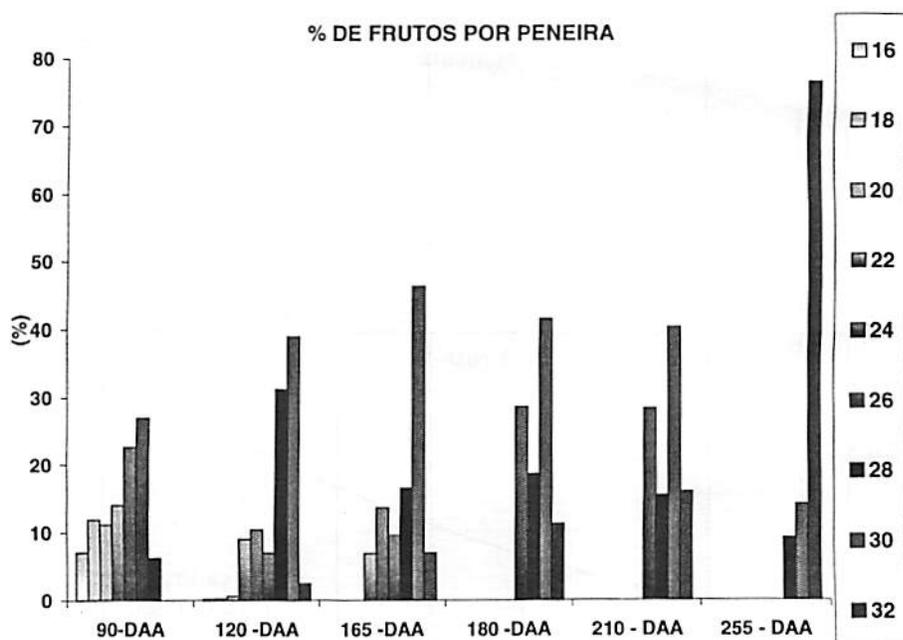


FIGURA 5 - Caracterização quanto a porcentagem de frutos por peneira, no desenvolvimento do cafeeiro. UFLA, Lavras – MG, 2001.

Aos 210 DAA foram observados valores percentuais de frutos, verde, verde-cana e cereja (Figura 6). Aos 210 DAA, o percentual foi de 39, 42 e 19 para verde, verde-cana e cereja, respectivamente, já aos 255 DAA, os valores dos percentuais foi de 4, 4 e 92 de frutos verde, verde-cana e cereja

respectivamente. Isso indica também que houve uma padronização da coloração dos frutos na fase final de maturação.

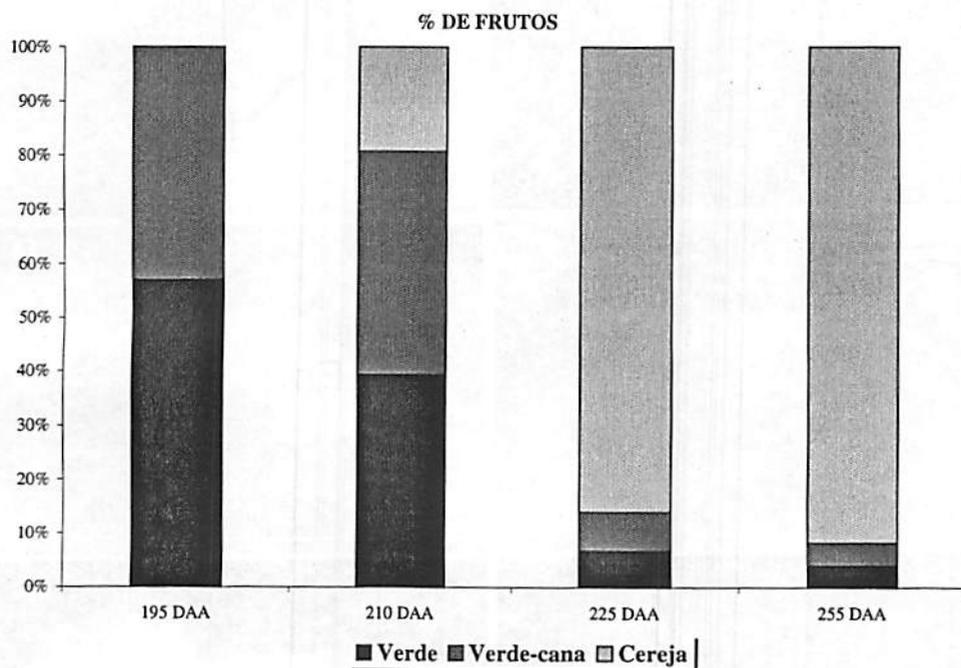


FIGURA 6 - Caracterização quanto à porcentagem de frutos verde, verde-cana e cereja no desenvolvimento. UFLA, Lavras – MG, 2001.

5.5. Análise morfológica

Analisando as imagens estereoscópicas da Figura 7, pode-se verificar o desenvolvimento dos diferentes tecidos do fruto de cafeeiro. Os integumentos são degradados logo após a fecundação dos óvulos (Figura 7A), confirmando que o que se desenvolve inicialmente é o tecido nucelar ou perisperma, sendo este transitório, o qual é parcialmente consumido, cedendo todo seu espaço ao endosperma, contendo em seu interior o embrião também em crescimento.

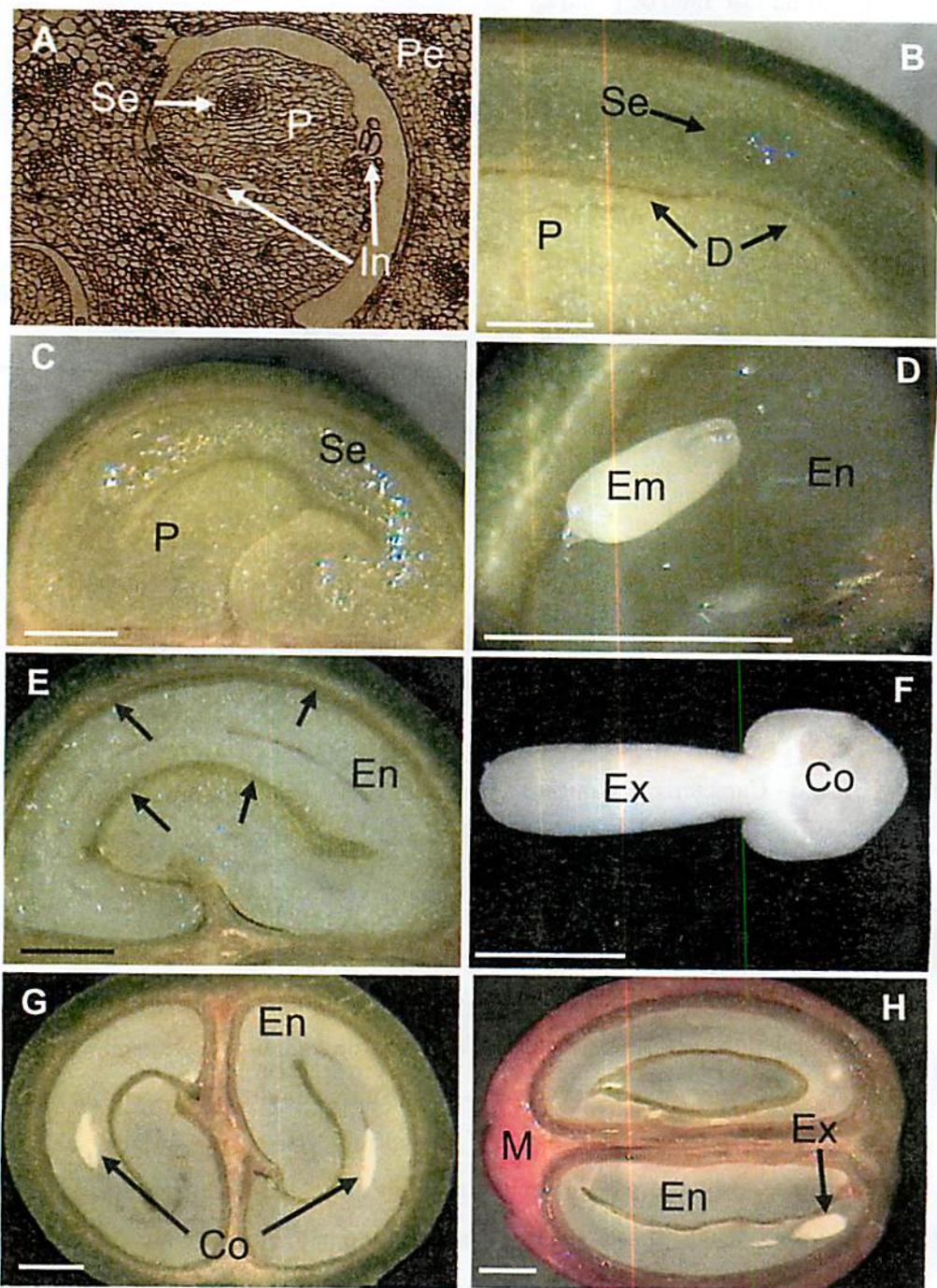


FIGURA 7 - Imagens estereoscópicas de tecidos de frutos de cafeeiros durante o desenvolvimento mostrando os diferentes padrões morfológicos. Barras indicam 2 mm.

A) 0 DAA, detalhes de um corte no botão floral, realizado na região do ovário, logo após a fecundação do óvulo, com indicação do perisperma (P), restos integumentares (In), pericarpo (Pe) e os primórdios da semente verdadeira (Se). (60 X).

B) Aos 90 DAA, mostrando o endosperma, o que seria a semente verdadeira (Se) ocupando cerca de 5 % do perisperma (P). Detalhes das dobras internas da semente (D).

C) Aos 120 DAA, mostrando o endosperma (semente verdadeira) (Se), num estado mais hialino, ocupando cerca de 70 % do perisperma (P).

D) Aos 120 DAA, mostrando o embrião (Em) no estágio coração-torpedo, iniciando a formação dos cotilédones e presença do suspensor, com o endosperma (En) num estado gelatinoso.

E) Aos 150 DAA, o perisperma (setas) se resume a uma camada de células, devido ao desenvolvimento do endosperma (En), o qual ocupou totalmente o espaço antes ocupado pela nucela/perisperma.

F) Aos 150 DAA, o embrião, no estágio cotiledonar. Eixo embrionário (Ex) e cotilédones (Co) já completaram seu desenvolvimento.

G) Aos 210 DAA, o endosperma (En) se apresenta em sua conformação final, num estado mais solidificado, já com uma coloração acinzentada e o perisperma, uma película fina que envolve o endosperma, mostrando também tecidos cotiledonares (Co) do embrião.

H) Aos 225 DAA, fruto no estágio cereja, mostrando detalhes do embrião, eixo embrionário (Ex) e o endosperma (En) solidificado. O fruto com uma camada de mucilagem (M) mais espessa, característica da maturação. UFLA, Lavras – MG, 2001.

O tecido remanescente origina a “película prateada” como é chamado o perisperma de semente de café.

Nesse período, evidenciando o desenvolvimento do endosperma, o qual ocupa o espaço do perisperma, que provavelmente é consumindo, se relaciona com os dados de Malavasi (1997), que cita que o tecido nucelar também é um tecido de reserva, suprindo com substâncias nutritivas o saco embrionário em desenvolvimento.

Aos 90 DAA foi possível a visualização do tecido endospermático (Figura 7B) pela análise microscópica.

O desenvolvimento inicial do fruto de cafeeiro se deve ao crescimento do tecido nucelar diplóide. O endosperma presente aos 90 DAA só pôde ser visto em cortes examinados ao microscópio, e dentro deste, um embrião minúsculo, apresentando-se como um conjunto de células, não diferenciadas. A partir dos 90 DAA, o perisperma, é gradativamente degradado e/ou consumido, cedendo espaço ao desenvolvimento do endosperma triplóide e embrião diplóide (semente verdadeira). O endosperma jovem com apenas algumas centenas de células tem uma forma oval ou de balão. Sua consistência é quase idêntica à da nucela que o envolve, consistindo de um tecido aquoso, hialino, que pode ser destacado do perisperma, desde que sejam tomadas precauções para evitar o rompimento da epiderme.

O tecido endospermático (semente) se desenvolve no perisperma, que aos 90 DAA, tem aparência aquosa, mas já apresenta reentrâncias características do endosperma (dobras). Nessa fase já se observam os primórdios do embrião ao microscópio. (Figura 7B).

Depois da forma oval que atinge dentro do perisperma, o endosperma em crescimento se achata e gradativamente vai crescendo cada vez mais, adquirindo uma consistência leitosa, a qual vai tomando o lugar da massa do perisperma, acompanhando as reentrâncias do endosperma.

Aos 120 DAA já pode ser observada a formação do endosperma leitoso em substituição ao perisperma. Nessa fase o perisperma apresenta uma coloração esverdeada (Figura 7C). O embrião já se destaca, com um formato de transição entre coração e torpeda, e com sua consistência mais firme (Figura 7D).

Aos 150 DAA (Figura 7E), o endosperma alcança o seu máximo tamanho e torna-se mais rígido na medida em que o fruto vai amadurecendo, entretanto, o fruto ainda continua a crescer, sendo esse crescimento

aparentemente associado ao crescimento do pericarpo, que, num estágio mais avançado, se transforma em uma polpa adocicada à medida que o fruto amadurece. O embrião já se apresenta totalmente diferenciado, apresentando o seu formato final (cotiledonar), crescendo apenas em tamanho (Figura 7F). O perisperma vai se reduzindo formando apenas uma fina camada esverdeada que envolve o endosperma.

