

## SENSIBILIDADE DE DIFERENTES PARTES DE SEMENTES DE CAFÉ À DESSECAÇÃO E A TEMPERATURAS SUBZERO<sup>1</sup>

Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa<sup>2</sup>; Stefania Vilas Boas Coelho<sup>3</sup>; Aline da Consolação Sampaio Clemente<sup>4</sup>; Madeleine Alves de Figueiredo<sup>5</sup>; Luis Filipe Serafim Coelho<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Trabalho financiado pelo Embrapa Café, Consórcio Nacional de Pesquisa – CNPq, Capes e Fapemig.

<sup>2</sup> Pesquisadora, DSc, Embrapa Café, Brasília-DF, sttela.rosa@embrapa.br

<sup>3</sup> Bolsista Capes, MS, Universidade Federal de Lavras, stefaniavbc@gmail.com

<sup>4</sup> Bolsista Fapemig, DSc, Universidade Federal de Lavras, alineagrolavras@gmail.com

<sup>5</sup> Bolsista Capes, MS, Universidade Federal de Lavras, madeleine\_dede@yahoo.com.br

<sup>6</sup> Bolsista, Universidade Federal de Lavras, iflipesc@gmail.com

**RESUMO:** Sementes de café apresentam sensibilidade à dessecação e baixo potencial de armazenamento, sendo classificadas como intermediárias. O armazenamento de diversas espécies à temperatura subzero é uma alternativa para conservar sementes a longo-prazo em bancos de Germoplasma. Entretanto, esta técnica ainda não é segura para espécies de comportamento intermediário como o caso de sementes de café. Objetivou-se com este trabalho avaliar as alterações fisiológicas em sementes de *Coffea arabica* L. armazenadas em temperaturas abaixo de zero. O trabalho foi conduzido no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e sementes de *Coffea arabica* L., Cv. Catuaí Amarelo IAC62 da safra 2012/2013 foram utilizadas. Antes do armazenamento, as sementes foram submetidas a dois tipos de secagem, rápida em sílica gel e lenta em solução salina saturada, até que as sementes atingissem teores de água de interesse, 40, 30, 20, 15, 10, 5% base úmida (bu). Após a secagem, as sementes foram equilibradas às temperaturas de 10, -20 e -86°C, durante 24 horas. A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada por meio da porcentagem de plântulas normais e viabilidade no teste de tetrazólio. Sementes com 40 e 10 % de umidade e armazenadas a 10 °C exibem desempenho fisiológico superior, independentemente da velocidade de secagem. Após a exposição a -20°C, sementes com teor de água entre 10 e 30 % e secadas mais rapidamente apresentam germinação acima de 70%. No entanto, em teores de água extremos (40 e 5 %), apenas os embriões sobrevivem à exposição a esta temperatura. Apenas as sementes submetidas à secagem rápida até 20% de umidade podem sobreviver à exposição à temperatura de -86°C. O baixo desempenho fisiológico de sementes de café com 5% de teor de água após exposição às temperaturas sub zero pode estar ligado à sensibilidade do endosperma, uma vez que os embriões são viáveis no mesmo teor de água.

**PALAVRAS-CHAVE:** Qualidade fisiológica, embrião, endosperma, tetrazólio.

### SENSITIVITY TO DESICCATION OF DIFFERENT PARTS OF COFFEE SEEDS

**ABSTRACT:** Coffee seeds exhibit sensitivity to desiccation and low storage potential and are classified as intermediate. Cooling seed of several species to subzero temperatures is an alternative for storing seeds for long periods of time in Gene bank. However, this technique is still not entirely safe for species of intermediate characteristics such as coffee seed. This research aimed to study the physiological changes in *Coffea arabica* seeds cooled to temperatures above zero. The work was performed at the Laboratory of Seed Analysis of the Universidade Federal de Lavras (UFLA). Seeds of 2012/2013 crop of *Coffea arabica* L. Catuaí amarelo IAC 62 were used. Prior to cooling, the seeds were subjected to two types of drying, rapid drying in silica gel and slow drying in saturated salt solutions until the seeds reached the water content of interest, 40, 30, 20, 15, 10, 5% (wet basis-wb). After drying the seeds were incubated for equilibrating at temperatures of 10, -20 and -86 °C, during 24 hours. The physiological quality of seeds was performed by percentage of normal seedlings and embryo viability in the tetrazolium test. At 40 and 10% wb and stored at 10 °C, coffee seeds exhibit higher physiological performance, regardless of the speed of drying. After exposure to -20 °C, seeds with water content between 10 e 30% wb dried more rapidly present germination above 70%. However, extremes water content (40 and 5%) only the embryos survive to exposure to this temperature. Only the seeds subjected to rapid drying to moisture of 20% survive exposure at temperature -86°C. The low physiological performance of coffee seeds with 5% wb after exposure to those temperatures is linked to the sensitivity of the endosperm, once the embryos were viable at the same moisture content.

