



NATHÁLIA APARECIDA BRAGANÇA FÁVARIS

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES E PRODUÇÃO DE
MUDAS DE *Coffea arabica* L.**

**LAVRAS - MG
2023**

NATHÁLIA APARECIDA BRAGANÇA FÁVARIS

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES E PRODUÇÃO DE MUDAS DE *Coffea*
arabica L.**

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

Pesq. Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

Dr. Rubens José Guimarães
Coorientador

**LAVRAS - MG
2023**

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

Fávaris, Nathália Aparecida Bragança.

Criopreservação de sementes e produção de mudas de *Coffea arabica* L. / Nathália Aparecida Bragança Fávaris. - 2023.

161 p. : il.

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

Coorientador(a): Rubens José Guimarães.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Café arábica. 2. Crioarmazenamento. 3. Manutenção da
qualidade. I. Rosa, Sttela Dellyzete Veiga Franco da. II. Guimarães,
Rubens José. III. Título.

NATHÁLIA APARECIDA BRAGANÇA FÁVARIS

CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES E PRODUÇÃO DE MUDAS DE *Coffea arabica* L.

CRYOPRESERVATION OF SEEDS AND SEEDLING PRODUCTION OF *Coffea arabica* L.

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

APROVADA em 22 de março de 2023.

Pesq. Dr. Adriano Delly Veiga	EMBRAPA CERRADOS
Prof ^a . Dra. Danielle Pereira Baliza	IF SUDESTE MG
Prof. Dr. Tiago Teruel Rezende	UFLA
Prof. Dr. Rubens José Guimarães	UFLA

Pesq. Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

Dr. Rubens José Guimarães
Coorientador

**LAVRAS - MG
2023**

*A Deus por tudo que representa e ser o suporte em minha vida.
A meus pais Eli e Sebastiana, gratidão e amor eternos.
Ao meu parceiro de vida Elton, por sempre acreditar em mim.
À mulher que sou hoje e por sempre buscar a minha melhor versão.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

O título de doutor exige de você muita dedicação, resiliência, abdicção e acima de tudo a vontade de vencer. Por todas as superações, agradeço a Deus pelo amor, cuidado, proteção, guia e principalmente por seu sustento.

Ao meu maior e mais puro amor, meus pais Eli e Sebastiana, cada um com sua forma única de ser fez a Nathália de hoje, sem vocês não estaria aqui, meu aconchego e meu lar. Gratidão e amor eternos.

A memória da minha amada avó Jovelina e do meu bisavô Sebastião Rosa. O amor de vocês será sempre a lembrança mais doce e é com lágrimas nos olhos e coração quentinho de amor, o meu muito obrigada.

Agradeço a minha família que sempre confiou no meu potencial, muitas vezes esquecido por mim, juntos somos mais.

Agradeço ao meu grande, único, o meu parceiro de vida Elton. Para mim, um tesouro com todo o seu esplendor e que torna meus dias mais leves.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade e suporte de estudo.

A minha querida orientadora pesquisadora Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, chamada por mim de “flor”, obrigada por ser muitas vezes mais que uma orientadora. Obrigada por me mostrar que todos cometemos erros, que dirigir uma equipe é um desafio, mas acima de tudo estamos uns pelos outros.

A meu coorientador Dr. Rubens José Guimarães, pelo apoio, incentivo na condução dos trabalhos. Em suas aulas e em nossas reuniões, obrigada por ressaltar os meus ensinamentos que a humildade, o simples deve permanecer em cada um de nós.

Obrigada a cada membro do grupo de orientados da pesquisadora Sttela, grupo do café, por todos os trabalhos, estudos, amizade e todo sucesso. Em especial, Laura, Júlia, Fernando e Rafaela pelas constantes ajudas, risadas e por me permitir contribuir com vocês na vida acadêmica.

Aos professores, pesquisadores e funcionários do Setor de Sementes, pelos conhecimentos transmitidos. Sementeiros, obrigada por toda a ajuda e incentivo.

Ao Alexandre, Felipe e Mateus funcionários do Setor de Cafeicultura, sem vocês este trabalho não teria o mesmo sucesso. Obrigada por serem minhas mãos, olhos, amigos na condução das minhas mudas e por terem sempre aquele café fresquinho.

Aos amigos que conquistei no estado de Minas Gerais, Edlânia, Jeferson, Júlia e Patrícia pelo apoio, pelo abraço apertado na vontade de ir embora, conversas sem compromisso. Sem vocês, Lavras teria sido mais difícil.

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

À Fundação Procafé, pelo fornecimento das sementes de café.

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

Aos meus amigos Aixelhe, Allan, Eduardo, Sabrina e Marcus Vinícius, que mesmo com a distância se fizeram presentes.

A todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte deste momento.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Para a espécie *C. arabica* L. as lavouras são implantadas, em quase sua totalidade, por mudas a partir da semeadura de sementes. Desse modo, a qualidade das sementes de café é de suma importância e vários fatores contribuem para o desempenho fisiológico das sementes durante o armazenamento, que ainda se constitui em uma das demandas tecnológicas prioritárias da cafeicultura. A criopreservação é uma técnica que tem sido amplamente pesquisada para espécies intermediárias e recalcitrantes e, para sementes de *C. arabica* L., já foi obtido protocolo seguro de armazenagem, com alta sobrevivência após imersão em nitrogênio líquido. Neste contexto, quatro estudos foram realizados, sendo que no primeiro foram investigados os efeitos do criarmazenamento por período de um ano na qualidade fisiológica e sistemas isoenzimáticos de sementes de diferentes cultivares de *C. arabica* L., visando subsidiar a produção de mudas em qualquer época do ano. O criarmazenamento das sementes de *C. arabica* L. por até um ano mantém a sua qualidade fisiológica. A atividade das enzimas catalase, peroxidase e esterase em *C. arabica* L. apresenta alterações durante o criarmazenamento, porém com pouca associação com o desempenho fisiológico das sementes. No segundo estudo foi avaliada a produção de mudas de *C. arabica* L., a partir da semeadura em todos os meses do ano, em dois diferentes ambientes, viveiro e casa de vegetação, e três cultivares. A utilização de sementes criopreservadas possibilita a produção de mudas *C. arabica* L. em qualquer época do ano, sendo a casa de vegetação, o ambiente que proporciona melhor desempenho das mudas, em comparação às produzidas em viveiro. A semeadura de sementes criopreservadas nos meses de janeiro a março requer maior tempo para a formação de mudas, as quais também apresentam desempenho fisiológico aquém do desempenho das mudas iniciadas nos meses de maio a julho. Mudas produzidas com sementes criopreservadas durante todos os meses do ano apresentam desempenho igual ou superior ao das mudas produzidas com sementes recém-colhidas e não imersas em nitrogênio líquido. No terceiro estudo, os aspectos fisiológicos de mudas de *C. arabica* L., produzidas durante dez meses do ano, em viveiro e em casa de vegetação, a partir da semeadura de sementes armazenadas em nitrogênio líquido foram avaliados. Os teores de clorofila a, b, total e condutância estomática sofreram pequenas modificações relacionadas à época de semeadura das sementes criopreservadas, independentemente do local de produção das mudas. A semeadura de sementes criopreservadas nos meses de fevereiro e março proporcionam pior desempenho fisiológico das mudas do que aquelas semeadas nos demais meses estudados. No último estudo, foi investigado a sobrevivência de sementes de *C. arabica* L. após retirada do nitrogênio líquido e reaquecimento. Após a criopreservação, as sementes mantidas em condições ambiente sofrem redução contínua da qualidade fisiológica, sendo que a germinação é mantida dentro dos padrões para a comercialização por período máximo de até dois dias em condição ambiente. As enzimas catalase, esterase e peroxidase são indicadores de qualidade de sementes de café arábica após criarmazenamento.

Palavras-chave: Café arábica. Nitrogênio líquido. Criarmazenamento. Manutenção da qualidade.

