



STEFÂNIA VILAS BOAS COELHO

CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DO GÊNERO *Coffea*:
MELHORIA DE PROTOCOLO PARA *Coffea arabica* L. E
ESTUDOS PRELIMINARES PARA *Coffea canephora* Pierre

**LAVRAS - MG
2018**

STEFÂNIA VILAS BOAS COELHO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DO GÊNERO *Coffea*: MELHORIA DE
PROTOCOLO PARA *Coffea arabica* L. E ESTUDOS PRELIMINARES PARA *Coffea
canephora* Pierre**

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

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

Dr. Luciano Coutinho Silva
Coorientador

**LAVRAS – MG
2018**

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

Coelho, Stefânia Vilas Boas.

Criopreservação de sementes do gênero *Coffea* : Melhoria de protocolo para *Coffea arabica* L. e estudos preliminares para *Coffea canephora* Pierre / Stefânia Vilas Boas Coelho. - 2018.

84 p. : il.

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

Coorientador(a): Luciano Coutinho Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Resfriamento lento e rápido. 2. Secagem em sílica gel. 3. Enzimas antioxidantes. I. Rosa, Sttela Dellyzete Veiga Franco da. II. Silva, Luciano Coutinho. III. Título.

STEFÂNIA VILAS BOAS COELHO

CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DO GÊNERO *Coffea*: MELHORIA DE PROTOCOLO PARA *Coffea arabica* L. E ESTUDOS PRELIMINARES PARA *Coffea canephora* Pierre

CRYOPRESERVATION OF SEEDS OF THE *Coffea* GENUS: IMPROVEMENT OF THE PROTOCOL FOR *Coffea arabica* L. AND PRELIMINARY STUDIES FOR *Coffea canephora* Pierre

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

APROVADA em 21 de fevereiro de 2018.

Dr. Renato Mendes Guimarães	UFLA
Dr. João Almir Oliveira	UFLA
Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho	EMBRAPA
Dra. Elisa Serra Negra Vieira	EMBRAPA

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

Dr. Luciano Coutinho Silva
Coorientador

**LAVRAS – MG
2018**

A Deus.
A minha amada filha Luisa.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser minha força e proteção, e por estar sempre à frente das minhas conquistas.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora e amiga, Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, pelos ensinamentos profissionais e pessoais, pelos conselhos, por estar sempre disposta em ajudar, além de nos motivar a correr atrás dos nossos sonhos. Sou imensamente grata a você.

Ao meu coorientador, professor Dr. Luciano Coutinho Silvo, pelos ensinamentos transmitidos e apoio na condução dos trabalhos.

Aos professores e pesquisadores do Setor de Sementes, Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho, Dr. João Almir Oliveira, Dr. Renato Mendes Guimarães. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho e Dr. Antônio Rodrigues Vieira (*In Memoriam*), pela boa vontade em ensinar e colaboração diária.

À Marli, secretária da pós-graduação da Fitotecnia, pela atenção e colaboração.

Aos bolsistas de iniciação científica Júlia, André, Ricardo, Lucas, Amanda e Gabriel, pela presença constante e ajuda fundamental durante a realização do trabalho.

Aos orientados da pesquisadora Sttela pela amizade e colaboração na condução dos trabalhos.

Aos colegas do Setor de Sementes pela amizade e companheirismo.

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

Aos funcionários do Setor de sementes, pela amizade conquistada durante os anos.

Ao Núcleo de estudos em sementes – NESem, por acrescentar na minha formação acadêmica e pessoal.

Aos meus pais, Silvio e Magali, pelo dom da vida e amor incondicional.

À minha filha Luisa, que chegou trazendo luz para minha vida e me ensinando o que é o amor. Ao meu noivo André, por ser meu porto seguro, companheiro, incentivador e amor da minha vida! Amo imensamente vocês.

Às minhas tias queridas, Ana e Vania, pelo apoio.

Às minhas tias emprestadas, Rosalina, Rosa, Nita, Luzia e Tê, e a minha sogra Nazaré, por cuidar da minha filha para que eu pudesse terminar meus estudos.

Às minhas amigas sementeiras, Tatiana, Cristiane, Bárbara, Raquel, Ariadne, Noêmia, Joana e Bel que fizeram dessa caminhada mais alegre e divertida, além da convivência diária e conhecimentos trocados. Agradeço a Deus por ter colocado vocês na minha vida!

Aos amigos (as) Isabela, Bela, Ana Paula, Margareth, Vanessa, Dennis, Diego pela imensa amizade e carinho.

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

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

Muito obrigada!

RESUMO

Devido à importância econômica e social do café para o Brasil e internacionalmente, a conservação do seu recurso genético torna-se muito importante. Entretanto, devido a sensibilidade ao armazenamento convencional das sementes de *Coffea* spp., alternativas biotecnológicas tal como a criopreservação tem sido requerida. O objetivo neste trabalho foi investigar a técnica mais adequada para a criopreservação de sementes de *Coffea canephora* Pierre, bem como aprimorar protocolos existentes para sementes da espécie *Coffea arabica* L. Alterações fisiológicas e bioquímicas foram utilizadas para o entendimento dos efeitos decorrentes das diferentes etapas da criopreservação nas sementes de café. Neste contexto, três estudos foram realizados. No primeiro trabalho, foi avaliado qual a melhor velocidade de secagem, bem como o teor de água ideal para posterior criopreservação de sementes de *C. canephora*. No segundo estudo, foi avaliada a criopreservação de sementes de *C. canephora* por resfriamento lento, onde foram testadas diferentes velocidades e temperaturas de pré-resfriamento antes da imersão em nitrogênio líquido, e o melhor protocolo para o resfriamento lento foi comparado ao resfriamento rápido. E, num terceiro estudo, avaliou-se a sensibilidade à criopreservação de sementes de cultivares comerciais de *C. arabica* por imersão direta em nitrogênio líquido após secagem rápida e lenta. Para sementes de *C. canephora*, a umidade de 0,25 g.g⁻¹ proporciona maior sobrevivência após criopreservação, sendo que a velocidade de secagem afeta a qualidade fisiológica das sementes criopreservadas, sendo a rápida em sílica gel mais favorável que a lenta em solução salina saturada de NaCl. A atividade das enzimas catalase, esterase, glutamato oxalacetato transaminase e polifenol oxidase são indicadoras da qualidade de sementes de *C. canephora* submetidas à criopreservação. As sementes de *C. canephora* respondem melhor à criopreservação por resfriamento rápido, ou seja, imersão direta em nitrogênio líquido, quando comparado ao resfriamento lento. A secagem das sementes de *C. canephora* até o teor de água de 0,25 g.g⁻¹ não prejudica a viabilidade das sementes. Sementes de *C. arabica* apresentam melhor qualidade fisiológica após secagem lenta, mas a secagem rápida é mais indicada para a criopreservação das sementes desta espécie. As sementes das cultivares investigadas podem ser criopreservadas, sendo a Catuaí Amarelo a mais tolerante e a Arara a mais sensível à criopreservação, independentemente da velocidade de secagem.

Palavras-chave: Resfriamento lento. Resfriamento rápido. Secagem em sílica gel. Enzimas antioxidantes. Qualidade fisiológica.

ABSTRACT

Due to the economic and social importance of coffee for Brazil and internationally, the preservation of its genetic resource becomes very important. However, due to the sensitivity to conventional storage of *Coffea* spp. seeds, biotechnological alternatives such as cryopreservation have been required. The aim of this work was to investigate the best technique for cryopreservation of *Coffea canephora* Pierre seeds, as well as to improve existing protocols for *Coffea arabica* L. seeds. Physiological and biochemical changes were used to understand the effects of coffee seeds stages of cryopreservation. In this context, three studies were carried out. In the first work, it was evaluated the best drying rate as well as the ideal water content for subsequent cryopreservation of *C. canephora* seeds. In the second study, slow cooling cryopreservation was evaluated, where different pre-cooling speeds and temperatures were tested before immersion in liquid nitrogen, and the best protocol for slow cooling was compared to fast cooling. And, in a third study, sensitivity to cryopreservation of seeds of commercial cultivars of *C. arabica* by direct immersion in liquid nitrogen after rapid and slow drying was evaluated. For seeds of *C. canephora*, the humidity of 0.25 g.g⁻¹ gives higher survival after cryopreservation, and the drying rate affects the physiological quality of the cryopreserved seeds, with the fast silica gel being more favorable than slow. The activity of the enzymes catalase, esterase, glutamate oxaloacetate transaminase and polyphenol oxidase are indicators of the quality of *C. canephora* seeds submitted to cryopreservation. The seeds of *C. canephora* respond better to cryopreservation by rapid cooling, that is, direct immersion in liquid nitrogen when compared to slow cooling. Drying the seeds of *C. canephora* to the water content of 0.25 g.g⁻¹ does not affect the viability of the seeds. Seeds of *C. arabica* show better physiological quality after slow drying, but fast drying is more suitable for cryopreservation of the seeds of this species. The seeds of the cultivars investigated may be cryopreserved, with Catuaí Amarelo being more tolerant and the Arara being more sensitive to cryopreservation, regardless of the drying rate.

Keywords: Slow cooling. Fast cooling. Drying in silica gel. Antioxidant enzymes. Physiological quality

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Curva de secagem das sementes de *Coffea canephora* Pierre submetidas à secagem rápida, em sílica gel e lenta, em solução salina saturada de NaCl, até os teores de água de 0.20, 0.25 e 0.28 g.g⁻¹. 35
- Figura 2.2 - Porcentagem média de Germinação (A), de plântulas normais fortes (B), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (C), peso médio de matéria seca de raiz (D) e de hipocótilo (E) e viabilidade de embriões pelo teste de tetrazólio (F), de sementes de *Coffea canephora* Pierre criopreservadas após secagem rápida em sílica gel e lenta em solução salina saturada de NaCl até os teores de água de 0.20, 0.25 e 0.28 g.g⁻¹. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam as velocidades de secagem dentro do mesmo teor de água. Letras minúsculas comparam os teores de água dentro da mesma velocidade de secagem. 38
- Figura 2.3 - Perfil eletroforético e quantificação densitométrica para as enzimas catalase (A) e superóxido dismutase (B), em sementes de *Coffea canephora* Pierre criopreservadas após secagem rápida (R) e lenta (L), até os teores de água de 0.20, 0.25 e 0.28 g.g⁻¹ 41
- Figura 2.4 - Perfil eletroforético e quantificação densitométrica para as enzimas esterase (C) e malato desidrogenase (D) em sementes de *Coffea canephora* Pierre criopreservadas após secagem rápida (R) e lenta (L), até os teores de água de 0.20, 0.25 e 0.28 g.g⁻¹ 43
- Figura 2.5 - Perfil eletroforético e quantificação densitométrica para as enzimas glutamato oxaloacetato transaminase (E) e polifenol oxidase (F) em sementes de *Coffea canephora* Pierre criopreservadas após secagem rápida (R) e lenta (L), até os teores de água de 0.20, 0.25 e 0.28 g.g⁻¹ 44
- Figura 3.1 - Influência da velocidade e temperatura final de pré-resfriamento nos resultados médios de germinação (A), protrusão radicular (B), plântulas com folhas cotiledonares expandidas (C), matéria seca de raiz (D) e de hipocótilo (E) e embriões viáveis no teste de tetrazólio (F), em sementes de *Coffea canephora* Pierre, após criopreservação por resfriamento lento. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam as velocidades de resfriamento dentro da mesma temperatura de pré-resfriamento. Letras maiúsculas comparam as temperaturas de pré-resfriamento dentro da mesma velocidade de resfriamento. 55
- Figura 3.2 - Dados médios de germinação (A), protrusão radicular (B), plântulas com folhas cotiledonares expandidas (C), matéria seca de raiz (D) e de hipocótilo (E), e embriões viáveis pelo teste de tetrazólio (F), de sementes de *Coffea canephora* Pierre úmidas, com 0.72 g.g⁻¹ e secas com 0.25 g.g⁻¹ (base seca), e submetidas aos protocolos de criopreservação por resfriamento rápido e lento. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 59
- Figura 3.3 - Perfil eletroforético de isoenzimas da catalase (A), superóxido dismutase (B), peroxidase (C), esterase (D) e malato desidrogenase (E) em sementes de *Coffea canephora* Pierre submetidos a diferentes protocolos de criopreservação. Os tratamentos estão descritos na Tabela 1. 62

Figure 4.1 - Mean percentage of normal seedlings (A) and of seedlings with expanded cotyledonary leaves (B), mean weight of shoot dry matter (C) and root dry matter (D) in the germination test, and embryo viability in the tetrazolium test (E) of seeds from four cultivars of <i>Coffea arabica</i> after drying in silica gel and in saturated saline solution. Uppercase letters compare the type of drying within the same cultivar; lowercase letters compare the cultivars within the same type of drying.	74
Figure 4.2 - Levels of catalase (A), esterase (B) and peroxidase (C) in seeds of four commercial cultivars of <i>Coffea arabica</i> before and after drying determined by electrophoresis. Lanes labeled 1 = control (moist seeds, without drying); lanes labeled 2 = seeds dried quickly over silica gel; lanes labeled 3 = seeds dried slowly over saturated NaCl solution.....	75
Figure 4.3 - Mean percentage of normal seedlings (A) and of seedlings with expanded cotyledonary leaves (B), mean weight of shoot dry matter (C) and root dry matter (D) in the germination test, and embryo viability in the tetrazolium test (E) of seeds from four commercial cultivars of <i>Coffea arabica</i> after cryopreservation. Uppercase letters compare the type of drying within the same cultivar; lowercase letters compare the cultivars within the same type of drying.....	76
Figure 4.4 - Levels of catalase (A), esterase (B) and peroxidase (C) in seeds of four commercial cultivars of <i>Coffea arabica</i> after cryopreservation determined by electrophoresis. Lanes labeled 1 = control (moist seeds, without drying); lanes labeled 2 = seeds dried quickly over silica gel and immersed in liquid nitrogen; lanes labeled 3 = seeds dried slowly over saturated NaCl solution and immersed in liquid nitrogen.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Valores médios de germinação, plântulas normais fortes, plântulas com folhas cotiledonares expandidas, matéria seca de raiz, matéria seca de hipocótilo e embriões viáveis, de sementes de <i>Coffea canephora</i> Pierre não criopreservadas, submetidas à dois métodos de secagem, rápido em sílica gel e lento, em solução salina saturada de NaCl	36
Tabela 3.1 - Identificação dos tratamentos e descrição dos procedimentos utilizados para a criopreservação de sementes de <i>Coffea canephora</i> Pierre.	53

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	14
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	A importância socioeconômica do gênero <i>Coffea</i>	16
2.2	Conservação de sementes de <i>Coffea</i> spp.....	17
2.3	Armazenamento à longo prazo: criopreservação.....	18
2.3.1	Nucleação da água e formação de cristais de gelo.....	19
2.3.2	Importância da secagem das sementes	20
2.3.3	Técnicas de criopreservação.....	21
2.3.3.1	Criopreservação clássica.....	22
2.3.3.2	Criopreservação moderna	23
2.4	Análises pós descongelamento.....	24
	CAPÍTULO 2 CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Coffea Canephora</i> PIERRE: IMPORTÂNCIA DA VELOCIDADE DE SECAGEM E TEOR DE ÁGUA	30
1	INTRODUÇÃO	31
2	MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1	Colheita e processamento dos frutos	32
2.2	Secagem e criopreservação das sementes.....	33
2.3	Avaliações fisiológicas	34
2.4	Avaliações bioquímicas	34
2.5	Delineamento experimental e análises estatísticas	35
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1	Análises fisiológicas de sementes criopreservadas	38
3.2	Análises enzimáticas das sementes criopreservadas	41
4	CONCLUSÕES	45
	REFERÊNCIAS	47
	CAPÍTULO 3 TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO EM SEMENTES DE <i>Coffea Canephora</i> PIERRE: RESFRIAMENTO LENTO E RÁPIDO	67
1	INTRODUÇÃO	50
2	MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1	Material biológico e processamento dos frutos.....	51
2.2	Secagem das sementes	51
2.3	Primeiro experimento - Procedimento de resfriamento lento.....	52
2.4	Segundo experimento - Procedimento de resfriamento rápido.....	52
2.5	Análises fisiológicas	53
2.6	Análises bioquímicas	54
2.7	Delineamento experimental e análises estatísticas	54
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1	Primeiro experimento - Método clássico de criopreservação (Resfriamento lento)	55
3.2	Segundo experimento - Comparação entre métodos de criopreservação por resfriamento lento e rápido	58
3.3	Avaliações bioquímicas	61
4	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65

	CAPÍTULO 4 CRYOPRESERVATION OF COFFEE SEEDS: A SIMPLIFIED METHOD	69
1	INTRODUCTION	70
2	MATERIALS AND METHODS.....	71
3	RESULTS.....	73
3.1	Results of evaluation after drying of seeds.....	73
3.2	Results of evaluation after cryopreservation of seeds.....	76
4	DISCUSSION.....	78
	REFERENCES	82

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O café é um importante produto da balança comercial brasileira, sendo o Brasil o maior produtor e exportador mundial desta *commodity*. Em 2017 o país produziu 44,77 milhões de sacas beneficiadas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2017), sendo Minas Gerais o principal estado produtor, com 54% da produção nacional (CONAB, 2018). Entre as centenas de espécies de café conhecidas, apenas duas são cultivadas e de interesse comercial, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre.

A importância do café vai além do aspecto econômico devido a sua relevância como componente social, cultural e alimentício. A expressiva geração de mão-de-obra torna a cafeicultura fonte de emprego para um grande contingente populacional. A rica composição nutricional associada ao baixo custo do produto contribui para torná-lo acessível a toda população (ABIC, 2017). A tradicionalidade na alimentação brasileira bem como a participação na história política do Brasil evidenciam a importância do café na cultura brasileira.

A baixa longevidade das sementes de café é um fator limitante para a manutenção do germoplasma à longo prazo, colocando em risco a variabilidade genética existente. Por ser considerada de comportamento intermediário e recalcitrante (ROBERTS, 1973), as sementes do gênero *Coffea* não podem ser armazenadas em bancos de sementes convencionais, a -18°C devido a sensibilidade à dessecação e ao resfriamento (PAMMENTER; BERJAK, 2014).

Tradicionalmente, as sementes de *Coffea* spp. vêm sendo conservadas *ex situ*, como plantas vivas mantidas em coleções de germoplasma no campo (EIRA; REIS; RIBEIRO, 2005). Entretanto, esta metodologia requer grandes extensões de terra e envolvem altos custos de manutenção, além do fato de que as plantas conservadas no campo estão vulneráveis ao ataque de pragas e doenças e a desastres climáticos, os quais podem subitamente dizimar toda a coleção (DUSSERT et al., 2012).

Para garantir o armazenamento seguro de recursos genéticos do café, pesquisas têm sido desenvolvidas visando o aprimoramento de técnicas de armazenamento de sementes intermediárias e recalcitrantes em temperaturas ultra-baixas, como por exemplo, em nitrogênio líquido a -196°C (BENSON, 2008; ENGELMANN, 2004). Nesta temperatura, a divisão celular e as atividades bioquímicas e metabólicas são reduzidas drasticamente e as

sementes podem ser armazenadas por longos períodos de tempo sem perda de qualidade (BENSON, 2008).

Na criopreservação, o teor de água é um fator crucial para o sucesso do armazenamento no nitrogênio líquido, pois a água, ao congelar-se, expande e forma cristais de gelo pontiagudos que perfuram as células causando morte celular (BERJAK; VARGHESE; PAMMENTER, 2011). Entretanto, a secagem, obrigatória para a retirada da água congelável, causa um estresse nas sementes sensíveis à dessecação, causando danos ao metabolismo celular devido à produção acentuada de radicais livres (BERJAK; PAMMENTER, 2013).

O método de criopreservação clássico, um dos mais utilizadas para sementes, hoje é realizado a partir do resfriamento controlado da amostra, enquanto o método moderno consiste na imersão direta no nitrogênio líquido (BENSON, 2008; ENGELMANN, 2011), ambos após a desidratação parcial das sementes. Entretanto, danos celulares relacionados às etapas de secagem e resfriamento podem ocorrer em ambos métodos (WALTERS et al., 2008; PAMMENTER; BERJAK, 2014).

A formação de radicais livres, consequência das alterações mecânicas, fisiológicas e bioquímicas ocorridas durante as etapas de criopreservação, são os principais causadores de danos ao sistema de membranas e às macromoléculas das células (BAUST; GAO; BAUST, 2009; ENGELMANN, 2011). Os sistemas de defesa enzimáticos, compostos por enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase, peroxidases, dentre outras, podem inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres (BERJAK, 2006).

Estudos vêm sendo conduzidos para criopreservação de sementes de café (EIRA; REIS; RIBEIRO, 2005; DUSSERT et al., 1997, 1998, 1999, 2001, 2003, 2012; DUSSERT; ENGELMANN, 2006; COELHO; ROSA; FERNANDES, 2017; FIGUEIREDO et al., 2017). Entretanto, ainda não há uma metodologia segura e eficaz para a conservação do gênero *Coffea*. Sendo assim, considerando-se a exigência estratégica da viabilização da conservação à longo prazo de recursos genéticos dos cafeeiros, o objetivo neste trabalho foi investigar a técnica mais adequada para a criopreservação de sementes de *Coffea canephora* Pierre, bem como aprimorar protocolos existentes para sementes da espécie *Coffea arabica* L.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A importância socioeconômica do gênero *Coffea*

Originária do continente africano, o café é pertencente à família Rubiaceae, gênero *Coffea*, com mais de 100 espécies descritas (DAVIS et al., 2006). Embora a diversidade seja bastante significativa, apenas *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre são cultivadas comercialmente, representando praticamente a totalidade do café produzido no mundo (CARVALHO, 2008). As demais espécies do gênero não possuem valor comercial, entretanto, devido a variabilidade genética são utilizadas em programas de melhoramento genético (VAN DER VOSSSEN; BERTRAND; CHARRIER, 2015).

O café é largamente cultivado em países tropicais, tanto para consumo próprio como para exportação para países de clima temperado. O Brasil é o maior produtor mundial dessa *commodity*, seguido pelo Vietnã e a Colômbia, e maior exportador (NETO, 2018). Em 2017, o Brasil produziu aproximadamente 45 milhões de sacas de 60 quilos, sendo o *C. arabica* correspondendo a 81% desse total e 19% de *C. canephora* (CONAB, 2018). A maioria da produção nacional de café encontra-se distribuída nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Rondônia e Paraná (CONAB, 2018).

A espécie *C. arabica* é um alotetraplóide com $2n=4x=44$ cromossomos e autógama, com cerca de 10% de polinização cruzada (CARVALHO; MÔNACO, 1964). Devido as cultivares conhecidas atualmente serem derivadas de duas formas botânicas, *typica* e *bourbon* (ANTHONY et al., 2001), sua base genética é estreita. As sementes são maiores que as de *C. canephora* e de verde mais escuro, além de possuírem um menor teor de cafeína (CARVALHO, 2008).