**KEYWORDS:** physiological quality, embryos, endosperm, tetrazolium.

### INTRODUÇÃO

Sementes de café apresentam sensibilidade à dessecação e baixo potencial de armazenamento, sendo classificadas como intermediárias, o que dificulta a obtenção de mudas vigorosas em época de clima mais apropriado ao plantio, além de colocar em risco a preservação da espécie. O armazenamento seguro das sementes de café no longo prazo ainda não é

viável (ROSA et al, 2005; DUSSERT et al, 2006; EIRA et al., 2006). O resfriamento de sementes em temperaturas sub zero é uma alternativa utilizada em bancos de germoplasma para conservar a viabilidade de sementes de várias espécies cultivadas no mundo por longos períodos de tempo. Entretanto essa técnica ainda não é totalmente segura para espécies de comportamento intermediário como o caso de sementes de café, sendo essa espécie ainda conservada *in situ* (DUSSERT et al., 2012). As sementes que toleram desidratação quase completa podem suportar, conseqüentemente, temperaturas extremamente baixas, o que supostamente não ocorre com as sementes intolerantes à dessecação. Contudo, ainda não foram estabelecidos os limites de redução da temperatura para essas sementes. A aquisição da tolerância à dessecação é um fenômeno complexo, envolvendo a interação de ajustes metabólicos e estruturais, permitindo que as células resistam a perdas consideráveis de água sem a ocorrência de prejuízos. A maior ou menor eficiência desses fatores poderia, dessa forma, acarretar a formação de sementes com diferentes níveis de tolerância à dessecação (MARCOS FILHO 2005). Possivelmente, tal fato poderia ocorrer, também, em relação à tolerância à redução da temperatura. Sementes de café, quando desidratadas entre 8% e 10% de umidade e armazenadas sob temperaturas próximas e abaixo de zero, apresentam perda do poder germinativo durante armazenagem, mesmo sendo classificadas como intermediárias quanto ao comportamento (ELLIS et al., 1990, 1991 a,b; VAN der VOSSSEN, 1979). Porém, há relatos de sobrevivência de sementes de café em temperaturas abaixo de zero. Sementes de *Coffea arabica* L. com conteúdo de água ajustado entre 0,11 e 0,12 g H<sub>2</sub>O. g<sup>-1</sup> dw, germinaram a temperaturas de -10, -16 e -20° C; (ELLIS et al., 1990; EIRA et al., 1999 a; HONG e ELLIS, 1998). Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar as alterações fisiológicas de sementes de *Coffea arabica* L. secadas em diferentes velocidades e resfriadas a temperaturas subzero.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório Central de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizadas sementes da safra 2012/2013, da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo IAC 62. Os frutos de café foram colhidos na Fazenda Experimental do Procafé, em Varginha, localizada a aproximadamente 110 Km de Lavras. Os frutos no estágio de maturação cereja foram seletivamente colhidos nos ramos médios das plantas e nas partes medianas dos ramos. Após a colheita os frutos foram selecionados mais uma vez para uniformização do estágio de maturação e descascados mecanicamente. Após o descascamento, as sementes foram desmuciladas por fermentação em água por 24 horas. As sementes de café foram secadas até diferentes teores de água em ambientes com temperaturas e umidades relativas controladas. Foram utilizados dois tipos de secagem, rápida em sílica gel e lenta em soluções saturadas de sais. Para ambas as secagens, o ambiente hermético utilizado foi caixa de acrílico do tipo gerbox, devidamente lacrada com papel filme, para que não ocorresse mudança de umidade relativa dentro do recipiente. Para a secagem rápida, as sementes foram colocadas sobre um telado em camada única no gerbox contendo sílica gel ativada. Na secagem lenta, foram utilizadas soluções salinas saturadas capazes de manter a umidade relativa interna estável. As soluções salinas foram colocadas no fundo do recipiente, e as sementes em camada única sobre uma tela sem tocar nas soluções. A solução salina foi preparada dissolvendo-se o sal específico em água. Para a retirada da primeira umidade de 40% foi utilizada solução de cloreto de lítio 5%. Para a umidade de 30% foi utilizada a solução saturada de cloreto de sódio e para as demais umidades, 20, 15, 10 e 5%, do cloreto de magnésio