Aos 210 DAA (Figura 7G), apesar de o fruto apresentar uma coloração de transição, com presença de frutos em diferentes estádios de maturação, o estágio verde é ainda bastante expressivo. No seu interior, a semente já completou todo o seu desenvolvimento morfológico, restando, no entanto a maturação do fruto externamente. Nesse estágio, apesar do fato de os embriões já estarem aptos a iniciarem o processo germinativo, a semente ainda não apresentou algum indício de germinação no estágio verde (Tabela 3). O pericarpo do fruto apresenta-se ainda não muito espesso, com uma coloração esverdeada e ainda com uma certa firmeza do mesocarpo, apresentando uma polpa mais firme. O endocarpo, que é chamado de “pergaminho”, se apresenta bem rígido. Após o endurecimento desse, as sementes não podem mais crescer em tamanho, em virtude da constrição mecânica imposta pelo endocarpo duro (Leon & Fournier, 1962). E o tamanho dos lóculos, portanto, determina o tamanho potencial do grão (Wormer, 1966). Portanto, o crescimento da semente cessa em estádios ainda imaturos de desenvolvimento, ficando o crescimento após esse período como resultado do “crescimento” e/ou “expansão” da mucilagem ou do tecido mucilaginoso.

Aos 225 DAA (Figura 7H), estádios finais do desenvolvimento, conseqüentemente da maturação, a semente atinge, o ápice do desenvolvimento, os frutos apresentam na sua maioria uma coloração cereja, com uma camada espessa de mucilagem e bastante adocicada, sendo essa a época ideal de colheita. Segundo Manual de Recomendações, a época ideal para colheita é quando a

lavoura apresenta uma porcentagem de frutos verdes não superior a 5 % (IBC, 1981).

De acordo com Mendes, et al. (1954), no desenvolvimento de frutos de café há três fases distintas: a primeira, na qual o óvulo é formado no interior do ovário; a segunda, decorrente da fertilização, que se caracteriza pelo rápido crescimento do óvulo e do ovário; nessa fase a semente já é delineada pelo perisperma, sendo esta considerada pelo autor como um perisperma transitório. Finalmente, na terceira fase, o perisperma, ou tecido nucelar, é substituído pelo endosperma contendo em seu interior um embrião.

Embora Houk (1938) inicialmente tivesse afirmado que no óvulo de *C. arabica* L. o núcleo e o integumento eram indistintos, pesquisas posteriores conduzidas por Graner (1939), Fagerlind (1939), Joshi (1938) e Mendes (1941), demonstraram que essas duas zonas de tecido se apresentam bem distintas e separadas; a nucela constituindo-se de apenas uma camada de células estreitas que rodeiam o macrósporo, e o único integumento, a primina, é espesso, formado por diversas camadas de células.

Segundo Dedeca (1957), com base em estudos da anatomia das sementes, conclui-se que no envoltório seminal, espermoderma ou película prateada, estão localizadas as características mais importantes a serem utilizadas na caracterização das espécies e variedades de cafeeiros. Essas características dizem respeito às dimensões das fibras que constituem a referida película, à espessura das suas paredes e ao número de pontuações nessas paredes.

No presente trabalho foi constatado que o integumento é degradado logo após a fertilização do óvulo, e o que se desenvolve é somente o perisperma e não os integumentos (Figura 7A). Esses resultados divergem dos encontrados por Houk (1938).

No que diz respeito à suposição inicial de Houk (1938), de que na semente de cafeeiro não havia um endosperma verdadeiro, diversos

investigadores demonstraram por meio de provas citológicas e genéticas a existência desse endosperma, que é do tipo nucleado. Essas afirmações são contestadas por Dedeca, (1957), que denomina perisperma, os restos dos tecidos da primina, que na semente madura estão representados pela película prateada.

5.6. Germinação

De acordo com os resultados descritos na Tabela 3, os embriões adquiriram germinabilidade a partir dos 120 DAA, já as sementes somente a partir dos 210 DAA mostrando que os embriões já se apresentavam viáveis a partir de 120 DAA.

A germinabilidade é adquirida pela semente somente a partir do estágio 225 DAA, independente do estágio de maturação. Não foi verificada diferença significativa nos valores de germinação das sementes colhidas nos estádios verde-cana (225 DAA) e cereja (255 DAA).

TABELA 3 - Germinabilidade de embriões *in vitro* e de sementes durante o desenvolvimento. UFLA, Lavras – MG, 2001.

Tecido	DAA															
	120		150		165		180		195		210		225		255	
EM	94	Aa	97	Aa	91	Aa	94	Aa	97	Aa	94	Aa	97	Aa	100	Aa
SEM	0	Bb	96	Aa	97	Aa										

- Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV = 5,57.

A máxima germinação ocorreu após os 225 DAA, não diferenciando após este período, mantendo-se com alta germinabilidade até aos 255 DAA. A germinação antes da maturidade fisiológica, em estádios ainda verdes ou imaturos das sementes foi observada em algodão por Carvalho (1974), em trigo

por Carvalho & Yanai (1976), em soja por Jacinto & Carvalho (1974) e em feijão por Silva (1974).

Até aos 255 DAA, considerando o acúmulo de matéria seca no fruto, não foi possível detectar o ponto de maturidade fisiológica, como verificado por Caixeta (1981), o qual considerou o ponto de maturidade fisiológica por meio da curva de matéria seca do fruto aos 220 DAA. O ponto de maturidade fisiológica é caracterizado pelo ponto máximo de matéria seca, apesar de nem sempre, o máximo de matéria coincidir com o máximo de vigor e germinabilidade. Analisando os dados da Tabela 3, pôde-se constatar que a partir de 225 DAA, a semente já apresenta o máximo de germinação, não variando estatisticamente aos 255 DAA. Isso indica que o parâmetro germinabilidade isoladamente, não fornece subsídio para afirmar que o ponto de maturidade fisiológica ocorre. Desse modo, verificando-se a curva de acúmulo de matéria (Figura 4), da semente isoladamente, foi possível detectar o ponto de maturidade fisiológica aos 235 DAA, discordando dos dados obtidos por Caixeta (1981) citados anteriormente, o qual verificou o ponto de maturidade fisiológica considerando o acúmulo de matéria seca nos frutos como um todo.

6 CONCLUSÕES

Os integumentos são degradados na fase inicial do desenvolvimento, após a fertilização do óvulo e o crescimento inicial do fruto se deve ao acúmulo do perisperma.

A película prateada se resume a resquícios do perisperma no final da fase de maturação, em resposta ao desenvolvimento do endosperma.

Apesar de ocorrerem variações no desenvolvimento inicial, no decorrer do desenvolvimento, ocorre uma uniformização morfológica e de tamanho dos frutos.

Os embriões adquirem germinação a partir dos 150 DAA, quando já apresentam formato cotiledonar, o que coincide com a fase de acúmulo crescente de matéria seca e perda de umidade. Essa germinação permanece com o mesmo índice, acima de 90 %, até o final do desenvolvimento, na maturação.

As sementes germinam somente a partir dos 210 DAA, quando o endosperma se apresenta sólido. A germinação máxima é alcançada na fase verde-cana e cereja.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALVIM, P. de T. *Coffea*. In:HALEVY, A. B., (ed.). **CRC handbook of flowering**. v. 2. Boca Raton: CRS Press, 1984.

BEWLEY, J.D. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**, Rockeville, v.9, p.1055-1066, 1997.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 1992. 365p.

CAIXETA, I. F. **Maturação fisiológica da semente do cafeeiro *Coffea arabica* L. Cv. Mundo Novo**. 1981, 48p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

CANNAEL, M. G. R. Seasonal patterns of growth and development of arabica coffee in Kenya. IV. Effects of seasonal differences in rainfall on bean size. **Kenya Coffee**. Nairobi, v.36. p.176-180. 1971.

CANNAEL, M. G. R. Factores affecting arabica coffee bean size in Kenya. **Journal of Horticultural Science**. London, v.49, p.65-76, 1974.

CARVALHO, N. M. Maturação de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) **Semente**. Brasília, n.0, p.4-7, 1974.

CARVALHO, N. M. e YANAI, L. Maturação de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) **Científica**. Jaboticabal, v. 4, n.1, p.33-38. Jan./Jun. 1976.

CARVALHO, N. M. e NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1980. 326p.

COMAI, L. e HARADA, J.J. Transcriptional activities in dry seed nuclei indicate the timing of the transition from embryogeny to germination. **Proceedings National Academic Science**, Stanford, v.87, p.2671-2674, 1990.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS – CFSEMG. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. 5ª Aproximação. Viçosa, MG, 1999. 359p.

DEDECA, D. M. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. Var. *Typica* Cramer. **Bragantia**. Campinas v.16, n.23, p.315-366, dez. 1957.

DELOUCHE, W. G. **Seeds maturation**. Mississipi: Mississipi State University, Seed Tecnology Laboratory, 1976. 15p,

FINGERLIND, G. Relation between chromossome number and stomata in *Coffea*. **Botânica Gazette**, Chicago, n.100, p.303-309. 1939.

GRANER, E. A. Embriogênese de *Coffea*. I. Desenvolvimento do óvulo em *Coffea arabica* L. IN: 1ª REUNIÃO SUL-AMERICANA DE BOTÂNICA, Rio de Janeiro, 1938. **Anais...** Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura 1939. v.3. p.193-202.

GUIMARÃES, R. M. **Fisiologia de Sementes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 129 p.

HILHORST, H.W.M.; GROOT, S.P.C. e BINO, R.J. The tomato seed as a model system to study seed development and germination. **Acta Botanica Neerlandica**, Leiden, v.47, p.169-183, 1998.

HOUK, W. G. Endosperm and perisperm of coffee with notes on the morphology of the ovule and seed development. **American Journal of Botany**.Columbus, n.25, p.56-61. 1938.

INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ. Processamento, classificação e armazenamento de café. In: _____. **Cultura do café no Brasil: manual de recomendações**. 4. ed. Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1981. p.421-460.

JACINTO, J. B. C. e CARVALHO, N. M. Maturação de sementes de soja (*Glycine max* (1), Merrill). **Científica**, Jaboticabal, v.1, n.1, p.81-88, Jan./Jun., 1974.

JOSHI, A. C. A Note on the morphology of the ovule of Rubiaceae with special reference to *Cinchona* and *Coffea*. **Current Science**, Bangalore, n.7, p.236-237, 1938.

LEON, J. e FOURNIER, L. Crecimiento e desarrollo del fruto de *Coffea arabica* L. **Turrialba**, Costa Rica, v.12, p.56-74, 1962.

MAESTRI, M. e BARROS, R. S. Coffee. In: ALVIM, P de T. & KOZLOWSKI, F., (ed.). **Ecophysiology of tropical crops**. New York: Academic Press, 1977. p.249-278

MALAVASI, M. M. **Produção e tecnologia de sementes. Desenvolvimento e formação de sementes - Morfologia e anatomia de sementes e plântulas.** Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 97p.

MAYER, A. M. ; MAYBER, A. P. **The germination of seeds.** 4.ed. New York: Pergamon press, 1989. 269p.

MENDES, A. J. T.; Cytological observations in *Coffea*. IV. Embryo and endosperm development in *Coffea arabica* L. **American Journal of Botany.**Columbus, n.28, p.784-798, 1941.

MENDES, A. J. T.; MEDINA D. M.; CONAGIN, C. H. T. M. **Citologia do desenvolvimento dos frutos sem sementes no café "Mundo Novo".** *Bragantia*, Campinas, v.13, n.22, p.257-279. out. 1954.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

SANHEWE, A. J.; ELLIS, R. H. Seed development and maturation in *Phaseolus vulgaris*.I. Ability to germinate and to tolerance desiccation. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 47, n.300, p.949-958, July, 1996.

SCARANARI, H.J. Viveiros de café, instruções práticas. **O Agrônomo**, Campinas, v.5, p.5-9, 1954.

SILVA, C. M. **Maturação da semente e da determinação da época adequada de colheita do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).** 1974. 39p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

WORMER, T. M. The growth of the coffee berry. **Annals of Botany**, London. V.28. p.47-55, 1964.

WORMER, T. M. Shape of bean in *Coffea arabica* L. in Kenya. Turrialba, Costa Rica, v. 16, p.221-236, 1966.

CAPÍTULO 3

AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE CAFEEIROS

(*Coffea arabica* L.)

1 RESUMO

ESTANISLAU, Wagner Tompson. **Aquisição de tolerância à dessecação durante o desenvolvimento de sementes de cafeeiros (*Coffea arabica* L.).** In. _____. **Modelo funcional de desenvolvimento de sementes de cafeeiros.** (*Coffea arabica* L.) 2002. Cap.3 Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras*.

Este trabalho foi elaborado com o objetivo de verificar a aquisição de tolerância à dessecação durante o desenvolvimento de sementes de cafeeiros (Cv. Acaíá Cerrado 1474). Os frutos foram coletados de ramos do terço superior das plantas dois dias após o início da florada em diferentes estádios de desenvolvimento, entre a antese e 255 dias após a antese (DAA), e classificados por coloração e tamanho. Foi determinado o teor de água de frutos frescos, que foram posteriormente submetidos à secagem rápida e lenta em soluções saturadas de sais, e secagem ambiente, até que alcançassem teor de água em torno de 14%. Dos frutos frescos e após a secagem foram isoladas sementes para serem submetidas ao teste de germinação em papel e delas obtidos embriões excisos para avaliação de germinação *in vitro*. O método de secagem afeta a tolerância à dessecação de sementes de cafeeiros em diferentes estádios de desenvolvimento. Em geral, a tolerância à dessecação e a germinação de sementes de cafeeiro se iniciam a partir de 210 dias após a antese no estágio verde-cana dos frutos, enquanto que em embriões excisos se iniciam a partir de 150 DAA.