ABSTRACT

For the *C. arabica* L. species, crops are entirely started from seedling production from seed sowing. Thus, the quality of coffee seeds is of paramount importance, and various factors contribute to the physiological performance of seeds during storage, which is still one of the top technological demands of coffee production. Cryopreservation is a technique that has been widely researched for intermediate and recalcitrant species, and for *C. arabica* L. seeds, a safe storage protocol has been established with high survival rates after 24 hours of immersion in liquid nitrogen. In this context, four studies were conducted, the first investigating the effects of one year of cryostorage on the physiological quality and isoenzymatic systems of seeds from different cultivars of *C. arabica* L., aiming to support seedling production at any time of the year. Cryostorage of *C. arabica* L. seeds for up to one year maintains the physiological quality of the seeds. The activity of catalase, peroxidase, and esterase enzymes in *C. arabica* L. undergoes changes during cryostorage, but with little association with the physiological performance of seeds. In the second study, seedling production of *C. arabica* L. was evaluated from seed sowing in all months of the year, in two different environments, nursery and greenhouse, and with three cultivars. The use of cryopreserved seeds allows to produce *C. arabica* L. seedlings at any time of the year, with the greenhouse providing better seedling performance compared to those produced in the nursery. Sowing of cryopreserved seeds from January to March requires more time for seedling formation, which also shows physiological performance below that of those started from May to July. Seedlings produced with cryopreserved seeds during all months of the year show equal or better performance than those produced with freshly harvested seeds not immersed in liquid nitrogen. In the third study, the physiological aspects of *C. arabica* L. seedlings produced for nine months of the year in the nursery and greenhouse from seeds stored in liquid nitrogen were evaluated. The levels of chlorophyll a, b, total and stomatal conductance undergo minor modifications related to the sowing time of cryopreserved seeds, regardless of the seedling production location. Sowing of cryopreserved seeds in February and March shows lower physiological performance of seedlings than those sowed in other months studied. In the last study, the survival of *C. arabica* L. seeds after removal from liquid nitrogen and rewarming was investigated. After cryopreservation, seeds kept under ambient conditions undergo continuous reduction in physiological quality, and germination is maintained within the standards for commercialization for a maximum period of up to two days under ambient conditions. Catalase, esterase, and peroxidase enzymes are indicators of quality for *C. arabica* L. seeds after cryostorage.

Keywords: Arabica coffee. Liquid nitrogen. Cryostorage. Maintenance of quality.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	12
1	INTRODUÇÃO	12
	REFERÊNCIAS	14
	CAPÍTULO 2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS SEMENTES DE <i>COFFEA ARABICA</i> L. CRIOARMAZENADAS POR UM ANO DESTINADAS A FORMAÇÃO DAS MUDAS	15
1	INTRODUÇÃO	17
2	MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1	Obtenção e processamento do material vegetal	19
2.2	Local e condução do experimento	19
2.3	Secagem das sementes	19
2.4	Crioarmazenamento das sementes	20
2.5	Aquecimento das sementes	20
2.6	Avaliação fisiológica das sementes de café	20
2.6.1	Teste de condutividade elétrica	21
2.6.2	Teste de germinação	21
2.6.3	Peso seco de plântulas	21
2.6.4	Teste de tetrazólio	22
2.7	Expressão eletroforética de isoenzimas	22
2.8	Delineamento experimental e análise estatística	22
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1	Análise fisiológica das sementes de café	24
3.2	Expressão eletroforética de isoenzimas	42
4	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS	47
	CAPÍTULO 3 MUDAS DE SEMENTES CRIOPRESERVADAS DE <i>COFFEA ARABICA</i> L.	51
1	INTRODUÇÃO	53
2	MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1	Obtenção e processamento do material vegetal	55
2.2	Local e condução do experimento	55
2.3	Secagem das sementes	55

2.4	Crioarmazenamento das sementes.....	56
2.5	Aquecimento das sementes	56
2.6	Produção e avaliação das mudas de café.....	56
2.6.1	Locais	56
2.6.2.	Recipiente, substrato e avaliações	57
2.7	Delineamento experimental e análise estatística.....	58
3	RESULTADOS	59
3.1	Cultivar Arara	63
3.2	Cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’	73
3.3	Cultivar Catucaí Amarelo ‘2SL’	87
4	DISCUSSÃO	91
5	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS	95
	CAPÍTULO 4 AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA DE MUDAS PRODUZIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO E EM VIVEIRO	101
1	INTRODUÇÃO	103
2	MATERIAL E MÉTODOS	105
2.1	Obtenção e processamento do material vegetal	105
2.2	Secagem das sementes	105
2.3	Crioarmazenamento das sementes.....	106
2.4	Aquecimento das sementes	106
2.5	Produção e avaliação fisiológica das mudas de café.....	106
2.5.1	Local de produção das mudas	106
2.5.2	Recipiente, substrato e avaliações	107
2.6	Delineamento experimental e análise estatística.....	108
3	RESULTADOS	109
3.1	Cultivar Arara	113
3.2	Cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’	123
3.3	Cultivar Catucaí Amarelo ‘2SL’	131
4	DISCUSSÃO	134
5	CONCLUSÕES	136
	REFERÊNCIAS	137
	CAPÍTULO 5 TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA DE SEMENTES DE <i>COFFEA ARABICA</i> L. APÓS CRIOARMAZENAMENTO	143

1	INTRODUÇÃO	145
2	MATERIAL E MÉTODOS	147
2.1	Obtenção e processamento do material vegetal	147
2.2	Local e condução do experimento	147
2.3	Secagem das sementes	147
2.4	Crioarmazenamento das sementes.....	148
2.5	Aquecimento das sementes	148
2.6	Avaliação fisiológica das sementes de café	148
2.6.1	Teste de germinação	149
2.6.2	Peso seco de plântulas	149
2.6.3	Teste de tetrazólio	149
2.7	Expressão eletroforética de isoenzimas	150
2.8	Delineamento experimental e análise estatística.....	150
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	151
3.1	Avaliação fisiológica das sementes de café	151
3.2	Expressão eletroforética de isoenzimas	154
4	CONCLUSÕES.....	157
	REFERÊNCIAS	158

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

No cenário cafeeiro, a espécie *Coffea arabica* L. possui grande importância econômica e social, especialmente para o Brasil, maior produtor e exportador mundial desta *commodity* (ICO, 2022). A produção acompanha uma tendência global de crescimento, demonstrado por uma maior procura e consumo de café pelos brasileiros. As lavouras de café são iniciadas por mudas, a partir da sementeira de sementes. Desta forma, a utilização de sementes com alta qualidade fisiológica é um dos principais fatores para obtenção de mudas vigorosas.

As sementes de *C. arabica* L. são classificadas como intermediárias (ELLIS et al., 1990), além disso, apresentam baixa longevidade, além de germinação lenta e desuniforme (ABREU et al., 2014; COELHO et al., 2015). Essas limitações dificultam a manutenção da viabilidade e vigor na conservação das sementes de café por longos períodos. As sementes do gênero *Coffea* são preservadas *in situ*, com o cultivo de plantas vivas mantidas nas coleções de germoplasmas no campo. Neste sentido, é de fundamental importância o armazenamento seguro das sementes, seja por tempo indeterminado para a preservação da diversidade genética, ou por curto prazo, para flexibilizar a produção de mudas.

Na cafeicultura diversas pesquisas estão sendo realizadas a fim de determinar o armazenamento seguro dessas sementes. Uma alternativa viável para a conservação *ex situ* dos recursos vegetais para as espécies que produzem sementes recalcitrantes e intermediárias, assim como de café, é a criopreservação (PAMMENTER; BERJAK, 2014; KAYA et al., 2017; COELHO et al., 2017a; FIGUEIREDO et al., 2017; RICARDONI, 2019). Logo, um protocolo de criopreservação de sementes de *C. arabica* L. foi recentemente desenvolvido para armazenagem, com alta sobrevivência após 24 horas de imersão em nitrogênio líquido (COELHO et al., 2017a; FIGUEIREDO et al., 2017).

A produção de mudas utilizando sementes criopreservadas possibilita um avanço no segmento cafeeiro visto que, os produtores de forma usual, utilizam sementes colhidas no mesmo ano do semeio. Assim, o aperfeiçoamento desta técnica pode levar a uma inovação tecnológica na cafeicultura por ser dinâmica e permitir a produção de mudas em qualquer época do ano.

Predominantemente, a produção de mudas de café ocorre em viveiros com o cultivo tradicional (MATIELLO et al., 2020), no entanto, existe necessidade de novas técnicas visando

obtenção de mudas vigorosas que apresentem melhores características agronômicas e, atualmente, o cultivo protegido vem sendo utilizado como uma alternativa para proteção das plantas.

O cultivo protegido tem se mostrado promissor para a produção de mudas, permitindo o desenvolvimento das plantas em situações adversas do meio ambiente (REBOUÇAS et al., 2015). Efeitos benéficos na produção de mudas a partir da utilização de sementes criopreservadas de *C. arabica* L. em casa de vegetação foi confirmado por Ricaldoni (2019), que obtiveram mudas com maior vigor em relação as mudas produzidas no sistema convencional, em viveiro.