hexahidratado. Os recipientes contendo as soluções salinas saturadas, a sílica gel e as sementes foram acondicionados em câmaras do tipo B.O.D, sob 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, de 40, 30, 20, 15, 10, 5% (base úmida). As sementes foram mantidas em três diferentes ambientes: câmara fria e seca (10°C, 45% UR), freezer (-20°C) e *deep-freezer* (-86°C), durante 24 horas, até se equilibrarem nessas temperaturas. Após o período de 24 horas, as sementes foram retiradas das embalagens e descongeladas rapidamente, por imersão direta em banho-maria à temperatura de 40°C, durante 2 minutos, segundo metodologia proposta por Dussert, 1999. Posteriormente ao descongelamento, procedeu-se a retirada dos pergaminhos e as sementes foram deixadas no ambiente para o equilíbrio de temperatura e logo após, submetidas à determinação do teor de água e às avaliações fisiológicas plântulas normais aos 30 dias e viabilidade pelo teste de tetrazólio. Para o teste de germinação quatro repetições de 25 sementes sem os pergaminhos foram colocadas para germinar em folhas de papel do tipo germitest, umedecidas com água em quantidade igual a 2,5 vezes o peso do papel seco. As sementes foram mantidas em germinador, em temperatura de 30°C e a porcentagem de plântulas normais foi avaliada após 30 dias, segundo as prescrições das RAS (BRASIL, 2009). O teste de tetrazólio foi realizado com quatro repetições de 10 sementes sem pergaminhos. As sementes foram colocadas em recipiente contendo água destilada para embebição por período de 48 horas, a 30°C (CLEMENTE, 2011). Após esse período, foi removido o embrião das sementes, com o auxílio de um bisturi, de tal forma que fossem evitados danos aos mesmos. Os embriões foram colocados em solução de tetrazólio a 0,5%, na ausência de luz, por período de 3 horas, a 30°C, para coloração. Após avaliação da viabilidade, os resultados foram expressos em porcentagem de embriões viáveis. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x6x3, sendo dois tipos de secagem, seis teores de água e três temperaturas. O fator quantitativo teores de água foi estudado por meio de uma análise de regressão na análise de variância, por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2003).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As velocidades de secagem obtidas foram de  $0,062\%.h^{-1}$  e de  $0,034\%.h^{-1}$ , nos métodos de secagem rápida e lenta, respectivamente. Nas análises de variância, verificou-se que a interação entre os fatores velocidade de secagem e umidade final das sementes foi significativa para todas as duas variáveis respostas analisadas quando as sementes foram submetidas às temperaturas de resfriamento de  $-20$  e  $-86^{\circ}C$ . Para a temperatura de  $10^{\circ}C$ , os resultados de porcentagem de plântulas normais aos 30 dias e de viabilidade dos embriões no teste de tetrazólio não apresentaram interação significativa dos fatores estudados, o que significa que esses fatores atuam independentemente. Pelos resultados da porcentagem de de plântulas normais aos 30 dias, observou-se que as sementes de café apresentam comportamentos diferentes quando são expostas a baixas temperaturas (Figura 1), após serem submetidas a diferentes métodos de secagem e com diferentes graus de umidade. Sementes de café com umidade acima de 10% toleram bem o resfriamento à temperatura de  $10^{\circ}C$ , com resultados de germinação acima de 70%. Porém, ocorre redução da germinação quando essas sementes são secadas até umidade em torno de 30%. Quando as sementes de café são expostas a temperaturas subzero, como  $-20^{\circ}C$ , observou-se interação entre o método de secagem e grau de umidade das sementes (Figura 1). Para os tratamentos em que as sementes foram submetidas à secagem rápida, observou-se valores elevados de germinação nas sementes com umidade entre 10 e 20%, com redução acentuada da germinação em sementes com teor de água maior ou menor que esses valores. Já para a temperatura de  $-86^{\circ}C$ , apenas as sementes com teor de água de 20% e secadas rapidamente apresentaram plântulas normais aos 30 dias, com uma porcentagem média de 40% de germinação. Ressalta-se que em ambas as temperaturas subzero ( $-20$  e  $-86^{\circ}C$ ), as umidades de 5 e 40% foram letais para as sementes de café.