*Comitê Orientador: Dr.^a Maria Laene Moreira de Carvalho - UFLA (Orientadora), Dr. Renato Delmondez de Castro, Dr. Renato Mendes Guimarães.

2 ABSTRACT

ESTANISLAU, Wagner Tompson. Acquisition of desiccation tolerance by developing coffee seeds (*Coffea arabica* L.). In: _____. A functional model of coffee (*Coffea arabica* L.) seed development. 2002. Dissertation (Master's degree in Crop Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras*.

The objective of the present study was to characterize the acquisition of desiccation tolerance by developing coffee (cv. Acaiá Cerrado 1474) seeds. Developing fruits were harvested from branches marked at the upper third part of the plants, between 0 and 255 days after anthesis (DAA), and classified in color and size. It was also evaluated the water and dry matter contents in isolated fresh tissues. Freshly harvested fruits were submitted to slow and fast drying under saturated salt solutions, and open air drying, until it could reach a water content around 14%. Seeds were isolated from fresh fruits and from fruits after drying and submitted to germination test. Isolated embryos were submitted to *in vitro* germination test. It could be observed that the acquisition of desiccation tolerance was affected by the drying regime and stage of development. In general, seeds acquired germinability and desiccation tolerance from 210 DAA onwards, becoming maximum in yellow and cherry fruits at 225 DAA, whereas isolated embryos was from 150 DAA onwards.

*Guidance Committee: Dr.^a Maria Laene Moreira de Carvalho - UFLA (Major Professor), Dr. Renato Delmondez de Castro, Dr. Renato Mendes Guimarães

3 INTRODUÇÃO

Sementes de cafeeiro são, particularmente, propensas a uma rápida deterioração, principalmente quando armazenadas em ambiente de alta temperatura e umidade relativa do ar, o que dificulta a sua utilização na produção de mudas, para formação e renovação de lavouras e como fonte de material genético para uso em melhoramento.

A fisiologia da semente de cafeeiro é complexa, e existem consideráveis diferenças na fisiologia das sementes das diferentes espécies do gênero *Coffea*, que afetam a longevidade em relação à habilidade ou não para tolerar a dessecação.

Alguns autores classificam as sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*) como recalcitrante (Roberts, 1973; King & Roberts, 1979), mas por alguns anos, foi sugerido que as sementes de cafeeiro não eram verdadeiramente recalcitrantes e poderiam ser ortodoxas (Roberts, et al., 1984). Ellis, et al. (1990), sugeriram uma categoria intermediária para sementes de cafeeiro, na qual essas poderiam resistir à desidratação até um certo grau de umidade, mas com sua armazenabilidade reduzida.

A aquisição de tolerância à dessecação ocorre durante o desenvolvimento das sementes de diversas espécies. Bewley, et al. (1989), demonstraram que sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) não germinaram e nem apresentaram síntese de proteínas associadas à germinação quando retiradas prematuramente da planta mãe, a não ser que fossem submetidas à secagem. Segundo os autores, a redução de água durante o desenvolvimento num determinado estágio, pode ser suficiente para que as sementes passem do programa de desenvolvimento para o de germinação.

Em experimento conduzido para definir o estágio de desenvolvimento, durante o qual embriões de sementes de milho adquirem tolerância à dessecação, Bochicchio et al., (1996) concluíram que embriões frescos podem germinar em estádios precoces, quando eles ainda são intolerantes à dessecação e a tolerância à rápida secagem é adquirida num estágio preciso do desenvolvimento, aos 25 dias após antese, portanto muito antes da maturidade fisiológica. Isto indica que, aparentemente, embriões de sementes de milho não necessitam do choque induzido pela secagem, que é frequentemente necessário para a mudança de programa de desenvolvimento para o de germinação.

Ellis, et al. (1991), verificaram que sementes de cafeeiro oriundas de frutos de maturidade intermediária (verde-cana) foram mais tolerantes à dessecação do que as colhidas no estágio cereja (frutos maduros) ou no estágio verde (imatuos). Já Carvalho & Alvarenga (1979) observaram que a germinação de sementes oriundas de frutos maduros (cereja) foi superior a de frutos imatuos (verde) ou de maturidade intermediária (verde-cana). Guimarães (2000) observou que o vigor das sementes de cafeeiro aumentou sensivelmente na fase de desenvolvimento entre os estádios verde e verde-cana apresentando redução de vigor e viabilidade quando submetidas à secagem.

A capacidade de embriões ou sementes sobreviverem após desidratação é também dependente do método de secagem, mais especificamente da velocidade com que a água é retirada (Seranata et al. 1989). Em embriões somáticos de alfafa (*Medicago sativa* L.), esses autores demonstraram que a secagem lenta garantiu melhores germinações e vigor, quando comparada com a secagem rápida, indicando as vantagens da secagem lenta em indução de tolerância à dessecação.

Segundo Rosa et al. (2000), sementes de milho submetidas à temperatura de 50°C em estádios intolerantes, apresentam baixa germinação e vigor e que a pré-secagem inicial à temperatura de 35°C (pré-condicionamento)

induz tolerância à temperatura de 50°C, a qual é adquirida gradativamente, à medida que as sementes de milho perdem água.

Estudos mais aprofundados considerando os mecanismos de tolerância à dessecação podem conduzir a resultados mais conclusivos e consistentes, além de auxiliarem no entendimento básico relativo ao desenvolvimento e à germinação das sementes. Assim sendo, teve-se com este trabalho o objetivo de verificar a tolerância à dessecação, de embriões e sementes de cafeeiro durante o seu desenvolvimento, submetidos aos diferentes métodos de secagem.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudadas as sementes de *Coffea arabica* L., cultivar “Acaiaí Cerrado MG-1474”, oriundas de plantas localizadas no campo experimental da UFLA (Universidade Federal de Lavras), Lavras, Minas Gerais, a 900 m de altitude. A lavoura foi instalada em março de 1997, sendo considerado seu 1º ano de carga comercial em 2000, com uma produção de 60 sc/ha. As adubações foram realizadas com base na análise do solo, conforme recomendações da 5ª Aproximação CFSEMG (1999).

4.1. Marcação das plantas, ramos e caracterização dos frutos

Foram selecionadas seis linhas de plantas com 40 plantas cada, com espaçamento de 2,0m por 0,6m. Os ramos foram marcados no terço superior das plantas. A marcação das flores foi realizada no 2º e 3º dias após o início da antese, considerando-se como padrão flores abertas e com pétalas ainda “presas” ao receptáculo floral, sendo eliminados botões florais e flores das quais as pétalas já tinham se soltado do receptáculo floral, procurando dessa forma, uma uniformização no desenvolvimento dos frutos.

Os frutos foram colhidos em épocas diferentes de desenvolvimento, distinguidos com base no número de dias após a antese (DAA) e coloração de frutos conforme a Tabela 4.

Os frutos foram classificados nos estádios: chumbo, verde, verde-cana e cereja (Scaranari, 1954; Caixeta, 1981) e posteriormente, nos estádios finais, da maturação, foram separados e classificados considerando a coloração como verde, verde-cana e cereja (Tabela 4). Os frutos foram também separados em peneiras com diâmetro dos crivos de 16 a 32 meshs, em cada coleta, sendo considerados os frutos correspondentes à peneira na qual houve maior retenção

de frutos. As amostras obtidas em cada coleta foram divididas em quatro porções, sendo que uma constituiu o material fresco e as outras três foram submetidas aos tratamentos de secagem.

TABELA 4 - Estádios de desenvolvimento dos frutos de cafeeiro em função de dias após a antese (DAA) no período de agosto de 1999 a julho de 2000. UFLA, Lavras, Minas Gerais.

Dias após antese (DAA)	Estádio de desenvolvimento
150	Chumbo
165	Verde
180	Verde
195	Verde
210	Verde a Verde-cana
225	Verde-cana
225	Cereja

4.2. Métodos de secagem

O decréscimo do conteúdo de água foi acompanhado de dois em dois dias durante o processo de secagem em todos os métodos adotados, até atingirem um conteúdo de água em torno de 13%, pelo método da estufa (Brasil, 1992).

Foram testados três métodos de secagem dos frutos:

1) Secagem rápida: os frutos foram acondicionados em câmaras (Higrostat), com controle da umidade relativa no interior dessas. O aparelho consiste de uma caixa de plástico com tampa para fechamento hermético, ao qual foi adaptado um fundo telado e suspenso a uma altura de 20 cm com relação ao fundo da câmara, um sistema de circulação de ar interno, com a finalidade de promover uma constante homogeneização da umidade relativa do ar dentro da

caixa. No fundo dessa, havia uma bandeja contendo uma solução salina higroscópica. O sal utilizado para a secagem foi o Cloreto de Lítio (LiCl) obtendo-se uma solução saturada, por meio da qual se obtém um ambiente com uma taxa de UR de 13 %.

2) Secagem lenta: semelhante ao processo de secagem rápida, foi alterado somente o tipo de sal utilizado no Higrostat durante o processo de secagem. O sal utilizado para secagem lenta foi o Cloreto de Sódio (NaCl) numa solução saturada da qual se obtém um ambiente com uma taxa de UR de 73 %.

3) Secagem ambiente: os frutos foram acondicionados em camada única em bandejas plásticas em condições ambiente (aproximadamente com temperatura de 25°C e umidade relativa de 70%).

4.3. Determinação do conteúdo de água

As determinações do conteúdo de água foram realizadas após a colheita em cada estágio de desenvolvimento dos frutos frescos, seguindo os procedimentos prescritos nas RAS, pelo método da estufa a 105°C ± 3 por 24 horas (Brasil, 1992). Foram utilizadas três amostras de 10 frutos inteiros. Para determinação do conteúdo de água em sementes, essas foram isoladas do fruto sendo removido ainda o endocarpo (pergaminho), usando-se 20 sementes por repetição.

4.4. Germinação

O teste de germinação dos embriões isolados foi conduzido em meio de cultura *in vitro*, extraindo os embriões das sementes (sendo estas extraídas dos frutos), sem danificá-los, com auxílio de estiletos e pinças sob condições assépticas em câmara com fluxo laminar. O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige e Skoog, 1962), com adição 2% de GA₃ (giberelinas). Os tubos de ensaio foram acondicionados em câmara de crescimento, no Laboratório de

Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras. Foram considerados germinados aqueles embriões que apresentavam uma coloração esverdeada dos cotilédones e com um comprimento radicular maior que 1 mm.

A germinação das sementes foi conduzida extraindo-as dos frutos, com auxílio de estilete, sendo a semeadura realizada em papel, na forma de rolos, umedecidos com um volume de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel. Foi utilizada a temperatura constante de 30°C, e as contagens foram realizadas de dois em dois dias, durante 30 dias. Foram consideradas germinadas, aquelas sementes que apresentavam protrusão radicular maior do que 1 mm.

4.5. Procedimento estatístico

Os dados de conteúdo de água e de germinação dos embriões foram avaliados estatisticamente, utilizando DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado), em esquema fatorial (7x4) sendo sete épocas de coleta dos frutos em diferentes estádios de desenvolvimento, para frutos frescos e aqueles submetidos aos três métodos de secagem, com 3 repetições.

Para os dados de germinação de sementes, o delineamento utilizado foi o DIC, em esquema fatorial (3x4), para três épocas de coleta dos frutos e esses sendo frescos e, aqueles submetidos aos três métodos de secagem com 4 repetições. Os dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise variância.

As médias foram comparadas pelo teste de Scott-knott, a 5 % de probabilidade.

A redução do número de épocas de coleta para sementes ocorreu uma vez que até aos 195 DAA, a germinação das sementes era nula.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Teor de água nos frutos

Na Tabela 5, são apresentados os valores de teores de água de frutos frescos e após seus respectivos tratamentos de secagens em cada época de coleta. Os frutos frescos apresentaram teores de água, variando de 66,03 a 79,35 %. A secagem foi efetuada até entrarem em equilíbrio higrostático, aproximadamente 13,5% de conteúdo de água, dependendo da época de coleta e do tipo de secagem.

TABELA 5 – Teores médios de água dos frutos frescos e após secagem. Valores em porcentagem. UFLA, Lavras – MG, 2001. (VC –Verde-cana / CE – Cereja)

DAA	FRESCO	S. RÁPIDA	S. LENTA	S. AMBIENTE
150	79,35 A	11,47 B b	14,75 B a	14,15 A a
165	74,52 B	11,42 B c	16,62 A a	13,82 A b
180	72,04 C	13,58 A a	14,85 B a	12,27 B b
195	67,71 D	10,44 B b	14,21 B a	15,04 A a
210	66,96 D	12,26 B b	16,75 A a	11,91 B b
225 –VC	66,03 D	14,78 A a	14,14 B a	14,04 A a
225 – CE	67,52 D	13,92 A b	17,37 A a	13,75 A b

- Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). CV = 6,47.

Os frutos frescos apresentaram um decréscimo contínuo de valores de umidade até 225 DAA. Esse comportamento de perda de água é característico do

desenvolvimento de frutos de cafeeiros conforme resultados encontrados por Caixeta (1981) e Astolfi et al. (1981).

Por ocasião do acúmulo de matéria seca e deposição de reservas, os valores de teores de água dos frutos passaram de 79,35 % aos 150 DAA para 66,03 % em frutos no estágio verde-cana e para 67,52 % no estágio cereja, aos 225 DAA.

Resultados semelhantes foram encontrados por Caixeta (1981), que trabalhando com *Coffea arabica* L. Cv. Mundo Novo verificou um teor de água de 78,59 % aos 140 DAA e de 66,51 % aos 220 DAA.