Diante do exposto, o objetivo dos estudos foi avaliar a qualidade de sementes de *Coffea arabica* L. criarmazenadas por período de doze meses, além da produção das mudas iniciando em todos os meses do ano, em diferentes ambientes, visando flexibilizar a oferta de mudas aos cafeicultores.

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.
- 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. et al. Tolerance of *Coffea arabica* L. seeds to sub zero temperatures. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 4, n. 3, p. 312-321, 2017. (a)
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behavior? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.
- FIGUEIREDO, M. A. de et al. Exploratory studies for cryopreservation of *Coffea arabica* L. seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 39, n. 2, p. 150-158, 2017.
- ICO. INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **A História do Café**. Londres: International Coffee Organization. Disponível em: <<https://www.ico.org/prices/production.pdf>>. Acesso em: 08 maio. 2022.
- KAYA, E. et al. Cryopreservation of citrus seed via dehydration followed by immersion in liquid nitrogen. **Turkish journal of biology**, v. 41, n. 1, p. 242-248, 2017.
- MATIELLO, J. B. et al. **Cultura de café no Brasil: manual de recomendações**. Varginha: FUNDAÇÃO PROCAFÉ, 2020. 728 p.
- 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.
- REBOUÇAS, P. M. et al. Radiação solar e temperatura do ar em ambiente protegido. **Revista Agrogeoambiental**, Pouso Alegre, v. 7, n. 2, p. 115-125, 2015.
- RICALDONI, M. A. **Uso de sementes criopreservadas e cultivo protegido para a produção de mudas de *Coffea arabica* L.** 76f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2019.

CAPÍTULO 2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS SEMENTES DE *Coffea arabica* L. CRIOARMazenADAS POR UM ANO DESTINADAS A FORMAÇÃO DAS MUDAS

RESUMO

Vários fatores contribuem para o sucesso do armazenamento das sementes de café, etapa esta que ainda se constitui em um desafio e uma das demandas tecnológicas prioritárias da cafeicultura. O armazenamento seguro das sementes é importante, seja por tempo indeterminado para a preservação da diversidade genética, ou por um curto prazo, para outras finalidades, como a flexibilização do período de produção de mudas ou para pesquisas. A criopreservação é uma técnica que tem sido amplamente pesquisada para espécies intermediárias e recalcitrantes e, para sementes de *Coffea arabica* L., já foi obtido protocolo seguro de armazenagem, com alta sobrevivência após 24 horas de imersão em nitrogênio líquido. Esse estudo foi realizado com o objetivo de investigar os efeitos de um ano de criarmazenamento na qualidade fisiológica e sistemas isoenzimáticos de sementes de diferentes cultivares de *Coffea arabica* L., visando subsidiar a produção de mudas em qualquer época do ano. Sementes das cultivares Arara, Catuaí Amarelo 'IAC 62' e Catuaí Amarelo '2SL' foram submetidas à secagem em sílica em gel até o teor de água de 17% (base úmida). Em sequência, as sementes foram diretamente imersas em nitrogênio líquido, onde permaneceram por período de 12 meses. A cada mês durante o criarmazenamento, amostras foram retiradas, reaquecidas em banho-maria e submetidas às avaliações fisiológicas, por meio dos testes de condutividade elétrica, de germinação e de tetrazólio, associando estes resultados aos das análises de expressão em gel de eletroforese, de isoenzimas do processo antioxidativo. O criarmazenamento das sementes de *Coffea arabica* L. por até um ano mantém a qualidade fisiológica das sementes. A atividade das enzimas catalase, peroxidase e esterase em *Coffea arabica* L. apresenta alterações durante o criarmazenamento, porém com pouca associação com o desempenho fisiológico das sementes.

Palavras-chave: Café arábica. Criogenia. Qualidade fisiológica. Eletroforese de isoenzimas.

ABSTRACT

Several factors contribute to the success of coffee seed storage, which remains a challenge and one of the top technological demands in coffee farming. Safe seed storage is important, whether for an indefinite period to preserve genetic diversity or for a short period for other purposes, such as extending the seedling production period or for research purposes. Cryopreservation is a technique that has been extensively researched for intermediate and recalcitrant species, and for *C. arabica* L. seeds, a safe storage protocol has been established with high survival rates after 24 hours of immersion in liquid nitrogen. This study aimed to investigate the effects of one year of cryostorage on the physiological quality and isoenzymatic systems of seeds from different cultivars of *C. arabica* L., aiming to support seedling production at any time of the year. Seeds from the Arara, Catuaí Amarelo 'IAC 62', and Catuaí Amarelo '2SL' cultivars were dried with silica gel until reaching a moisture content of 17% (wet basis). Subsequently, the seeds were directly immersed in liquid nitrogen and remained there for a period of 12 months. Every month during cryostorage, samples were taken, rewarmed in a water bath, and subjected to physiological evaluations using electrical conductivity, germination, and tetrazolium tests, associating these results with gel electrophoresis analysis of antioxidant enzyme isozymes. Cryostorage of *C. arabica* L. seeds for up to one year maintains the physiological quality of the seeds. The activity of catalase, peroxidase, and esterase enzymes in *C. arabica* L. undergoes changes during cryostorage but with little association with the physiological performance of the seeds.

Keywords: Arabica coffee. Cryogenics. Physiological quality. Isozyme electrophoresis.

1 INTRODUÇÃO

Vários fatores contribuem para sucesso do armazenamento das sementes de café, etapa esta que ainda se constitui em uma das demandas tecnológicas prioritárias da cafeicultura. O armazenamento seguro das sementes é importante, seja por tempo indeterminado para a preservação da diversidade genética, seja por um curto prazo, para flexibilizar o período de produção de mudas. As sementes de café são preservadas *in situ*, com o cultivo de plantas vivas mantidas em coleções de germoplasma no campo. Entretanto, essa preservação requer altos custos de manutenção, grandes extensões de terra e podem ser acometidas pelos desastres climáticos (DUSSERT et al., 2012). Além disso, por serem classificadas como intermediárias, tem seu armazenamento inviabilizado em bancos de sementes convencionais, sob -18/-20 °C (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990).

Para a espécie *Coffea arabica* L., existem relatos de características naturais de baixa longevidade, germinação lenta e desuniforme (ABREU et al., 2014; COELHO et al., 2015). Essas limitações dificultam a manutenção da germinação e de vigor, durante a conservação das sementes de café por longos períodos. Diversos trabalhos foram realizados a fim de estudar o comportamento fisiológico das sementes de café durante o armazenamento visando o seu aperfeiçoamento (PAMMENTER; BERJAK, 2014; COELHO et al., 2015; COELHO et al., 2017a; FIGUEIREDO et al., 2017; PENIDO et al., 2021; FÁVARIS et al., 2022).

Diante desse contexto, estão sendo realizadas pesquisas a fim de definir uma metodologia para o armazenamento das sementes de café. A tecnologia de armazenamento a partir da criopreservação das sementes está sendo amplamente pesquisada, para as espécies intermediárias e recalcitrantes (PAMMENTER; BERJAK, 2014; KAYA et al., 2017; COELHO et al., 2017a; FIGUEIREDO et al., 2017; RICALDONI, 2019). Essa técnica baseia-se na conservação do material vegetal em nitrogênio líquido em -196 °C ou em sua fase de vapor (-150 °C), garantindo a viabilidade do material armazenado sem que ocorram modificações ou alterações genéticas por um período indeterminado (KARTHA, 1985; SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2005).

Em pesquisas recentes sobre criopreservação de sementes de café (*C. arabica*), foram obtidos resultados satisfatórios de sobrevivência após imersão em nitrogênio líquido (COELHO et al., 2017a; FIGUEIREDO et al., 2017; RICALDONI, 2019; SOUZA, 2019; FIGUEIREDO et al., 2021), sendo obtido protocolo seguro de armazenagem, com alta sobrevivência após 24 horas de imersão em nitrogênio líquido (COELHO et al., 2017a; FIGUEIREDO et al., 2017).