A espécie *C. canephora*, por sua vez, é diploide ($2n=2x=22$ cromossomos) e alógama, apresentando incompatibilidade do tipo gametofítica (CONAGIN; MENDES, 1961), e diversidade genética mais ampla. As sementes são menores que as do *Coffea arabica* L., de cor verde-clara, película prateada aderente, endosperma rico em cafeína e menos aromático, com grande quantidade de sólidos solúveis, apresentando por isso bebida mais amarga e encorpada (CARVALHO, 2008).

Atualmente no Brasil, a espécie *C. canephora* é cultivada principalmente nos estados do Espírito Santo e Rondônia. Um dos principais interesses comerciais na espécie se deve ao elevado teor de sólidos solúveis, interessante para a indústria de café solúvel, além do

consumo como café torrado e moído (RIBEIRO et al., 2014). A cafeína presente, também é matéria-prima nas indústrias farmacêuticas e alimentícias (RIBEIRO et al., 2014).

Visto que a cafeicultura tem grande participação nos setores econômicos e sociais, em nível nacional e mundial, torna-se fundamental preservar a diversidade genética deste gênero. Entretanto, a implantação de bancos de sementes convencionais é improvável para a espécies *C. arabica* e *C. canephora*, que apresenta sementes do tipo intermediárias e recalcitrantes. Apesar de intensos programas de pesquisa em sementes de café nos últimos anos, a definição das melhores metodologias de armazenamento seguro dessas espécies ainda não foi elucidada.

2.2 CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE *COFFEA* SPP.

Desde os anos 1800, a cafeicultura ocupa uma posição de destaque na balança comercial brasileira, sendo uma das principais *commodities* de exportação do país (CONAB, 2018). O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, e responde por 31% da produção global. O faturamento bruto com a cultura no país chegou a 22 bilhões de reais no ano de 2016 (CECAFÉ, 2017).

A sustentabilidade da cafeicultura depende principalmente da disponibilidade de variabilidade genética. Para o desenvolvimento e lançamento de novas cultivares, é necessário a existência de bancos de germoplasma, que são considerados a fonte principal para qualquer programa de melhoramento genético (NASS et al., 2008). A diversidade genética é essencial para os programas de melhoramento buscarem genótipos mais adaptados, resistente à pragas e doenças, tolerante a estresses ambientais, além de aumentar a produtividade (DULLOO et al., 2009).

As sementes constituem a forma mais comum de conservação *ex situ* das espécies cultivadas. Entretanto, a baixa longevidade das sementes de café é um fator limitante para a conservação de sua variabilidade à longo prazo (DUSSERT et al., 2012).

As sementes da maioria das espécies cultivadas podem ser armazenados por longos períodos de tempo sob baixa umidade relativa e temperatura. Entretanto, o armazenamento de algumas espécies não é viável nessas condições. Sementes do gênero *Coffea* são intermediárias ou recalcitrantes, ou seja, não toleram dessecação abaixo de um nível de água (10%-12% ou 20% base úmida - bu, respectivamente, (HONG; ELLIS, 1992) e armazenamento em temperaturas subzero sem perder a viabilidade (PAMMENTER; BERJAK, 2014).

Tradicionalmente, as sementes do gênero *Coffea* vêm sendo conservadas *ex situ*, como plantas vivas mantidas em coleções de germoplasma no campo. Entretanto, esta metodologia requer grandes extensões de terra e envolvem altos custos de manutenção, além do fato de que as plantas conservadas no campo estão vulneráveis ao ataque de pragas e doenças e a desastres climáticos, os quais podem subitamente dizimar toda a coleção (EIRA; REIS; RIBEIRO, 2005; DUSSERT et al., 2012).

Uma das maneiras de se conservar o germoplasma vegetal é em bancos de sementes a temperatura em torno de -18°C , viável para as espécies consideradas ortodoxas (WALTERS, 2015). Porém, espécies recalcitrantes são sensíveis à dessecação e ao armazenamento em temperaturas negativas, sendo necessário métodos alternativos para a conservação à longo prazo (BARBEDO; CENTENO; RIBEIRO, 2013).

Uma alternativa para o armazenamento seguro de recursos genéticos do cafeeiro por período prolongado é criopreservação a -196°C (DUSSERT; ENGELMANN, 2006), porém a técnica necessita ainda de ajustes. Até o momento, existem muitos questionamentos a respeito do comportamento de sementes de café em relação à tolerância à dessecação e ao resfriamento em nitrogênio líquido e estes devem ainda, ser investigados.

2.3 ARMAZENAMENTO À LONGO PRAZO: CRIOPRESERVAÇÃO

A opção mais eficaz para armazenar à longo prazo o germoplasma de espécies consideradas recalcitrantes e intermediárias, é a criopreservação, ou seja, a conservação do material biológico em nitrogênio líquido, a -196°C , ou em sua fase a vapor, a -150°C (SAKAI; ENGELMANN, 2007; ENGELMANN, 2004). Nestas temperaturas, todas as divisões celulares e processos metabólicos são reduzidos drasticamente, o que garante a manutenção das características fisiológicas e genéticas das espécies por tempo indeterminado (ENGELMANN, 2011).

Diferentes tipos de células vegetais, tecidos e órgãos podem ser criopreservados, incluindo suspensões celulares, pólen, culturas embriogênicas, embriões somáticos e zigóticos, meristemas e sementes (ENGELMANN, 2011; KAVIANI, 2011). As vantagens da técnica são estabilidade, segurança, necessidade de pouco espaço e manutenção, baixo custo, além da possibilidade de armazenamento por longos períodos de tempo (DULLOO et al., 2009; CHEN et al., 2011).

A criopreservação varia entre o material biológico a ser utilizado, a espécie e ainda dentro de cultivares de uma mesma espécie (PANIS; SWENNEN; ENGELMAN, 2001;

SANT et al., 2008). A necessidade do ajuste da técnica para cada material é primordial para alcançar o sucesso, além da habilidade do tecido em sobreviver à desidratação e exposição a ultra baixa temperatura (BERJAK; PAMMENTER, 2007).

No caso do café as sementes tem sido a principal escolha como explante para a criopreservação (DUSSERT, et al., 2002). Entretanto, dentro do gênero *Coffea* são encontrados espécies com vários graus de tolerância a dessecação e que devido a rápida perda da viabilidade fisiológica das sementes, torna-se necessário que o lote utilizado possua alta qualidade inicial (DUSSERT et al., 1997; DUSSERT; ENGELMANN, 2006).

Os principais fatores que influenciam a criopreservação são a secagem, o congelamento, o descongelamento e a germinação das sementes, sendo que os três primeiros processos estão relacionados à formação de cristais de gelo intracelular (SANTOS, 2000).

2.3.1 NUCLEAÇÃO DA ÁGUA E FORMAÇÃO DE CRISTAIS DE GELO

O maior desafio na técnica de criopreservação consiste em evitar a formação de cristais de gelo intracelular, que podem causar a destruição das membranas celulares (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005). Isso porque a água, ao congelar, forma estruturas irregulares e pontiagudas que, dependendo da extensão, perfuram a membrana e a parede celular, causando a morte das células (WESLEY-SMITH et al., 2015).

O ideal é induzir vitrificação durante a criopreservação. No estado vítreo, a viscosidade é extremamente elevada, efetivamente uma natureza sólida, de modo que a mobilidade molecular é extremamente baixa (ENGELMANN, 2004). O estado vitrificado impedirá o crescimento de cristais de gelo em tamanhos suficientemente grande para causar danos mecânicos às células (WESLEY-SMITH et al., 2014). A baixa capacidade molecular da matriz vítrea também irá impor uma estase na geração de radicais livres (BERJAK; PAMMENTER, 2007).

À medida que a água pura é resfriada, a mobilidade das moléculas de água individuais é reduzida, diminuindo a probabilidade de um cristal de gelo crescer. Este fenômeno é conhecido como nucleação homogênea, que em água pura ocorrerá a - 40 °C. Irregularidades na água (conforme previsto por superfícies intracelulares) fornecem sítios de nucleação em que os cristais de gelo podem se formar e crescer: este é o processo de nucleação heterogênea e ocorrerá em temperaturas superiores a -40 °C (MAZUR, 2004). É provável que a formação de cristais de gelo em tecidos biológicos é através de nucleação

heterogênea e o congelamento de células hidratadas será iniciado por volta de $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (MAZUR, 2004; WESLEY-SMITH et al., 2014)).

Embora a nucleação homogênea ocorra a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, em temperaturas inferiores a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, a mobilidade molecular é ainda mais reduzida, e o cristal de gelo não se forma (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008). Assim, na faixa de temperatura entre 0 a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, é onde a formação e o crescimento de cristais de gelo são possíveis. Quanto mais tempo o tecido reside nesta faixa de temperatura, mais provável é o dano do cristal de gelo. É devido esta razão que na maioria dos protocolos de criopreservação para os tecidos multicelulares complexos, como as sementes, o resfriamento é muito rápido, na faixa de $-200^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ (BERJAK; PAMMENTER, 2007).

Da mesma forma, no mesmo intervalo de temperatura de 0 a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante o reaquecimento, o estado vitrificado da água pode se converter ao estado cristalino, gerando danos físicos associados aos cristais de gelo (BERJAK; PAMMENTER, 2007). Tal como acontece com o resfriamento, quanto mais o tecido estiver exposto durante o processo de aquecimento, maior a probabilidade de formação de cristais de gelo, e o reaquecimento rápido é tão importante quanto o resfriamento rápido (BERJAK; PAMMENTER, 2007; WESLEY-SMITH et al., 2014).

Em estruturas complexas, como as sementes, a secagem é um dos processos mais importantes e críticos na criopreservação. A água presente nas células durante o resfriamento precisa estar ajustada, com o mínimo de água congelável possível. Além disso, a velocidade com que a água é retirada, influencia na qualidade final das sementes, uma vez que as espécies recalcitrantes são sensíveis à dessecação.

2.3.2 IMPORTÂNCIA DA SECAGEM DAS SEMENTES

Na criopreservação de sementes, o conteúdo de água é um aspecto fundamental para o sucesso do armazenamento em nitrogênio líquido. Para se evitar danos celulares, a água contida no seu interior deve ser retirada, evitando assim a formação de cristais de gelo durante o congelamento e o descongelamento (WESLEY-SMITH et al., 2014). Entretanto, a dessecação dos tecidos é crítica, pois a água tem muitas funções biológicas nas células (MARCOS FILHO, 2015).

A secagem promove a redução do metabolismo celular, o que visa aumentar a longevidade das sementes no armazenamento. Entretanto, existem espécies intolerantes à dessecação, sendo necessário, por isso, o desenvolvimento de tecnologias específicas para a

conservação do germoplasma vegetal à longo prazo (KOHOMA et al., 2006). A tolerância à dessecação é adquirida no final da fase de maturação e pode variar entre as espécies e até mesmo entre sementes do mesmo lote (PAMMENTER; BERJAK, 2014). Segundo Dekkers et al. (2015), a longevidade das sementes está intimamente relacionada à sua tolerância à dessecação.

A secagem retira a água livre fracamente ligada às macromoléculas, ou seja, a água remanescente presente nas sementes (MARCOS FILHO, 2015). A velocidade de retirada da água pode intervir no tipo de dano causado, no grau de tolerância à dessecação e na viabilidade, principalmente para sementes com características de recalcitrância (ROSA et al., 2005; JOSÉ et al., 2011; COELHO et al., 2015).

Segundo Rosa et al. (2005) e Coelho et al. (2015), sementes sensíveis à dessecação, como as de café, podem sobreviver a menores teores de água quando submetidas a uma secagem mais rápida, o que evita que os danos se acumulem durante o processo. Porém, outros autores afirmam que a secagem lenta pode aumentar a tolerância à dessecação das sementes devido ao maior tempo para indução de mecanismos de proteção (SANTOS; VON PINHO; ROSA, 2013; ABREU et al., 2014). No entanto, independentemente da velocidade de secagem, existe um limite a partir do qual as sementes de *Coffea* spp. perdem a viabilidade (DUSSERT; ENGELMANN, 2006).

A criopreservação de sementes é feita basicamente por desidratação do tecido e posterior resfriamento (PANIS; LAMBARDI, 2005). Entretanto, esse procedimento não pode ser utilizado indiscriminadamente em *Coffea* spp. Dussert e Engelmann (2006) demonstraram que a faixa de umidade em que uma semente de *Coffea arabica*, variedade Caturra poderia ser criopreservada e apresentar alta viabilidade (> 80%) após o descongelamento é muito estreita, e deve ser investigada com cautela.

Devido a interdependência entre as etapas do processo de criopreservação, a desidratação parcial da amostra antes de resfriá-la pode significar diminuição dos danos nas etapas posteriores à secagem. Entretanto, a velocidade de resfriamento, etapa seguinte à secagem, também é importante para garantir a sobrevivência das sementes antes de conservá-las em nitrogênio líquido.

2.3.3 TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO

Dentre os métodos de criopreservação existentes atualmente, dois principais são utilizados para sementes. Os métodos de criopreservação baseados no resfriamento lento,

também chamado de método clássico, e o resfriamento rápido por meio da vitrificação (moderno) são hoje os mais validados no meio vegetal (SAKAI; ENGELMANN, 2007; ENGELMANN, 2011). Segundo Berjak e Pammenter (2013), para espécies recalcitrantes tropicais/subtropicais, melhores resultados são observados quando se utiliza a criopreservação clássica.

Um resfriamento relativamente lento na criopreservação favorece a migração de água para os espaços extracelulares, diminuindo essencialmente a concentração de água dentro das células, em um processo descrito como dessecação induzida pelo congelamento (MAZUR, 2004). Em contraste, o resfriamento rápido favorece o super-resfriamento da água intracelular e eventual vitrificação (WALTERS et al., 2008; WESLEY-SMITH et al., 2015). A formação de gelo intracelular irá ocorrer na taxas de resfriamento intermediária (WESLEY-SMITH et al., 2014). A velocidade de resfriamento ideal varia bastante entre os tipos de células, dependendo de características fisiológicas, como a permeabilidade da membrana à água, constituintes celulares e tolerância a estresse hídrico (WESLEY-SMITH et al., 2014).

2.3.3.1 CRIOPRESERVAÇÃO CLÁSSICA

A técnica de criopreservação clássica, ou por resfriamento lento, consiste na redução lenta da temperatura de resfriamento a uma velocidade definida, até uma temperatura de pré-resfriamento, seguido pela imersão das sementes em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2011).

Ao diminuir a temperatura a uma velocidade relativamente baixa, pequenos cristais de gelo são formados na solução extracelular, enquanto a água intracelular ficará super-resfriada. Este super-resfriamento pode levar a um efluxo de água celular devido a um maior diferença no potencial hídrico causada pela formação de gelo extracelular (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008). A medida que a água é perdida das células, o conteúdo intracelular se tornam mais concentrados e o ponto de resfriamento diminui (PAMMENTER; BERJAK, 2014). Conseqüentemente, as células ficam cada vez mais desidratadas e concentradas com a diminuição da temperatura, evitando-se assim a formação dos cristais de gelo intracelular. Deste modo, se a taxa de resfriamento for suficientemente lenta, a perda de água (exosmose) promoverá a desidratação celular e o soluto intracelular concentrado permanecerá descongelado (MAZUR, 2004).

A técnica de criopreservação por resfriamento lento em sementes é constituído por algumas etapas, incluindo o resfriamento do material vegetal a uma velocidade definida (0,5 –

2° C/minuto) até uma determinada temperatura de pré-resfriamento (usualmente, por volta de -40 °C), rápida imersão em nitrogênio líquido, armazenamento e reaquecimento (ENGELMANN, 2011). O material biológico geralmente é resfriado sob o controle de um freezer programável e, uma vez atingida uma adequada desidratação celular, o material é estocado em nitrogênio líquido à temperatura de -196°C (ENGELMANN, 2011).

Sendo as sementes estruturas complexas, com uma diversidade de tipos de células, apenas a desidratação acarretada pelo resfriamento lento não é suficiente para a retirada de toda a água necessária (WALTERS, 2015). Logo, a secagem antes da etapa de resfriamento lento é primordial para que as sementes alcancem o teor de água ideal para a criopreservação.

2.3.3.2 CRIOPRESERVAÇÃO MODERNA

A vitrificação tem se tornado um dos melhores caminhos para prevenir a formação de cristais de gelo em nitrogênio líquido, sem danos na membrana celular e com redução do teor de água celular congelável (PANIS; LOMBARDI, 2005). O estado vítreo é formado pela indução da água remanescente presente nas células em um estado amorfo, metaestável, não cristalino e altamente concentrado (ENGELMANN, 2011), o que lhe confere as propriedades mecânicas de um sólido embora não haja formação de uma estrutura cristalina (PAMMENTER; BERJAK, 2014).

A viscosidade alcançada com a vitrificação é tão alta que paralisa o movimento molecular e, conseqüentemente, evita que moléculas de água individuais se juntem para formar grandes cristais de gelo. Além disso, a baixa mobilidade molecular inibe as reações químicas e metabólicas, efetivamente colocando o sistema em estase, o que evita processos prejudiciais associados envelhecimento das sementes (BENSON, 2008).

A vitrificação pode ser alcançada através da redução da água congelável, intra e extracelular, seja pela exposição de tecidos vegetais a misturas crioprotetoras concentradas ou por dessecação física e subsequente resfriamento muito rápido, geralmente por imersão direta em nitrogênio líquido (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008). Todos esses processos são potencialmente prejudiciais para o tecido que é sensível à dessecação e ao resfriamento, sendo, por isso, importante considerar as taxas de secagem e resfriamento.

O estado vítreo alcançado na criopreservação é instável, principalmente durante a etapa de reaquecimento (MAZUR, 2004). A recristalização do gelo da água residual congelável no tecido ocorrerá entre -80 e -40°C se o reaquecimento for lento (BERJAK; PAMMENTER, 2014; PAMMENTER; BERJAK 2014). Uma maneira de evitar a

recristalização da água é reaquecer rapidamente as sementes, atravessando este intervalo de temperatura tão rapidamente quanto possível (BENSON, 2008; BERJAK; PAMMENTER, 2014). Segundo Berjak e Pammenter (2014), para espécies sensíveis a estresses, o reaquecimento é realizado em temperaturas entre 38 e 45°C, durante um ou dois minutos

2.4 ANÁLISES PÓS DESCONGELAMENTO

Durante as etapas da criopreservação, danos celulares podem ocorrer impedindo a sobrevivência das sementes (WEN et al., 2012), quando os materiais vegetais são resfriados com o seu conteúdo de água desajustado. Extravasamento de material citoplasmático devido a ruptura nas paredes e membrana plasmática são danos comumente observados durante a criopreservação, resultantes da formação de cristais de gelo (WEN et al., 2012).

A realização de alguns testes podem ajudar a elucidar os danos causados pelas diferentes técnicas da criopreservação. A avaliação fisiológica permite avaliar a extensão dos danos relacionados à viabilidade e vigor das sementes, e os testes de germinação e de tetrazólio são os mais utilizados em trabalhos com sementes de café (ABREU et al., 2014; CLEMENTE et al., 2011; COELHO et al., 2015).

As alterações nas atividades enzimáticas durante a deterioração das sementes também são importantes para investigar a extensão dos danos relacionados à criopreservação. Mudanças nos perfis eletroforéticos de enzimas relacionadas ao processo respiratório, à peroxidação de lipídios e à remoção de radicais livres também podem constituir ferramentas eficientes para analisar as alterações bioquímicas resultantes da deterioração (CHAUHAN; GOPINATHAN; BARU, 1985).

Na maioria dos resultados de trabalhos realizados com sementes de café criopreservadas (DUSSERT et al., 1997; 1998, 1999, 2001; 2002, 2003; 2012; DUSSERT; ENGELMANN, 2006; COELHO; ROSA; FERNANDES, 2017; FIGUEIREDO et al., 2017), observam-se baixas porcentagens de germinação e/ou formação de plântulas normais após a exposição das sementes ao nitrogênio líquido. Devido a isso, para que haja sucesso com a técnica de criopreservação, é necessário considerar e estudar os efeitos que as etapas de secagem, resfriamento e reaquecimento podem causar a estas sementes.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. A. S. et al. Behavior of coffee seeds to desiccation tolerance and storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 4, p. 399-406, 2014.
- ANTHONY, F. et al. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica**, Wageningen, v.118, p.53-65, 2001
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Produção Mundial de Café - Principais Países Produtores**. Safra 2017. Disponível em: <<http://abic.com.br/>>. Acesso em: 15 out. 2017.
- BARBEDO, C.J.; CENTENO, D. C.; RIBEIRO, R. C. L. F. Do recalcitrant seeds really exist?. **Hoehnea**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 583-593, 2013.
- BAUST, J. G.; GAO, D.; BAUST, J. M. Cryopreservation: an emerging paradigm change. **Organogenesis**, Philadelphia, v. 5, n. 3, p. 90-96, 2009.
- BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant Cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008, p. 15-32.
- BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 16, n. 1, p. 1-15, 2006
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, London, v. 101, n. 2, p. 213-228, 2007.
- BERJAK, P; VARGHESE, B; PAMMENTER, N. W. Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. **Seed Science. Research**. Wageningen, v. 21, n. 3, p. 187-203, 2011
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, p. 478, 2013.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Cryostorage of germplasm of tropical recalcitrant-seeded species: Approaches and problems. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 29-39, 2014.
- CARVALHO, C.H.S. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa café, 2008.
- CARVALHO, A., MÔNACO, L.C. Natural crosspollination in *C. arabica*. In: INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS, 16., 1964, Brussels. **Proceedings...** Brussels: ISHS, 1964.v.4, p.447-449.
- CECAFÉ – CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL. Exportações mundiais. Disponível em: <<http://www.cecafe.com.br/dados-estatisticos/exportacoes-mundiais/>>. Acesso em: 11 nov. 2017.