O termo ortodoxa e recalcitrante foi proposto por Roberts (1973) para distinguir sementes de alta e baixa longevidade. Segundo Brandão Junior (2000), sementes ortodoxas são aquelas que sobrevivem por longos períodos, podem ser secas até conteúdos de água abaixo de 5 %, sem injúrias, e são hábeis para tolerar temperaturas de congelamento. O mesmo autor caracteriza como recalcitrantes sementes que não podem ser secas para conteúdos de água abaixo de 30 % sem injúrias e são incapazes de tolerar temperaturas de congelamento. Como resultado, sementes recalcitrantes sobrevivem por curtos períodos e apresentam problemas quanto à armazenabilidade. Assim sendo, os mecanismos que envolvem a tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro são complexos e a literatura ainda não apresenta resultados conclusivos.

Tem ocorrido uma certa controvérsia no que diz respeito a um conteúdo crítico de água, abaixo do qual a viabilidade da semente é perdida. Segundo Roberts & Ellis (1989), o conteúdo final de água em sementes secas (juntamente com a temperatura), parece ser importante na determinação da sobrevivência por longos períodos. Para Brandão Júnior (2000), sementes de cafeeiros secas a 15 % de umidade, têm a qualidade fisiológica mantida ao longo de nove meses de armazenamento sob condições de 10° C e 50 % de UR (umidade relativa). A literatura apresenta resultados em relação ao conteúdo de água em sementes,

citando que há um conteúdo crítico de água para manutenção da qualidade de sementes da espécie em questão, no entanto, nessas pesquisas tem-se ignorado o tempo gasto para a perda de água ou mesmo a temperatura em que os experimentos de secagem foram realizados.

Em experimentos com sementes sensíveis à dessecação, ou com eixos excisos destas, a taxa de secagem determina o tempo gasto para o material passar por uma série de valores de conteúdos de água. Quanto mais rapidamente a desidratação é atingida, menor é o conteúdo de água crítico para essas sementes ou eixos (Normah, et al. 1986; Fu et al., 1990; Pammenter et al 1991e Pammenter et al, 1993).

A taxa de secagem também influencia a resposta à desidratação de sementes ortodoxas em desenvolvimento (Bewley & Black, 1994; Harada, 1997) e a tolerância à dessecação de tecidos vegetativos (Oliver & Bewley, 1997). Em ambos os casos, uma melhor sobrevivência à desidratação foi observada em secagem lenta, presumivelmente devido ao tempo suficiente que é concedido para indução e operação dos mecanismos de proteção.

5.2. Germinação

Os testes ligados ao processo germinativo são os mais utilizados para prever a qualidade fisiológica de uma semente. Alguns processos e mecanismos de germinação têm sido sugeridos para o entendimento da tolerância à dessecação. Esses estudos incluem pesquisas com tecidos vegetativos e embriões excisos, visando ao entendimento e ao comportamento destes com relação à tolerância à dessecação.

A germinação de embriões excisos (Tabela 6), ocorreu a partir dos 150 DAA, não apresentando variação da sua germinabilidade no decorrer do desenvolvimento até aos 225 DAA.

Os embriões extraídos dos frutos após secagem, submetidos ao teste de germinação, apresentaram resultados que indicam que os mesmos não toleram a dessecação nos estádios intermediários de desenvolvimento. Aos 150 DAA, os embriões não toleram a secagem, não apresentando germinabilidade, independentemente do teste de secagem utilizado. Apesar de os resultados não diferirem estatisticamente entre 150 e 180 DAA, os embriões apresentaram alguma tolerância à dessecação aos 165 DAA.

TABELA 6 – Porcentagem de germinação *in vitro* de embriões em meio de cultura MS. Embriões extraídos de frutos frescos e após secagem. Fresco (FRE), secagem rápida (SR), secagem lenta (SL), secagem ambiente (SAM). UFLA, Lavras – MG, 2001. (VC – Verde-cana / CE – Cereja).

DAA	FRESCO	SR	SL	SAM
150	97,22 A a	0 C b	0 D b	0 D b
165	91,66 A a	5,55 C b	8,33 D b	13,89 D b
180	94,44 A a	5,55 C b	0 D b	2,77 D b
195	97,22 A a	2,77 C c	38,88 C b	36,11 C b
210	94,44 A a	13,89 C c	77,78 B b	66,66 B b
225 – VC	100,00 A a	83,33 A a	97,22 A a	94,44 A a
225 – CE	97,22 A a	58,33 B b	94,44 A a	83,33 A a

- Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). CV = 18,71.

A aquisição da tolerância à dessecação é adquirida gradativamente com o decorrer do desenvolvimento, a qual se torna mais evidente a partir dos 195 DAA, nos quais já existe germinabilidade para embriões submetidos aos métodos de secagem lenta (com 38,88 % de germinação) e à secagem ambiente (com 36,11 %). Com relação à secagem rápida nessa mesma época, o valor

germinação (2,77 %) foi inferior aos observados nos embriões submetidos aos outros métodos de secagem. Aos 210 DAA, houve um aumento da tolerância à dessecação dos embriões submetidos à secagem lenta e no ambiente, em relação aos extraídos aos 195 DAA, o que não ocorreu com embriões submetidos à secagem rápida. Menores valores de germinação foram observados em sementes submetidas à secagem rápida, indicando que a mesma não proporciona incremento na tolerância à dessecação.

Aos 225 DAA VC, comparando-se os resultados de germinação de embriões de frutos submetidos aos diferentes métodos de secagem ou de embriões de frutos frescos, não foram observadas diferenças estatísticas entre esses tratamentos. Nesse estágio foram observados valores máximos de germinação em embriões de frutos frescos. Nessa época, pôde-se constatar que os tratamentos de secagem não influenciaram a germinação dos embriões. Dessa forma, o máximo de tolerância à dessecação ocorreu em embriões aos 225 DAA VC. Aos 225 DAA CE, com a secagem rápida, os embriões foram menos tolerantes à dessecação, apresentando menores valores de germinação, os quais diferenciaram estatisticamente daqueles observados em embriões frescos e submetidos à secagem lenta e ao ambiente.

Comparando os valores de germinação de embriões submetidos a cada método de secagem, com aqueles observados em embriões frescos, infere-se que a secagem rápida proporcionou menores valores de germinação dos embriões em todos os estágios de desenvolvimento, exceto aos 225 DAA VC, quando foram observados os maiores valores de germinação, os quais não diferiram estatisticamente daqueles observados em embriões submetidos aos diferentes métodos de secagem.

De um modo geral, a redução do conteúdo de água, no decorrer do desenvolvimento foi acompanhada por um aumento da tolerância à dessecação para embriões de cafeeiro. Isso foi verificado para algumas espécies

recalcitrantes, como *Acer pseudoplatanus* (Hong & Ellis, 1990), *Q. robur* (Finch-Savage & Blake, 1994), *A. hippocastanum* (Tompsett & Pritchard, 1993; Farrant et al., 1997), *Camellia sinensis* (Berjak et al., 1993).

Sementes de cafeeiro, consideradas como semi-recalcitrantes ou de recalcitrância intermediária, apresentam taxas de germinação de embriões excisos diferenciadas conforme seu estágio de desenvolvimento, dependendo do método de secagem.

A comparação dos valores de germinação observados em embriões dos frutos que sofreram secagem nos diferentes estádios de desenvolvimento permite concluir que a secagem lenta é menos prejudicial à germinação em relação à secagem rápida, ou seja, a secagem lenta conferiu aos embriões maior tolerância à dessecação. Em estádios mais avançados do desenvolvimento, próximos aos 225 DAA, o dano de secagem não foi tão evidente. Esses resultados podem ser explicados por eventos que ocorrem no final do período de maturação de diversas espécies, como os citados por Iljin (1957) e Farrant et al. (1997), que indicam a deposição de reservas insolúveis, como de proteínas; alteração no volume vacuolar e aumento de oligossacarídeos que são mecanismos que estão associados à tolerância à dessecação.

Portanto, a secagem rápida sugerida para minimizar os efeitos deletérios associados com a desidratação de tecidos metabolicamente ativos (Pammenter et al., 1991; Berjak & Pammenter, 1997; Pritchard & Manger, 1998), não estão evidentes nessa pesquisa, então, a secagem rápida não diminuiu a sensibilidade à dessecação de “materiais” inteiramente ou semi-recalcitrantes. Esse fato implica que a secagem rápida com o intuito de evitar ou fugir daquele período de secagem durante o qual as reações deletérias ocorrem, não ocorreu nessa pesquisa.

De uma maneira geral, a germinabilidade de sementes de cafeeiros (Tabela 7), foi observada a partir dos 210 DAA, tanto em sementes de frutos

submetidos à secagem, como em frutos frescos. As secagens lentas e realizadas em condições ambiente proporcionaram resultados de germinação superiores aos das sementes de frutos submetidos à secagem rápida e de sementes de frutos frescos.

A partir dos 225 DAA (Tabela 7), tanto nos estádios verde-cana como no cereja, os resultados de germinação apresentaram-se maiores, não diferenciando estatisticamente entre si, independentemente do método de secagem. As sementes dos frutos que foram submetidos à secagem rápida apresentaram valores de germinação semelhantes aos observados naquelas submetidas à secagem lenta e ambiente. Isso indica que a semente de cafeeiro apresenta tolerância à dessecação nesses estádios de desenvolvimento. Esses resultados condizem com os encontrados por Guimarães (2000), que verificou que há uma evolução acentuada da germinação entre os estádios verde e verde-cana, e uma subsequente tendência à estabilização entre os estádios verde-cana e cereja, independente do método de secagem.

TABELA 7 - Porcentagem de germinação de sementes de cafeeiros. Secagem rápida (SR), Secagem lenta (SL) e Secagem ambiente (SAM). UFLA, Lavras – MG, 2001.

DAA	FRESCO	SR	SL	SAM
210	0 B b	3 B b	21 B a	15 B a
225 – VC	97 A a	92 A a	89 A a	96 A a
225 – CE	96 A a	92 A a	90 A a	92 A a

- Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). CV = 10,49.

Pelos dados contidos na Tabela 7, a secagem em estádios verde-cana e cereja, aos 225 DAA, não conferiu nenhum dano à germinação das sementes, ou

seja, nesses estádios de desenvolvimento, as sementes de cafeeiros se comportaram como tolerantes à dessecação. Resultados diferentes foram obtidos por Guimarães (2000), em que, trabalhando com sementes em diferentes estádios de maturação, observou maiores taxas de germinação das sementes antes da secagem, nos estádios verde, verde-cana e cereja, evidenciando que as sementes de cafeeiro podem ser incluídas num grupo de sementes descrito por Kermode & Bewley (1989), no qual, a dessecação não representa um sinal que desvia o programa de desenvolvimento para um programa germinação, visto que a secagem foi prejudicial à germinação.

De uma maneira geral, pode-se observar que a tolerância à dessecação se manifesta distintamente em cada fase de desenvolvimento, ou seja, o comportamento da semente é distinto do comportamento do embrião com relação à dessecação; e os embriões apresentam germinabilidade num estágio mais imaturo de desenvolvimento do fruto, comparado com a semente, que germina apenas nos estádios finais de desenvolvimento.

6 CONCLUSÕES

O método de secagem afeta a tolerância à dessecação de sementes de cafeeiros em diferentes estádios de desenvolvimento.

A aquisição de tolerância à dessecação de embriões tem um comportamento diferenciado do comportamento da semente como um todo. Os embriões germinam aos 150 DAA, enquanto que as sementes germinam a partir dos 210 DAA.

A tolerância à dessecação de embriões de cafeeiros é adquirida gradualmente no decorrer do desenvolvimento do fruto, a partir dos 150 DAA, atingindo um máximo aos 225 DAA.

A aquisição da tolerância à dessecação e germinação de sementes de cafeeiro se inicia a partir de 210 DAA, com os frutos no estágio verde-cana.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ASTOLFI, P. T.; PEDROSO, P. A. C.; CARVALHO, N. M.; SADER, R. Maturação de sementes de café (*Coffea arabica* L. Cv. Mundo Novo). *Científica*, São Paulo, v.9, n.2, p.289-294. 1981.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 1992. 365p.

BERJAK, P. e PAMMENTER, N. W. Progresses in the understanding and manipulation of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds. In: ELLIS, R. M.; BLACK, M.; MURDOCH, A. J.; HONG, T. D. (eds.) **Basic and applied aspects of seed biology**. Dordrecht: Kluweeer Academic Publishers, 1997. p.689-703.

BERJAK, P.; VERTUCCI, C. W.; PAMMENTER, N. W. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristic of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds to *Camellia sinensis*. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.2, p.155-166, June, 1993.

BEWLEY, J.D. ; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. 2.ed., New York: Plenum Press 1994. 445p.

BEWLEY, J. D.; KERMODE, A. R. e MIRSA, S. Desiccation and minimal drying treatments of seeds of castor bean and *Phaseolus vulgaris* which terminate development and promot germination cause changes in protein and messenger RNA syntheses. **Annals of Botany**, London, v.63, n.1, p.3-17, 1989.

BOCHICCHIO, A.; VERNIERI, P.; PULIGA, S.; BALDUCCI, F.; VAZZANA, C. Desiccation Tolerance in Immature Embryos of Maize: Sucrose, Raffinose and ABA-Sucrose Relation. In: **INTERNATIONAL WORKSHOP ON SEEDS: basic and applied aspects of seed biology**, 5., 1995, Reading. **Proceedings...** Reading, UK.: University of Reading, UK., 1996. p.1-12.