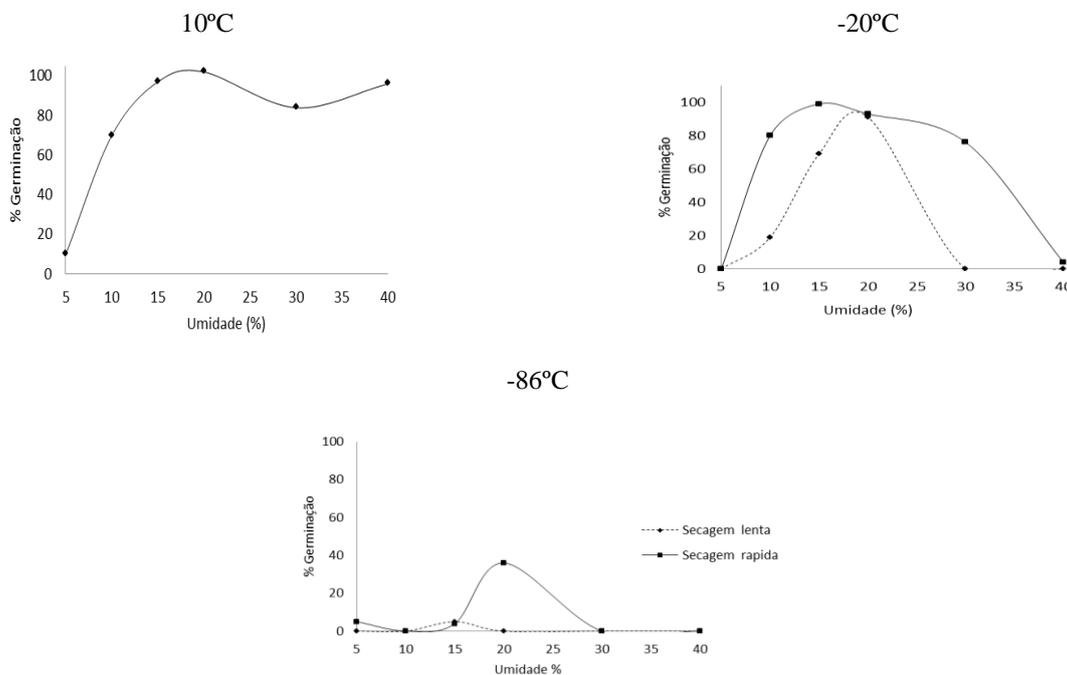


Figura 1. Porcentagem média de plântulas normais aos 30 dias de sementes de café secadas em diferentes velocidades e equilibradas em temperaturas supra e subzero.

Esse comportamento está ligado ao fato de existir um ponto ou uma faixa de umidade ótima para a tolerância às baixas temperaturas, ou seja, com água disponível para prevenir os danos por dessecação, mas em teor de água baixo o suficiente para prevenir os danos por cristalização da água pelo congelamento (EIRA et al., 1999a; DUSSERT et al., 2001, 2003). Segundo Ellis et al. (1990a) as sementes de café foram classificadas na categoria intermediária quanto à tolerância à dessecação, observando que sementes de quatro cultivares de *Coffea arabica* não tiveram a germinação reduzidas ao serem secadas até cerca de 10% de umidade, mas foram prejudicadas pelo armazenamento às temperaturas de  $0^{\circ}C$  e  $-20^{\circ}C$ , comportamento característico da categoria intermediária. Sementes dessa categoria podem resistir à secagem até certo nível, mas têm sua armazenabilidade reduzida. No presente estudo, as sementes com umidade de 10, 15 e 20 % toleraram o resfriamento a  $-20^{\circ}C$  por 24 horas, sem efeitos deletérios na germinação das sementes. Em trabalhos anteriores também foram encontrados resultados semelhantes aos deste trabalho, nos quais foi observada germinação apenas quando as sementes foram armazenadas com 20% de teor de água na temperatura de  $-20^{\circ}C$  (EIRA et al., 1999b, DUSSERT et al 2003, 2006, 2012). Dussert et al. (2006) demonstraram que a faixa de umidade em que uma semente de *Coffea arabica*, variedade Caturra poderia ser criopreservada e ainda apresentar alta viabilidade é muito estreita. Pelo teste de tetrazólio também é possível observar o efeito do resfriamento das sementes de café com diferentes umidades e métodos de secagem (Figura 2), sobre a qualidade fisiológica. O resfriamento a  $10^{\circ}C$  de forma