- CHAUHAN, K.P.S.; GOPINATHAN, M.C.; BABU, C.R. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.13, p. 629- 641, 1985
- CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grow apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 397-403, 2011.
- CLEMENTE, A. C. S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, 2011.
- COELHO, S. V. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, 2015.
- COELHO, S.V.B.; ROSA, S.D.V.F.; FERNANDES, J.S. Cryopreservation of coffee seeds: a simplified method. **Seed Science and Technology**, v. 45, n. 3, p. 638-649, 2017
- CONAGIN, C.H.T.M., MENDES, A.J.T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Auto-incompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. **Bragantia**, Campinas, SP, v.20, p.787-804, 1961
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: café, **Terceiro levantamento**, setembro 2017. Brasília: Conab, v. 4, n. 3, p. 1-106, 2018.
- DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 152, n. 4, p. 465–512, 2006.
- DEKKERS, B. J. W. et al. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. **Planta**, Berlin, v. 241, n. 3, p. 563-577, 2015.
- DULLOO, M. E. et al. Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. **Crop Science**, Madison, v. 49, n. 6, p. 2123-2138, 2009.
- DUSSERT, S. et al. Cryopreservation of *Coffea* (Coffee) In: TOWILL, L.E.T.; Bajaj, Y.P.S. (Eds). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Cryopreservation of Plant Germplasm II**. v. 50, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002. p. 224-233.
- DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. New determinants for tolerance of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. **CryoLetters**, Cambridge v. 27, n. 3, p. 169-178, 2006.
- DUSSERT, S. et al. Basis of coffee seed sensitivity to liquid nitrogen exposure: oxidative stress or imbibitional damage? **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 119, n. 4, p. 534-543, 2003.
- DUSSERT, S. et al. Biologie de la conservation des semences de caféiers: aspects fondamentaux et conséquences pratiques: une revue. **Cahiers Agricultures**, Les Ulis, v. 21, n. 2-3, p. 106-114, 2012.

- DUSSERT, S. et al. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature. **CryoLetters**, Cambridge, v. 18, n. 7, p. 269-276, 1997.
- DUSSERT, S. et al. Cryopreservation of seed of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 8, n. 1, p. 9-15, 1998.
- DUSSERT, S. et al. Quantitative estimation of seed desiccation sensitivity using a quantal response model: application to nine species of the genus *Coffea* L. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 9, n. 2, p. 135-144, 1999.
- DUSSERT, S. et al. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition, and cooling procedure. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 112, n. 4, p. 495- 504, 2001.
- EIRA, M. T. S.; REIS, R. B.; RIBEIRO, F. N. S. Banco de sementes de café em criopreservação: experiência inédita do Brasil, In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais eletrônicos...** Brasília: Embrapa Café, 2005. 1 CD-ROM
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, 2004.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 5- 16, 2011.
- FIGUEIREDO, M.A. et al. Exploratory studies for cryopreservation of *Coffea arabica* L. seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v.39, n.2, p.150-158, 2017
- GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 1-13, 2008.
- HONG, T.D; ELLIS, R. H. Optimum air-dry seed storage environments for arabica coffee. **Seed Science and technology**. Zurich, v. 20, n. 3, p. 547-560, 1992.
- JOSÉ, A. C. et al. Effects of drying rate and storage time on *Magnolia ovata* Spreng. seed viability. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 39, n. 2, p. 425-434, 2011.
- KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science**, [s.l.] v.5, n. 6, p. 778–800, 2011.
- KOHOMA, S. et al. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* LAM. (Grumixameira). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 72-78, 2006.
- MAZUR, P. Principles of cryobiology. In: FULLER, B. J.; LANE, N.; BENSON, E. E. (Eds.). **Life in the frozen state**. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2004, cap. 1, p. 3-65.

- NASS, L. L. et al. Pré-melhoramento de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Org). Recursos genéticos vegetais. Brasília: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, 2008. p. 683-716.
- MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2°. ed., Londrina: ABRATES, 2015. 660p.
- NETO, M. Tecnologia garante rentabilidade a Produtores de café. **Portal Revista Safra**, Goiânia, 10 jan. 2018, Disponível em: <<http://revistasafra.com.br/tecnologia-garante-rentabilidade-produtores-de-cafe/>> Acesso em:
- PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 21-28, Jan. 2014.
- PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: A cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, Limerick, v. 168, n. 1, p. 45-55, 2005.
- PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: RUANE, J.; SONNINO, A. **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**, Turin: FAO, 2005, v. 5, n. 7, p. 43-54.
- PANIS, B.; SWENNEN, R.; ENGELMAN, F. Cryopreservation of plant germplasm. In: International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 4., 2001, Tampere. **Proceedings...** Tampere: ISHS Acta Horticulturae, v. 650, 79-86, 2001.
- ROSA, S. D. V. F. et al. Effects of different drying rates on the physiological quality of *Coffea canephora* Pierre seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, n. 2, p. 199-205, 2005.
- RIBEIRO, B.B. et al. Avaliação química e sensorial de blends de *Coffea canephora* Pierre e *Coffea arabica* L. **Coffee Science**, Lavras, v. 9, n. 2, p. 178-186, 2014
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, p.499-514, 1973.
- SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: A review. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 28, n. 3, p. 151-172, 2007.
- SANT, R. et al. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 107-111, 2008.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.12,p. 70-94, 2000.

SANTOS, G. C.; VON PINHO, E. V. R.; ROSA, S.D.V.F. Gene expression of coffee seed oxidation and germination processes during drying. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 6968-6982, 2013.

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

WALTERS, C. et al. Cryopreservation of recalcitrant (i.e. desiccation-sensitive) seeds. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant Cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008, p. 465-484.

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

WEN, B. et al. Cytological and physiological changes in recalcitrant Chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation. **Protoplasma**, New York, v. 249, n. 2, p. 323-335, 2012.

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

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

CAPÍTULO 2

CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Coffea Canephora* PIERRE: IMPORTÂNCIA DA VELOCIDADE DE SECAGEM E TEOR DE ÁGUA

RESUMO

Sementes da espécie *Coffea canephora* são consideradas de comportamento mais recalcitrante que as da espécie *Coffea arabica*, toleram uma desidratação parcial e não podem ser armazenadas em bancos convencionais a -18°C , pois apresentam sensibilidade a temperaturas sub-zero. A criopreservação é um método seguro para armazenar sementes com essas características por longos períodos de tempo, entretanto são necessários estudos preliminares para determinar as condições ideais para o armazenamento. Visando diminuir a mortalidade das sementes causadas pela formação de cristais de gelo intracelular, bem como evitar danos celulares causados pela dessecação excessiva, objetivou-se neste trabalho investigar as condições físicas e fisiológicas ideais para a criopreservação de sementes de *Coffea canephora*. As sementes foram submetidas à secagem rápida em sílica gel e lenta em solução salina saturada de NaCl até os teores de água de 0,20; 0,25 e 0,28 g.g^{-1} (base seca), seguido por imersão direta em nitrogênio líquido, por resfriamento rápido. Foram realizadas análises fisiológicas e bioquímicas para avaliar a qualidade das sementes antes e após a criopreservação. A secagem rápida das sementes de *Coffea canephora* até valores próximos a 0,20 g.g^{-1} (bs) não causa redução na qualidade fisiológicas. O teor de água de 0,25 g.g^{-1} proporciona maior sobrevivência de sementes de *Coffea canephora* após criopreservação. A velocidade de secagem afeta a qualidade fisiológica das sementes de *Coffea canephora* criopreservadas, sendo a rápida em sílica gel mais favorável que a lenta em solução salina saturada de NaCl. A atividade das enzimas catalase, esterase, glutamato oxaloacetato transaminase e polifenol oxidase são indicadoras da qualidade de sementes de *Coffea canephora* submetidas à criopreservação.

Palavras-chave: Secagem em sílica gel. Resfriamento rápido. Sementes recalcitrantes. Enzimas antioxidantes. Qualidade fisiológica.

1 INTRODUÇÃO

Dois fatores principais determinam a dificuldade em armazenar sementes de comportamento recalcitrante, quando comparado com as sementes ortodoxas. Sementes de *Coffea canephora* Pierre são caracterizadas pela alta atividade metabólica e sensibilidade à dessecação e ao resfriamento (PAMMENTER; BERJAK, 2014), o que impossibilita a conservação do material vegetal em bancos convencionais de germoplasma.

Enquanto o armazenamento convencional das sementes tolerantes a dessecação é realizado em câmaras de 18 a 20 °C abaixo de zero, a única alternativa viável para a conservação *ex-situ* de espécies recalcitrantes é a criopreservação (ENGELMANN, 2011), a qual consiste no armazenamento das sementes em nitrogênio líquido à -196 °C, ou na sua fase a vapor, a -150 °C (WALTERS, 2015). Nestas condições, a divisão celular e as atividades bioquímicas e metabólicas são reduzidas drasticamente e as sementes podem ser armazenadas por períodos de tempo indeterminado, sem alterações na qualidade fisiológica (BENSON, 2008).

O foco principal na técnica de criopreservação é evitar a formação de cristais de gelo no meio intracelular, o que é letal para as células, caso o teor de água não seja adequado para a espécie. Os cristais de gelo ocorrem porque a água, ao congelar, se expande e forma estruturas pontiagudas que danificam as paredes celulares, levando ao extravasamento do conteúdo celular (WESLEY-SMITH et al., 2014). A velocidade de secagem e o teor de água se tornam então, essenciais para o sucesso da criopreservação de sementes mais sensíveis à dessecação, principalmente considerando a estreita faixa de umidade tolerada pelas sementes durante a criopreservação (KAVIANI, 2011).

O desempenho fisiológico das sementes após secagem depende da velocidade com que a água é retirada (ROSA et al., 2005; JOSÉ et al., 2011; COELHO et al., 2015). Segundo Pammenter e Berjak (2014), sementes sensíveis à dessecação podem sobreviver a menores teores de água, se submetidas a uma secagem mais rápida, devido ao tempo insuficiente para que os danos se acumulem durante o processo.

Dentre as técnicas atuais de criopreservação, tem-se o resfriamento rápido, utilizado principalmente para sementes e embriões zigóticos (WESLEY-SMITH et al., 2014), que consiste na desidratação do material vegetal até um teor de água ideal e subsequente imersão direta em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2011). Durante esse procedimento, a água presente nas células passa para o estado vítreo, desejável para se evitar a cristalização, que neste caso acontece devido a rápida velocidade de congelamento aliado a alta viscosidade das

soluções intracelulares (KAVIANI, 2011; WESLEY-SMITH et al., 2014). Para alcançar o nível desejado de viscosidade que poderia transformar um fluido em um estado vítreo, as sementes precisam estar com o conteúdo de água ajustado e ideal, o que pode ser alcançado por meio da secagem.

A tolerância à criopreservação de diversas espécies do gênero *Coffea*, dentre eles *C. canephora*, foi investigada por Eira et al. (1999) e Dussert et al. (2001). Eira et al. (1999) observou que as sementes de *C. canephora* sobrevivem ao armazenamento em temperaturas de -10 e -20°C durante trinta dias, mas não sobrevivem em temperatura de -150 °C. Dussert et al. (2001) estudou a criopreservação por resfriamento rápido e lento em sementes de *C. canephora*, porém não obteve sobrevivência após o descongelamento.

O estresse causado às sementes submetidas as condições de secagem e resfriamento pode causar desequilíbrio iônico às células, redução da energia disponível para os processos metabólicos, produção e acúmulo de radicais livres, alterações na permeabilidade da membrana celular, desnaturação de proteínas, além de induzir à morte celular (BAUST, 2007). A avaliação da atividade de enzimas envolvidas em algumas rotas metabólicas pode auxiliar na interpretação dos resultados fisiológicos, além de elucidar quais os processos estão envolvidos na tolerância à secagem e ao congelamento.

O sucesso para a criopreservação consiste em determinar as condições ideais de velocidade de secagem, teor de água ideal e velocidade de resfriamento, bem como a interação desses fatores. Diante da importância de se preservar os recursos genéticos do café e da inexistência de protocolo ideal para criopreservação das sementes, objetivou-se neste trabalho investigar as condições físicas e fisiológicas ideais para a criopreservação de sementes de *Coffea canephora* Pierre.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Colheita e processamento dos frutos

Frutos da espécie *Coffea canephora* Pierre, cultivar Apoatã, foram colhidos em lavouras da Fazenda Experimental de Varginha - Fundação Procafé (Programa Integrado de Apoio à Tecnologia Cafeeira), na safra 2014/2015. Os frutos no estágio de maturação cereja foram seletivamente colhidos nos ramos médios das plantas e nas partes medianas destes ramos. Após a colheita, os frutos foram selecionados para uniformização do estágio de maturação e descascados mecanicamente. As sementes foram desmuciladas por fermentação

em água durante 48 horas em temperatura ambiente e posteriormente pré-secadas à sombra para a retirada da umidade superficial. Para uniformização do tamanho, foram utilizadas as sementes retidas nas peneiras de crivo circular nº 18/64 e 20/64, sendo descartadas aquelas de tamanho acima e abaixo destes.

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

2.2 Secagem e criopreservação das sementes

As sementes foram secadas até os teores de água de 0,20; 0,25 e 0,28 g.g⁻¹ (base seca). Para a secagem rápida, as sementes foram acondicionadas em camada única sobre as telas metálicas das caixas de acrílico do tipo gerbox, contendo 80 mg de sílica gel ativada em seu interior e abaixo das telas. No decorrer da secagem, a sílica era trocada diariamente, no mesmo horário. Para a secagem lenta, as sementes foram acondicionadas da mesma forma, em caixas contendo solução salina saturada de NaCl (75% de umidade relativa a 25 °C), sendo essa solução capaz de manter a umidade relativa interna estável. A solução salina saturada foi feita utilizando 65 mg do sal NaCl para 20 mL de água destilada, para cada gerbox. Os recipientes foram lacrados e mantidos em câmaras do tipo B.O.D, em temperatura constante de 25 °C. A perda de água durante a secagem foi monitorada por pesagens contínuas em balança de precisão de 0,001 g, até que as sementes atingissem os teores de água de interesse.

Após atingirem os teores de água de interesse e antes da imersão em nitrogênio líquido, as sementes foram submetidas aos testes fisiológicas para avaliação da qualidade das sementes antes da criopreservação.

As sementes secas foram, então, acondicionadas em embalagens trifoliadas de alumínio e imersas diretamente em tanque contendo nitrogênio líquido, o que proporciona um resfriamento ultrarrápido, na velocidade de aproximadamente -200 °C/minuto (DUSSERT et al., 2001). Após 24 horas, as embalagens contendo as sementes foram retiradas e as sementes descongeladas em banho-maria a 40 °C, por 2 minutos (DUSSERT et al., 1998). Para o descongelamento, as sementes foram retiradas rapidamente, de suas respectivas embalagens e imersas diretamente no banho-maria. Posteriormente, foram secadas em papel toalha para retirada da água superficial e tiveram seus pergaminhos retirados manualmente para serem submetidas à avaliação fisiológica e bioquímica.

2.3 Avaliações fisiológicas

Para as avaliações fisiológicas, foram utilizadas as sementes controle, ou seja, úmidas e sem passar por qualquer tratamento; as sementes secadas até os teores de 0,20; 0,25 e 0,28 g.g⁻¹, sem imersão em nitrogênio líquido; e as sementes criopreservadas.

O **teste de germinação** foi realizado com quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento, semeadas em folhas de papel de germinação, umedecidas com água em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. As sementes foram mantidas em germinador, em temperatura constante de 30 °C, sendo a porcentagem de plântulas normais avaliada após 30 dias, segundo as prescrições das RAS (BRASIL, 2009). No teste de germinação determinou-se também a porcentagem de **plântulas normais fortes** aos 30 dias, sendo computadas como fortes aquelas que apresentavam alça hipocotiledonar com três centímetros ou mais, e porcentagem de **plântulas com folhas cotiledonares expandidas** aos 45 dias após a semeadura, e **matéria seca das plântulas**.

Para a determinação da **matéria seca de plântulas**, os eixos hipocótilo-radículas das plântulas normais foram isolados, acondicionados em sacos de papel e secados em estufa de circulação de ar a 60 °C, durante cinco dias. Após esse período foi determinada a massa seca de raízes e de partes aéreas das plântulas, sendo os resultados expressos em miligramas por plântula.

No **teste de tetrazólio** foram utilizadas quatro repetições de 10 sementes, as quais foram embebidas em água destilada por período de 48 horas, a 30 °C (CLEMENTE et al., 2011). Após embebição os embriões foram removidos com o auxílio de bisturi, evitando-se danos aos mesmos. Para a coloração os embriões foram imersos em solução de tetrazólio a 0,5%, na ausência de luz, por período de 3 horas, a 30 °C, quando foram avaliados, sendo os resultados expressos em porcentagem de embriões viáveis.

2.4 Avaliações bioquímicas

Para as **análises bioquímicas**, apenas as sementes criopreservadas foram utilizadas. As sementes foram maceradas em nitrogênio líquido, na presença de polivinilpirrolidona e as amostras foram armazenadas em temperatura de -86 °C (deep-freezer) até o momento da realização das análises. Utilizou-se a metodologia proposta por Alfenas et al. (2006) para extração, corrida eletroforética e revelação das isoenzimas catalase (CAT), superóxido

dismutase (SOD), esterase (EST), malato desidrogenase (MDH), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) e polifenol oxidase (PPO).

2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

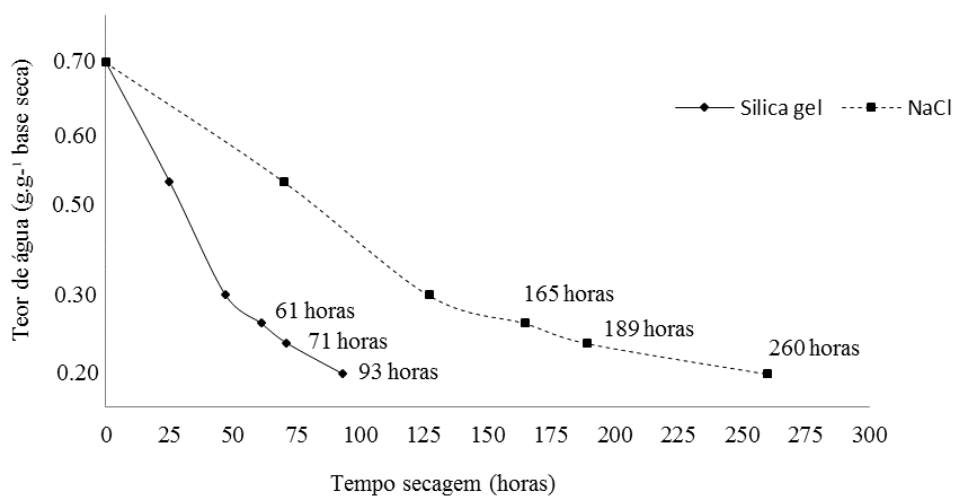
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x2, sendo três teores de água, 0,20; 0,25 e 0,28 g.g⁻¹ (bs) e duas velocidades de secagem, rápida e lenta, com quatro repetições. Os resultados dos testes fisiológicos foram submetidos à análise de variância por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2014), sendo as médias comparadas por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Secagem e análises fisiológicas de sementes não criopreservadas

Observa-se na Figura 2.1 as curvas de secagem das sementes de café submetidas à secagem rápida em sílica gel e lenta, em solução salina saturada de NaCl, até atingirem os teores de água de 0,20; 0,25 e 0,28 g.g⁻¹.

Figura 2.1 - Curva de secagem das sementes de *Coffea canephora* Pierre submetidas à secagem rápida, em sílica gel e lenta, em solução salina saturada de NaCl, até os teores de água de 0.20, 0.25 e 0.28 g.g⁻¹.



Fonte: Do autor (2018)

Quando submetidas à secagem rápida em sílica gel, as sementes com umidade inicial de 0,70 g.g⁻¹ levaram 61, 71 e 93 horas para atingirem os teores de água de 0,28; 0,25 e 0,20 g.g⁻¹ respectivamente, apresentando velocidade média de secagem de 0,54 %.h⁻¹. Na secagem lenta, em solução salina saturada de NaCl, as sementes levaram 165, 189 e 260 horas para atingirem os mesmos teores de água, com velocidade média de 0,19 %.h⁻¹. Observa-se que a secagem em sílica gel foi 2,8 vezes mais rápida que a secagem em solução salina saturada de NaCl.

Na análise de variância dos resultados das avaliações fisiológicas das sementes secas, não criopreservadas, foi constatado efeito significativo apenas do fator velocidade de secagem, para todas as variáveis respostas estudadas (Tabela 2.1), exceto para embriões viáveis.

Tabela 2.1 - Valores médios de germinação, plântulas normais fortes, plântulas com folhas cotiledonares expandidas, matéria seca de raiz, matéria seca de hipocótilo e embriões viáveis, de sementes de *Coffea canephora* Pierre não criopreservadas, submetidas à dois métodos de secagem, rápido em sílica gel e lento, em solução salina saturada de NaCl

Variáveis	Secagem		Controle	CV (%)
	Sílica gel	NaCl		
Germinação (%)	88 A	81 B	88	7,51
Plântulas normais fortes (%)	22 A	15 B	18	18,38
Folhas cotiledonares expandidas (%)	43 A	30 B	38	13,03
Matéria seca de raiz (mg)	66,08 A	43,08 B	98,50	17,46
Matéria seca de hipocótilo (mg)	450,11 A	310,98 B	386,00	16,68
Embriões viáveis	86 A	80 A	90	13,86

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

Fonte: Do autor (2018).

De acordo com os resultados do teste de germinação das sementes (Tabela 2.1), após a secagem rápida em sílica gel as sementes apresentaram melhor qualidade fisiológica quando comparado à secagem lenta, em solução de NaCl. Também foi observado que não houve redução na porcentagem de germinação das sementes durante o processo de secagem rápida, sendo que as sementes úmidas (testemunha) apresentou média igual às das sementes secas.

Quando os embriões zigóticos foram retirados das sementes secas e avaliadas no teste de tetrazólio (Tabela 2.1), não observa-se diferença entre a viabilidade das sementes submetidas à secagem rápida e a lenta, sendo os resultados estatisticamente semelhantes.

Com relação aos resultados dos testes de vigor das sementes secas, sem criopreservação (Tabela 2.1), observa-se que após a secagem rápida, em sílica gel, as sementes apresentam resultados superiores quando comparado à secagem lenta, indicando que a secagem rápida foi melhor para preservar as qualidades fisiológicas das sementes de *Coffea canephora*, corroborando com os resultados do teste de germinação.

Com estes resultados observa-se que de uma forma geral, a velocidade de secagem influencia a viabilidade e o vigor das sementes. Sementes de *Coffea canephora* secadas rapidamente apresentam maior qualidade fisiológica do que as secadas lentamente.

Rosa et al. (2005) estudando o efeito da taxa de secagem na qualidade fisiológica de sementes de *Coffea canephora* Pierre, observaram que imediatamente após a secagem, apenas o efeito do teor de água final das sementes foi significativo, não sendo relevante a taxa com que a água é retirada. Ressalta-se que as condições de secagem realizadas por Rosa et al. (2005) foram diferentes da realizada no presente trabalho. Além disso, esses autores estudaram teores de água bem distintos, entre 51 e 15%, e sendo as sementes de *Coffea canephora* Pierre consideradas recalcitrantes, a umidade final influenciou na qualidade fisiológica das sementes.