BRANDÃO JÚNIOR, D, S. **Marcadores da tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro**. 2000. 144p. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CARVALHO, M. M. de ALVARENGA, G. Determinação do estágio de desenvolvimento mínimo do fruto do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) para germinação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRA, 7, 1979, Araxá. Resumos... Rio de Janeiro: I B C/GERCA, 1979. p. 118-119.

CAIXETA, I. F. **Maturação fisiológica da semente do cafeeiro cv. Mundo Novo.** 1981. 48p.(Dissertação – Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS – CFSEMG. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. 5ª Aproximação.** Viçosa, MG, 1999. 359p.

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.230, p.1167-1174, Sept. 1990.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour?: II. Effects of provenance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford. v.42, n.238, p.653-657, May 1991.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. M.; BERJAK, P.; WALTERS, C. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. **Seed Science Research**. Wellingford, v.7, p.135-144. 1997.

FINCH-SAVAGE, W. E. e BLAKE, P. S. Indeterminate development in desiccation-sensitive seeds of *Quercus robur* L. **Seeds Science Research**. Wellingford v. 4, p.127-133. 1994

FU, J. R.; ZHANG, B. Z.; WANG, X. P.; QIAO, Y. Z.; HUANG. X. L. Physiological studies on desiccation, wet storage and cryopreservation of recalcitrant seeds of three fruit species dan their excise embryonic axes. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.8, n.3, p.743-754, 1990.

GUIMARÃES, R. M. **Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*, L.).** 2000. 180p. Tese (doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

HARADA, J.J. **Seed maturation and control of germination.** In: LARKINS, B. A. E VASIL, I. K.; DORDRECHT, N. L. **Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development**, Kluwer Academic Publishers, 1997. p.545-592.

HONG, T. D. ; ELLIS, R. H. A comparison of maturation drying, germination, and desiccation tolerance between developing seeds of *Acer pseudoplatanus* L. and *Acer platanoides* L. *New Phytologist*. v. 16, p. 589-596, 1990.

ILJIN, W. S. Drought resistnace in plants and physiological processes. *Annual Review of Plant Physiology*. New York, v.3, p.341-363. 1957.

KERMODE, A. R.; BEWLEY, J. D. Development seeds of *Ricinus communis* L. When detached and mantained in an atmosphere of high relative humidity, switch to a germinative mode without the requirement for complete desiccation. *Plant Physiology*, Rockville, v.9, n.3, p.702-707, July 1989.

KING, M. W.; ROBERTS, E. H. **The storage of recalcitrant seeds: achievements and possible approaches.** Roma: International Board for Plant Genetic Resources, 1979.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

NORMAH, M. N.; CHIN, H. E.; HOR, Y. L. Desiccation and cryopreservation of embryonic axes of *Hevea brasiliensis* Muell – Arg. *Pertanica*, Malasya, v.9, p.299-303, 1986.

PAMMENTER, N. W.; VERTUCCI, C. W.; BERJAK, P. Homeohydrous (recalcitrant) seeds: dehydration, the state of water and viability characteristics in *landolphia kirkii*. *Plant Physiology*, Rockville: v.96, p.1093-1098, 1991.

PAMMENTER, N. W.; VERTUCCI, C. W.; BERJAK, P. Responses of dehydration in relation to non-frezable water in desiccation-sensitive and tolerant seeds. In: CÔME, D.; CORBMEAU, F. (eds.) **Fourth international workshop seeds: Basic and applied aspects of seed biology.** Paris: ASFIS. 1993. p. 867-872.

PRITCHARD, H. W.; MANGER, K. R. A calorimetric perspective on desiccation stress during preservation procedures with recalcitrant seeds of *Quercus robur* L. *Cryoletters*, Cambridge, v.19, p.23-30, 1998. Supplement 1.

OLIVER, M. J.; BEWLEY, J. D. Desiccation-tolerance of plant tissues: A mechanism overview. *Horticultural Reviews*, New York, v.18, p.171-213, 1997.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seeds Science and Technology**, Zurich, v.1, n.3, p.499-514, 1973.

ROBERTS, E. H.; KING, M. W.; ELLIS, R. H. Recalcitrant seeds: their recognition and storage. In HOLDEN, J. H. W.; WILLIAMS, J. T. (eds.) **Crop Genetic Resources: conservation and evolution**. London: George Allen and Unwin, 1984. p. 38-52.

ROBERTS, E. H. e ELLIS, R. H. Water and seed survival. **Annals of Botany**, New York, v.63, n.1, p.499-514, 1989.

ROSA, S. D. F.; VON PINHO, E. V. R.; VIEIRA, M. G. G. C.; e VEIGA, R. D. Eficácia do teste de condutividade elétrica para uso em estudos de danos de secagem em sementes de milho (*Zea mays*L.) **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.22, n.1, p.54-63, 2000.

SARANATNA, T.; MCKERSIE, B. D. e BEWLEY, S. R. Artificial seeds alfalfa (*Medicago sativa* L.) Induction of desiccation tolerance in somatic embryos. **In vitro Cellular & Development Biology Plant**. Columbia, v.14, p.90-95, 1989.

SCARANARI, H.J. Viveiros de café, instruções práticas. **O Agrônomo**, Campinas, v.5, p.5-9, 1954.

TOMPSETT, P. B. e PRITCHARD, H. W. Water status changes during development relation to the germination and tolerance of *Aesculus hippocastanum* L. seeds. **Annals of Botany**, New York, v.71, p.107-116. 1993.

CAPÍTULO 4

β-TUBULINA E CITOESQUELETO MICROTUBULAR NO DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)

1 RESUMO

ESTANISLAU, Wagner Tompson. **β-Tubulina e Citoesqueleto Microtubular no desenvolvimento de sementes de cafeeiros (*Coffea arabica* L.).** In: _____. **Modelo funcional de desenvolvimento de sementes de cafeeiros (*Coffea arabica* L.).** 2002. Cap.4 Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras*.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar o padrão de acúmulo de β-tubulina e configurações do citoesqueleto microtubular nas diferentes fases do desenvolvimento de sementes de cafeeiro. Os frutos foram colhidos entre a antese e 255 dias após a antese (DAA), e das sementes foram isolados os tecidos do perisperma, endosperma e embrião. Desses tecidos foram extraídas frações de proteínas totais, que foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE e 'western blotting' para a imunodeteção quimiluminescente de β-tubulina. Para a visualização do citoesqueleto microtubular, os diferentes tecidos foram isolados e preparados por meio de fixação em paraformaldeído e emblocamento em butilmetilmetacrilato (BMM). Em seguida, procedeu-se o seccionamento dos materiais, imunodeteção e visualização de β-tubulina e do citoesqueleto microtubular em microscópio de fluorescência. As análises do acúmulo de β-tubulina e das configurações do citoesqueleto microtubular permitiram caracterizar o processo de histodiferenciação e organogênese durante o desenvolvimento e maturação do fruto e sementes de cafeeiro, e sua possível funcionalidade em relação aos eventos físicos e fisiológicos durante as diferentes fases do desenvolvimento da semente.

*Comitê Orientador: Dr.^a Maria Laene Moreira de Carvalho - UFLA (Orientadora), Dr. Renato Delmondez de Castro, Dr. Renato Mendes Guimarães.

2 ABSTRACT

ESTANISLAU, Wagner Tompson. β -Tubulin and microtubular cytoskeleton in developing coffee (*Coffea arabica* L.) seeds. In: _____. A functional model of coffee (*Coffea arabica* L.) seed development. 2002. Cap.4 Dissertation (Masters degree in Crop Science) Universidade Federal de Lavras, Lavras*.

The objective of the present work was to verify the pattern of β -tubulin accumulation and microtubular cytoskeleton configurations during development of coffee seeds. Developing fruits were harvested between 0 and 255 days after the pollination (DAA) from the upper third part of the plants. Perisperm, endosperm and embryos were isolated from fruits and seeds. Total proteins were then extracted from each tissue and submitted to SDS-PAGE electrophoresis and chemiluminescent western blotting for the immunodetection of β -tubulin. For the visualization of microtubular cytoskeleton, the different tissues were fixed in paraformaldehyde and embedded in butyl-methacrylate (BMM). Thereafter, the materials were sectioned and submitted to immunocytochemistry detection of β -tubulin and visualization of the microtubular cytoskeleton on a fluorescence microscope. The analysis of β -tubulin accumulation and microtubular cytoskeleton configurations allowed the characterization of histodifferentiation and organogenesis during fruit and seed development, as well as its functionality in relation to the physical and physiological events during the different phases of seed development.

*Guidance Committee: Dr.^a Maria Laene Moreira de Carvalho - UFLA (Major Professor), Dr. Renato Delmondez de Castro, Dr. Renato Mendes Guimarães.

3 INTRODUÇÃO,

O crescimento de qualquer ser vivo, de uma maneira geral, depende de divisão assim como de expansão celular. A seqüência dos processos que acontecem durante a divisão celular é definida como ciclo celular, o qual depende da síntese e duplicação de DNA, e da estrutura dinâmica do citoesqueleto em relação aos padrões específicos de organogênese e morfogênese, ou seja, diferenciação celular (Varela et al, 1975; Barlow, 1993). Em níveis citológico e molecular, o ciclo celular envolve o ciclo cromossômico, no qual a síntese e duplicação de DNA acontecem durante a intérfase, além do ciclo mitótico, o qual leva à divisão celular (Gunning & Steer, 1996). A padronização do ciclo de divisão celular leva a padrões recursivos das configurações dos componentes do citoesqueleto, o qual, atuando como o “maquinário estrutural subcelular” é necessário para eventos de divisão e expansão celular, que resultam no crescimento.

Os microtúbulos são um dos componentes principais do esqueleto celular ou citoesqueleto. Eles apresentam uma estrutura cilíndrica, sem ramificações, com cerca de 25 nm em diâmetro externo, e com um canal central aberto de cerca de 15 nm de diâmetro, sendo formados a por dímeros contendo um polipeptídeo de α -tubulina e um de β -tubulina, cada um com peso molecular em torno de 50 a 55 kD e cerca de 450 aminoácidos (De Castro, 1998). Os microtúbulos são considerados como uma armação que determina a forma e distribuição dos constituintes da célula. A integridade dos microtúbulos é necessária para manter a forma característica de muitas células e de uma ampla lista de atividades celulares que incluem: o posicionamento e movimento de organelas (Cole & Lippincott-Schwartz, 1995); localização e regulação de rotas bioquímicas, como exemplo a glicólise (Masters, 1984), e tanto os sistemas de

microfilamentos como de microtúbulos estão envolvidos nos processos de cariocinese e citocinese do ciclo celular (Steiger & Lloyd, 1991). Os microtúbulos estão relacionados ao ciclo celular por meio de arranjos reorganizacionais e configuracionais distintos, tais como os arranjos corticais característicos da intérfase, atuantes em eventos de expansão celular, e os arranjos de prófase, fusos mitóticos e fragmoplastos, os quais são característicos da fase mitótica e de divisão celular (Derksen, et al. 1990; Goddard et al., 1994; Gunning & Steer, 1996).

Poucos trabalhos têm sido conduzidos com o intuito de se entenderem os mecanismos de embriogênese e desenvolvimento das sementes de cafeeiro, além daqueles durante a germinação. Isso implica a deficiência de informações a respeito dos possíveis fatores que possam afetar o desenvolvimento e a qualidade das sementes de cafeeiro como um todo.

Os “eventos” ativos durante a embriogênese e o desenvolvimento da semente de cafeeiro são fatores que podem estar relacionados à qualidade final da semente. A qualidade máxima obtida durante o desenvolvimento de uma semente depende do estágio de desenvolvimento e maturação do embrião e da semente. Dependendo da espécie, ou mesmo da cultivar, a qualidade máxima pode ocorrer antes ou depois do ponto de maturidade fisiológica (Bewley & Black, 1994). Pelo presente estudo tem-se como objetivo verificar o padrão de acúmulo de β -tubulina e configurações do citoesqueleto microtubular e suas relações e funcionalidades nas diferentes fases do desenvolvimento de sementes de cafeeiro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas as sementes de *Coffea arabica* L., cultivar “Acaiá Cerrado MG-1474”, oriundas de plantas localizadas no campo experimental da UFLA (Universidade Federal de Lavras), Lavras, Minas Gerais, a 900 m de altitude. A lavoura foi instalada em março de 1997, sendo considerado seu 1º ano de carga comercial em 2000, com uma produção de 60 sc/ha. As adubações foram realizadas com base na análise do solo, conforme recomendações da 5ª Aproximação CFSEMG (1999).

4.1. Marcação de plantas, ramos e caracterização dos frutos

Foram selecionadas 6 linhas de plantas com 40 plantas cada, com espaçamento de 2,0m por 0,6m. Os ramos foram marcados no terço superior das plantas. A marcação das flores foi realizada no 2º e 3º dias após o início da antese, considerando como padrão abertas e com pétalas ainda “presas” ao receptáculo floral, sendo eliminados botões florais e flores das quais as pétalas já tinham se soltado do receptáculo floral, procurando dessa forma, uma uniformização do desenvolvimento dos frutos.

Os frutos foram colhidos em épocas diferentes de desenvolvimento, distinguidos com base no número de dias após a antese (DAA).

Os frutos foram separados por peneiras de classificação de 18 a 32 meshes com diâmetros dos crivos em mm de: 7,14; 7,94; 8,73; 9,53; 10,32; 11,11 (até aos 90 DAA); 11,91; 12,70 e classificados nos estádios: chumbinho, chumbo, verde, verde-cana e cereja conforme Scaranari (1954) e Caixeta (1981) nos diferentes DAAs que constituíram os tratamentos conforme a Tabela 8. A partir dos 120 DAA, em razão da maior uniformidade do tamanho dos frutos, foram considerados os frutos correspondentes à peneira na qual houve maior

retenção dos frutos. As sementes foram isoladas dos frutos manualmente e com uso de estiletes

TABELA 8 - Descrição dos tratamentos: estádios de desenvolvimento de frutos de cafeeiro em função de dias após antese (DAA) no período de agosto de 1999 a julho de 2000. UFLA, Lavras, Minas Gerais.