No entanto, para que a criopreservação das sementes de café seja uma técnica comumente utilizada é necessário estudar o efeito da imersão direta e manutenção por diferentes períodos em nitrogênio líquido, visando avaliar a sobrevivência das sementes mediante o teste de germinação (BRASIL, 2009), assim como, testes complementares de vigor e análises bioquímicas (DUSSERT; ENGELMANN, 2006; SHARMA et al., 2012; COELHO et al., 2015; COELHO et al., 2017a; COELHO et al., 2017b; ABREU et al., 2018; COELHO et al., 2019, FIGUEIREDO et al., 2021).

As análises bioquímicas podem ser realizadas para auxiliar na avaliação da qualidade das sementes, permitindo identificar os sistemas enzimáticos, os quais podem atuar como marcadores de qualidade ou de deterioração. Pesquisas têm sido desenvolvidas objetivando estudar a qualidade de sementes de café por meio dos perfis enzimáticos da peroxidase (COELHO et al., 2017b), da catalase (COELHO et al., 2017a) e esterase (FIGUEIREDO et al., 2021), dentre outras.

Diante do exposto, esse estudo foi realizado com o objetivo de investigar os efeitos de um ano de crioarmazenamento na qualidade fisiológica e sistemas isoenzimáticos de sementes de diferentes cultivares de *Coffea arabica* L., visando subsidiar a produção de mudas em qualquer época do ano.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e processamento do material vegetal

Foram utilizados frutos de café, da espécie *Coffea arabica* L., cultivares Arara, Catuaí Amarelo ‘IAC 62’ e Catuaí Amarelo ‘2SL’, safra 2019/2020, colhidos em lavouras da Fazenda Experimental da Fundação Procafé em Varginha, no mês de junho/2019 e cuidadosamente transportados para Universidade Federal de Lavras. Os frutos foram colhidos no estágio de maturação “cereja”, por meio de colheita seletiva, e na sequência foram submetidos ao processamento via úmida, sendo lavados/imersos em água para separação por densidade e eliminação dos frutos cerejas dos frutos chochos, malformados, brocados e de impurezas. Após a separação, os frutos cerejas foram descascados e as sementes foram despulpadas por meio da fermentação em água durante 24 horas na temperatura de 30 °C 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 19, 20 e 21, sendo descartadas aquelas de tamanho acima e abaixo destes.

2.2 Local e condução do experimento

Após o descascamento dos frutos e despulpamento das sementes, o experimento foi conduzido no Laboratório Central de Pesquisa em Sementes, do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG.

Para a caracterização dos lotes, as sementes foram inicialmente submetidas à determinação do teor de água e avaliação da qualidade, pelo teste de condutividade elétrica, teste de germinação, peso seco de plântulas e teste de tetrazólio. Em seguida, foram submetidas à secagem até atingirem o teor de água de 17% (base úmida), conforme trabalhos realizados por Figueiredo et al. (2017) e Coelho et al. (2017a). Posteriormente, as sementes foram armazenadas em tanque contendo nitrogênio líquido, em temperatura de -196 °C, até a realização das análises e experimentos.

2.3 Secagem das sementes

Para a secagem das sementes foram utilizadas 60g de sílica gel ativada como agente dessecante, em caixas tipo “gerbox”, as quais foram mantidas em câmaras tipo B.O.D, reguladas em temperatura de 25 °C, na ausência de luz. A perda de água durante a secagem foi monitorada por pesagens contínuas em balança de precisão de 0,001 g, até teor de água de 17% bu.

2.4 Crioarmazenamento das sementes

As sementes das três cultivares foram armazenadas no nitrogênio líquido (-196 °C), no mês de agosto de 2019, onde foram mantidas por período de 12 meses, sendo que a cada mês foram retiradas amostras para as avaliações da qualidade. Foram utilizados 12 sacos de tule para cada cultivar, sendo um saco para cada mês de avaliação da qualidade, contendo cada um, 640 sementes com teor de água de 17% bu (COELHO et al., 2017a; FIGUIREIDO et al., 2017). As sementes foram imersas diretamente no nitrogênio líquido (-196 °C) e a cada mês, amostras foram retiradas e reaquecidas para realização dos testes de avaliação.

2.5 Aquecimento das sementes

Após cada período de armazenamento, as sementes de cada cultivar armazenadas no nitrogênio líquido foram retiradas do criotânque e rapidamente imersas em banho-maria por 2 minutos à 40 °C, de acordo com metodologia de Dussert et al. (1998). Em seguida, as sementes foram avaliadas por meio das análises fisiológicas e bioquímicas, além da determinação do teor de água. Para as análises fisiológicas e bioquímicas os pergaminhos das sementes foram retirados manualmente.

A determinação do teor de água foi realizada pelo método de estufa a 105 °C, durante 24 horas de acordo com as prescrições da RAS (BRASIL, 2009) com modificações, em duas repetições de 10 sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem com base no peso úmido (bu) das sementes.

2.6 Avaliação fisiológica das sementes de café

As sementes das três cultivares, secadas até umidade de 17% bu e crioarmazenadas, assim como as sementes correspondentes aos perfis, não submetidas à secagem e à criopreservação, foram submetidas às avaliações, por meio dos testes descritos a seguir.

2.6.1 Teste de condutividade elétrica

Foi conduzida com quatro repetições de 25 sementes, a quais foram pesadas, com precisão de três casas decimais, e colocadas para embeber em recipientes de 200 mL, contendo 37,5 mL de água deionizada (KRZYZANOWSKY; FRANÇA NETO; HENNING, 1991). Em seguida, foram mantidas em BOD, em temperatura constante de 25 °C, onde permaneceram por 24 horas. Após o período de condicionamento, as soluções foram levemente agitadas para uniformização dos lixiviados e foi medida a condutividade elétrica da solução por meio da leitura em um aparelho condutivímetro da marca MS Tecnopon Instrumentação, modelo mCA-150, sendo os resultados expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

2.6.2 Teste de germinação

Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes, semeadas em folhas de papel de germinação, umedecidas em água destilada em quantidade equivalente a duas vezes e meia a massa do papel seco, conforme prescrição das RAS (BRASIL, 2009), com modificação. Posteriormente, os rolos foram mantidos em germinador, em temperatura constante de 30 °C com presença de luz, por 45 dias.

Foram realizadas contagens de plântulas normais aos 15 e aos 30 dias após a semeadura, sendo os resultados obtidos em porcentagem. No teste de germinação, foram também, determinadas: a porcentagem de plântulas normais fortes e fracas em relação ao eixo hipocotiledonar, sendo consideradas como plântulas normais fortes aquelas que apresentavam alça hipocotiledonar com três centímetros ou mais e fracas as que se encontravam abaixo deste padrão. Ao final do teste, aos 45 dias, foi determinada a porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas.

2.6.3 Peso seco de plântulas

O peso seco de plântulas foi determinado aos 45 dias após a semeadura. A parte aérea foi separada das raízes, com auxílio de bisturi e o material vegetal foi colocado em sacos de papel, os quais foram submetidos à secagem em estufa de circulação forçada de ar em 60 °C por quatro a cinco dias ou até massa constante. O peso seco foi determinado em balança de precisão (0,0001 g), com os resultados expressos em mg.plântula⁻¹.

2.6.4 Teste de tetrazólio

Foram utilizadas quatro repetições de 10 sementes de café embebidas em água destilada por 36 horas, em temperatura de 30 °C (CLEMENTE et al., 2011) com modificação, para extração dos embriões. Os embriões extraídos foram mantidos em solução antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) e, após esta etapa, foram lavados em água destilada e embebidos em solução de tetrazólio 0,5%, em frascos escuros, mantidos em temperatura de 30 °C, por três horas. Os embriões foram avaliados quanto à viabilidade, com auxílio de lupa estereoscópica com aumento de 10 vezes para visualização interna e externa de suas estruturas, obtidas pelo corte longitudinal ao meio dos embriões. Assim, foram classificados em viáveis e não viáveis, por meio da análise da localização e extensão de danos observados (BRASIL, 2009).

2.7 Expressão eletroforética de isoenzimas

Para a análise bioquímica, em cada mês em que as sementes foram retiradas do criotânque, até completar os 12 meses de armazenamento, foram utilizadas 50 sementes para cada cultivar. As amostras foram acondicionadas, identificadas e armazenadas em deep-freezer a -86 °C até a realização das análises eletroforéticas de isoenzimas. A metodologia proposta por Alfenas (2006) foi utilizada para extração, corrida eletroforética e revelação das isoenzimas do processo antioxidante, catalase (CAT), peroxidase (PO), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) e esterase (EST).