No presente trabalho não foram observadas diferenças estatísticas entre os teores de água investigados de 0,20; 0,25 e 0,28 g.g⁻¹, uma vez que sendo valores tão próximos, não influenciaram na qualidade fisiológica das sementes. Foi observado também no trabalho de Rosa et al. (2005) que ocorre diminuição da germinação das sementes de *Coffea canephora* à medida em que estas perdem água, fato esse não observado no presente trabalho.

Coelho et al., (2015) estudando os efeitos da taxa de secagem na qualidade de sementes de *Coffea arabica* L. observaram que na secagem rápida, as sementes toleraram dessecação a menores teores de água. Por outro lado, a secagem lenta foi mais eficiente quando as sementes foram secadas até teores mais elevados de água.

Segundo Berjak e Pammenter (2008) sementes recalcitrantes podem sobreviver a um menor conteúdo de água quando secadas rapidamente. Isso porque quando a secagem é instantânea, ocorre a passagem rápida através dos intervalos de conteúdo de água intermediários, em que ocorre o dano relacionado ao metabolismo aquoso, com desequilíbrio iônico e acúmulo de radicais livres (PAMMENTER; BERJAK, 2014). Ou seja, se as sementes

passam rapidamente por este intermediário teor de água, não há tempo suficiente para que os danos possam se acumular em níveis letais.

3.2 Análises fisiológicas de sementes criopreservadas

Na análise de variância dos resultados das avaliações fisiológicas após a criopreservação das sementes, foi constatada interação significativa para os dois fatores estudados, velocidade de secagem e teor de água, para todas as variáveis respostas estudadas (Figura 2.2)

Figura 2.2 - Porcentagem média de Germinação (A), de plântulas normais fortes (B), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (C), peso médio de matéria seca de raiz (D) e de hipocótilo (E) e viabilidade de embriões pelo teste de tetrazólio (F), de sementes de *Coffea canephora* Pierre criopreservadas após secagem rápida em sílica gel e lenta em solução salina saturada de NaCl até os teores de água de 0.20, 0.25 e 0.28 g.g⁻¹. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam as velocidades de secagem dentro do mesmo teor de água. Letras minúsculas comparam os teores de água dentro da mesma velocidade de secagem.(Continua)

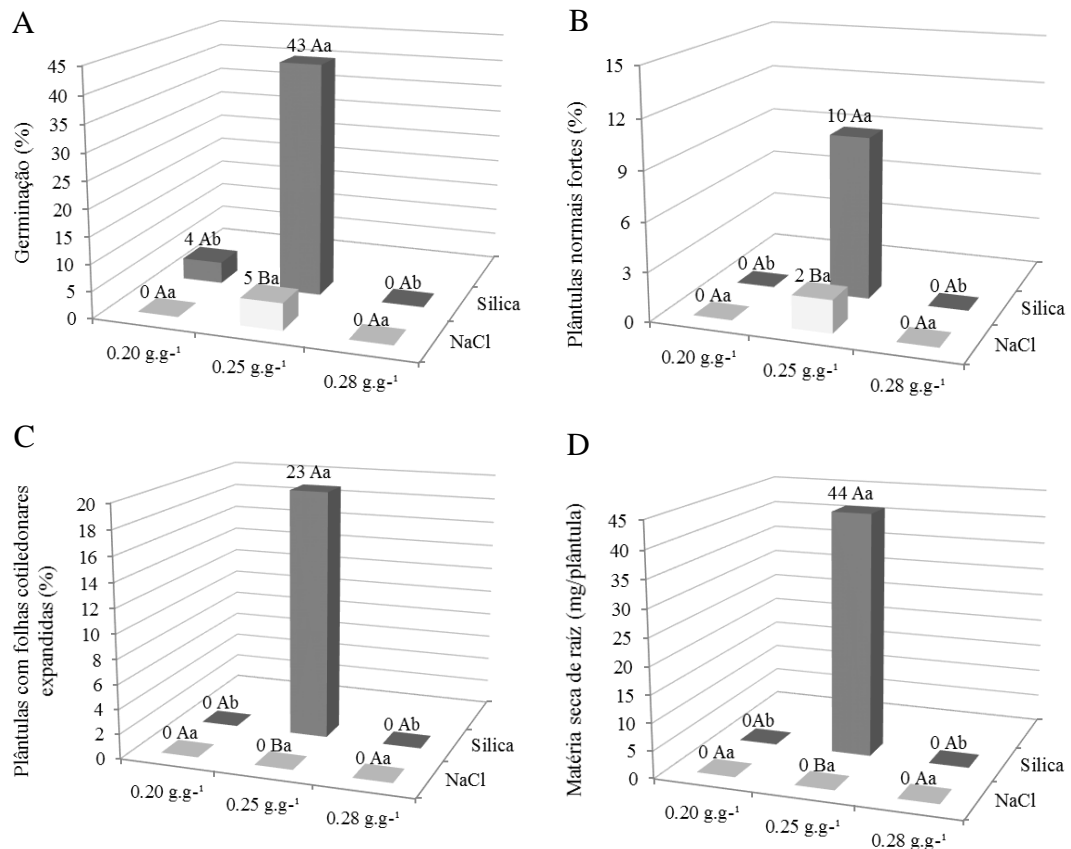
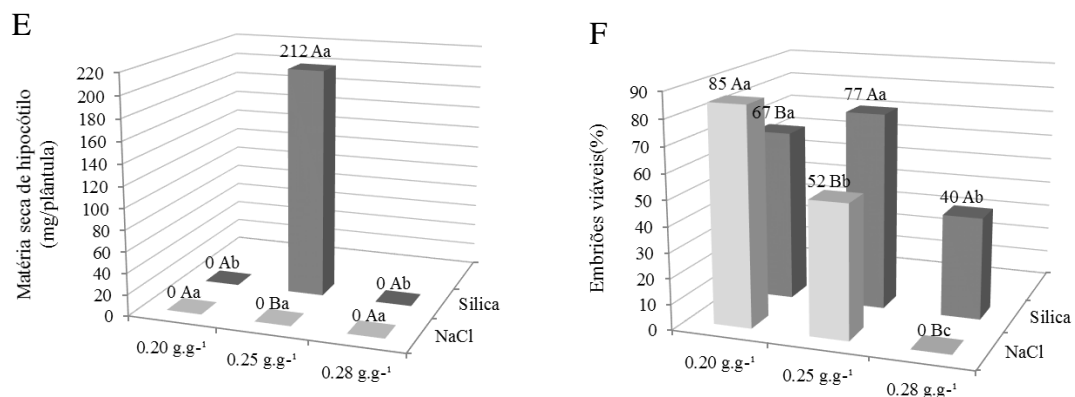


Figura 2.2 - Porcentagem média de Germinação (A), de plântulas normais fortes (B), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (C), peso médio de matéria seca de raíz (D) e de hipocótilo (E) e viabilidade de embriões pelo teste de tetrazólio (F), de sementes de *Coffea canephora* Pierre criopreservadas após secagem rápida em sílica gel e lenta em solução salina saturada de NaCl até os teores de água de 0,20, 0,25 e 0,28 g.g⁻¹. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam as velocidades de secagem dentro do mesmo teor de água. Letras minúsculas comparam os teores de água dentro da mesma velocidade de secagem. (Conclusão)



Fonte: Do autor (2018)

No presente trabalho, em que as sementes foram armazenadas em nitrogênio líquido, observa-se pelos resultados do teste de germinação (Figura 2A) que o teor de água mais indicado para a criopreservação das sementes de *Coffea canephora* é de 0,25 g.g⁻¹, sendo a secagem rápida, em sílica gel, a ideal para atingir esse conteúdo. As sementes secadas de forma rápida até 0,20g.g⁻¹ apresentaram alguma sobrevivência, porém muito pequena quando comparada com as sementes com umidade de 0,25 g.g⁻¹. O teor de água de 0,28 g.g⁻¹ é altamente prejudicial para a criopreservação das sementes de *C. canephora*, independentemente da velocidade de secagem.

Avaliando-se os resultados dos testes de vigor (Figura 2.2, B-E) observa-se a mesma tendência dos resultados do teste de germinação, ou seja, o melhor teor de água para criopreservar sementes de *Coffea canephora* Pierre é de 0,25 g.g⁻¹, secadas em sílica gel. Teores de água acima ou abaixo desse valor causam redução drástica na qualidade fisiológica das sementes criopreservadas, o que pode indicar que existe uma umidade pontual e não uma faixa de teor de água ideal para armazenar as sementes em nitrogênio líquido.

Esses resultados sugerem também que houve formação de cristais de gelo nos teores de água estudados, especialmente no teor de água acima de 0,25 g.g⁻¹, já que as sementes secas antes da imersão em nitrogênio líquido apresentaram sobrevivência superior a 80%.

Embora o estado ideal de hidratação das sementes antes da exposição ao nitrogênio líquido seria que todas elas tivessem apenas água não-congelável, na prática, isto não é atingido. A variação de umidade entre as sementes durante e após a secagem interferem na quantidade de água congelável que permanece nas células no momento da criopreservação (BERJAK; PAMMENTER, 2013), podendo ser esse o motivo pelo qual apenas 43% das sementes germinaram após a imersão em nitrogênio líquido.

Com relação as velocidades de secagem investigadas, observa-se que a secagem lenta é prejudicial quando o objetivo é secar as sementes de café para a criopreservação (Figura 2.2). Em todos os testes realizados, a secagem rápida até $0,25 \text{ g.g}^{-1}$ foi melhor quando comparada à secagem lenta (Figura 2.2), quando se avalia a qualidade das sementes após criopreservação. Com esses resultados, fica evidente a importância da velocidade de secagem a que as sementes são submetidas, sendo esta primordial para o sucesso da técnica de criopreservação.

Figueiredo et al. (2017) estudando protocolos de criopreservação de sementes de *Coffea arabica* L., outra espécie do gênero *Coffea* com características similares ao *Coffea canephora*, observaram que a umidade de 20% bu (que corresponde a $0,25 \text{ g.g}^{-1}$ bs) permite maior sobrevivência das sementes, bem como de embriões zigóticos após a criopreservação.

Dussert et al. (2001) ao estudarem a tolerância de nove espécies de *Coffea* à criopreservação, observaram que independentemente do teor de água e da taxa de resfriamento, as sementes de *Coffea canephora* não germinam após imersão em nitrogênio líquido; entretanto, os autores concluíram que os danos ocorrem principalmente em endospermas das sementes, uma vez que os embriões, ao serem extraídos dessas sementes criopreservadas, apresentam sobrevivência.

No presente trabalho também foi observado maior sobrevivência dos embriões retirados das sementes criopreservadas quando comparada aos resultados do teste de germinação (Figura 2.2, A e F), principalmente nas umidades de $0,20$ e $0,28 \text{ g.g}^{-1}$, que foram letais para as sementes de café, semelhante aos resultados encontrados por Dussert et al. (2001). Embriões de sementes secadas lentamente até $0,28 \text{ g.g}^{-1}$ não apresentaram sobrevivência, mostrando ter sido este o pior tratamento dentre os investigados nesta pesquisa, para a criopreservação de sementes de *Coffea canephora*.

Fatores como qualidade inicial das sementes, condições de secagem, taxa de resfriamento e o descongelamento são importantes para a sobrevivência das espécies pós criopreservação. No presente trabalho, observa-se alta qualidade inicial das sementes, bem

como após a secagem, indicando ser as etapas de resfriamento e reaquecimento os entraves para alcançar alta sobrevivência de sementes criopreservadas.

De uma forma geral, os resultados encontrados neste trabalho sugerem que a velocidade de secagem rápida, em sílica gel, é a ideal para a criopreservação de sementes de *Coffea canephora*. Entretanto, a uniformidade com que a secagem é realizada, bem como a técnica de criopreservação utilizada precisam ser melhor estudados.

3.3 Análises enzimáticas das sementes criopreservadas

Os sistemas isoenzimáticos das sementes de *Coffea canephora* submetidas à criopreservação, revelados e quantificados para catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), esterase (EST), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), malato desidrogenase (MDH) e polifenol oxidase (PPO) estão representados nas Figura 2.3, 2.4 e 2.5.

Na atividade enzimática da catalase (Figura 2.3A) foi observado que a medida em que a umidade das sementes diminui, a atividade aumenta, principalmente na secagem lenta. Foi observado também que os tratamentos que passaram pela secagem lenta antes da criopreservação apresentaram uma menor atividade quando comparamos com os tratamentos de secagem rápida. Houve expressão muito baixa da enzima catalase nas sementes criopreservadas a 0,28 g.g⁻¹ após secagem lenta, sendo esse tratamento o de pior qualidade fisiológica dentre os testados no presente trabalho.

Figura 2.3 - Perfil eletroforético e quantificação densitométrica para as enzimas catalase (A) e superóxido dismutase (B), em sementes de *Coffea canephora* Pierre criopreservadas após secagem rápida (R) e lenta (L), até os teores de água de 0.20, 0.25 e 0.28 g.g⁻¹ (Continua)

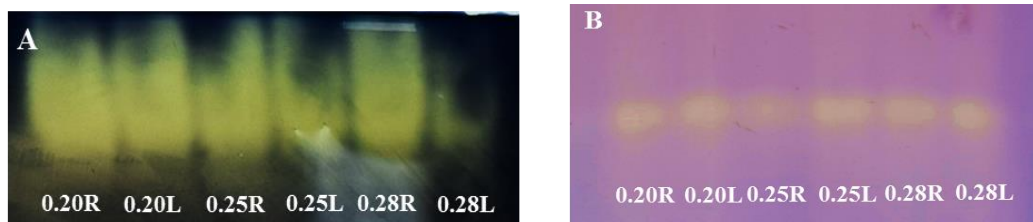
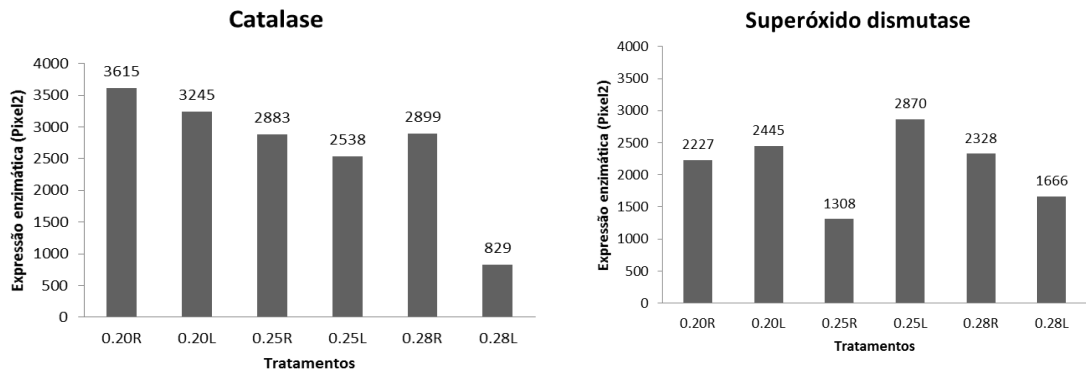


Figura 2.3 - Perfil eletroforético e quantificação densitométrica para as enzimas catalase (A) e superóxido dismutase (B), em sementes de *Coffea canephora* Pierre criopreservadas após secagem rápida (R) e lenta (L), até os teores de água de 0.20, 0.25 e 0.28 g.g⁻¹ (Conclusão.)



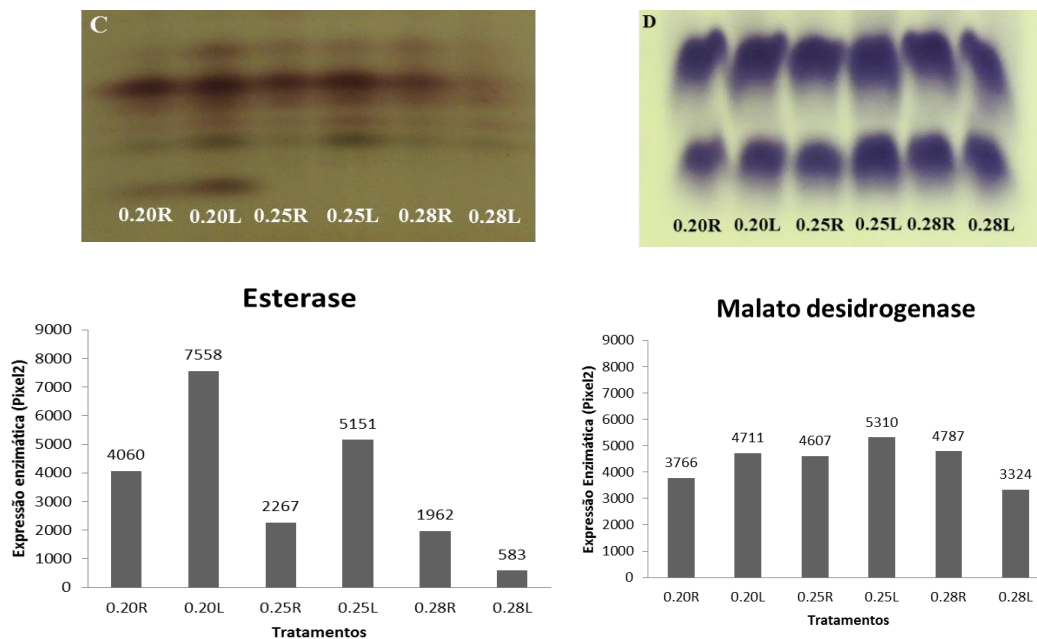
Fonte: Do autor (2018)

A catalase está envolvida na remoção de peróxidos de hidrogênio (H₂O₂) das células, e sua maior atividade pode estar relacionada à diminuição de mecanismos de prevenção de danos oxidativos (BAILLY et al., 1996). Esses resultados corroboram com os de Brandão Júnior; Vieira e Hilhost (2002), que observaram uma diminuição na atividade da catalase em sementes de café que apresentaram menor desempenho fisiológico, resultante de dessecação. O estresse causado às sementes devido a secagem e criopreservação causa aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e estimula a geração de peróxido de hidrogênio. Provavelmente, este processo estimulou o aumento da expressão do complexo izoenzimático da enzima catalase no decorrer da secagem, explicando a maior atividade nas sementes mais secas (Figura 2.3A).

A enzima superóxido dismutase (SOD) é considerada a primeira a atuar no sistema antioxidante das células, realizando a dismutação do radical superóxido (O₂⁻), resultando em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (HENDRY, 1993). Na expressão dessa enzima (Figura 2.3B), observou-se que o protocolo de criopreservação de sementes de *Coffea canephora* que resultou em sementes de maior viabilidade e vigor, ou seja, sementes secadas até 0,25 g.g⁻¹ em sílica gel e posterior imersão em nitrogênio líquido, foi o que apresentou a menor atividade dessa enzima, podendo indicar uma baixa atuação de radicais livres nesse tratamento. Observa-se também, de uma forma geral, que houve maior expressão dessa enzima nos tratamentos secados em solução salina saturada de NaCl, quando comparado à secagem em sílica gel dentro de um mesmo teor de água, indicando uma maior deterioração das sementes nestes tratamentos.

Na expressão da enzima esterase (Figura 2.4C), observou-se que ocorreu um aumento da expressão com a diminuição do teor de água das sementes (Figura 2.4C), sendo os tratamentos das sementes criopreservadas com 0,20 g.g⁻¹ de umidade com maior intensidade das bandas. Ainda com relação a esterase, observou-se uma expressão muito baixa das sementes que foram secadas lentamente e criopreservadas a 0,28 g.g⁻¹ de umidade, sendo esse tratamento o que apresentou pior qualidade fisiológica. A enzima esterase participa das reações de hidrólise de ésteres e pode também, atuar sobre os fosfolipídios de membrana (TAIZ; ZEIGER, 2009). Brandão Júnior; Vieira e Hilhost (2002) observaram maior expressão dessa enzima em amostras provenientes de sementes de café secas.

Figura 2.4 - Perfil eletroforético e quantificação densitométrica para as enzimas esterase (C) e malato desidrogenase (D) em sementes de *Coffea canephora* Pierre criopreservadas após secagem rápida (R) e lenta (L), até os teores de água de 0.20, 0.25 e 0.28 g.g⁻¹



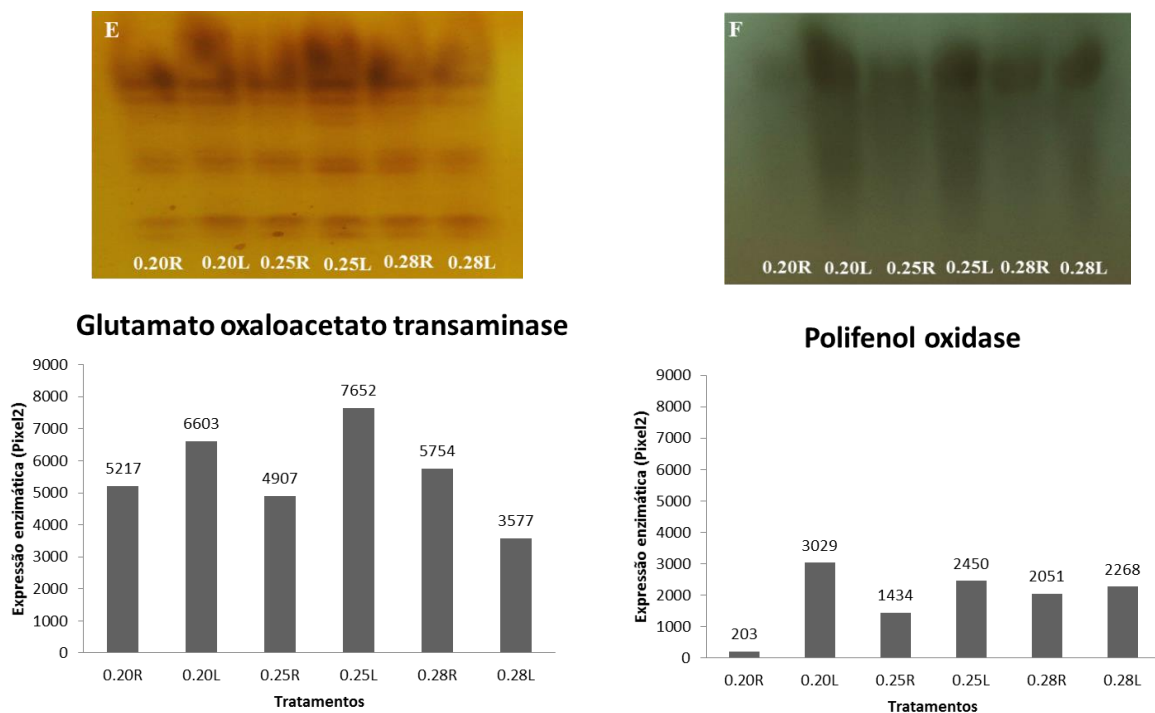
Fonte: Do autor (2018)

Com relação à expressão da enzima malato desidrogenase (Figura 2.4D) foi observado pequena alteração entre os tratamentos estudados. Entretanto, maior atividade ocorreu nas sementes secadas em solução salina de NaCl, quando comparado à secagem rápida antes da criopreservação, exceto para o teor de água de 0,28 g.g⁻¹. Essa maior atividade pode estar relacionada à alta taxa de respiração das sementes e conseqüentemente, maior deterioração (Catão et al., 2016). A enzima MDH desempenha importante função no ciclo de Krebs, catalisando a conversão de malato a oxaloacetato, produzindo NADH, que é um produto

fundamental na produção de ATP e de compostos intermediários essenciais ao funcionamento das células (TAIZ; ZEIGER, 2009).