Dias após antese (DAA)	Estádio de desenvolvimento (peneiras)
90	Chumbinho (18-28)
120	Chumbo (30)
150	Chumbo (30)
165	Verde (30)
180	Verde (30)
195	Verde a verde-cana (30)
210	Verde-cana (30)
225	Verde-cana a cereja (32)
255	Cereja (32)

4.2. Detecção de β -tubulina

Para verificar o acúmulo de β -tubulina no decorrer do desenvolvimento, prescrevem-se as seguintes etapas.

4.2.1. Extração de proteínas

Para realização das análises moleculares, o material extraído da semente foi: embriões, partes do endosperma e perisperma. Os tecidos extraídos foram colocados em tubos de reação "Eppendorf" e congelados imediatamente em nitrogênio líquido, para que os mesmos pudessem ser triturados, para obtenção de um pó, evitando-se qualquer dano na atividade enzimática e/ou metabolismo.

Adicionou-se uma pequena porção de areia de quartzo para facilitar a trituração do material congelado. Posteriormente, foram adicionados ao pó congelado cerca de 50 a 80 μ l de uma solução tampão de Laemmli (1970) modificada (62.5 mM de Tris-HCl, SDS 2% (p/v), 15 mg/ml de DTT e glicerol 87% (v/v), em pH 9.0), para a extração e obtenção de proteínas totais desnaturadas que foram separadas em eletroforese de uma dimensão. Após proceder a mistura do pó com a solução de extração, as amostras foram fervidas por 10 minutos para facilitar a desnaturação protéica, e centrifugadas posteriormente por 15 minutos a 14.000 rpm, obtendo-se então o sobrenadante contendo somente proteínas.

4.2.2. Determinação da concentração protéica

A determinação da concentração de proteínas no sobrenadante foi realizada seguindo os procedimentos do ensaio "Micro-protein" (Bio-Rad), modificado com base nos métodos descritos por Lowry et al. (1951) e Bradford (1976), utilizando-se albumina bovina (BSA) como padrão.

4.2.3. Eletroforese e eletrotransferência (western blotting)

A eletroforese de proteínas desnaturadas foi conduzida em uma dimensão, utilizando-se géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) horizontais os quais foram corridos no sistema Multiphor (Pharmacia), operando por 1:20 horas, a 15°C, em condições de 600W e 50mA. Foram utilizados 30 μ g de conteúdo protéico a ser separado em gel de gradiente contendo de 8 a 18% de acrilamida em SDS. Também foram colocadas nos géis duas quantidades diferentes de tubulina pura de bovino, respectivamente 10 e 30 ng, as quais serviram de referência.

Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas ("blotting") dos géis para membranas Hybond ("blot") de difluoreto de polivinilidina (PVDF) de 0.45 μ m de espessura (Amersham), utilizando-se uma unidade de

transferência eletroforética Novablot (Pharmacia), operando por 2 horas a 4°C, em condições de 0.8 mA/cm² e 200mA. A solução tampão de transferência foi constituída de 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e etanol 10% (v/v), em pH 8,7.

4.2.4. Imunodeteccão quimiluminescente da β -tubulina

Todos os passos da imunodeteccão bioquímica foram realizados em temperatura ambiente com agitação lenta. Após a eletrotransferência e subsequente lavagem em solução tampão salina de Tris (TBS – “Tris buffer saline”) com pH 7.5, as membranas foram bloqueadas por 1 hora em solução bloqueadora 1% (p/v) (Boehringer Mannheim), e incubadas em 1 μ g/ml de anticorpo monoclonal de rato contra a β -tubulina (mouse “anti- β -tubulin”, Boehringer Mannheim), diluído em solução bloqueadora 0.5% por mais 1 hora. Em seguida, foram então lavadas por duas vezes, 10 minutos cada, em volumes grandes de TBS (diluído 10 vezes) contendo detergente (Tween-20) 0.5% (v/v) (TBST, mínimo de 30 ml para membranas com 10 cm² de área), com pH 7.5. Em seguida, as membranas foram lavadas por mais duas vezes, 10 minutos cada, em solução bloqueadora 0.5% (p/v), e incubadas por mais 1 hora em 50mU/ml de um anticorpo secundário de caprino, contra rato, conjugado com peroxidase (POD) (“goat antimouse-POD”, Boehringer Mannheim) diluído em solução bloqueadora 0.5% (p/v). Posteriormente, as membranas foram lavadas novamente 4 vezes, por 15 minutos em volumes TBST, e processadas de acordo com Leying *et al.* (1994). Em uma última etapa, as membranas foram incubadas por 1 minuto em uma solução de detecção (130 μ l/cm²) previamente misturada em temperatura ambiente, constituída de uma mistura (100:1) do substrato “A” mais o substrato “B” (Boehringer Mannheim), a qual reagiu com a peroxidase do anticorpo secundário, emitindo quimiluminescência no espectro de luz azul. Posteriormente, várias folhas de filme fotográfico Hyperfilm-ECL (Amersham)

foram expostas às membranas por períodos diferentes de tempo, em sala escura e sob luz de segurança, sendo revelados de acordo com o protocolo do fabricante.

4.3. Visualização do citoesqueleto microtubular

Para visualização do citoesqueleto microtubular, prescrevem-se as etapas que se seguem.

4.3.1. Preparo do material

As amostras utilizadas para a detecção de tubulina e citoesqueleto microtubular foram processadas e imunodetectadas de acordo com o protocolo estabelecido por Baskin et al. (1992). O processo de preparo das amostras para imunodeteção consistiu em fixar o material por 4 horas em paraformaldeído, sendo em seguida lavado em água bidestilada por 5 minutos, e desidratado em séries de etanol (10, 30, 50, 70, 90, 96 e 100%). Todas as amostras foram infiltradas com butilmetilmetacrilato (BMM, Merck) por meio de imersão em séries de substituição etanol/BMM (5:1, 3:1, 1:1, 1:3) até que foram completamente preenchidas (100%) por BMM. Em seguida, todo o material foi submetido à polimerização do BMM sob luz ultravioleta (UV), por ± 16 horas, a -20°C .

Uma vez polimerizado, o material foi seccionado em um ultramicrotomo LKB (Leica), no qual seções com espessura média de $3\ \mu\text{m}$ foram coletadas com micro-piça e colocadas flutuando sobre uma gota de água em cima de uma lâmina de observação microscópica, sendo em seguida estendidas com vapor de clorofórmio, e aderidas à lâmina por meio de aquecimento da lâmina em chapa a 60°C . Em seguida, as lâminas contendo as seções microscópicas foram armazenadas em temperatura ambiente ou a 4°C até que fossem utilizadas para análise.

4.3.2. Imunodeteccção citoquímica da β -tubulina (citoesqueleto)

O processo de imunodeteccção para a análise de β -tubulina e visualização do citoesqueleto microtubular se iniciou com a remoção do BMM contido nas secções microscópicas, por meio de imersão das lâminas por 2 vezes durante 5 minutos em acetona 100%.

O passo seguinte foi incubar as lâminas contendo as secções em solução de anticorpo primário, composto de anticorpo monoclonal de rato contra β -tubulina (“anti- β -tubulin”, Amersham), diluído 1:200 (v/v) em solução tampão salina de fosfato (PBS – “phosphate buffer saline”) contendo 0.1% de soro de albumina bovina acetilada (BSAc – “acetylated bovine serum albumin”), aplicado sobre as secções na lâmina, por 1 hora a 37°C. As lâminas foram submetidas a 4 lavagens de 15 minutos cada, em PBS contendo BSAc (PBS/BSAc). Em seguida, as lâminas foram incubadas com solução de anticorpo secundário, composto de anticorpo de caprino contra rato conjugado com isotiocianato de fluorescina (“fluorescein isothiocyanate” – FITC, que emite fluorescência no espectro verde) (“goat antimouse-FITC”, Amersham), diluído 1:200 (v/v) em PBS/BSAc, aplicado sobre as secções na lâmina, por mais 1 hora a 37°C. As lâminas foram então submetidas a mais 4 lavagens de 15 minutos cada, em PBS/BSAc. Em seguida, foi aplicada sobre as secções nas lâminas uma quantidade mínima de Citifluor (Agar Aids) que foram então cobertas com lamínulas de proteção, sendo posteriormente submetidas à análise e coleta de imagens em microscópio confocal de rastreamento a laser (Confocal Laser Scanning Microscope MRC600, Bio-Rad).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A β -tubulina foi imunodetectada após solubilização, em extratos de proteínas totais do perisperma do fruto, do endosperma e do embrião das sementes em desenvolvimento. Foram observados perfis de β -tubulina distintos para cada tecido, em função do estágio do desenvolvimento (Figura 8).

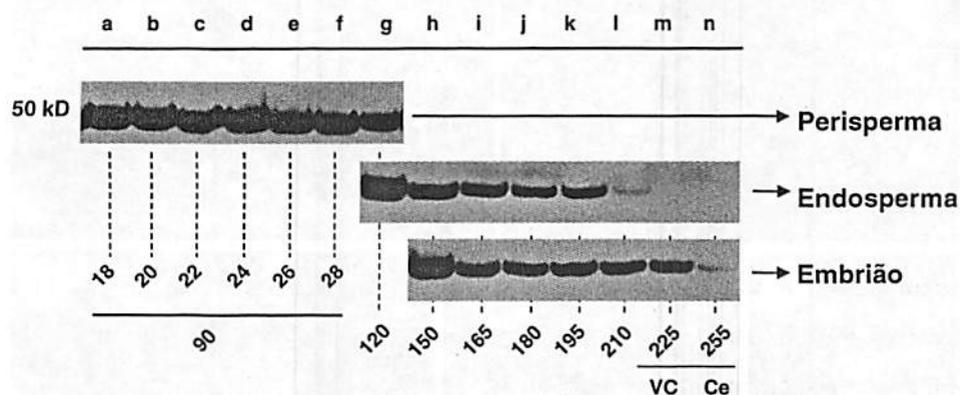
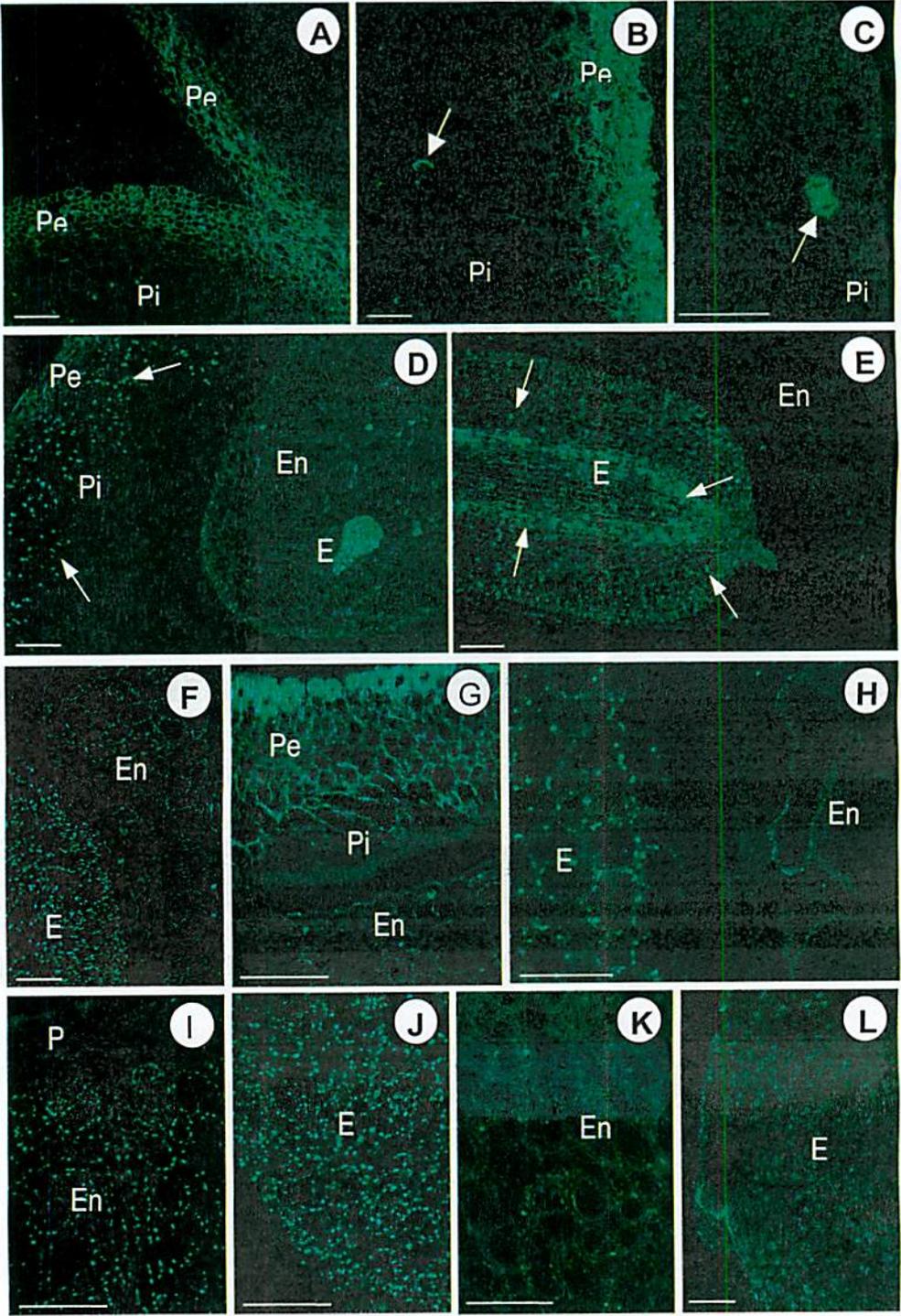


FIGURA 8 – Perfil de acúmulo de β -tubulina ('Western blot' após eletroforese SDS-PAGE) em diferentes tecidos do fruto e das sementes de cafeeiro em estádios de desenvolvimento (Colunas, 'a' a 'n'), caracterizados com base no tamanho (Peneiras, 18 a 30 e dias após a antese DAP, 90 a 255), e coloração do fruto na fase de maturação (VC – verde cana; C – cereja). UFLA, Lavras – MG, 2001.