geral, não prejudicou a viabilidade dos embriões de café. No entanto, quando as sementes são expostas à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , observou-se que em sementes mais úmidas ( $> 20\%$ ), os embriões perderam a viabilidade, principalmente quando as sementes foram submetidas à secagem lenta. Quando as sementes de café são equilibradas em temperaturas mais extremas ( $-86^{\circ}\text{C}$ ), o efeito negativo sob a viabilidade dos embriões é ainda mais acentuado, diminuindo a faixa de umidade em que as sementes toleram o resfriamento até essa temperatura. Observou-se viabilidade dos embriões apenas nas sementes com umidades mais baixas, ou seja, 5, 10 e 15% de umidade, sendo 10% do teor de água com viabilidade superior aos outros dois. Ainda assim, os resultados são interessantes se comparados aos resultados de porcentagens de germinação, os quais foram bem inferiores em relação ao tetrazólio (Figura 1 e 2). Observa-se que os embriões suportam melhor as baixas temperaturas, indicando maior sensibilidade dos endospermas, o que pode interferir negativamente durante o processo de germinação das sementes, resultando em baixos percentuais de plântulas normais. Esses resultados corroboram com outros autores (DUSSERT, 1997, 1998, 1999, 2006, 2012), em que a taxa de sobrevivência de embriões zigóticos excisados de sementes criopreservadas foi alta. Em contraste, segundo esses autores, a porcentagem de viabilidade das sementes inteiras, nas mesmas condições, pode ser obtida apenas para uma limitada faixa de umidade e temperatura. Ainda segundo esses autores, a exposição do endosperma a baixas temperaturas causa danos aos mesmos. Nesses casos, o endosperma é suficientemente intacto para permitir a germinação de todos os embriões viáveis, porém sua função nutricional é prejudicada.

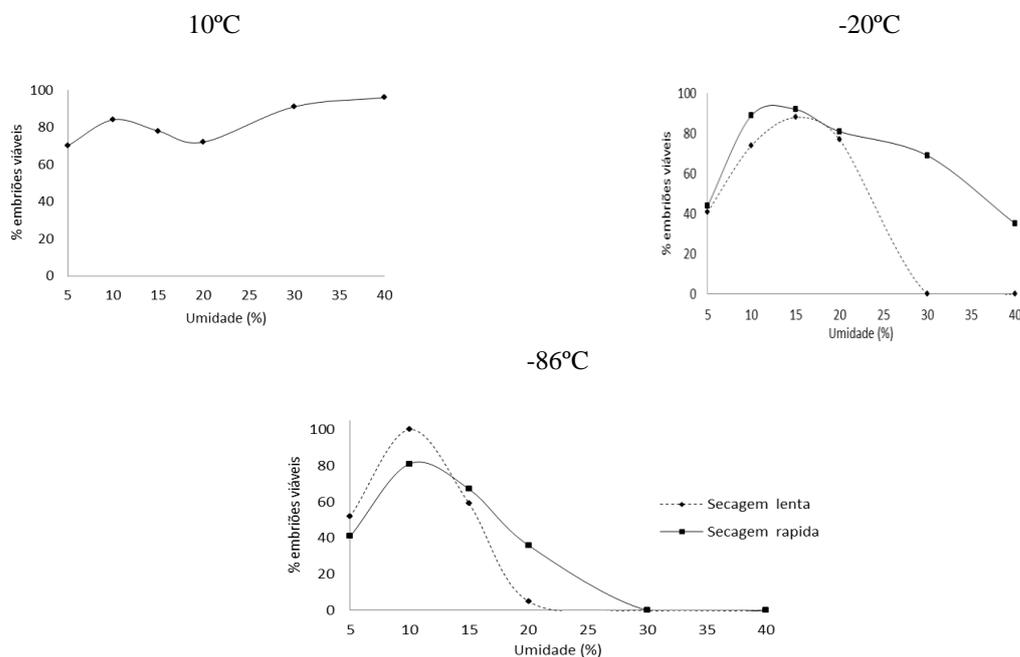


Figura 2. Porcentagem média de embriões viáveis no teste de tetrazólio de sementes de café secadas em diferentes velocidades e equilibradas em temperaturas supra e subzero.