As enzimas glutamato oxaloacetato transaminase (Figura 2.5E) e polifenol oxidase (Figura 2.5F) apresentaram expressão semelhantes. Para essas enzimas, observou-se que a velocidade de secagem influenciou mais a atividade do que o teor de água final das sementes. Deste modo, as sementes secadas de forma lenta apresentaram uma maior expressão do que aquelas sementes secadas rapidamente, independentemente do teor de água em que as sementes se encontravam.

Figura 2.5 - Perfil eletroforético e quantificação densitométrica para as enzimas glutamato oxaloacetato transaminase (E) e polifenol oxidase (F) em sementes de *Coffea canephora* Pierre criopreservadas após secagem rápida (R) e lenta (L), até os teores de água de 0.20, 0.25 e 0.28 g.g⁻¹



Fonte: Do autor (2018)

A glutamato oxalacetato transaminase atua na oxidação de aminoácidos visando o fornecimento de energia para o ciclo de Krebs ou para a redução do α -cetoglutarato, voltada à biossíntese de novos aminoácidos visando o crescimento do embrião (MALONE et al., 2007). Deste modo, estresses aplicados às sementes podem atuar direta ou indiretamente sobre esta enzima, afetando assim a retomada do crescimento do embrião (Figura 2.2F) e consequentemente a germinação das sementes (Figura 2.2A).

A enzima polifenol oxidase atua sobre os compostos fenólicos das sementes, os quais têm importante função antioxidante e de proteção de aldeídos, a exemplo dos ácidos clorogênicos e o caféico. Essas enzimas estão ligadas às membranas celulares, e quando ocorrem danos nas membranas, essas enzimas são liberadas e ativadas, e podem reagir com substratos fenólicos intra e extracelulares, e transformá-los em quinonas (AMORIM, 1978). Isso explica a alta atividade dessa enzima nos tratamentos de secagem lenta, evidenciando os danos ocasionados às membranas celulares e consequente redução na qualidade fisiológica.

De uma forma geral, as sementes secadas lentamente até $0,28 \text{ g.g}^{-1}$ e criopreservadas apresentaram uma expressão muito baixa ou quase nula na maioria dos complexos enzimáticos estudados. Nota-se que as sementes estavam mortas, uma vez que apresentaram valores nulos nos testes de germinação e tetrazólio, justificando a baixa ou nula atividade (Figura 2.2, 2.3, 2.4 e 2.5).

No presente trabalho, foram abordadas análises físicas, fisiológicas e bioquímicas a respeito da criopreservação de sementes de café, as quais permitiram detectar algumas transformações ocorridas durante esse processo. Essa pesquisa vem elucidar alguns entraves com relação à conservação à longo prazo da espécie *Coffea canephora*, que ainda não tinham sido estudados, e ainda contribuir com o universo de informações a respeito do armazenamento e longevidade das sementes de café. Isso se torna de grande valia para os estudos relacionados à tolerância à dessecação, os quais buscam o aprimoramento das técnicas de criopreservação.

4 CONCLUSÕES

O teor de água de $0,25 \text{ g.g}^{-1}$ (bs) proporciona maior sobrevivência de sementes de *Coffea canephora* após criopreservação por imersão direta.

A velocidade de secagem afeta a qualidade das sementes de *Coffea canephora* criopreservadas, sendo a secagem rápida em sílica gel mais favorável que a secagem lenta em solução salina saturada de NaCl para atingir o teor de água de $0,25 \text{ g.g}^{-1}$ (bs).

A secagem rápida das sementes de *Coffea canephora* até valores próximos a $0,20 \text{ g.g}^{-1}$ (bs) não causa redução na qualidade fisiológica.

A atividade das enzimas catalase, esterase, glutamato oxalacetato transaminase e polifenol oxidase são indicadoras da qualidade de sementes de *Coffea canephora* submetidas à criopreservação.

AGRADECIMENTOS

À Capes, ao CNPq, à Fapemig, à Embrapa e à UFLA pelo financiamento do estudo e pela concessão de bolsas.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006. 627 p.
- AMORIM, H.V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com deterioração da qualidade**. 1978. 85p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1978
- BAILLY, C. et al. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.97, p.104- 110, 1996.
- BAUST, J. M. Properties of cells and tissues influencing preservation outcome: molecular basis of preservation induced cell death. In: BAUST, J. G.; BAUST, J. M. (Eds.). **Advanced in biopreservation**. New York: CRC Press. Cap. 3, p. 63-87.
- BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008. p. 15-32.
- BERJAK, et al. Homoiohydrous (recalcitrant) seed: the enigma of their desiccation sensitivity and the state of water in axes of *Londolphia kirkii* Dyer. **Planta**, Berlin, v. 186, p. 249-261, 1989.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: Seed Recalcitrance in Perspective. **Annals of Botany**, London, v. 101, n. 2, p. 213-228, 2008
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in plant science**, Lausanne. v. 4, p. 478, 2013.
- BRANDÃO JÚNIOR, D.S.; VIEIRA, M. das G.G.C.; HILHOST, H.W.M. Aquisição da tolerância à dessecação nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, p.673- 681, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA: SDA, 2009. 395 p.
- CATÃO, H.C.R. et al. Physiological and isozyme alterations in lettuce seeds under different conditions and storage periods. **Journal of Seed Science**, Londrina, v.38, n.4, p.305-313, 2016,
- CLEMENTE, A. C. S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, 2011.
- COELHO, S. V. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, 2015.

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

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

EIRA, M.T.S. et al. Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.11, n.2, p.97-105, 1999.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 17-25, 2011.

FERREIRA D.F. Sisvar: A guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FIGUEIREDO, M.A. et al. Exploratory studies for cryopreservation of *Coffea arabica* L. seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v.39, n.2, p.150-158, 2017

HENDRY, G. A. F. Oxygen and free radical processes in seed longevity. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 3, p. 141-153, Sept. 1993.

JOSÉ, A. C. et al. Effects of drying rate and storage time on *Magnolia ovata* Spreng. seed viability. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 39, n. 2, p. 425- 434, 2011.

KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science**, [s. l.] v.5, n. 6, p. 778-800, 2011.

MALONE, G. et al. Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 61-67, 2007.

PAMMENTER, N. W; BERJAK, P. Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 21-28, 2014.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

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

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

CAPÍTULO 3

TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO EM SEMENTES DE *Coffea Canephora* PIERRE: RESFRIAMENTO LENTO E RÁPIDO

RESUMO

O café é umas das principais *commodities* agrícolas do país, sendo importante a conservação do material vegetal para os programas de melhoramento genético. A criopreservação é uma alternativa promissora para conservar à longo prazo e de forma segura, o germoplasma de espécies consideradas recalcitrantes, a exemplo de *Coffea canephora* Pierre. Entretanto, estudos devem ser conduzidos para alcançar a máxima sobrevivência de plântulas após imersão em nitrogênio líquido. Objetivou-se neste trabalho encontrar um protocolo de criopreservação seguro e eficiente para armazenar sementes de *Coffea canephora* Pierre, estudando dois métodos de criopreservação, resfriamento lento e rápido. As sementes foram submetidas à secagem em sílica gel, até o teor de água de 0,25 g.g⁻¹(base seca). No primeiro experimento, as sementes secas foram submetidas a tratamentos de resfriamento lento nas velocidades -1 °C min.⁻¹, -3 °C min.⁻¹ e -5 °C min.⁻¹ até as temperaturas finais de -40 °C, -50 °C, e -60 °C, por meio de um biocongelador, e posteriormente imersas em nitrogênio líquido. No segundo experimento, foi selecionado o melhor resultado da velocidade e temperatura final de pré-resfriamento do primeiro experimento e comparado com o resfriamento rápido, em que as sementes secas, com 0,25 g.g⁻¹ de umidade, foram imersas diretamente em nitrogênio líquido. As alterações fisiológicas e bioquímicas ocorridas nas sementes após criopreservação foram avaliadas por meio de testes de germinação e vigor e eletroforese de isoenzimas. As sementes de *Coffea canephora* respondem melhor a criopreservação por resfriamento rápido, ou seja, imersão direta em nitrogênio líquido, quando comparado ao resfriamento lento. A secagem das sementes de *Coffea canephora* até o teor de água de 0,25 g.g⁻¹ não prejudica a viabilidade das sementes. As enzimas catalase e esterase são bons marcadores bioquímicos para sementes de café criopreservadas e sua atividade é maior nas sementes de maior qualidade fisiológica.

Palavras-chave: Resfriamento lento. Resfriamento rápido. Secagem em sílica gel. Sementes recalcitrantes.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* apresenta atualmente mais de 100 espécies descritas, e dentre estas, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre são as mais comercializadas mundialmente (OIC, 2017). Sementes de *Coffea arabica* L. são parcialmente tolerantes à dessecação e ao armazenamento, sendo por isto consideradas como de comportamento intermediário (EIRA et al., 1999; ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990). As sementes de *Coffea canephora* Pierre, consideradas mais recalcitrantes, são caracterizadas por serem propagadas com altos conteúdos de água, não toleram a desidratação a níveis adequados para o armazenamento em bancos de sementes convencionais em temperaturas de -18 a -20 °C e são metabolicamente ativas, o que dificulta a conservação do germoplasma vegetal da espécie (BERJAK; PAMMENTER, 2013).

Para garantir o armazenamento seguro de recursos genéticos do cafeeiro, pesquisadores têm buscado o aprimoramento de técnicas de conservação de sementes com características de recalcitrância, como as de café, em nitrogênio líquido (- 196°C) ou em sua fase a vapor, a -150°C (DUSSERT et al., 2012; BERJAK; PAMMENTER, 2014; COELHO; ROSA; FERNANDES, 2017; FIGUEIREDO et al., 2017). A criopreservação é uma opção viável para a conservação em longo prazo do material vegetal dessas espécies (ENGELMANN, 2011), e o armazenamento pode ser conduzido por um período ilimitado de tempo, sem que ocorram divisões celulares e alterações metabólicas (WESLEY-SMITH et al., 2015).

Dentre os métodos de criopreservação existentes atualmente, dois principais são utilizados para sementes. O método clássico consiste no resfriamento lento do material vegetal até uma certa temperatura, seguido de rápida imersão em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2011). O método mais moderno é baseado na vitrificação, em que o material é imerso diretamente em nitrogênio líquido, após uma desidratação controlada (WALTERS et al., 2013). Segundo Berjak e Pammenter (2014), para espécies recalcitrantes tropicais/subtropicais, melhores resultados são observados quando se utiliza a criopreservação clássica, utilizando-se o resfriamento lento.

O maior gargalo a ser superado nos protocolos de criopreservação são os danos associados a formação de cristais de gelo intracelular, uma vez que comprometem a integridade das células (WESLEY-SMITH et al., 2014). O conteúdo de água das sementes é o fator mais importante, pois é determinante para a sobrevivência das sementes após a imersão em nitrogênio líquido (UEMURA; MINAMI; KAWAMURA, 2009). A perda de viabilidade

das sementes irá ocorrer caso o conteúdo de água for alto o suficiente para acarretar a formação de gelo intracelular, ou baixo o suficiente para causar estresses físicos às células, uma vez que são espécies sensíveis à dessecação (PAMMENTER; BERJAK, 2014).

Como as células se desidratam à medida que a temperatura diminui, definir a velocidade de resfriamento, bem como a temperatura de pré-resfriamento pode ser fundamental para impedir que danos ocorram nas sementes (KAVIANI, 2011). Em contrapartida, o resfriamento rápido induz à vitrificação, o que poderia ser benéfico às sementes.

Até o momento, não há uma metodologia eficiente e segura para conservação das sementes de *Coffea canephora* Pierre a longo prazo, e os trabalhos de criopreservação envolvendo a espécie estão defasados (EIRA et al., 1999; DUSSERT et al., 2001). Diante da importância econômica da espécie e da necessidade de conservar o germoplasma vegetal, objetivou-se neste trabalho encontrar um protocolo de criopreservação seguro e eficiente para armazenar sementes de *Coffea canephora* Pierre, estudando dois métodos de criopreservação, resfriamento lento e rápido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material biológico e processamento dos frutos

Frutos em estágio de maturação cereja, da espécie *Coffea canephora* Pierre cultivar Apoatã, foram seletivamente colhidos em lavouras da Fazenda Experimental da Fundação Procafé (Programa Integrado de Apoio à Tecnologia Cafeeira), na cidade de Varginha-MG. Após a colheita, os frutos foram transportados para a Universidade Federal de Lavras, onde foram novamente selecionados para uniformizar o estágio de maturação, despulpados mecanicamente e as sementes desmuciladas por fermentação em água, por período de 48 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as sementes foram dispostas em camada única sobre tela e mantidas à sombra, para a retirada da água superficial.

Para determinar o grau de umidade inicial das sementes, foi realizado o método de estuda a 105 °C por 24 horas (BRASIL, 2009) e avaliação da qualidade fisiológica inicial foi realizada por meio dos testes de germinação (BRASIL, 2009) e viabilidade de embriões pelo teste de tetrazólio (CLEMENTE et al., 2011).

2.2 Secagem das sementes

Inicialmente foram realizados testes preliminares para determinar a melhor velocidade de secagem, bem como do teor de água ideal para a criopreservação das sementes de *Coffea canephora*. De acordo com estes testes (resultados não apresentados), a velocidade de secagem mais rápida, em sílica gel, e o teor de água após secagem das sementes, de $0,25 \text{ g.g}^{-1}$ (base seca) foram os tratamentos que proporcionaram melhores resultados.

As sementes foram, então, secadas em camada única sobre telas metálicas no interior de caixas de acrílico do tipo gerbox, contendo 80 mg de sílica gel ativada em seu interior e abaixo da tela. A sílica gel foi trocada diariamente, no mesmo horário, para regeneração da capacidade de retirada de água. Os recipientes foram lacrados e mantidos em câmaras do tipo B.O.D, em temperatura constante de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A perda de água durante a secagem foi monitorada por pesagens contínuas em balança de precisão de $0,001 \text{ g}$, até que as sementes atingissem o teor de água de interesse.

2.3 Primeiro experimento - Procedimento de resfriamento lento

Para o teste de resfriamento lento (criopreservação clássica), as sementes com teor de água de $0,25 \text{ g.g}^{-1}$ foram acondicionadas em embalagens trifoliadas de papel alumínio e colocadas em biocongelador (Icecube, modelo 14S-B, software SY-LAB - Minitub do Brasil), por meio do qual foram programadas diferentes curvas de resfriamento, variando-se as velocidades ($-1 \text{ }^\circ\text{C min.}^{-1}$; $-3 \text{ }^\circ\text{C min.}^{-1}$; $-5 \text{ }^\circ\text{C min.}^{-1}$) e as temperaturas finais de pré-resfriamento ($-40 \text{ }^\circ\text{C}$; $-50 \text{ }^\circ\text{C}$; $-60 \text{ }^\circ\text{C}$). Após o resfriamento, as sementes foram retiradas do biocongelador e imersas diretamente em tanque contendo nitrogênio líquido ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$), onde permaneceram por 24 horas. Para o descongelamento, as embalagens contendo as sementes foram retiradas rapidamente do nitrogênio líquido, e imersas em banho maria, durante dois minutos a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, segundo metodologia proposta por Dussert et al. (1998). As sementes foram então secadas superficialmente em papel toalha, tendo seus endocarpos (pergaminhos) manualmente retirados para realização das avaliações fisiológicas e bioquímicas.

2.4 Segundo experimento - Procedimento de resfriamento rápido

Foi testado também a metodologia de criopreservação por imersão direta, ou resfriamento rápido. Para isso, as sementes com umidade de $0,25 \text{ g.g}^{-1}$ foram acondicionadas em embalagens trifoliadas de papel alumínio e imersas diretamente em tanque contendo

nitrogênio líquido, o que constitui uma velocidade de resfriamento da ordem de $200\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (DUSSERT et al., 2001). As sementes permaneceram no criotânque por 24 horas, sendo o descongelamento das amostras também realizado por imersão em banho maria, durante dois minutos a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (DUSSERT et al., 1998).

Desta forma, os seguintes tratamentos foram investigados neste trabalho:

Tabela 3.1 - Identificação dos tratamentos e descrição dos procedimentos utilizados para a criopreservação de sementes de *Coffea canephora* Pierre.

Número	Tratamento	Secagem	Pré-resfriamento	
			Velocidade	Temperatura final
1	Testemunha	Sem secagem- 0.72 g.g^{-1}	-	-
2		Secagem em sílica gel até 0.25 g.g^{-1}	-	-
3	Resfriamento rápido*	Sílica gel até 0.25 g.g^{-1}	Imersão direta no nitrogênio	
4				-40°C
5			$-1^{\circ}\text{C/minuto}$	-50°C
6			-60°C	
7	Resfriamento lento**	Secagem em sílica gel até 0.25 g.g^{-1}		-40°C
8			$-3^{\circ}\text{C/minuto}$	-50°C
9				-60°C
10				-40°C
11			$-5^{\circ}\text{C/minuto}$	-50°C
12			-60°C	

* Imersão direta em nitrogênio líquido; ** Pré-resfriamento em biocongelador.

Fonte: Do autor (2018).

2.5 Análises fisiológicas

As sementes submetidas aos tratamentos descritos na Tabela 3.1 foram submetida à avaliação fisiológica, por meio do teste de germinação.

O teste de germinação foi realizado com quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento, semeadas em folhas de papel de germinação, tipo germitest, umedecidas com água em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. As sementes foram mantidas em germinador, em temperatura constante de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo a porcentagem de plântulas normais avaliada após 30 dias, segundo as prescrições das RAS (BRASIL, 2009). No teste de germinação determinou-se também a porcentagem de **protrusão radicular aos 15 dias**, e a porcentagem de **plântulas com folhas cotiledonares expandidas e matéria seca de plântulas**, aos 45 dias após a semeadura.

Aos 45 dias do teste de germinação, avaliou-se também a **matéria seca de plântulas**, quando os eixos hipocótilo-radículas das plântulas normais foram isolados, acondicionados em sacos de papel e secados em estufa de circulação de ar a 60 °C, durante cinco dias. Após esse período foi determinada a massa seca de raízes e de partes aéreas das plântulas, sendo os resultados expressos em miligramas por plântula.

No **teste de tetrazólio** foram utilizadas quatro repetições de 10 sementes, as quais foram embebidas em água destilada por período de 48 horas, a 30 °C (CLEMENTE et al., 2011). Após embebição os embriões foram removidos com o auxílio de bisturi, evitando-se danos aos mesmos. Para coloração os embriões foram imersos em solução de tetrazólio a 0,5%, na ausência de luz, por período de 3 horas, em 30°C, quando foram avaliados, sendo os resultados expressos em porcentagem de embriões viáveis.

2.6 Análises bioquímicas

Para as **análises bioquímicas**, as sementes provenientes dos tratamentos descritos na Tabela 3.1 foram maceradas em nitrogênio líquido, na presença de polivinilpirrolidona e as amostras armazenadas em temperatura de -86 °C (deep-freezer) até o momento da realização das análises eletroforética de isoenzimas. Utilizou-se a metodologia proposta por Alfenas (2006) para extração, corrida eletroforética e revelação das isoenzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidase (PO), esterase (EST) e malato desidrogenase (MDH).

2.7 Delineamento experimental e análises estatísticas

Para o estudo sobre o efeito da velocidade e temperatura final de pré-resfriamento (primeiro experimento), foi utilizado o fatorial 3 x 3, sendo três velocidades de resfriamento e três temperaturas finais de resfriamento, com quatro repetições

No segundo experimento, os protocolos de criopreservação de resfriamento lento e rápido foram comparados à testemunha e às sementes secas até 0,25 g.g⁻¹, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Os dados de ambos os experimentos foram submetidos à análise de variância no programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2014), sendo as médias comparadas por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Primeiro experimento - Método clássico de criopreservação (Resfriamento lento)

Na Figura 3.1 estão apresentados os resultados dos testes fisiológicos realizados nas sementes de *Coffea canephora* Pierre secadas até $0,25 \text{ g.g}^{-1}$ de umidade, em sílica gel, e posteriormente submetidas ao protocolo de criopreservação por resfriamento lento.