2.8 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado para todas as análises. Os resultados das avaliações fisiológicas foram analisados em esquema fatorial 12 X 3, sendo doze épocas de crioarmazenamento e três cultivares (Arara, Catuaí Amarelo 'IAC 62' e Catucaí

Amarelo '2SL'), com quatro repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade por meio do software R (R CORE TEAM, 2022). As médias de cada cultivar e época de armazenamento foram comparadas as médias do tratamento controle, por meio do teste t de Student, em nível de 5% de probabilidade. Para as análises bioquímicas, a interpretação dos resultados obtidos para as isoenzimas foi realizada levando-se em consideração a presença/ausência e a intensidade das bandas nos géis.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise fisiológica das sementes de café

Os resultados das avaliações das sementes dos tratamentos controle, ou seja, sementes de cada cultivar, recém-colhidas e avaliadas antes de serem imersas no nitrogênio líquido, encontram-se na tabela 1. Estes resultados, referentes à qualidade inicial das sementes, não foram submetidos à análise de variância. Sementes das cultivares Arara, Catuaí Amarelo ‘IAC 62’ e Catucaí Amarelo ‘2SL’ apresentaram, após colheita e processamento, teor de água inicial de 41%, 40% e 46% bu, respectivamente.

Tabela 1. Porcentagem de protusão radicular (PR), porcentagem de plântulas normais (PN), plântulas com folhas cotiledonares (FC), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raiz (PSR), embriões viáveis (EV) e condutividade elétrica (CE) de sementes de três cultivares de *Coffea arabica* L. recém-colhidas.

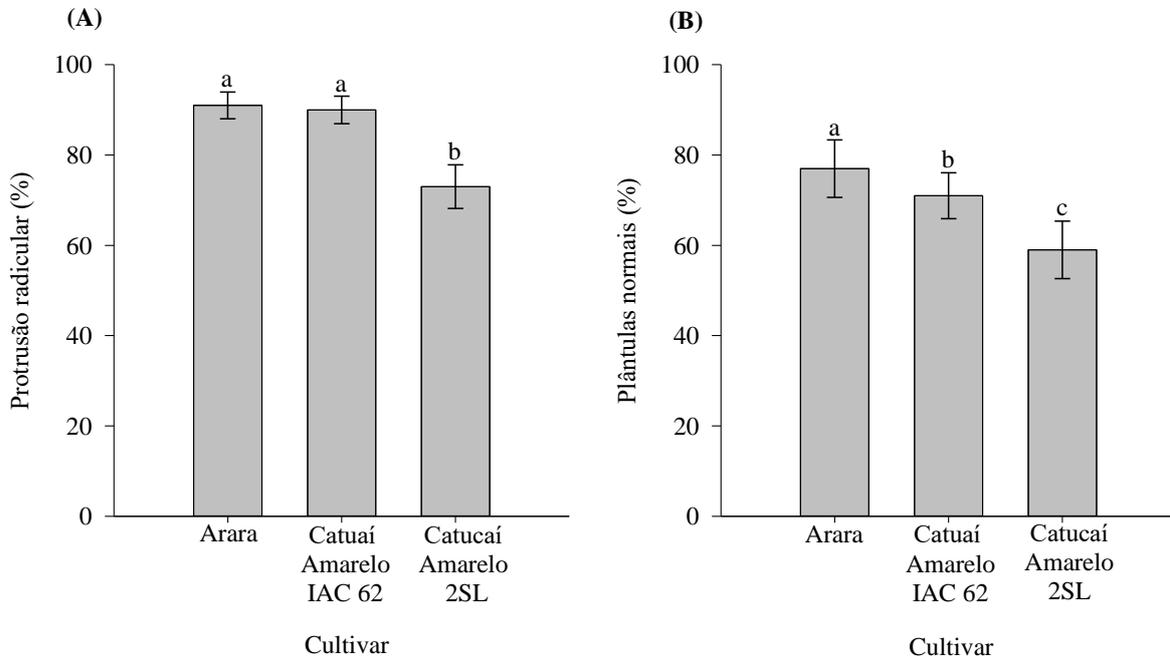
Cultivares	PR (%)	PN (%)	FC (%)	PSPA (mg.plântula ⁻¹)	PSR (mg.plântula ⁻¹)	EV (%)	CE (μS cm ⁻¹ g ⁻¹)
Arara	97	64	61	28,20	5,20	96	17,36
Catuaí Amarelo IAC 62	89	80	80	38,10	7,70	96	19,61
Catucaí Amarelo 2SL	77	76	73	34,40	6,40	78	38,10

Fonte: Da autora (2023).

Para as sementes crioarmazenadas, houve efeito da interação entre os fatores cultivares e período de crioarmazenamento para as variáveis porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, peso seco da parte aérea, peso seco da raiz e condutividade elétrica. Para a porcentagem de protrusão radicular e de plântulas normais, foi observado apenas efeito isolado dos fatores cultivares e período de crioarmazenamento. Para a variável embriões viáveis houve efeito apenas do fator período de crioarmazenamento (APÊNDICE A).

Verificou-se desempenhos fisiológicos semelhantes entre as cultivares Arara e Catuaí Amarelo ‘IAC 62’ para a variável porcentagem de protrusão radicular, apresentando médias superiores que as sementes da cultivar Catucaí Amarelo ‘2SL’ (FIGURA 1A). Já para a variável plântulas normais, a maior média no teste de germinação foi apresentado pela cultivar Arara, com melhor porcentagem de plântulas normais do que as sementes das outras duas cultivares (FIGURA 1B), independentemente do tempo de crioarmazenamento das sementes.

Figura 1. Porcentagem de protrusão radicular (A) e de plântulas normais (B) de sementes das cultivares de *Coffea arabica* L., criopreservadas por um ano. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



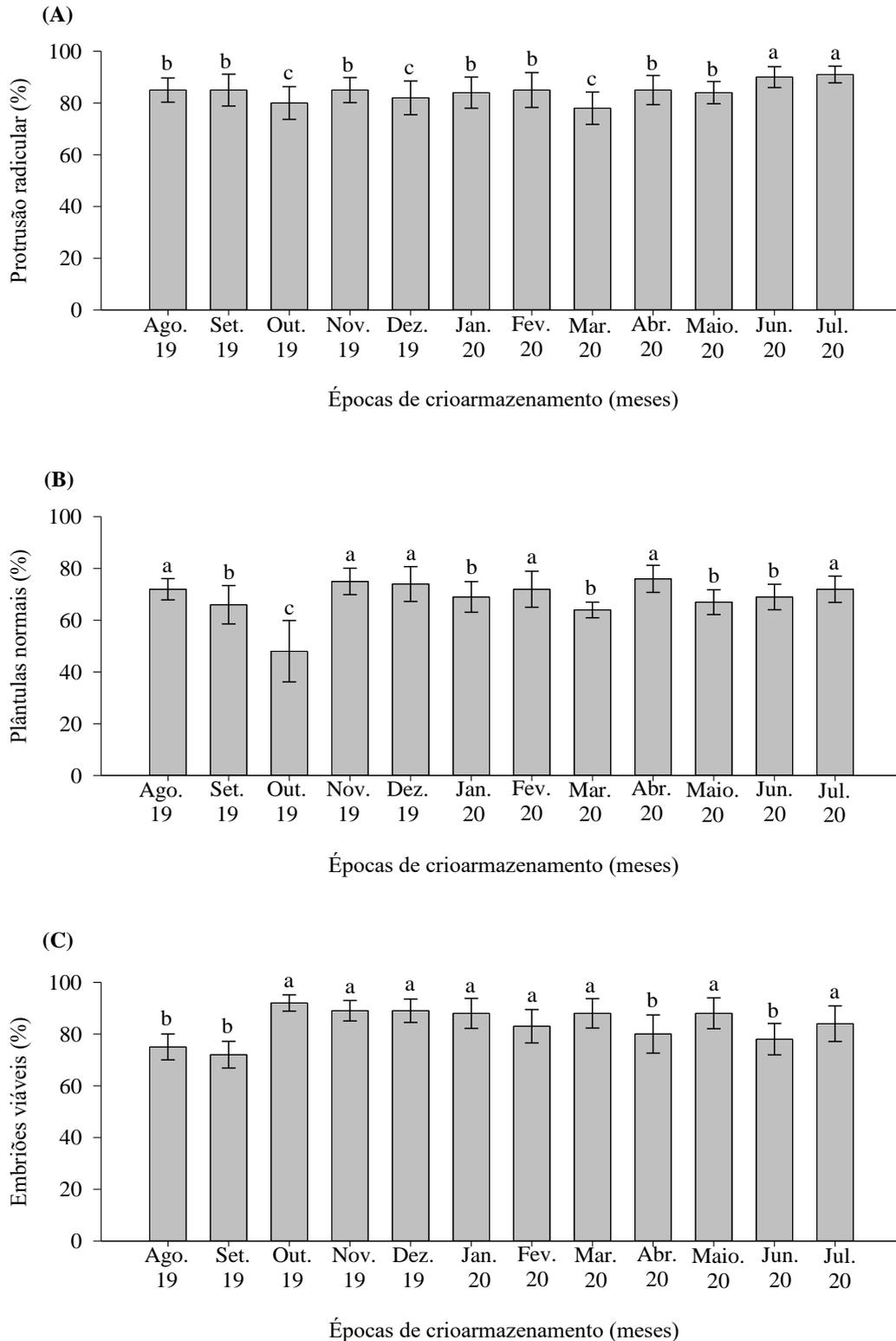
Fonte: Da autora (2023).