Os perfis de acúmulo e conteúdo de β -tubulina para cada tecido, em função do estágio do desenvolvimento, foram relacionados aos conteúdos e configurações distintas de citoesqueleto microtubular correspondentes a cada tecido e estágio do desenvolvimento (Figura 9).



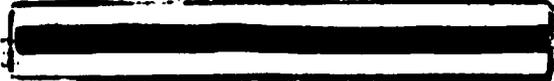


FIGURA 9: Micrografias de imunofluorescência (FITC) mostrando as configurações do citoesqueleto microtubular em tecidos do fruto e sementes de cafeeiros.

A) Frutos com tamanho de peneira 18 aos 90 DAP, mostrando o perisperma com abundante presença de citoesqueleto microtubular, observado-se células com configurações de citoesqueleto microtubular mitóticos, assim como cortical. Pe - refere à porção mais externa do perisperma; Pi - porção mais interna do perisperma. Barra indica 10 μm

B - C) Frutos de peneira 22 aos 90 DAP. Em detalhe, as setas indicam células mitóticas em processo de divisão celular no perisperma, sendo observado em 'B' uma célula mitótica em prófase na região interna (Pi), e em 'C' uma outra célula em fragmoplasto durante metáfase na região interna (Pi). Barras indicam 5 μm

D) Frutos de peneira 28 aos 90 DAP, mostrando na região proximal do fruto o perisperma externo (Pe) com citoesqueleto cortical intacto, e interno (Pi) com citoesqueleto e células em processo de degradação evidenciado pela presença de grânulos fluorescentes de β -tubulina (setas). Observa-se ao mesmo tempo o crescimento do endosperma (En) contendo em seu interior o embrião (E) em estágio globular, ambos contendo citoesqueleto cortical e mitótico abundante. Barra indica 10 μm .

E) Frutos de peneira 30 aos 120 DAP, mostrando a radícula de um embrião (E) em estágio torpedo, observando-se uma abundante rede de citoesqueleto cortical, e inúmeras células com citoesqueleto microtubular mitótico (setas), conforme as configurações mitóticas em B e C. O endosperma envolve o embrião, o qual apresenta células com citoesqueleto cortical e mitótico. Barra indica 10 μm

F) Frutos aos 150 DAP, mostrando a degeneração do citoesqueleto microtubular cortical no embrião (E), que resulta na formação de grânulos fluorescentes de β -tubulina, ao passo que no endosperma (En) quase não se verifica presença de microtúbulos e poucos grânulos de β -tubulina. Barra indica 10 μm

G) Frutos aos 165 DAP, mostrando o endosperma ainda contendo grânulos de β -tubulina, os restos do perisperma interno (Pi), além da parte externa (Pe) que representará a película prateada em sementes maduras secas. Barra indica 10 μm .

H) Frutos aos 165 DAP, mostrando detalhes da degradação do citoesqueleto microtubular no tecido embrionário (E), com a presença de grânulos de β -tubulina em quantidade maior que no endosperma (En). Barra indica 5 μm .

I) Frutos aos 180 DAP, mostrando outra região do endosperma (En) ainda contendo uma quantidade relativamente alta de grânulos de β -tubulina, além da presença de do perisperma (P), que nessa fase já se encontra sem citoesqueleto, representando o resto do tecido nucelar, que posteriormente será a película prateada (Pe). Barra indica 10 μm .

J) Frutos aos 180 DAP, mostrando maior detalhe dos grânulos de β -tubulina ainda bastante intensos no embrião (E). Barra indica 10 μm .

K) Frutos aos 225 DAP (fruto cereja), mostrando uma região do endosperma (En) com uma quantidade bem pequena de grânulos de β -tubulina. Barra indica 10 μm .

L) Frutos aos 225 DAP (fruto cereja), mostrando detalhe da radícula do embrião (E), onde já quase não existem grânulos de β -tubulina. Barra indica 10 μm . UFLA, Lavras - MG, 2001.

O conteúdo de β -tubulina no perisperma apresentou-se aparentemente constante em frutos de diferentes tamanhos retidos em peneiras de 18 a 28 meshes aos 90 DAA (Figura 8, coluna a-f), com uma tendência de decréscimo do conteúdo em frutos retidos na peneira 30 aos 120 DAA (Figura 8, coluna g). Não foi possível extrair proteínas totais e imunodetectar tubulina do perisperma após 120 DAA (Figura 8, coluna h-n), uma vez que a porção interna deste tecido (Pi) já se encontrava quase que completamente degradada, restando somente a porção mais externa (Pe) que dá origem à película prateada ao final do desenvolvimento, sendo o seu espaço substituído pelo endosperma e embrião em crescimento, que compõem a semente 'verdadeira'.

A análise imunocitoquímica por meio de microscopia de imunofluorescência para a detecção de tubulina polimerizada e visualização de microtúbulos permitiu observar uma abundante rede de citoesqueleto microtubular cortical, assim como mitótico nas células da porção interna e externa do perisperma em frutos de diferentes tamanhos colhidos entre 90 e 120 DAA (Figura 9A-C). Foi possível observar também a degradação do citoesqueleto microtubular em células do perisperma, na região próxima a do endosperma em crescimento. A degradação de microtúbulos em células desta região parece anteceder a degradação das próprias células do perisperma que cedem espaço ao endosperma em crescimento. Isso é verificado pela detecção de pontos de fluorescência, que representam aglomerados de tubulina resultantes da depolimerização do citoesqueleto microtubular (Figura 9D).

O padrão de β -tubulina detectado nos extratos protéicos do perisperma em frutos de diferentes tamanhos colhidos aos 90 DAA (Figura 8, colunas a-f) correlacionam com os conteúdos elevados de citoesqueleto microtubular nos mesmos frutos (Figura 9A-C). Já o conteúdo ligeiramente inferior de β -tubulina em frutos retidos na peneira 30 aos 120 DAA parece estar relacionado com a

degradação do citoesqueleto, da tubulina e de células perispermáticas que ocorrem nos frutos (Figura 8, coluna g; Figura 9D) em função do desenvolvimento do endosperma.

A presença de citoesqueletos mitótico e cortical leva a crer que o perisperma no seu todo se diferencia e cresce por divisão e expansão celular (Gunning & Steer, 1996; De Castro, 1998; De Castro et al., 2000). No entanto, esse comportamento depende da região do fruto em sua seção longitudinal. Durante o desenvolvimento do fruto, o perisperma pode estar em crescimento na região distal (distante do pedúnculo), ao mesmo tempo em que pode estar sofrendo um processo de degradação de microtúbulos e de suas células na região proximal (próximo ao pedúnculo) do fruto, na qual acontece o crescimento do endosperma e embrião (Figura 9A-D). Isso acontece de forma gradual, conforme o crescimento do endosperma avança da região proximal em sentido à região distal.

Até aos 150 DAA ocorre a degradação do perisperma, quando o espaço é completamente preenchido pelo endosperma em crescimento, que contém em seu interior o embrião também em crescimento (Capítulo 2).

O comportamento decrescente do padrão de β -tubulina no endosperma a partir de 120 DAA e no embrião a partir de 150 DAA (Figura 8, colunas g e h em diante) está relacionado com a presença de citoesqueleto microtubular e de agregados de tubulina resultantes da degradação do próprio citoesqueleto durante o progresso da maturação (Figura 9 E-L). A presença de citoesqueleto microtubular mitótico até os 120 DAA é um indicativo de que a histodiferenciação tanto do endosperma como do embrião, e da semente como um todo, está compreendida entre 0 DAA e 120 DAA (Figura D, E). Após 150 DAA observa-se a presença somente de citoesqueleto cortical, indicando a predominância de eventos complementares de morfogênese e crescimento do endosperma e do embrião por expansão celular, característicos do processo de

maturação da semente (De Castro 1998; De Castro & Hilhorst, 2000). O avanço da maturação leva à degradação gradual do citoesqueleto e o sinal da β -tubulina atinge níveis abaixo dos limites detectáveis pela análise de micrografias de imunofluorescência (Figura 9F, H, K).

De modo geral, a análise individual dos diferentes tecidos, perisperma, endosperma e embrião, permitiu verificar que há um acúmulo decrescente de tubulina durante o desenvolvimento do fruto e sementes. O perisperma na sua fase mais expressiva, aos 90 DAA, começa a ser degradada, ocupando o espaço interno do fruto em quase sua totalidade, cerca de 95 %. Nesse ponto observa-se o início do desenvolvimento e crescimento do endosperma e do embrião, ou da semente propriamente dita. O declínio no acúmulo de β -tubulina como resultado da degradação do citoesqueleto microtubular é um indicativo de declínio na atividade do ciclo celular naquele tecido, à medida que a semente vai aumentando de tamanho.

O desenvolvimento inicial do endosperma, verificado nos frutos maiores aos 90 DAA, é caracterizado pela visualização do citoesqueleto microtubular, tanto mitótico como cortical, como indicativo de uma atividade intensa do ciclo celular (Figura 9D). Essa atividade, ou acúmulo de β -tubulina não foi detectada aos 90 DAA (Figura 8) por causa da dificuldade de isolamento do tecido endospermático.

Nessa fase o embrião está presente em formato globular, também com uma intensa atividade de citoesqueleto, cortical e mitótico. Aos 120 DAA o embrião apresenta-se na sua forma de torpedo, e assim como no endosperma, ainda com intensa atividade do citoesqueleto mitótico e cortical, atuante no processo de histodiferenciação desse tecidos.

Aos 150 DAA (Figura 9 F) não se observa a presença do citoesqueleto mitótico, mas somente citoesqueleto cortical em processo de degradação, tanto no embrião como no endosperma, indicando o encerramento da fase de

histodiferenciação desses tecidos. Foi observada grande quantidade de grânulos de tubulina a partir de 150 DAA (Figura 9 F), que correspondeu ao decréscimo do padrão de β -tubulina detectado no 'western blot' (Figura 8). A presença de grânulos de β -tubulina foi detectada na periferia do endosperma, próximo ao perisperma (Figura 9 G), que apresenta uma camada Pe de células intactas e uma camada Pi composta de resquícios das células que foram degradadas. Já na parte mais interna do endosperma próxima ao embrião há uma quantidade menor de grânulos de tubulina comparado ao embrião no mesmo estágio (Figura 9 H), ao passo que a quantidade de grânulos de tubulina é mantida elevada no endosperma da parte distal do fruto, assim como no embrião ainda aos 185 DAA (Figura 9 I, J). A degradação de microtúbulos e tubulina é máxima a partir dos 225 DAA (Figura 9 K, L),

Em geral, a degradação do citoesqueleto e tubulina no decorrer do desenvolvimento de sementes de cafeeiros segue um padrão característico, no qual conteúdos elevados de tubulina representam conteúdos elevados de citoesqueleto microtubular, ao passo que os conteúdos reduzidos de tubulina representam a degradação do citoesqueleto. O processo gradual de degradação do citoesqueleto e tubulina durante o desenvolvimento do endosperma e embrião da semente de cafeeiro, da parte interna para a parte externa dos tecidos, se assemelha ao padrão detectado durante o desenvolvimento de sementes de outras espécies, como em tomate, pepino e neem (Sacandé et al., 1997; De Castro, 1998; De Castro & Hilhorst, 2000; Jing, 2000; Sacandé, 2000).

Tem sido reportado que a degradação do citoesqueleto microtubular acontece como resultado, pelo menos parcial, do processo de dessecação envolvendo sementes recalcitrantes (Roberts, 1973; Berjak, 1989; Wesley-Smith et al., 1992; Mycock et al., 2000), e tecidos vegetativos (Bartolo & Carter, 1991), quando esses atingem conteúdos de água críticos, abaixo dos quais não é possível a reconstituição da rede de citoesqueleto após a reidratação. Assim

como acontece com sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), pepino (*Cucumis sativus* L.) e neem (*Azadirachta indica* A. Juss.), as sementes de cafeeiro atingem a maturidade com teores de água relativamente altos, entre 30 e 50%. Ainda assim, o conteúdo de citoesqueleto e tubulina nessas sementes é quase nulo. Tanto as sementes de tomate e pepino, que são classificadas como ortodoxas (Roberts, 1973), assim como as sementes de cafeeiro e da árvore neem, que são consideradas como semi-recalcitrantes ou de nível intermediário (Ellis et al., 1990, 1991; Sacandé, 1997; Sacandé et al., 2000), toleram a dessecação forçada após serem isoladas dos frutos maduros e são capazes de manter a viabilidade e reconstituírem a rede de citoesqueleto microtubular após a reidratação, diferentemente das sementes recalcitrantes (Roberts, 1973).