## CONCLUSÕES

1. Sementes de café secadas até 5% de umidade perdem a capacidade germinativa, porém os embriões permanecem viáveis neste teor de água.
2. Sementes armazenadas em  $10^{\circ}\text{C}$  com umidades de 40 a 10% apresentam melhor desempenho fisiológico do que em umidades intermediárias, independentemente da velocidade de secagem.
3. Sementes secadas rapidamente apresentam maior tolerância à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  quando comparadas às que foram secadas mais lentamente.
4. Apenas as sementes submetidas à secagem rápida até 20% de umidade sobrevivem à exposição à temperatura de  $-86^{\circ}\text{C}$ .
5. Apesar das sementes de café com teores de água entre 5 e 30% não germinarem, os embriões apresentam viabilidade no teste de tetrazólio, após exposição a  $-86^{\circ}\text{C}$ .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Coordenação de Laboratório Vegetal. Brasília, 2009.
- CLEMENTE, A.C.S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.33, n.1, p.38-44, jul. 2011

- DUSSERT, S., CHABRILLANGE, N., ENGELMANN, F., ANTHONY, F., HAMON, S. **Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature.** *CryoLetter* 18:269–276. 1997
- DUSSERT, S., CHABRILLANGE, N., ENGELMANN, F., ANTHONY, F., LOUARN, J., HAMON, S. **Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate.** *Seed Sci. Res.* 8:9-15. 1998
- DUSSERT, S.; CHABRILLANGE, N.; ENGELMANN, F.; HAMON, S. **Quantitative estimation of seed desiccation sensitivity using a quantal response model: application to nine species of the genus *Coffea* L.** *Seed Sci. Res.* 9: 135-144. 1999
- DUSSERT, S., CHABRILLANGE, N., ROCQUELIN, G., ENGELMANN, F., LOPEZ, M., HAMON, S. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultralow temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition and cooling procedure. **Physiol. Plant.** 112:495–504. 2001
- DUSSERT, S., CHABRILLANGE, N., MONTILLET, J.L., AGNEL, J.P., ENGELMANN F, NOIROT M. Basis of coffee seed sensitivity to liquid nitrogen exposure: oxidative stress or imbibitional damage? **Physiol. Plant.** 119:534–543. 2003
- DUSSERT, S.; DAVEY, M.W.; LAFFARGUE, A.; DOULBEAU, S.; SWENNEN, R.; ETIENNE, H. **Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds.** *Physiol. Plant.* In press, 2006.
- DUSSERT, S.; COUTURON, E.; ENGELMANN, F.; JOET, T. Biologie de la conservation des semences de caféiers: aspects fondamentaux et conséquences pratiques. Une revue. **Cah Agric**, vol. 21, n8 2–3, mars-avril – mai-juin 2012
- EIRA, M.T.S., WALTERS, C., CALDAS, L.S, FAZUOLI, L.C., SAMPAIO, J.B., DIAS, M.C.C. **Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature.** *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 11:97–105. 1999a
- EIRA, M.T.S.; SILVA, E.A.A; CASTRO, R.D.; DUSSERT, S.; WALTERS, C.; BEWLEY, J.D.; HILHORST, H.W.M. **Coffe seed physiology.** *Journal Plant Physiology*, Lavras, MG, v.18, n.1, p. 149-163, 2006.
- ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. **Effect of temperature and moisture content on the germination of papaya seeds.** *Seed Science Research*, California, v.1, p.69-72, 1991a.
- ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H.; SOETISNA, U. **Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*.** *Seed Science Research*, Califórnia, v.1, p.99-104, 1991b.
- ELLIS, R.H., T.D. Ho G and E.H. ROBERTS. 1990. **An intermediate category of seed storage behaviour?** *J Expt. Bot.* **41** (230): 1167-1174.
- FERREIRA, D.F. **Programa de análises estatísticas (statistical analysis software) e planejamento de experimentos – SISVAR 5.0, build 67**, Lavras: DEX/UFLA, 2003. Software
- HONG, T.D.; ELLIS, R.H. Contrasting seed storage behavior among different species of Meliaceae. **Seed Science and technology**, Zurich, v.26, n.1, p.77-95, 1998.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de pantas cultivadas.** Piracicaba: FEALQ, 2005. 459P.
- ROSA, S.D.V.F. Da et al. Effects of diferente drying rates on the physiological quality of *Coffea canéfora* Pierre seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v.17, n.2, p.199-205, Mar./Apr.2005
- VAN DER VOSSSEN, H.A.M. **Methods of preserving the viability of coffee seed in storage.** *Seed Sci. Technol.* 7:65–74. 1979