Em sementes de *C. arabica* L. o sucesso da técnica de criopreservação está relacionado ao teor de água das sementes, sendo este o fator mais importante do que a taxa de desidratação, resfriamento ou pré-resfriamento e reaquecimento (BERJAK; VARGHESE; PAMMENTER, 2011; COELHO et al., 2017a; COELHO et al., 2017b; FIGUEIREDO et al., 2017; FIGUEIREDO et al., 2021).

Coelho et al. (2017a), estudando a tolerância de sementes de *C. arabica* L. a temperaturas sub zero, observaram que a criopreservação agiu de forma benéfica em sementes de café que apresentavam menor qualidade fisiológica antes da imersão em nitrogênio líquido, corroborando com os resultados encontrados neste estudo. Ainda, de acordo com esses autores, o efeito benéfico pode estar associado ao endosperma das sementes de café, uma vez isolados os embriões, apresentaram alta viabilidade pelo teste de tetrazólio, no entanto, maiores estudos são necessários. Figueiredo et al. (2021), verificaram as estruturas celulares das sementes criopreservadas de *Coffea arabica* L., e pelo padrão observado, em todas as sementes, indicou que o dano da criopreservação é menos drástico nas células dos embriões do que nos endospermas.

De acordo com os resultados da avaliação de plântulas normais, de protrusão radicular e de viabilidade de embriões pelo teste de tetrazólio (FIGURA 2), em que o fator época de crioarmazenamento foi significativo isoladamente, observou-se alta sobrevivência das sementes imersas em nitrogênio líquido, em todos os meses de crioarmazenamento. Na variável protrusão radicular, foi possível observar que as sementes criopreservadas, apresentaram, ao longo dos meses, altas porcentagens, todavia, as maiores médias foram obtidas nos meses de junho e julho de 2020 (FIGURA 2A).

Figura 2. Porcentagem de protrusão radicular (A), de plântulas normais (B) e de viabilidade de embriões pelo teste de tetrazólio (C) de sementes criopreservadas de *Coffea arabica* L., por até um ano. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da autora (2023).

Pelos resultados de plântulas normais observa-se que os lotes de sementes criarmazenados por diferentes períodos ao longo de doze meses apresentaram porcentagens de germinação significativamente diferentes entre si (FIGURA 2B). No entanto, as maiores médias foram obtidas com um, quatro, cinco, sete, nove e doze meses de armazenamento das sementes, ou seja, nos meses de agosto/19, novembro/19, dezembro/19, fevereiro/20, abril/20 e julho/20.

Assim como para os resultados de plântulas normais, a porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio também foram significativamente diferentes entre os meses de criarmazenamento das sementes (FIGURA 2C). Entretanto, as diferenças em porcentagem de viabilidade dos embriões foram menos discrepantes que as observadas nos resultados de plântulas normais, no teste de germinação. Os percentuais de viabilidade no teste de tetrazólio foram superiores a 70% em todos os meses estudados, indicando alcance do padrão mínimo exigido pelo MAPA para a comercialização das sementes do gênero *Coffea* (BRASIL, 2009).

Resultados semelhantes foram encontrados por Devi; Kumaria; Das (2019), ao desenvolverem possíveis técnicas de armazenamento de longo prazo para o germoplasma de *Aquilaria malaccensis* Lam, onde concluíram que para esta espécie arbórea sensível à dessecação (recalcitrante) o armazenamento a longo prazo em nitrogênio líquido é uma tecnologia promissora e mantém a viabilidade. Este fato, corroborado por outros autores (FERRARI et al., 2020), permite a inferência de que a criopreservação é uma tecnologia para o armazenamento a longo prazo, como verificado para as espécies *Cattleya labiata* Lindl quanto para *Miltonia regnellii* Rchb.f.

Apesar de não haver interação significativa dos fatores estudados, na análise de variância, para os resultados da variável plântulas normais, observa-se diferenças significativas entre os meses de criarmazenamento, conforme pode ser observado na tabela 2, onde também são comparados os percentuais de germinação das sementes de cada cultivar e a cada época, com o percentual de germinação das sementes da testemunha, ou seja, daquelas recém-colhidas e avaliadas antes de serem imersas no nitrogênio líquido.

Tabela 2. Porcentagem de plântulas normais (PN) de sementes criopreservadas de três cultivares de *Coffea arabica* L., por até um ano.

Época de crioarmazenamento (meses)	Cultivares		
	Arara PN (%)	Catuaí Amarelo ‘IAC 62’ PN (%)	Catuaí Amarelo 2SL PN (%)
Agosto/19	78 aA	74 aA	65 aA
Setembro/19	82 aA	62 bB	54 bB
Outubro/19	57 bB	56 bB	30 cB
Novembro/19	81 aA	72 aA	73 aA
Dezembro/19	85 aA	79 aA	59 bB
Janeiro/20	75 aA	76 aA	56 bB
Fevereiro/20	82 aA	81 aA	54 bB
Março/20	65 bB	68 bB	60 bB
Abril/20	87 aA	68 bB	72 aA
Mai/20	75 aA	69 bB	58 bB
Junho/20	74 aA	75 aA	59 bB
Julho/20	83 aA	72 aA	62 bB
Controle*	64B	80A	76A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade.

As médias seguidas de letras maiúsculas iguais à do controle, não diferem entre si, pelo teste t de Student, em nível de 5% de probabilidade.

* Sementes recém-colhidas, avaliadas antes da imersão no nitrogênio líquido.

Fonte: Da autora (2023).

Para todas as cultivares utilizadas, de maneira geral, observa-se uma boa porcentagem de sobrevivência das sementes crioarmazenadas em todos as épocas, obtidas no teste de germinação (TABELA 2). Para a cultivar Arara foi possível observar altas porcentagens de plântulas normais em todas as épocas de crioarmazenamento das sementes, exceto nos meses de outubro/19 e março/20. Comparando-se as sementes do tratamento controle, ou seja, sementes recém-colhidas, com as criopreservadas, observa-se aumento da porcentagem de plântulas normais em quase todos os meses estudados.

As sementes da cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’, retiradas do criotank nos meses de setembro/19, outubro/19, março/20, abril/20 e maio/20, com dois, três, oito, nove e dez meses de armazenamento, apresentaram as menores porcentagens de plântulas normais, se diferindo significativamente dos demais meses trabalhados, assim como, se comparado ao controle, as menores médias também foram observadas nos meses descritos (TABELA 2).