Figura 3.1 -Influência da velocidade e temperatura final de pré-resfriamento nos resultados médios de germinação (A), protrusão radicular (B), plântulas com folhas cotiledonares expandidas (C), matéria seca de raiz (D) e de hipocótilo (E) e embriões viáveis no teste de tetrazólio (F), em sementes de *Coffea canephora* Pierre, após criopreservação por resfriamento lento. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam as velocidades de resfriamento dentro da mesma temperatura de pré-resfriamento. Letras maiúsculas comparam as temperaturas de pré-resfriamento dentro da mesma velocidade de resfriamento. (Continua)

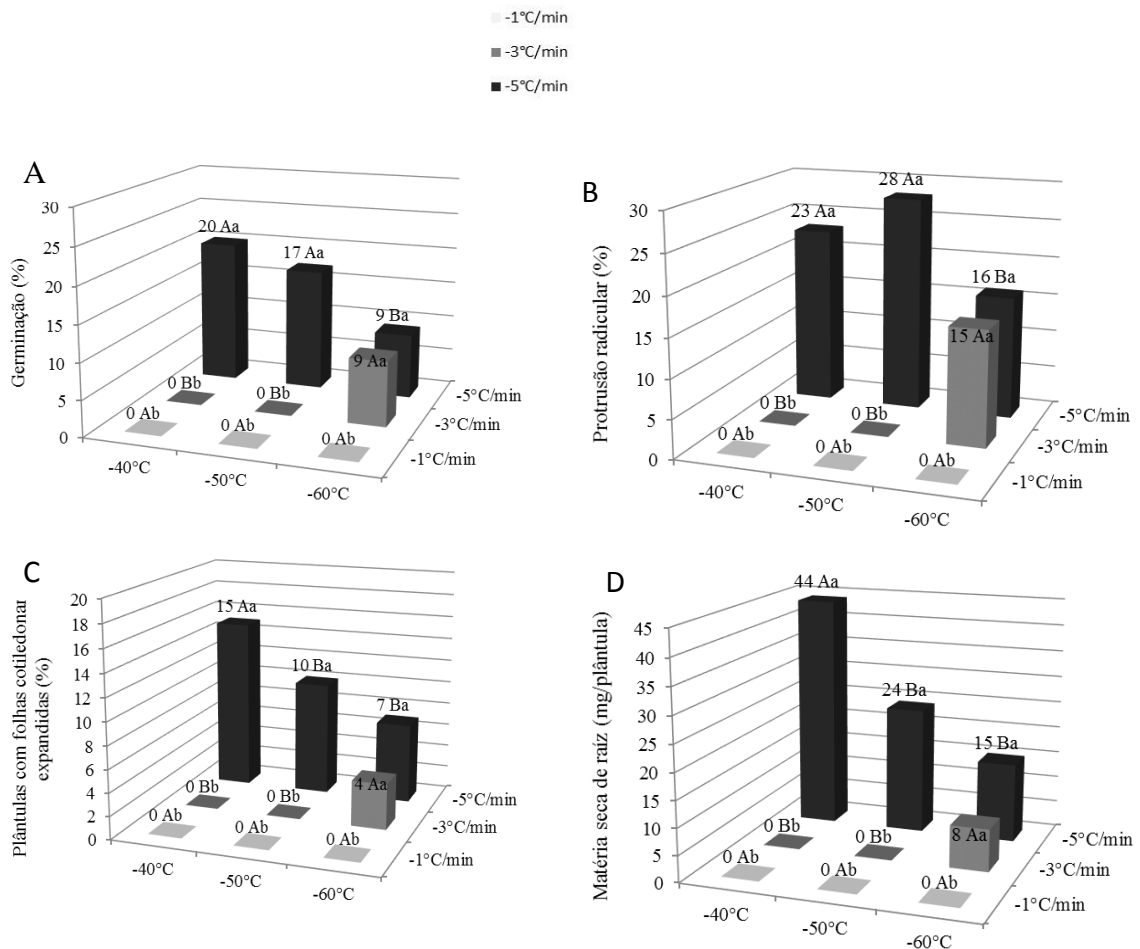
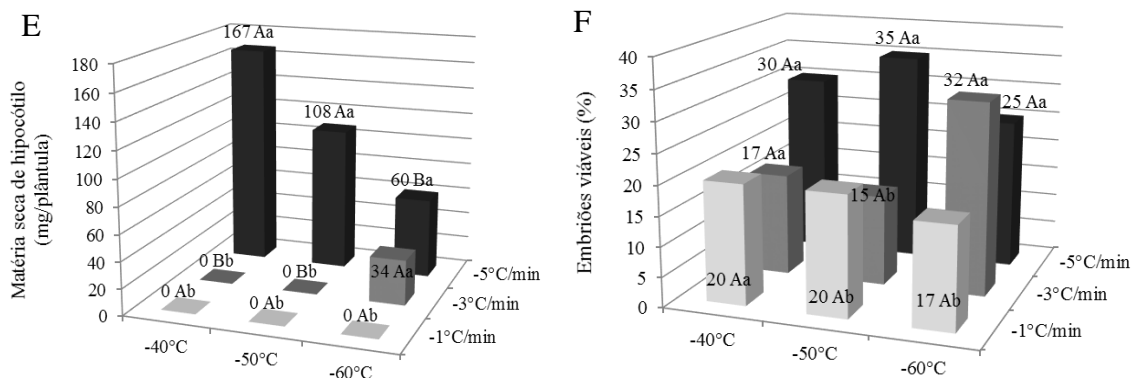


Figura 3.1 -Influência da velocidade e temperatura final de pré-resfriamento nos resultados médios de germinação (A), protrusão radicular (B), plântulas com folhas cotiledonares expandidas (C), matéria seca de raiz (D) e de hipocótilo (E) e embriões viáveis no teste de tetrazólio (F), em sementes de *Coffea canephora* Pierre, após criopreservação por resfriamento lento. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam as velocidades de resfriamento dentro da mesma temperatura de pré-resfriamento. Letras maiúsculas comparam as temperaturas de pré-resfriamento dentro da mesma velocidade de resfriamento. (Conclusão)



Fonte: Do autor (2018)

De acordo com os resultados do teste de germinação (Figura 3.1A), observou-se que as taxas de resfriamento mais lentas, ou seja, $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e $-3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, foram altamente prejudiciais à qualidade fisiológica das sementes de café, independentemente da temperatura final. Observa-se que na taxa de resfriamento de $-3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, as sementes só apresentaram sobrevivência quando foram pré-resfriadas até a temperatura final de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes da imersão em nitrogênio líquido. Dentre as taxas de resfriamento utilizadas, a que proporcionou alguma sobrevivência após criopreservação foi a mais rápida, ou seja, $-5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, até a temperatura final de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo que as sementes deste tratamento apresentaram 20% de plântulas normais no teste de germinação (Figura 3.1A).

De acordo com os resultados dos testes de vigor, protrusão radicular, plântulas com folhas cotiledonares expandidas e matéria seca de raiz e de hipocótilo (Figura 3.1, B-E), foi também observado que a taxa de resfriamento mais lenta, de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, foi extremamente prejudicial às sementes de *Coffea canephora*. A velocidade mais rápida de resfriamento, ou seja, $-5\text{ }^{\circ}\text{C}\text{ min}^{-1}$ combinada com a temperatura final de pré-congelamento, de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi a que proporcionou melhor resultado nas avaliações realizadas, resultados esses igualmente encontrados no teste de germinação (Figura 3.2A)

Segundo Berjak e Pammenter (2008) a escolha da velocidade e temperatura final de congelamento deve ser ajustada de acordo com a espécie e, geralmente, está entre uma taxa de 0,5-10 °C min.⁻¹ até a temperatura de aproximadamente -40 °C. No presente trabalho, a taxa de congelamento mais rápida, ou seja, -5 °Cmin⁻¹ foi a que proporcionou alguma sobrevivência das sementes de *Coffea canephora* Pierre, comparada à taxa mais lenta, de -1°C min⁻¹. Este resultado dá indícios de que uma velocidade maior do que -5 °C min⁻¹ pode ser mais apropriada para a criopreservação de sementes desta espécie. Devido ao fato da temperatura de nucleação da água ultra pura ser de aproximadamente -40 °C (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008), temperaturas abaixo desse valor podem ser prejudiciais às células, o que justifica o melhor resultado dessa temperatura encontrado neste trabalho.

O método de criopreservação baseado no resfriamento lento é um dos métodos mais usados em sementes, no qual consiste nas etapas de secagem, resfriamento do tecido vegetal a uma taxa controlada até uma temperatura de pré-congelamento, seguido a imersão em nitrogênio líquido e posterior reaquecimento (PAYNTER, 2000). Neste método, a cristalização das moléculas de água é iniciada nos espaços extracelulares, o que causa uma diferença no potencial hídrico, acarretando na migração das moléculas de água do meio intra para o extracelular (MAZUR, 2004; ENGELMANN, 2004). Se a taxa de resfriamento for suficientemente lenta e adequada para a espécie em questão, a perda de água acarretará na desidratação celular e o soluto intracelular concentrado permanecerá descongelado (MAZUR, 2004), desejável nos protocolos de criopreservação.

Nota-se com esses resultados a importância de encontrar um protocolo de criopreservação que seja apropriado para cada espécie, uma vez que há diferenças principalmente entre o tamanho das sementes. A velocidade de resfriamento aplicada pode não ser tão lenta ou tão rápida quanto esperado dependendo da espécie estudada, o que irá interferir nos resultados de germinação após imersão em nitrogênio líquido.

Pelo teste de tetrazólio (Figura 3.1F) foi possível observar maior sobrevivência dos embriões retirados das sementes resfriadas mais rapidamente, ou seja, -5 °C min⁻¹ e -3 °C min⁻¹, semelhante ao encontrado no teste de germinação. Observa-se sobrevivência dos embriões das sementes que foram resfriadas lentamente a -1 °C min⁻¹, enquanto que o resultado de germinação dessas sementes foi 0%. Esses resultados podem indicar uma maior sensibilidade dos tecidos do endosperma ao estresse da dessecação e do resfriamento, uma vez que os embriões apresentaram coloração no teste de tetrazólio enquanto que, no teste de germinação das sementes, não houve ocorrência de plântulas normais, corroborando com os resultados

encontrados por Dussert et al. (2001) e Coelho et al. (2015) e Coelho; Rosa e Fernandes, (2017).

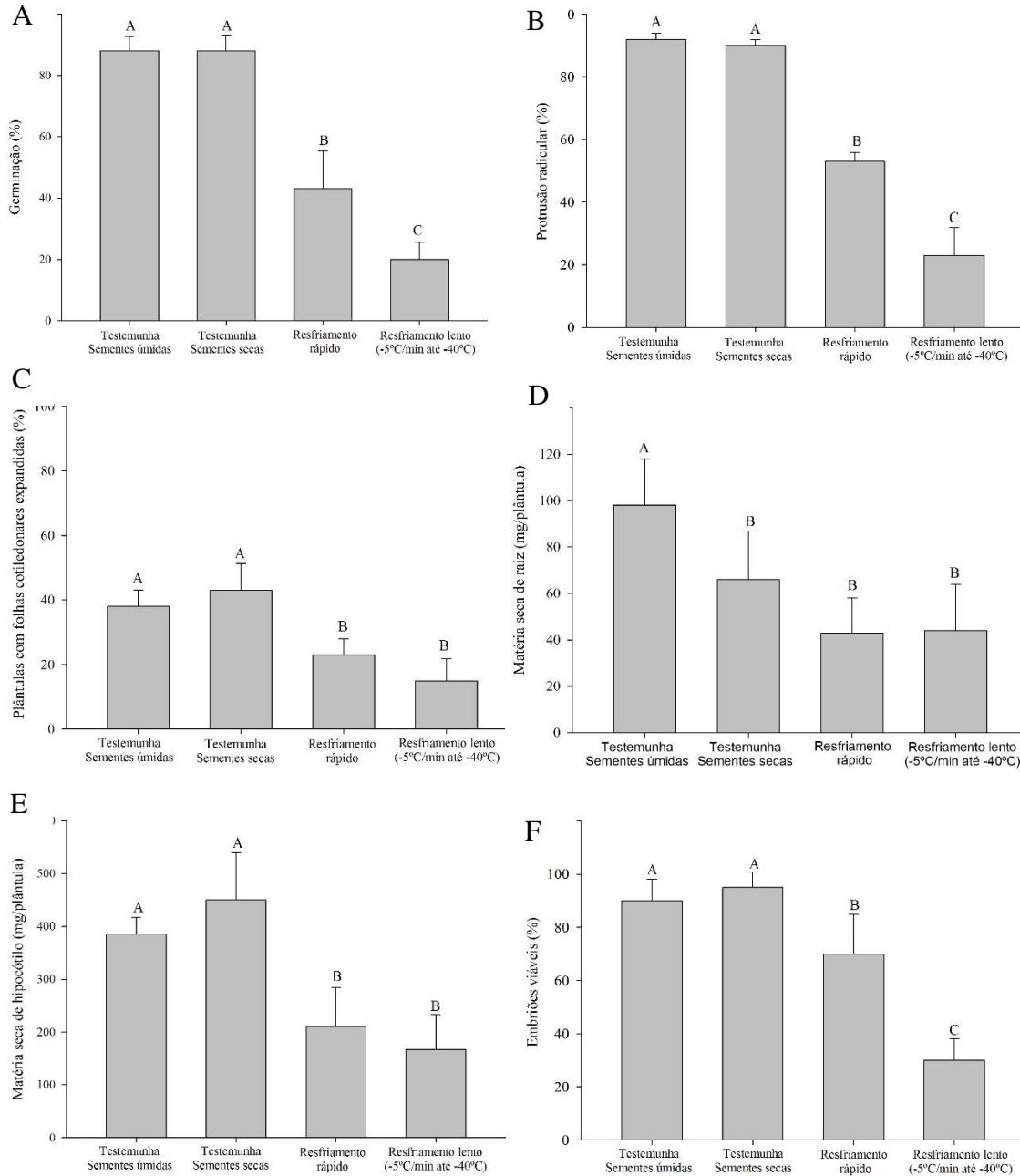
Segundo Dussert et al. (1998), a ocorrência de maiores danos aos endospermas comparado aos danos nos embriões durante a criopreservação, impede o fornecimento de nutrientes necessário ao crescimento do eixo embrionário, comprometendo assim a germinação e conseqüentemente a formação das plântulas.

De maneira geral, para todas as variáveis respostas analisadas no presente estudo, embora nenhum tratamento tenha resultado em bom desempenho fisiológico, a velocidade mais rápida de resfriamento, de $-5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, foi a mais eficiente, resultando em sementes com maiores valores de germinação e de vigor, principalmente quando foram pré-resfriadas até a temperatura final -40°C . Diferentemente dos resultados encontrados no presente trabalho, Dussert et al. (1997) observaram que a velocidade de resfriamento de $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até temperatura de -50°C proporcionou melhor viabilidade de sementes de *Coffea arabica* L., porém, apenas 30% se desenvolveram em plântulas normais. Igualmente, Figueiredo et al. (2017) em estudos sobre protocolos de criopreservação para sementes de *Coffea arabica* L., observaram que o pré-congelamento até -40°C a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ proporcionou melhor resultado, com 79% de plântulas normais. Ressalta-se que ocorrem diferenças entre espécies do gênero *Coffea*, sendo as sementes de *Coffea canephora* Pierre mais sensíveis a estresses do que as de *Coffea arabica* L. (EIRA; REIS; RIBEIRO, 2005; ROSA et al., 2005)

3.2 Segundo experimento - Comparação entre métodos de criopreservação por resfriamento lento e rápido

Na Figura 3.2 estão apresentados os resultados fisiológicos das sementes de *Coffea canephora* submetidas aos protocolos de criopreservação por resfriamento lento e rápido. À partir dos resultados do experimento anterior, foi selecionado o melhor resultado da velocidade e temperatura final de pré-resfriamento (Figura 3.1), ou seja, $-5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , antes da imersão em nitrogênio líquido. Este tratamento foi designado como sendo o método de criopreservação por resfriamento lento e foi comparado ao método de criopreservação por resfriamento rápido, em que as sementes foram secadas em sílica gel até $0,25\text{ g.g}^{-1}$ e imersas diretamente em nitrogênio líquido. Na Figura 3.2 são apresentados os resultados fisiológicos das sementes correspondentes a estes tratamentos, além dos resultados de sementes úmidas (não submetidas à secagem), com $0,72\text{ g.g}^{-1}$, e sementes que foram secadas em sílica gel até $0,25\text{ g.g}^{-1}$.

Figura 3.2 - Dados médios de germinação (A), protrusão radicular (B), plântulas com folhas cotiledonares expandidas (C), matéria seca de raiz (D) e de hipocótilo (E), e embriões viáveis pelo teste de tetrazólio (F), de sementes de *Coffea canephora* Pierre úmidas, com 0.72 g.g^{-1} e secas com 0.25 g.g^{-1} (base seca), e submetidas aos protocolos de criopreservação por resfriamento rápido e lento. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



Fonte: Do autor (2018)

Foi observado que, de um modo geral, a secagem até $0,25 \text{ g.g}^{-1}$ não prejudica à qualidade fisiológica das sementes de *Coffea canephora* Pierre (Figura 3.2). No entanto, houve uma redução no vigor dessas sementes, como observado na massa seca de raízes, cujo

valor foi estatisticamente inferior ao das sementes úmidas, não submetidas à secagem. Esta sensibilidade de sementes de *Coffea canephora* também foi observada por Rosa et al. (2005), que estudando o efeito da velocidade de secagem na qualidade fisiológica de sementes de *Coffea canephora* Pierre, observaram que a redução do teor de água das sementes provoca uma redução nos valores de germinação e vigor, independentemente da velocidade de secagem utilizada.

De acordo com a Figura 3.2, observa-se, também, que os dois protocolos de criopreservação, seja por resfriamento lento ou por imersão direta (resfriamento rápido) são prejudiciais às sementes de *Coffea canephora*. No entanto, o protocolo de criopreservação por congelamento rápido proporciona maior sobrevivência, com resultados de 43% de plântulas normais, quando comparado às sementes criopreservadas por congelamento lento. Esta maior sobrevivência foi confirmada em todas as variáveis respostas analisadas.

A utilização do congelamento rápido pode prevenir a formação de cristais de gelo, por meio da vitrificação, devido à alta velocidade de resfriamento utilizada, por volta de $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ minuto^{-1} (DUSSERT et al., 2001). Nestas condições, a água congelável remanescente nas células se transforma num sólido amorfo, não cristalizável e de alta viscosidade, impedindo que as moléculas de água se transformem em cristais de gelo (BENSON, 2008; ENGELMANN, 2011).

Em geral, as sementes das espécies recalcitrantes são grandes, e esse tamanho impede que o resfriamento seja rápido o suficiente para induzir a vitrificação, o que interfere no sucesso na criopreservação (BERJAK; PAMMENTER, 2013), sendo essa uma possível explicação da baixa germinação das sementes após resfriamento rápido. Ainda segundo Berjak e Pammenter (2013), para sementes recalcitrantes, é necessário que a secagem, o resfriamento e o reaquecimento sejam rápidos, para impedir a cristalização e recristalização nos espaços intracelulares.

Uma das vantagens de se utilizar o resfriamento rápido para criopreservar sementes consiste no fato de não ser necessária a utilização de equipamentos específicos para realizar o pré-resfriamento, o que eleva os custos do procedimento, além de ser mais trabalhoso (DUSSERT et al., 2012). Além de simplificar e tornar o processo mais econômico, no resfriamento rápido, por meio da imersão direta das sementes em nitrogênio líquido, o pré-resfriamento é eliminado, reduzindo também, o manuseio e possibilidades de estresses às sementes. Em sementes de *Coffea arabica* L., a simplificação do protocolo de criopreservação, com a imersão direta das sementes em nitrogênio líquido resultou em melhores resultados, conforme estudos de Coelho; Rosa e Fernandes (2017).

Por outro lado, Dussert et al. (1998) observaram que em sementes de *Coffea arabica*, apenas o resfriamento lento a $-2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -50°C resultou em plântulas normais, em estudo sobre o resfriamento rápido e lento na criopreservação de quatro espécies do gênero *Coffea*. Dussert et al. (2001) estudando a tolerância de sementes de nove espécies de *Coffea* à exposição ao nitrogênio líquido, observaram que para *Coffea canephora*, nenhuma plântulas normal foi formada após criopreservação das sementes, independentemente da taxa de congelamento utilizada. Dussert e Engelmann (2006) verificaram que realizar um pré-resfriamento antes da imersão em nitrogênio líquido favorece o aumento da tolerância de sementes de café à criopreservação. Entretanto, segundo Berjak et al (1989) e Wesley-Smith et al (1992), a secagem rápida seguido do congelamento rápido pode ser utilizado para a criopreservação de várias espécies sensíveis à dessecação.

3.3 Avaliações bioquímicas

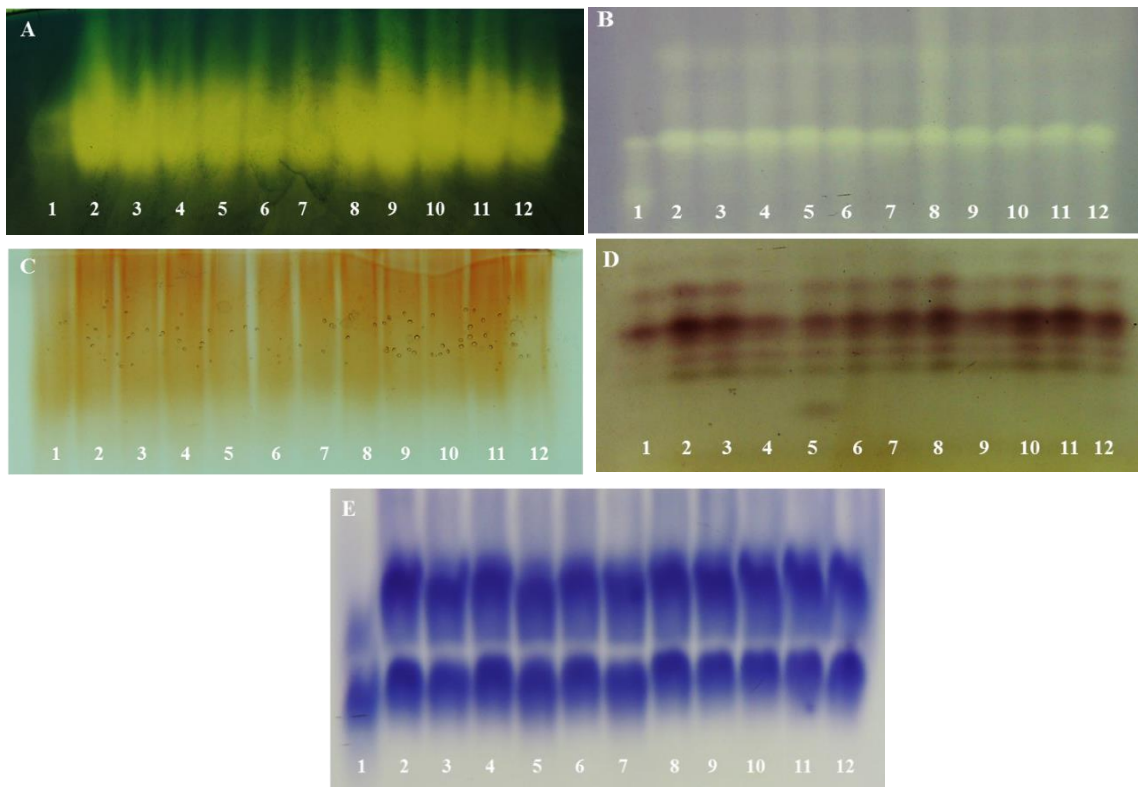
As alterações bioquímicas foram avaliadas por meio da análise do padrões eletroforético de izoenzimas (Figura 3.3), de todos os tratamentos estudados no presente trabalho.

Superóxido dismutase, catalase e peroxidase são enzimas conhecidas por atuarem removendo os radicais livres, também conhecidas como “scavengers”. Essas enzimas estão envolvidas em uma resposta antioxidativa por neutralizar o oxigênio tóxico nas células, formado durante as condições de estresses (WINSTON, 1990) e, dentre esses está a secagem e o resfriamento, a qual pode causar danos às sementes. Situações de estresse, como a remoção severa da água das células e o abaixamento abrupto da temperatura, induzem a processos oxidativos e produção de radicais livres, os quais são altamente reativos (HENDRY, 1993).