O padrão de degradação do citoesqueleto microtubular e tubulina durante o desenvolvimento das sementes parece ser independente do caráter ortodoxo, semi-recalcitrante ou recalcitrante, mas sim de um programa inerente ao próprio desenvolvimento das diferentes espécies de sementes. Esse programa viria garantir ou não a integridade e viabilidade celular em condições de dessecação, tendo em vista a capacidade, pelo menos parcial, de reconstituição do citoesqueleto após reidratação, e reativação plena da atividade celular e da manutenção da viabilidade da semente. Isso reflete na efetivação dos processos de diferenciação e organogênese, e do desenvolvimento em si. Nesse contexto, as sementes de cafeeiro, classificadas como semi-recalcitrantes, possuem um programa de degradação do citoesqueleto e tubulina correspondente a de sementes ortodoxas, que são capazes de se reconstituírem após reidratação.

Dessa forma, baseada apenas nas configurações do citoesqueleto e padrões de β -tubulina, a semente de cafeeiros segue o mesmo padrão de sementes ortodoxas.

6 CONCLUSÕES

As análises do acúmulo de β -tubulina e das configurações do citoesqueleto microtubular permitem identificar as fases de histodiferenciação dos tecidos perispermático, endospermático e embrionário, que são distintos em função do estágio de desenvolvimento dos frutos de cafeeiro.

A fase de histodiferenciação se encerra em torno dos 150 DAA, com o desaparecimento do citoesqueleto mitótico e consumo do perisperma.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BARLOW, P.W. The cell division cycle in relation to root organogenesis. seeds. In: ORMROD, J.C. e FRANCIS, D., DORDRECHT, N.L. **Molecular and Cellular Biology of the Plant Cell Cycle**, Kluwer Academic Publishers, 1993. p.179-199.

BARTOLO, M. E. e CARTER, J. V. Microtubules in the mesophyll cells of nonacclimated and cold-acclimated spinach. **Plant Physiology**, Rockeville, v.97, p.175-181, 1991.

BASKIN, T.I.; BUSBY, C.H.; FOWKE, L.C.; SAMMUT, M. e GUBLER, F. Improvements in immunostaining samples embedded in methacrylate: localization of microtubules and other antigens throughout developing organs in plants of diverse taxa. **Planta**, New York, v.187, p.405-413, 1992.

BERJAK, P. Storage behaviour of seeds of *Havea brasiliensis*. **Journal of Natural Rubber Research**, Kuala Lumpur, v.4, p.195-203, 1989.

BEWLEY, J.D. e BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. 2.ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.

CAIXETA, I. F. **Maturação fisiológica da semente do cafeeiro *Coffea arabica* L. Cv. Mundo Novo**. 1981, 48p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

COLE, N. B.; LIPPINCOTT-SCHWARTS, J. Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. **Current Opinions in Cell Biology**, Philadelphia, v.7, p.55-64, 1995.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS – CFSEMG. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. 5ª Aproximação. Viçosa, MG, 1999. 359p.

DE CASTRO, R.D. **A Functional Analysis of Cell Cycle Events in Developing and Germinating Tomato Seeds**.1998. 110 p. Dissertação

(Doutorado em Biotecnologia de Sementes) Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

DE CASTRO, R. D.; HILHORST, H. W. M.; VAN LAMMEREN, S. P. C.; ANDRE, A. M.; GROOT, R. J. BINO., Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology**, Rockeville, v.122, p.1-9. 2000

DE CASTRO, R.D.: HILHORST,H. W.M. Dormancy, germination and the cell cycle in developing and imbibing tomato seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. V.12, Edição Especial. P.105-136. 2000a.

DE CASTRO, R.D.: HILHORST,H. W.M. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology**, Rockeville, v.122, p.327-335, 2000b.

DERKSEN, J.; WILMS, F.H.A. e PIERSON, E.S. The plant cytoskeleton: its significance in plant development. **Acta Botanica Neerlandica**, Leiden, v.39, p.1-18, 1990.

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.230, p.1167-1174, Sept. 1990.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour?: II. Effects of provenance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford. v.42, n.238, p.653-657, May 1991.

JING, H. C.; BERGERVOET, J. H. W.; JALINK, H.; KLOOSTER, M. S.L.; BINO, R. J.; HILHORST, H., W. M. ; GROOT, S. P. C.Cucumber (*Cucumis sativus* L).seed performance as influenced by ovary and ovule position. **Seed Science Research**, Wellingford, v.10, p.435-445, 2000.

GODDARD, R.H.; WICK, S.,M.; SILFLOW, C.D. e SNUSTAD, D.P. Microtubule components of the plant cell cytoskeleton. **Plant Physiological**, Rockeville, v.104, p.1-6, 1994.

GUNNING, B.E.S. ; STEER, M.W. Plant cell biology, structure and function. **Jones and Bartlett Publishers**, Sudbury: Massachusetts, 1996.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. T4. *Nature*, New York, v.227, p.680-685, 1970.

LEYING H.J.; HUBER, I. e HINZPETER, M. Detection of proteins with BMM chemiluminescence western blotting system. *Biochemica*, v.1, p.10-12, 1994.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. e RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.

MASTERS, C. Interactions between glycolitic enzymes and components of the cytomatrix. *Journal of Cell Biology*, New York, v.99, p.222-225, 1984.

MYCOCK, D. J.BERJAK, P.; FINCH. Effects os desiccation on the subcellular matrix of *Quercus robur* In:BLACK,M. BRADFORD, K. J.; VÁSQUEZ-RAMOS, J. *Seed biology: advances and applications*. Mérida, México. CABI.. 1999. Cap. 18, p.197

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. *Seeds Science and Technology*, Zurich, v.1, n.3, p.499-514, 1973.

STAIGER, C. J.; LLOYD, C. W. The plant cytoskeleton. *Current opinions in cell biology*, Philadelphia, v 3, p.33-42, 1991.

SACANDÉ, M.; GROOT, S.P.C.; HOEKSTRA, F.A.; DE CASTRO, R.D. e BINO, R.J. Cell cycle events in developing neem *Azadirachta indica* seeds: Are they related to the intermediate storage behaviour. *Seed Science Research*, Wellingford, v.7, p.161-168, 1997.

SACANDÉ, M.; *Stress, Storage and Survival of Neem Seeds*. 2000. 124 p. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia de Sementes) Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

SCARANARI, H.J. Viveiros de café, instruções práticas. *O Agrônomo*, Campinas, v.5, p.5-9, 1954.

VARELA, F.G.; MATURANA, H.R. e URIBE, R. Autopoiesis: the organization of living systems, its characterisation and a model. *Biosystems*, Limerick, v.5, p.187-196, 1975.

WESLEY-SMITH, J.; VERTUCCI, C. W.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W.; CRANE, J. Cryopreservaiton of dessication-sensitive axes of *Camellia sinensis* in relation to dehydration, freezing rate and the thermal properies of tissue water. **Journal of plant Physiology**, Washington n.140, p. 596-604, 1992.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A primeira fase do desenvolvimento de sementes de cafeeiro consiste na histodiferenciação ou morfogênese que se inicia com a fertilização e rápida divisão celular para formação do eixo embrionário e dos tecidos de reserva. A fase seguinte se refere à fase de expansão dos tecidos da semente, durante a qual há um aumento na matéria seca, ocorrendo expansão celular juntamente com deposição de reserva. A terceira e última fase, a maturação, é caracterizada pela redução geral do metabolismo e redução do teor de água na semente.

O início da floração ocorreu após um período de precipitação e o desenvolvimento dos frutos se iniciou imediatamente após fertilização, até atingir 2mm de comprimento, quando ocorreu um veranico, isto é, correu a paralisação da precipitação.

O crescimento dos frutos só foi retomado aos 60 DAA, com início de chuvas constantes e intensas. A diferenciação do saco embrionário só foi verificada aos 90 DAA, em frutos pertencentes à peneira 24. Nessa fase houve um crescimento acelerado e desuniforme dos frutos que foram classificados em peneiras de 16 a 28 meshs. Os frutos se caracterizaram por conterem somente perisperma, com revestimento externo composto pelos tecidos do pericarpo (endocarpo, mesocarpo e exocarpo).

Aos 120 DAA os frutos se distribuíram entre as peneiras 16 e 32, com maior proporção da peneira 30 com cerca de 39 % do total de frutos. Os frutos das peneiras 28 e 30 apresentaram o perisperma ocupando cerca de 40% do volume da semente (análise visual), sendo que os outros 60% eram preenchidos pelo saco embrionário. Foi possível identificar dentro endosperma em desenvolvimento, o embrião nos estádios “globular” ou “torpedo”, dependendo da peneira. Um rápido crescimento e desenvolvimento ocorreu a partir desta fase

coincidindo com condições ambientais favoráveis como, disponibilidade de água e temperaturas adequadas.

Aos 150 DAA, 70% dos frutos foram classificados em peneiras 28 e 30, sendo que os frutos da peneira 30 representavam 38% do total. O saco embrionário já ocupava cerca de 90 a 100% do volume total da semente (análise visual) e foi possível identificar os embriões com mais facilidade, visto que se apresentaram maiores e com formato cotiledonar. O embrião passa do estágio globular para o estágio cotiledonar, considerado como já diferenciado, em um curto período de tempo entre os 90 e 150 DAA. O endosperma mostra-se esbranquiçado e o perisperma esverdeado.

O desenvolvimento aos 165 DAA, se caracteriza por apresentar um crescimento bem mais acelerado, com 63% dos frutos pertencentes às peneiras 28 e 30, e com uma certa expressividade para a peneira 30 que representa 46% do total. Essa fase se diferencia pouco da anterior, destacando-se pelo rápido crescimento do fruto, com um intenso acúmulo de reservas, que se caracteriza por um certo endurecimento do endosperma e por apresentar uma coloração mais esbranquiçada, passando de um estágio leitoso para pastoso.

Aos 180 DAA, o embrião continua crescendo e o endosperma ganha em consistência assumindo uma coloração mais esbranquiçada, enquanto o perisperma adquire coloração verde intensa. Há um acúmulo de matéria seca e decréscimo no conteúdo de água dos frutos, sementes e embriões. A maior proporção de frutos pertence às peneiras 28 e 30, com 60 % dos frutos, destacando a peneira 30 com cerca de 42% do total.

Dos 195 aos 210 DAA, ocorrem apenas diferenças com relação ao tamanho dos frutos. Durante esse período, o embrião cresce em tamanho, mantendo suas características, ao passo que o endosperma ganha mais consistência assumindo uma coloração mais acinzentada. O perisperma, apesar de ainda verde, começa a dar indícios de mudança de coloração prateada.

Aos 225 DAA, ocorre uma intensa maturação dos frutos, sendo que 86% deles apresentam o exocarpo vermelho, típico do estágio cereja, com 74 % de frutos pertencentes à peneira 32. O mesocarpo se encontra mucilaginoso, enquanto que o endocarpo já se encontra aparentemente lignificado (pergaminho). O perisperma se apresenta como uma película que envolve o endosperma de coloração verde-acinzentada.

Baseado nos dados obtidos nas avaliações dos frutos foi proposto um modelo de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (Figura 10).

A partir desse modelo, é possível identificar ou alocar eventos morfológicos e fisiológicos, dentro do desenvolvimento, para que cada vez mais se possa entender e compreender os processos e mecanismos que regem o desenvolvimento com o intuito de melhorar a preservação e a qualidade de sementes e frutos de cafeeiro.

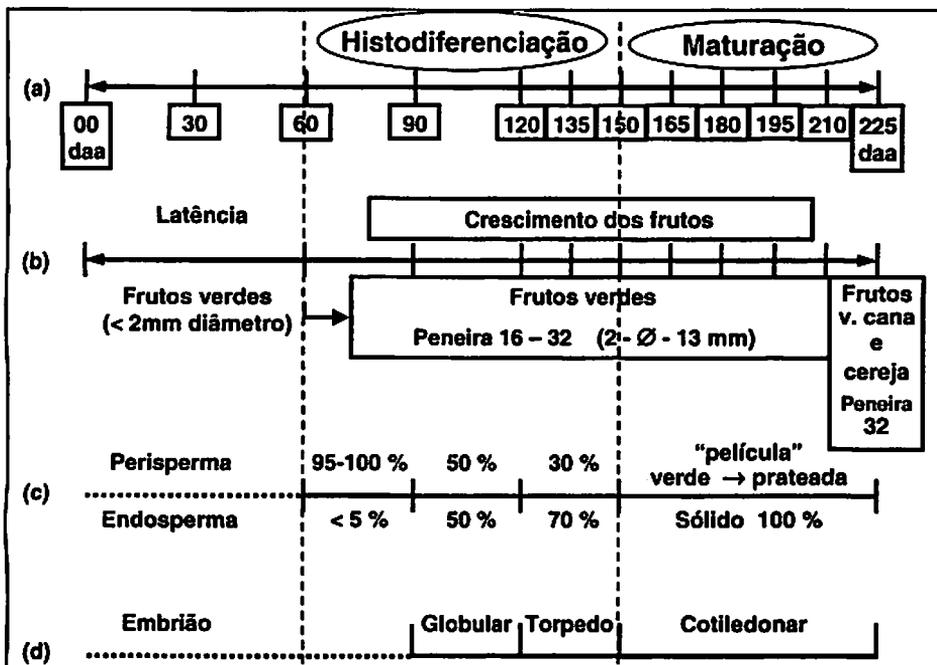


FIGURA 10 - Modelo descritivo do desenvolvimento de sementes de café (*Coffea arabica* Cv. Acaíá Cerrado 1747).

- (a) Identificação das fases do desenvolvimento.
- (b) Desenvolvimento em função do tamanho e coloração dos frutos.
- (c) Diferenciação e organogênese do perisperma e endosperma (% de acúmulo e coloração).
- (d) Diferenciação e organogênese do embrião (formato).