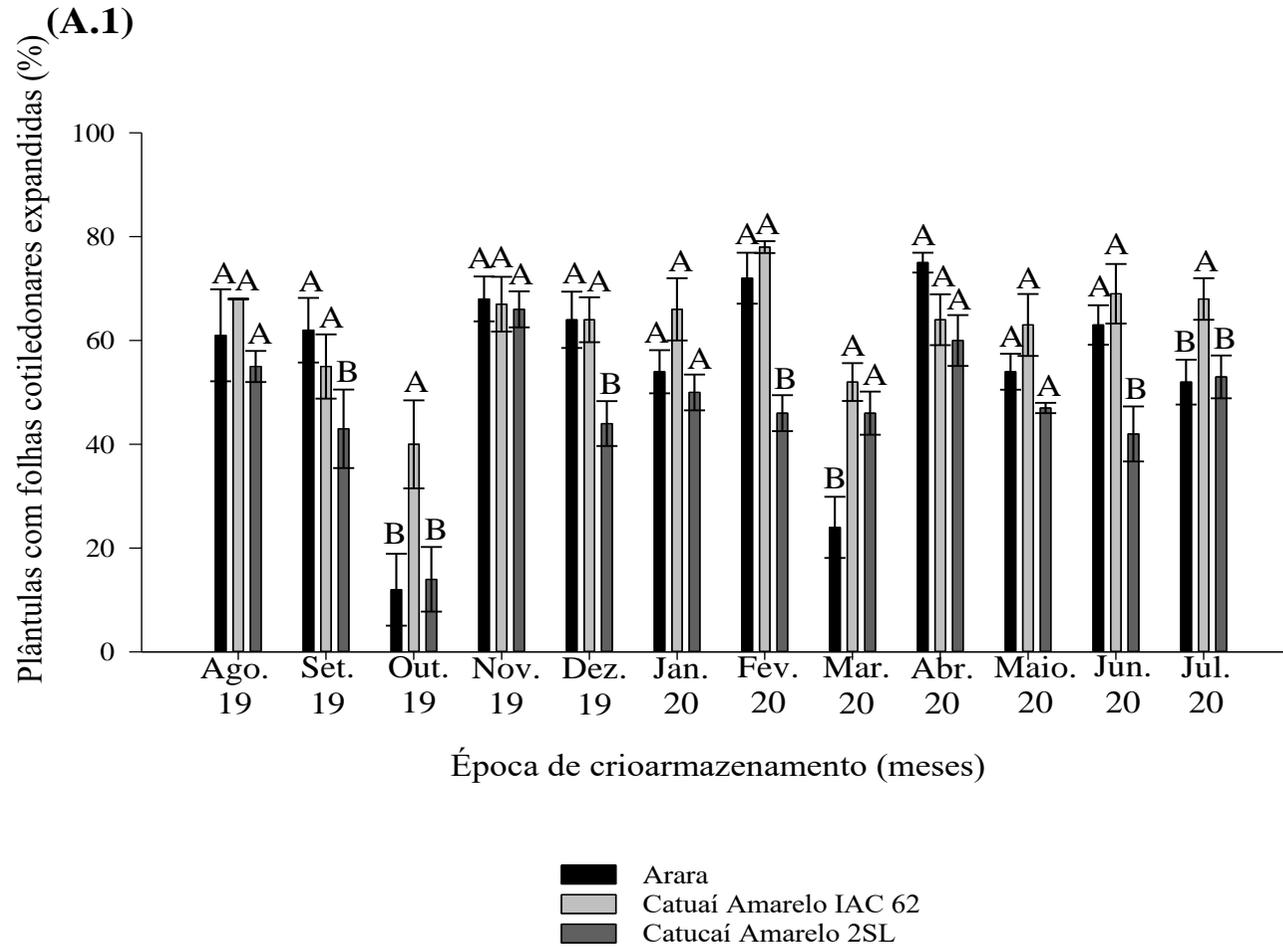
No entanto, para a cultivar Catuaí Amarelo ‘2SL’ as maiores porcentagens de germinação foram verificadas nos meses de agosto/19, novembro/19 e abril/20 (TABELA 2),

assim como quando comparado às sementes do tratamento controle o mesmo comportamento foi observado. Nota-se que, de maneira geral, as sementes criarmazenadas da cultivar Catucaí Amarelo '2SL' apresentaram menor porcentagem de plântulas normais (a exceção daquelas criarmazenadas por um, quatro e nove meses), sendo menos tolerantes a criopreservação que as cultivares Arara e Catucaí Amarelo 'IAC 62'.

Com referência às cultivares Arara e Catucaí Amarelo 'IAC 62', o desempenho fisiológico após criopreservação por até doze meses, verifica-se que as sementes apresentaram as maiores médias de porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas e sem diferenças significativas entre os meses estudados, exceto nos meses de outubro/19 e julho/20, em que as sementes apresentaram 40 e 68%, respectivamente (FIGURA 3, A.1). Independentemente da cultivar, nos meses de novembro/19 e abril/20 as sementes apresentaram maior porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias (FIGURA 3, A.2).

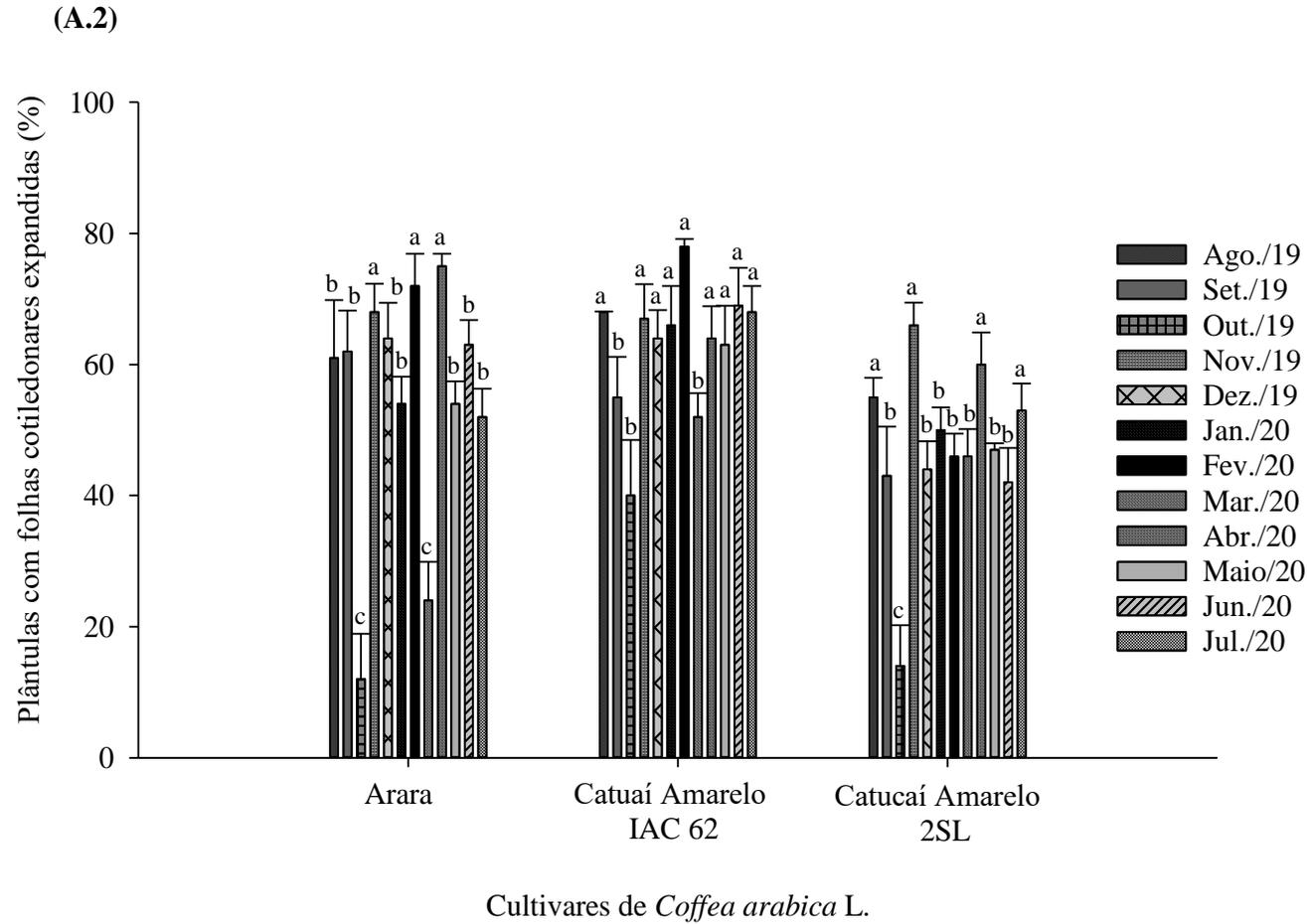
Coelho; Rosa; Fernandes (2017b) ao estudarem sementes de diferentes cultivares de *C. arabica* após criopreservação por imersão direta em nitrogênio líquido após secagem rápida e lenta, observaram que as diferentes cultivares de sementes de café arábica podem ser criopreservadas, no entanto, existem diferentes níveis de tolerância à imersão em nitrogênio líquido.