A enzima catalase (Figura 3.3A) apresentou maior atividade nos tratamentos 2, 9, 10 e 11, ou seja, nas sementes secas até $0,25 \text{ g.g}^{-1}$ sem criopreservação, e nas sementes que foram criopreservadas nas velocidades de resfriamento de $-5^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Observa-se que esses tratamentos são os que apresentaram maior sobrevivência das sementes, indicando assim que a atividade da catalase aumenta nos tratamentos de melhor desempenho fisiológico. Resultado semelhante foi encontrado por Brandão Júnior; Carvalho e Vieira, (1999), que a maior atividade da catalase pode estar relacionado à maior viabilidade das sementes. Como a catalase atua removendo os radicais livres, a exemplo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), decompondo-o em água (H_2O) e oxigênio (O_2) (GARG; MANCHANDA, 2009), uma maior

expressão desta pode ser indicativo de melhor qualidade fisiológica das sementes, com menores danos oriundos da criopreservação.

Figura 3.3 - Perfil eletroforético de isoenzimas da catalase (A), superóxido dismutase (B), peroxidase (C), esterase (D) e malato desidrogenase (E) em sementes de *Coffea canephora* Pierre submetidos a diferentes protocolos de criopreservação. Os tratamentos estão descritos na Tabela 1.



Fonte: Do autor (2018)

A superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima a atuar no sistema antioxidante, realizando a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (SINHA; SAXENA, 2006). De acordo com a Figura 3.3B, observa-se pequenas diferenças no perfil de expressão dessa enzima, exceto no tratamento 1, em que se observa menor atividade, caracterizado pelas sementes que não passaram pelo estresse da secagem e criopreservação. Resultado semelhante ao encontrado na expressão da enzima superóxido dismutase foi observado também para a peroxidase (Figura 3.3 C). Para essas enzimas, o efeito dos diferentes protocolos de criopreservação nas sementes de café foram insignificativos, não sendo observado diferença entre as atividades eletroforéticas. Nota-se com isso que os sistemas enzimáticos superóxido dismutase e peroxidase não são bons marcadores bioquímicos para o estudo de protocolos de criopreservação em sementes de *C. canephora*.

A esterase (Figura 3.3D) atua na hidrólise de ésteres, podendo atuar sobre fosfolipídeos de membranas em sementes (COELHO et al., 2015; SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2005). Neste trabalho, notou-se maior atividade dessa enzima nos tratamentos 2, 10 e 12, ou seja, aqueles que apresentaram maiores valores no teste de germinação. Segundo Nakada et al. (2010), a esterase é indicativo de deterioração em sementes, entretanto, neste trabalho o aumento da sua expressão não coincide com baixa qualidade fisiológica.

A atividade da enzima malato desidrogenase (MDH) (Figura 3.3E) foi semelhante em todos os tratamentos estudados, exceto para o tratamento 1, caracterizado pelas sementes úmidas. A MDH é uma enzima da rota respiratória e catalisa a reação do malato a oxalato na última reação do ciclo de Krebs (CONN; STUMPF, 1980). Brandão Júnior; Carvalho e Vieira (1999), observaram que a atividade da malato desidrogenase foi a menos afetada pelos tratamentos de envelhecimento acelerado em sementes de milho.

Em todas as enzimas estudadas, observa-se que o tratamento 1, caracterizado pelas sementes úmidas, a expressão é muito pequena, ou quase inexistente em algumas enzimas. Isso porque em células hidratadas, a água atua como um “amortecedor” entre os radicais livres e as macromoléculas alvo, reduzindo assim os danos (BENECH-ARNOLD; SÁNCHEZ, 2004).

Analisando todas as avaliações realizadas no presente trabalho, constata-se melhores resultados fisiológicos e bioquímicos em sementes submetidas aos protocolos de criopreservação 3, ou seja, secagem em sílica gel até $0,25 \text{ g.g}^{-1}$ e imersão direta em nitrogênio líquido, e reaquecimento a $40 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por dois minutos. Apesar da porcentagem de germinação alcançada com a criopreservação de sementes de *C. canephora* ainda ser baixa (40%), houve um progresso em relação aos estudos anteriores. Além de defasados, as pesquisas envolvendo conservação de sementes de *C. canephora* não foram satisfatórias e a sobrevivência das plântulas foi de 0% após criopreservação (DUSSERT et al., 2001; EIRA et al., 1999).

Em outras espécies recalcitrantes, a criopreservação por resfriamento rápido também é a melhor opção. Michalak; Plitta-Michalak e Chmielarz (2015) observaram que sementes de cereja toleram a criopreservação quando são secadas a um intervalo de teor de água entre $0,20$ e $0,25 \text{ g.g}^{-1}$ (bs) e são imersas diretamente em nitrogênio líquido.

4 CONCLUSÕES

As sementes de *Coffea canephora* respondem melhor a criopreservação por resfriamento rápido, ou seja, imersão direta em nitrogênio líquido, quando comparado ao resfriamento lento.

A secagem das sementes de *Coffea canephora* até o teor de água de 0,25 g.g⁻¹ não prejudica a viabilidade das sementes.

As enzimas catalase e esterase são bons marcadores bioquímicos para sementes de café criopreservadas e sua atividade é maior nas sementes de maior qualidade fisiológica.

AGRADECIMENTOS

À Capes, ao CNPq, à Fapemig, à Embrapa e à UFLA pelo financiamento do estudo e pela concessão de bolsas.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006. 627 p.
- BENECH-ARNOLD, R. L.; SÁNCHEZ, R. A. **Handbook of Seed Physiology: Applications to Agriculture**. New York: Food Products Press, 2004.
- BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant Cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, p. 15-32, 2008
- BERJAK, et al. Homoiohydrous (recalcitrant) seed: the enigma of their desiccation sensitivity and the state of water in axes of *Londolphia kirkii* Dyer. **Planta**, Berlin, v. 186, p. 249-261, 1989.
- BERJAK, P. PAMMENTER, N.W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 4, p. 478, 2013.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Cryostorage of germplasm of tropical recalcitrant-seeded species: Approaches and problems. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 29-39, 2014.
- BRANDÃO JÚNIOR, D. da S.; CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. G. C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 21, n. 1, p. 114-121, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA: SDA, 2009. 395 p.
- CLEMENTE, A. C. S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, 2011.
- COELHO, S. V. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, 2015.
- COELHO, S.V.B.; ROSA, S.D.V.F.; FERNANDES, J.S. Cryopreservation of coffee seeds: a simplified method. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 45, n. 3, p. 638-649, 2017
- CONN, E. E.; STUMPF, P. K. **Introdução à bioquímica**. São Paulo: E. Blucher, 1980.
- DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. New determinants for tolerance of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. **CryoLetters**, Cambridge v. 27, n. 3, p. 169-178, 2006.
- DUSSERT, S. et al. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature. **CryoLetters**, Cambridge, v. 18, n. 7, p. 269-276, 1997.

- DUSSERT, S. et al. Cryopreservation of seed of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 8, n. 1, p. 9-15, 1998.
- DUSSERT, S. et al. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition, and cooling procedure. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 112, n. 4, p. 495- 504, 2001.
- DUSSERT, S. et al. Biologie de la conservation des semences de caféiers: aspects fondamentaux et conséquences pratiques: une revue. **Cahiers Agricultures**, Les Ulis, v. 21, n. 2-3, p. 106-114, 2012.
- EIRA, M.T.S. et al. Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.11, n.2, p.97-105, 1999.
- EIRA, M. T. S.; REIS, R. B.; RIBEIRO, F. N. S. Banco de sementes de café em criopreservação: experiência inédita do Brasil, In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais eletrônicos...** Brasília: Embrapa Café, 2005. 1 CD-ROM
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour?: I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 9, p. 1167-1174, 1990.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, 2004.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 17-25, 2011.
- FERREIRA D.F. Sisvar: A guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.
- FIGUEIREDO, M.A. et al. Exploratory studies for cryopreservation of *Coffea arabica* L. seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v.39, n.2, p.150-158, 2017.
- GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosystems**, London, v. 143, n. 1, p. 81-96, 2009.
- GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 1-13, 2008.
- HENDRY, G. A. F. Oxygen and free radical processes in seed longevity. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 3, p. 141-153, Sept. 1993.
- KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science**, [s. l.] v.5, n. 6, p. 778–800, 2011.

MAZUR, P. Principles of cryobiology. In: FULLER, B. J.; LANE, N.; BENSON, E. E. (Eds.). **Life in the frozen state**. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2004, cap. 1, p. 3-65.

NAKADA, P. G. et al. Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 42-051, 2010.

MICHALAK, M.; PLITTA-MICHALAK, B. P.; CHMIELARZ, P. A new insight in desiccation tolerance and cryopreservation of mazzard cherry (*Prunus avium* L.) seeds. **Central European Journal of Biology**, Louisville, v. 10, n. 1, p. 354-364, 2015.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Historical Data on the Global Coffee Trade**. Disponível em: <http://www.ico.org/new_historical.asp?section=Statistics>. Acesso em: 02 dez. 2017.

PAMMENTER, N. W; BERJAK, P. Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 21-28, 2014.

PAYNTER, S. J. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. **Human Reproduction**, Oxford, v. 6, n. 5, p. 449-456, 2000.

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

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 104-114, 2005.

SINHA, S.; SAXENA, R. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. **Chemosphere**, Oxford, v. 62, n. 8, p. 1340-1350, 2006.

UEMURA, M.; MINAMI, A.; KAWAMURA, Y. Effect of low temperature and cryoprotectants on plant plasma membranes. In: International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species, 1., Leuven, **Programme and Abstracts**, Leuven: ISHS, 2009.

WALTERS, C. et al. Preservation of recalcitrant seeds. **Science**, Washington, v. 339, n. 6122, p. 915-916, 2013.

WESLEY-SMITH et al. Cryopreservation of desiccation-sensitive axes of *Camellia sinensis* in relation to dehydration, freezing rate and thermal properties of tissue water. **Plant physiology**. Bethesda, v. 140, n. 5, p. 596-604, 1992.

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

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

WINSTON, G. W. Physiochemical basics for free radical formation in cells: production and defenses. In: ALSCHER, R. G.; CUMMING, J. R. (Ed.). **Stressresponses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York: W. Liss, 1990.

CAPÍTULO 4

CRYOPRESERVATION OF COFFEE SEEDS: A SIMPLIFIED METHOD

ABSTRACT

Coffee seeds are sensitive to desiccation and to storage. Advances in the technique of cryopreservation of these seeds have been achieved in recent years, and the aim of this study was to evaluate *Coffea arabica* seeds cryopreserved through direct immersion in liquid nitrogen after rapid and slow drying. Seeds of the cultivars “Arara”, “Catiguá”, “Catuaí Amarelo” and “Mundo Novo” underwent rapid and slow drying to 20% moisture content (dry basis); they were then immersed in liquid nitrogen for 24 hours and after that, reheated in a water bath. *C. arabica* seeds have better physiological quality after slow drying, but rapid drying is better for cryopreservation of these seeds. The seeds of the cultivars investigated have different levels of tolerance, but all can be cryopreserved; “Catuaí Amarelo” is the most tolerant and “Arara” the most sensitive to cryopreservation, regardless of the drying speed. The activity of the enzymes catalase, peroxidase and esterase increased after drying and after cryopreservation. Rapid drying in silica gel to 20% moisture content, followed by direct immersion in liquid nitrogen, allows cryopreservation of coffee seeds in a fast, simple and economical manner.

1 INTRODUCTION

Conservation of plant genetic resources is an established and recognised priority worldwide because genetic variability of species is fundamental for development of new cultivars (PILATTI et al., 2011). Conservation of *Coffea arabica* L. germplasm is of great socioeconomic importance in Brazil because Brazil is the world's largest producer and exporter of this commodity (ABIC, 2016). Due to the intermediate or recalcitrant nature of *Coffea* seeds, they are conserved through *ex situ* germplasm banks in field plantings. This methodology, however, involves high maintenance cost; moreover, plants conserved in the field are vulnerable to pests, diseases and climatic factors (EIRA; REIS; RIBEIRO, 2005; DUSSERT et al., 2012).

Ex situ conservation through cryopreservation is the most promising technique for preservation of plant genetic resources for species that produce recalcitrant or intermediate seeds (DUSSERT et al., 2012; BERJAK; PAMMENTER, 2014). It is a method of conserving biological material in liquid nitrogen at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, or in its vapour phase at $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ after controlled dehydration (BERJAK; PAMMENTER, 2014). This procedure prevents metabolic reactions, ensuring viability in storage for an indeterminate period of time without losing the physiological quality (ENGELMANN, 2011).

Drying seeds to an ideal seed moisture content before cryopreservation is fundamental for success because this avoids formation of ice crystals in the intracellular space (KAVIANI, 2011). The ideal moisture content is necessary for vitrification whereby water becomes a non-crystalline, supersaturated, amorphous and metastable solid, thus impeding rupture of cells by ice crystals (ENGELMANN, 2011). However, in intermediate species such as *Coffea arabica* L., the rate of water removal can bring about irreversible damage to cells and compromise seed viability (KOHOMA et al., 2006). Dussert et al. (1998, 2002) and DUSSERT; ENGELMANN (2006) showed that the moisture range within which *C. arabica* seeds can be cryopreserved and then show high viability ($> 80\%$) after thawing is very narrow, between 0.20 and 0.22 g H₂O g⁻¹ dry weight. However, the rate at which water is removed from the seeds to achieve the percentage of moisture adequate for cryopreservation has not yet been clarified. According to Coelho et al. (2015), the drying rate and the residual water content in the seeds are essential factors and they must be considered when studying protocols for conservation of coffee seeds.

Exposure of seeds to stress conditions, such as cryopreservation, can promote physiological and biochemical changes. Free radicals are the main causes of damage to the

membrane system and to macromolecules, causing change in metabolic processes, ionic imbalance, and induction of cell death through apoptosis (ENGELMANN, 2011). Reactive-oxygen-species-removing enzymes, such as catalase, superoxide dismutase and peroxidase, among others, can mitigate or reverse damage caused by these stresses, which makes biochemical studies important for elucidating the effect of cell damage caused by cryopreservation (BERJAK, 2006; DUSSERT; ENGELMANN, 2006).

In recent years, significant advances have been achieved in relation to use of the cryopreservation for coffee seeds (DUSSERT et al., 1997, 1998, 2000, 2003, 2012; EIRA; REIS; RIBEIRO, 2005; DUSSERT; ENGELMANN, 2006). However, the best results from cryopreservation were obtained after drying seeds in saturated saline solutions. Hence it is important to try and simplify this technique and to study the tolerance to cryopreservation of seeds of the main coffee cultivars currently cultivated in Brazil.

Given the importance of preserving coffee genetic resources and the absence of studies on the effect of drying rate on seed cryopreservation, the aim of this study was to evaluate seeds from different cultivars of *C. arabica* after cryopreservation by direct immersion in liquid nitrogen after rapid and slow drying.

2 MATERIALS AND METHODS

Seeds of four commercial cultivars of *C. arabica*, “Arara”, “Catiguá”, “Catuaí Amarelo” and “Mundo Novo”, from the 2014/2015 crop season were used. The fruits were harvested on the Procafé Experimental Farm in Varginha, Minas Gerais, at an altitude of 980 m a.s.l., with a subtropical highland climate (Cwb), according to the Köppen classification. Coffee fruits in the cherry stage were selectively harvested from plants of the coffee cultivars (grown under the same climate and management practices) from the middle part of the middle branches. After harvest, the fruits were selected to standardise the stage of maturity, and they were mechanically pulped. Mucilage was removed from the seeds by fermentation in water for 24 hours (fully washed) and they were pre-dried in the shade for removal of surface moisture. Seed size was standardised by taking seeds from circular mesh sieves no. 18/64 and 20/64; seeds of bigger or smaller size were discarded.

After hulling, the seeds were dried to 20% moisture content (dry basis) because this is the moisture content recommended for cryopreservation of coffee seeds according to previous studies (DUSSERT et al., 1997, 1998, 2000, 2003, 2012; EIRA; REIS; RIBEIRO, 2005; DUSSERT; ENGELMANN, 2006). Two types of drying, rapid and slow, were used. The two

types of drying were performed in a hermetic environment on screens in acrylic boxes, “gerbox type”, that were sealed with PVC film to prevent the ingress of atmospheric air.

For rapid drying, the seeds were arranged in a single layer on metal screens in the boxes; the boxes contained activated colour-indicator silica gel below the screen. During drying, the silica was exchanged before it changed colour. For slow drying, the seeds were arranged in the same manner, but in boxes containing saturated NaCl solution (75% relative humidity). The containers were sealed and kept in B.O.D. incubators at 25°C. Water loss during drying was monitored by repeatedly weighing on a precision balance with 0.001 g readability until the seeds reached the desired moisture content.

The dry seeds, with 20% moisture content were then placed in tri-laminate aluminum packages and directly immersed in a tank containing liquid nitrogen (ultra-rapid freezing). After 24 hours of cryopreservation, the packages containing the seeds were removed and the seeds were thawed in a water bath at 40°C for two minutes (DUSSERT et al., 1998). In the thawing process, the seeds were quickly removed from their respective packages and immersed directly in the water bath. After that, they were dried in paper towels and their parchments were manually removed. The seeds then underwent physiological and biochemical evaluation.

The moisture content of the seeds was determined by drying samples in a laboratory oven at 105 °C for 24 hours (BRASIL, 2009); the results are expressed as percentages based on the dry weight of the seeds.

The physiological quality of the seeds was evaluated by the percentage of normal seedlings, of seedlings with expanded cotyledonary leaves, of embryo viability in the tetrazolium test and by seedling dry matter.

The germination test was conducted with four replications of 25 seeds between sheets of paper, moistened with water at 2.5 times the weight of the dry paper. The seeds were kept in a seed germinator at 30 °C, and the percentage of normal seedlings was evaluated after 30 days (BRASIL, 2009). Forty-five days after the beginning of the germination test, the number of seedlings with expanded cotyledonary leaves was counted, and the results were expressed in percentage.

Seedling dry matter was also determined 45 days after the start of the germination test, when the hypocotyl-radicle axes of the normal seedlings were isolated, placed in paper bags and dried in an air-circulation laboratory oven at 60 °C for five days. After this period, the root and shoot dry matter of the seedlings was determined, and the results were expressed in milligrams per seedling.

In the tetrazolium test, four replications of 10 seeds were used, which were soaked in distilled water for 48 hours at 30 °C (CLEMENTE et al., 2011). After soaking, the embryos were removed with a scalpel to prevent damage to them. They were immersed in a tetrazolium solution at 0.5% in the absence of light for three hours, at which time the staining pattern was evaluated. The results are expressed as percentage of viable embryos.

For biochemical analyses, the seeds were macerated in liquid nitrogen in the presence of polyvinylpyrrolidone and the samples were stored at -86 °C (deep-freezing) until the analysis. The methodology proposed by Alfenas (2006) was used for extraction, electrophoresis and determination of catalase (CAT), peroxidase (PO) and esterase (EST).

A completely randomised experimental design was used in a 2 × 4 factorial arrangement, consisting of two types of drying (rapid and slow) and four cultivars, with four replications. The results of the physiological tests were subjected to ANOVA using SISVAR (FERREIRA, 2011). The means were compared by the Scott-Knott test at 5% probability.

3 RESULTS

3.1 Results of evaluation after drying of seeds

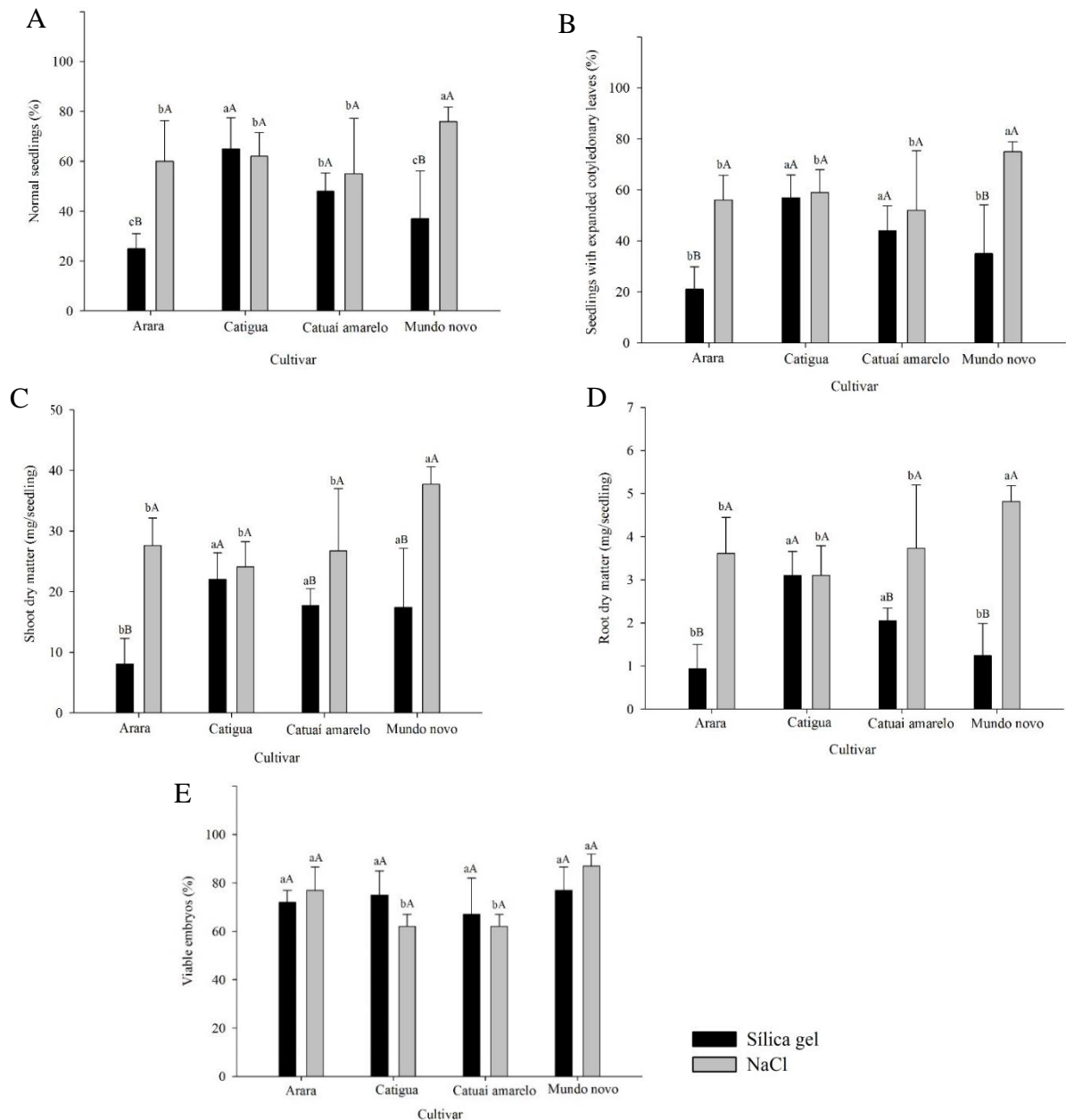
Seeds of coffee cultivars “Arara”, “Catiguá”, “Catuaí Amarelo” and “Mundo Novo” had an initial moisture content of 59, 61, 54 and 59 % (dry basis), respectively, and germination of 69, 83, 75 and 75 %, respectively. Seeds that were dried rapidly over silica gel took 49 hours to reach 20% moisture; seeds that were slowly dried over NaCl took 162 hours to reach the same moisture content. The drying rate decreased as the seeds lost water, but mean drying rate was 0,775% hour⁻¹ with rapid drying and 0.234% hour⁻¹ with slow drying.

Analysis of variance of the results of the evaluations after drying showed significant interaction effects of drying rate and cultivar for all the response variables (Figure 4.1). The results of evaluation of normal seedlings and seed vigour (Figure 4.1A-D) showed that slower drying led to better results compared with rapid drying for “Arara”, “Catuaí Amarelo” and “Mundo Novo”. For “Catiguá”, the drying rate did not affect germination and seed vigour. “Mundo Novo” was more tolerant to desiccation than the other cultivars when seeds were dried slowly.

The tetrazolium test did not identify differences depending on the drying rate for the four cultivars (Figure 4.1E). Seeds of “Arara” that were dried in silica gel had a high

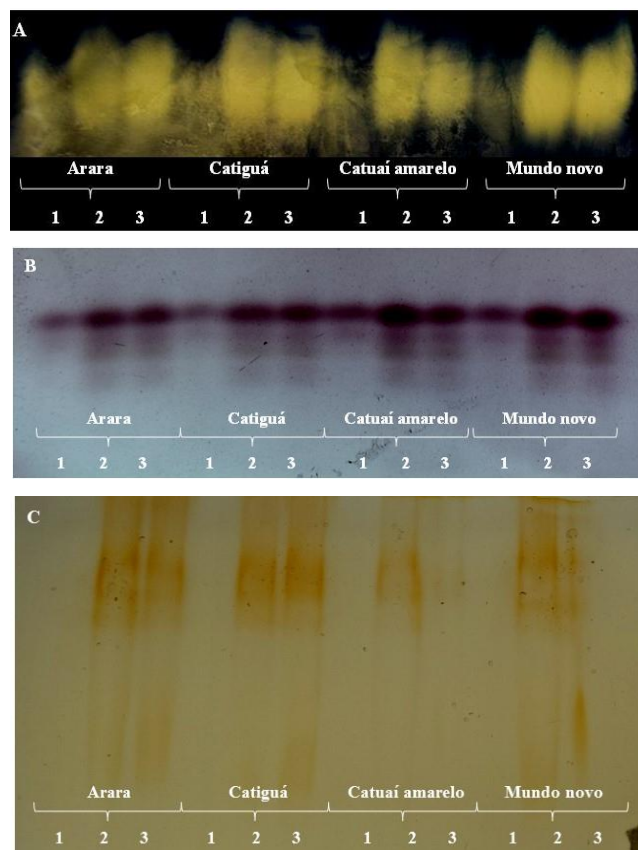
percentage of viable embryos, even though they had low physiological performance in the germination test.

Figure 4.1 - Mean percentage of normal seedlings (A) and of seedlings with expanded cotyledonary leaves (B), mean weight of shoot dry matter (C) and root dry matter (D) in the germination test, and embryo viability in the tetrazolium test (E) of seeds from four cultivars of *Coffea arabica* after drying in silica gel and in saturated saline solution. Uppercase letters compare the type of drying within the same cultivar; lowercase letters compare the cultivars within the same type of drying.



For all four cultivars, undried seeds had the lowest catalase activity (Figure 4.2A). When the coffee seeds were dried, at both the more rapid and slower rate, an increase in expression of this enzyme was observed. Similarly, greater intensity of the esterase bands was observed for the dry seeds, especially for “Catuaí Amarelo” and “Mundo Novo” (Figure 4.2B). For “Arara” and “Catiguá”, there was also an increase in activity after drying the seeds, however, without apparent differences in expression between seeds that were subjected to rapid or slow drying. The cultivars “Catuaí Amarelo” and “Mundo Novo” had greater expression in seeds dried more rapidly.

Figure 4.2 - Levels of catalase (A), esterase (B) and peroxidase (C) in seeds of four commercial cultivars of *Coffea arabica* before and after drying determined by electrophoresis. Lanes labeled 1 = control (moist seeds, without drying); lanes labeled 2 = seeds dried quickly over silica gel; lanes labeled 3 = seeds dried slowly over saturated NaCl solution.



Fonte: Do autor (2018)

There was an increase in levels of peroxidase upon drying; moist seeds had very low or no activity compared with dry seeds (Figure 4.2C). Of the four cultivars studied, “Catuaí Amarelo” and “Mundo Novo” had lower expression of this enzyme after slow drying. The cultivars “Arara” and “Catiguá” had greater expression after fast drying.

3.2 Results of evaluation after cryopreservation of seeds

Analysis of variance of the data after cryopreservation showed significant interaction effects of drying rate and cultivar for all the response variables (Figure 4.3). In contrast to the effects of drying alone on seed quality, rapid drying in silica gel was more favourable for cryopreservation than slow drying, except for the cultivar “Catuaí Amarelo”, for which there was no difference between the slow- and fast-dried seeds (Figure 4.3A-D). Seeds of “Catuaí Amarelo” dried in silica gel had greater tolerance to cryopreservation, regardless of the manner of drying. Seeds of “Arara” were most sensitive to the effects of cryopreservation, based on the results of the germination test (Figure 4.3A).

In the tetrazolium test, in which the viability of coffee embryos is evaluated (Figure 4.3E), no significant differences were found depending on the method of drying or on cultivar, except seeds of “Catiguá” that were dried slowly, had relatively low embryo viability. The results of the tetrazolium test also showed greater physiological quality of the coffee embryos compared with the physiological quality of the seeds for all the cultivars studied, regardless of the type of drying.

Figure 4.3 - Mean percentage of normal seedlings (A) and of seedlings with expanded cotyledonary leaves (B), mean weight of shoot dry matter (C) and root dry matter (D) in the germination test, and embryo viability in the tetrazolium test (E) of seeds from four commercial cultivars of *Coffea arabica* after cryopreservation. Uppercase letters compare the type of drying within the same cultivar; lowercase letters compare the cultivars within the same type of drying. (Continue)

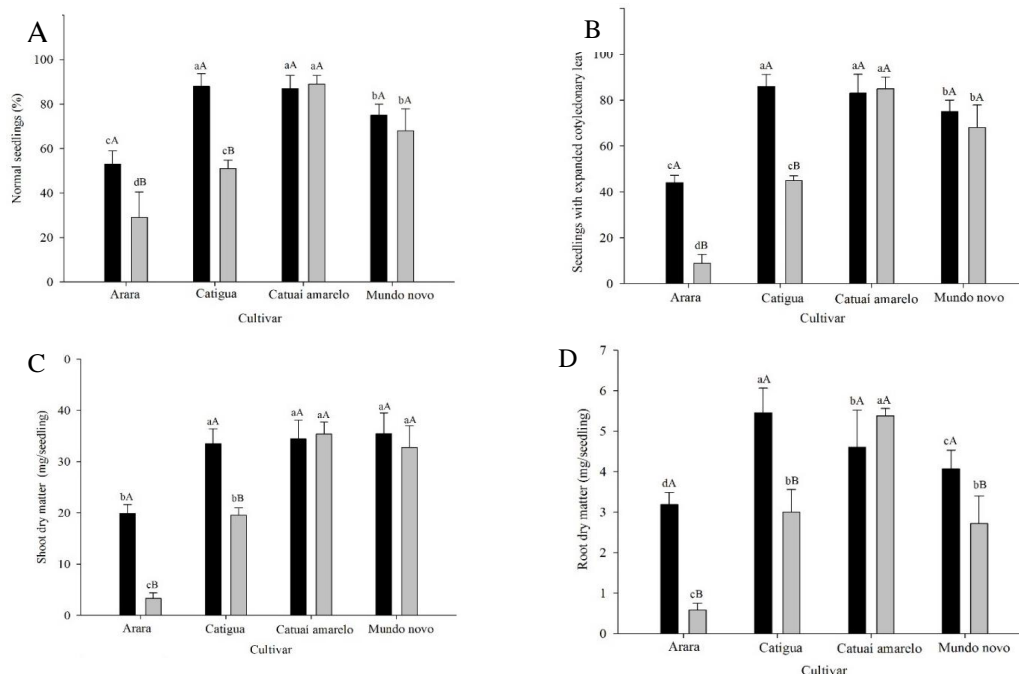
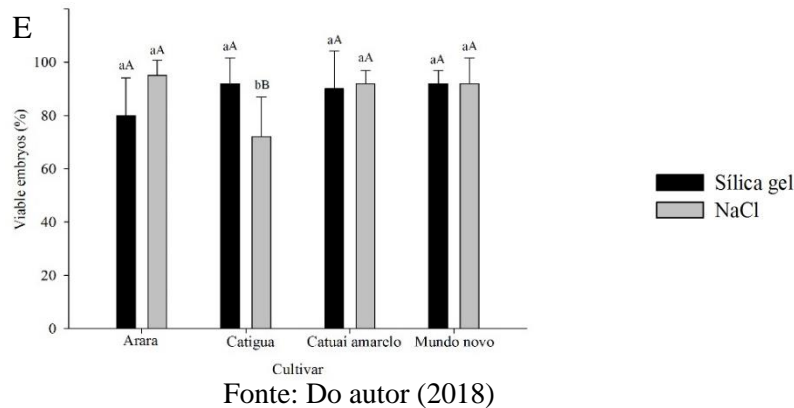


Figure 4.3 - Mean percentage of normal seedlings (A) and of seedlings with expanded cotyledonary leaves (B), mean weight of shoot dry matter (C) and root dry matter (D) in the germination test, and embryo viability in the tetrazolium test (E) of seeds from four commercial cultivars of *Coffea arabica* after cryopreservation. Uppercase letters compare the type of drying within the same cultivar; lowercase letters compare the cultivars within the same type of drying. (Conclusion)



The electrophoretic profile of CAT showed, for all cultivars, that the undried seeds (control) had low activity compared with the dried and cryopreserved seeds (figure 4A). Esterase had a result similar to that of CAT, in which expression increased after cryopreservation of the seeds, for all the cultivars (figure 4B). Greater band intensity in the slowly dried and cryopreserved seeds was observed for “Arara”. The cultivars “Catuai Amarelo” and “Mundo Novo” had a result opposite to that of the cultivar “Arara”, in which rapidly dried and cryopreserved seeds had greater expression of this enzyme.

Seeds of the control treatment of all cultivars did not show any PO activity (figure 4C). The cryopreserved seeds of “Catuai Amarelo” also did not show expression of PO. The cryopreserved seeds of “Catigua” did not show different expression of PO in seeds dry in silica gel and saturated NaCl solution.

Figure 4.4 - Levels of catalase (A), esterase (B) and peroxidase (C) in seeds of four commercial cultivars of *Coffea arabica* after cryopreservation determined by electrophoresis. Lanes labeled 1 = control (moist seeds, without drying); lanes labeled 2 = seeds dried quickly over silica gel and immersed in liquid nitrogen; lanes labeled 3 = seeds dried slowly over saturated NaCl solution and immersed in liquid nitrogen. (Continue)

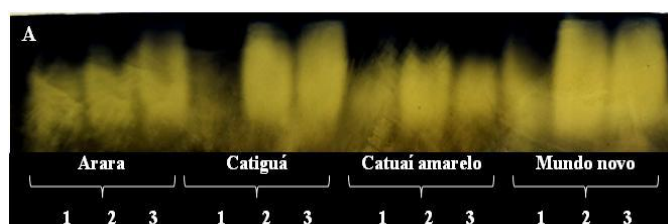
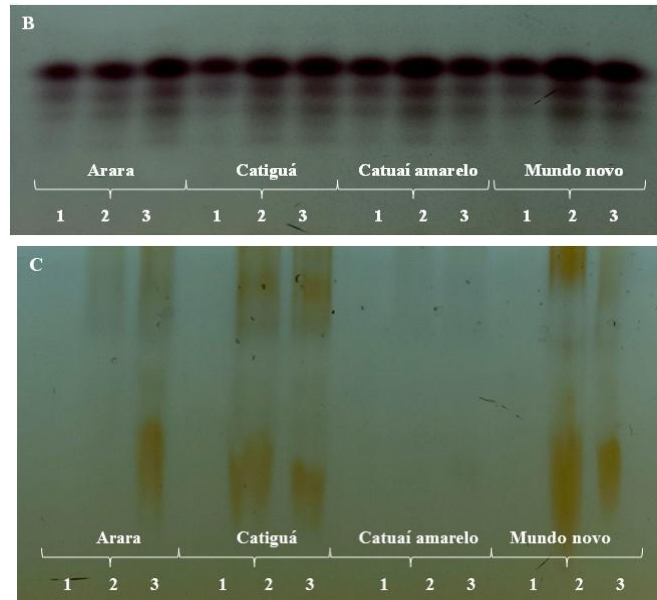


Figure 4.4 - Levels of catalase (A), esterase (B) and peroxidase (C) in seeds of four commercial cultivars of *Coffea arabica* after cryopreservation determined by electrophoresis. Lanes labeled 1 = control (moist seeds, without drying); lanes labeled 2 = seeds dried quickly over silica gel and immersed in liquid nitrogen; lanes labeled 3 = seeds dried slowly over saturated NaCl solution and immersed in liquid nitrogen. (Conclusion.)



Fonte: Do autor (2018)

4 DISCUSSION

The results of this study show that *C. arabica* seeds have superior physiological quality after slow drying, but rapid drying is recommended for cryopreservation of the seeds of this species (figure 1 and 3). José et al. (2011) studied the best method for drying seeds of *Magnolia ovata* (a species with intermediate seed behaviour, like coffee seeds) and observed that germination is reduced more by rapid drying than by slow drying for the same moisture content, corroborating the results found in this study. However, according to Walters et al. (2008), when dehydration is faster, there is not enough time for accumulation of the damage that occur during drying, that is, the tissue are at moisture contents in which degradation processes can occur for a shorter time and before damage can accumulate to harmful levels.

Zhang et al. (2014) investigated the effects of cryopreservation on the physiological quality of seeds of *Citrus paradisi* Macfad., another species with intermediate seeds, and also found that seeds dried in silica gel had greater viability after exposure to liquid nitrogen compared with those dried in saturated saline solutions. That result is similar to the result of the present study, in which rapid drying in silica gel is better than slower drying in saturated

saline solution (75% relative humidity) for cryopreservation of coffee seeds (figure 3). According to Pammenter and Berjak (2014), slow drying induces the loss of viability at higher moisture contents, whereas seeds dried more rapidly can survive the lower moisture content, which is sufficient to allow vitrification of the residual intracellular solution and hence prevent the formation of ice crystals.

Based on the results of the present study with different cultivars, coffee seeds can be cryopreserved but have different levels of tolerance to immersion in liquid nitrogen; “Catuaí Amarelo” is the most tolerant and “Arara” is the most sensitive to immersion in liquid nitrogen, regardless of the drying rate of the seeds (figure 3). Due to the narrow genetic base of cultivars of *C. arabica*, there is a great deal of similarity between parental lines, and, in many cases, genotypic and phenotypic discrimination is difficult. Nevertheless, the seeds of the cultivars investigated in this study had different responses to the drying and cryopreservation process. It is noteworthy that in this study the results of the germination test performed on the seeds after drying were inferior to the results in the seeds after cryopreservation (figures 1 and 3). These results indicate that cryopreservation acted in a beneficial manner in coffee seeds that had lower physiological quality before immersion in liquid nitrogen. The causes of this response should be investigated further, but there are signs that the beneficial effects occurred in the endosperm of the coffee seeds since the embryos isolated from those seeds had high viability in the tetrazolium test (figure 1E).

The results of the tetrazolium test also showed greater physiological quality of the coffee embryos compared with the physiological quality of the cryopreserved seeds, for all the cultivars studied (figure 3). This indicates that the endosperms are more sensitive than the embryos to damage that occurred during drying and immersion in liquid nitrogen. The embryos isolated from seed lots that had low percentages of normal seedlings due to the damage from drying and immersion in liquid nitrogen showed high percentages of viability in the tetrazolium test.

Rapid drying to 20% moisture content (dry basis), followed by direct immersion in liquid nitrogen and later reheating in a water bath for two minutes allowed effective cryopreservation of coffee seeds, and this protocol is faster and simpler than the protocols used in other studies. Dussert et al. (2001) found that slow cooling at $1^{\circ}\text{C minute}^{-1}$ to -40°C in a biofreezer is better than direct immersion in liquid nitrogen for coffee seeds dried using a saturated saline solution of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (81% RH) to $0.20 \text{ gH}_2\text{O g}^{-1}$ dry weight, the same moisture content used in this study. Eira et al. (1999) found different levels of tolerance among four *C. arabica* cultivars to exposure to -150°C after drying in an NaCl saturated

saline solution, to moisture content of around $0.20 \text{ gH}_2\text{O g}^{-1}$ dry weight, rather placing the seeds directly in contact with the vapor phase of the liquid nitrogen. The activity of CAT, PO and EST increased with drying and upon cryopreservation of the *C. arabica* seeds. Catalase is a redox isoenzyme and acts in removal of free radicals during oxidative stresses (BERJAK, 2006). Its greater activity may be related to greater intensity of damage that occurs during seed drying, indicating that drying causes an increase in free radicals in cell metabolism. This requires the expression and action of these enzymes, preparing the defense mechanism in seeds and protecting them against damage to tissues.

Lower activity of CAT in coffee seeds that did not undergo physiological stress was also found by Santos et al. (2014) and Abreu et al. (2014), confirming that loss of seed viability during the drying and cryopreservation is followed by an increase in the levels of reactive oxygen species (ROS) due to the physiological stress that occurred.

Esterase is also important as an indicator of seed deterioration (NAKADA et al., 2010). According to Russell et al. (2011), this enzyme is part of the different plant metabolic processes because it acts in ester hydrolysis and lipid metabolism. In spite of the EST enzyme having an important catalytic function in cell disintoxication, its activity may indicate seed deterioration (RUSSEL et al., 2011).

The enzymatic system of peroxidase also plays a fundamental role in the cleaning mechanism of ROS because it uses hydrogen peroxide as an electron acceptor (TAVEIRA et al., 2012). In the *C. arabica* seeds in this study, changes were observed in the profiles of PO, with an increase in the expression of the enzyme during the drying process (figure 2D). Moist seeds did not show activity or showed very low activity compared with seeds that underwent drying, indicating that this enzyme is activated when the tissues pass through the stress of water loss. Among the four cultivars studied, “Catuaí Amarelo” and “Mundo Novo”, which had the lowest expression of PO after slow drying, also had the best physiological quality. According to Abreu et al. (2014), in moist seeds, the enzymatic mechanisms of repair against free radicals such as CAT and PO are not activated, which explains the absence of expression of PO in the seeds that did not undergo drying.

ACKNOWLEDGMENTS

Our thanks to Embrapa Café, to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico (CNPq), to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and to the Universidade Federal de Lavras (UFLA).

REFERENCES

- ABREU, L. A. S. et al. Behavior of coffee seeds to desiccation tolerance and storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 4, p. 399-406, 2014.
- ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006. 627 p.
- Abic (2016). Associação Brasileira da indústria de café.[Brazilian Association of the coffee industry]. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#5103>. Acesso em: 19 ago. 2016.
- BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 16, n. 1, p. 1-15, 2006
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Cryostorage of germplasm of tropical recalcitrant-seeded species: Approaches and problems. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 29-39, 2014.
- BRASIL (2009). Regras para análise de sementes. [Seed analysis guidelines], Brasília, DF., Brasil.
- CLEMENTE, A. C. S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, 2011.
- COELHO, S. V. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, 2015.
- DUSSERT, S. et al. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature. **CryoLetters**, Cambridge, v. 18, n. 7, p. 269-276, 1997.
- DUSSERT, S. et al. Cryopreservation of seed of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 8, n. 1, p. 9-15, 1998.
- DUSSERT, S. et al. Beneficial effect os post-thawing osmoconditioning on the recovery of cryopreserved coffee (*Coffea arabica* L.) seeds. **CryoLetters**, Cambridge, v. 21, n. 1, p. 47-52, 2000.
- DUSSERT, S. et al. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition, and cooling procedure. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 112, n. 4, p. 495- 504, 2001.
- DUSSERT, S. et al. Cryopreservation of *Coffea* (Coffee) In: TOWILL, L.E.T.; Bajaj, Y.P.S. (Eds). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Cryopreservation of Plant Germplasm II**. v. 50, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002. p. 224-233.

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

DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. New determinants for tolerance of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. **CryoLetters**, Cambridge, v. 27, n. 3, p. 169-178, 2006.

DUSSERT, S. et al. Biologie de la conservation des semences de caféiers: aspects fondamentaux et conséquences pratiques: une revue. **Cahiers Agricultures**, Les Ulis, v. 21, n. 2-3, p. 106-114, 2012.

EIRA, M.T.S. et al. Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.11, n.2, p.97-105, 1999.

EIRA, M. T. S.; REIS, R. B.; RIBEIRO, F. N. S. Banco de sementes de café em criopreservação: experiência inédita do Brasil, In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais eletrônicos...** Brasília: Embrapa Café, 2005. 1 CD-ROM

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 17-25, 2011.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

JOSÉ, A. C. et al. Effects of drying rate and storage time on *Magnolia ovata* Spreng. seed viability. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 39, n. 2, p. 425-434, 2011.

KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science**, [s. l.] v.5, n. 6, p. 778-800, 2011.

KOHOMA, S. et al. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* LAM. (Grumixameira). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 72-78, 2006.

NAKADA, P. G. et al. Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 42-051, 2010.

PAMMENTER, N. W; BERJAK, P. Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 21-28, 2014.

PILATTI, F. K. et al. In vitro and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 82-98, 2011.

RUSSELL, R. J. et al. The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. **Evolutionary Applications**, v. 4, n. 2, p. 225-248, 2011.

SANTOS, F. C. et al. Desiccation sensitivity from different coffee seed phenological stages. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 25-31, 2014.

TAVEIRA, J. H. S. et al. Perfis proteicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Piracicaba, v. 47, n. 10, p. 1511-1517, 2012.

ZHANG, N. et al. Low-temperature storage and cryopreservation of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad.) seeds. **CryoLetters**, Cambridge, v. 35, n. 5, p. 418-426, 2014.

WALTERS, C. et al. Cryopreservation of recalcitrant (i.e. desiccation-sensitive) seeds. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant Cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008, p. 465-484.