Figura 3. Porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas de sementes das três cultivares de *Coffea arabica* L. em cada tempo (meses) de criarmazenamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, dentro de cada época de criarmazenamento (A.1) e minúscula dentro de cada cultivar (A.2) não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Continua).



Fonte: Da autora (2023).

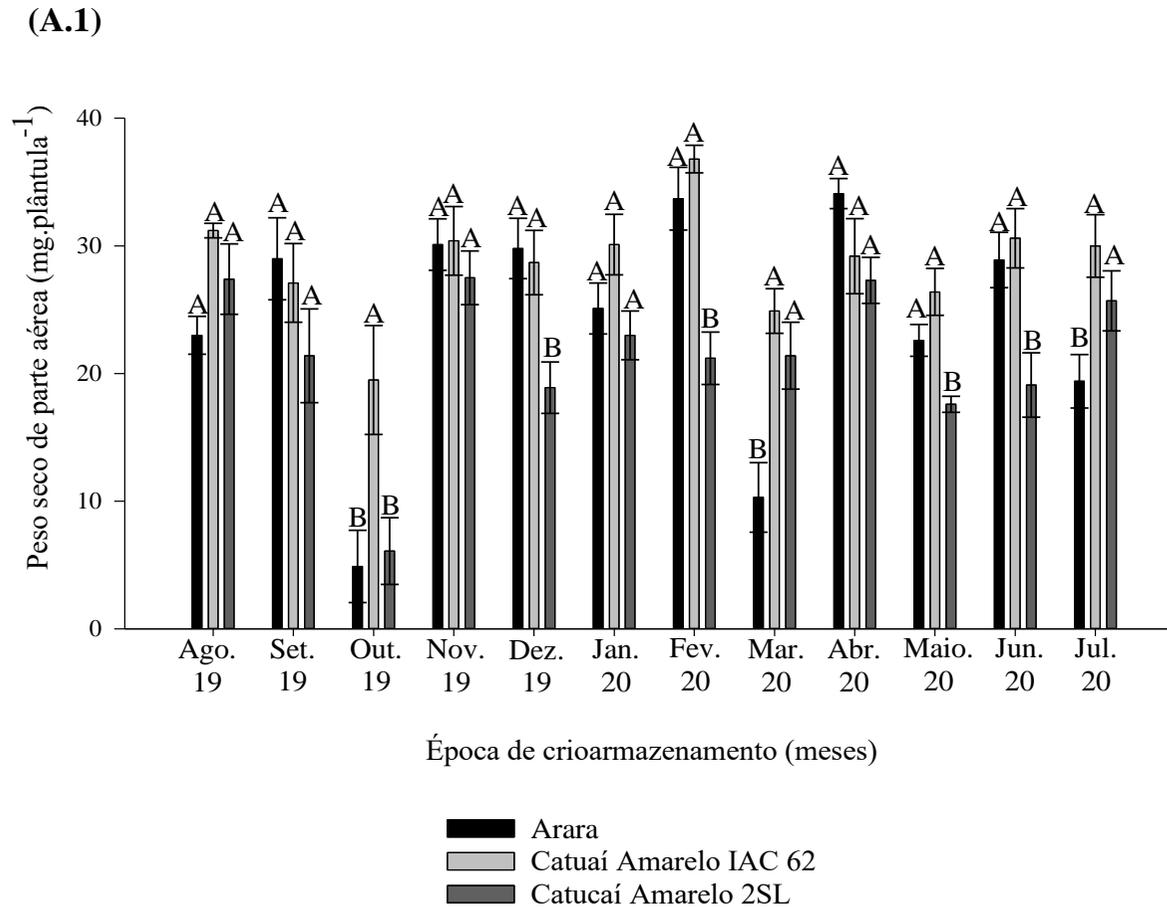
Figura 3. Porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas de sementes das três cultivares de *Coffea arabica* L. em cada tempo (meses) de criarmazenamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, dentro de cada época de criarmazenamento (A.1) e minúscula dentro de cada cultivar (A.2) não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Conclusão).



Fonte: Da autora (2023).

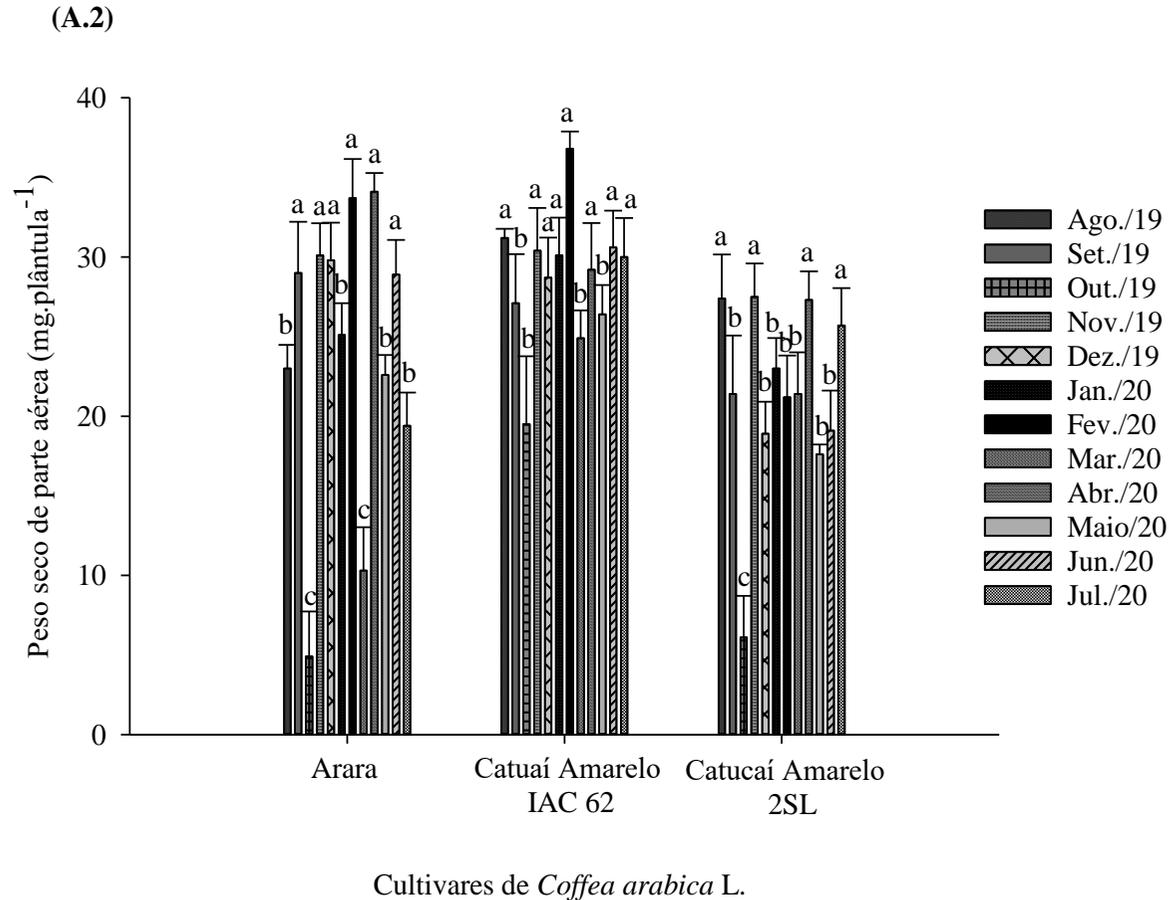
Nos meses de agosto/19, setembro/19, novembro/19, janeiro/20 e abril/20 não houve diferenças significativas nos pesos secos de parte aérea, entre as cultivares (FIGURA 4, A.1). Observa-se que para a cultivar Catuaí Amarelo 'IAC 62', foram constatados os maiores percentuais médios dos pesos secos de parte aérea, comparado às sementes das cultivares Arara e Catucaí Amarelo 2SL, cujas médias foram significativamente iguais na maioria dos meses de armazenamento das sementes (FIGURA 4, A.2). Corroborando com esses resultados, Coelho; Rosa; Fernandes (2017b) verificaram que as sementes da cultivar Catuaí Amarelo 'IAC 62' são mais tolerantes após a imersão em nitrogênio líquido, apresentando melhor qualidade fisiológica.

Figura 4. Peso seco de parte aérea de plântulas das três cultivares de *Coffea arabica* L. em cada tempo (meses) de criarmazenamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula dentro de cada época de criarmazenamento (A.1) e minúscula dentro de cada cultivar (A.2) não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Continua).



Fonte: Da autora (2023).

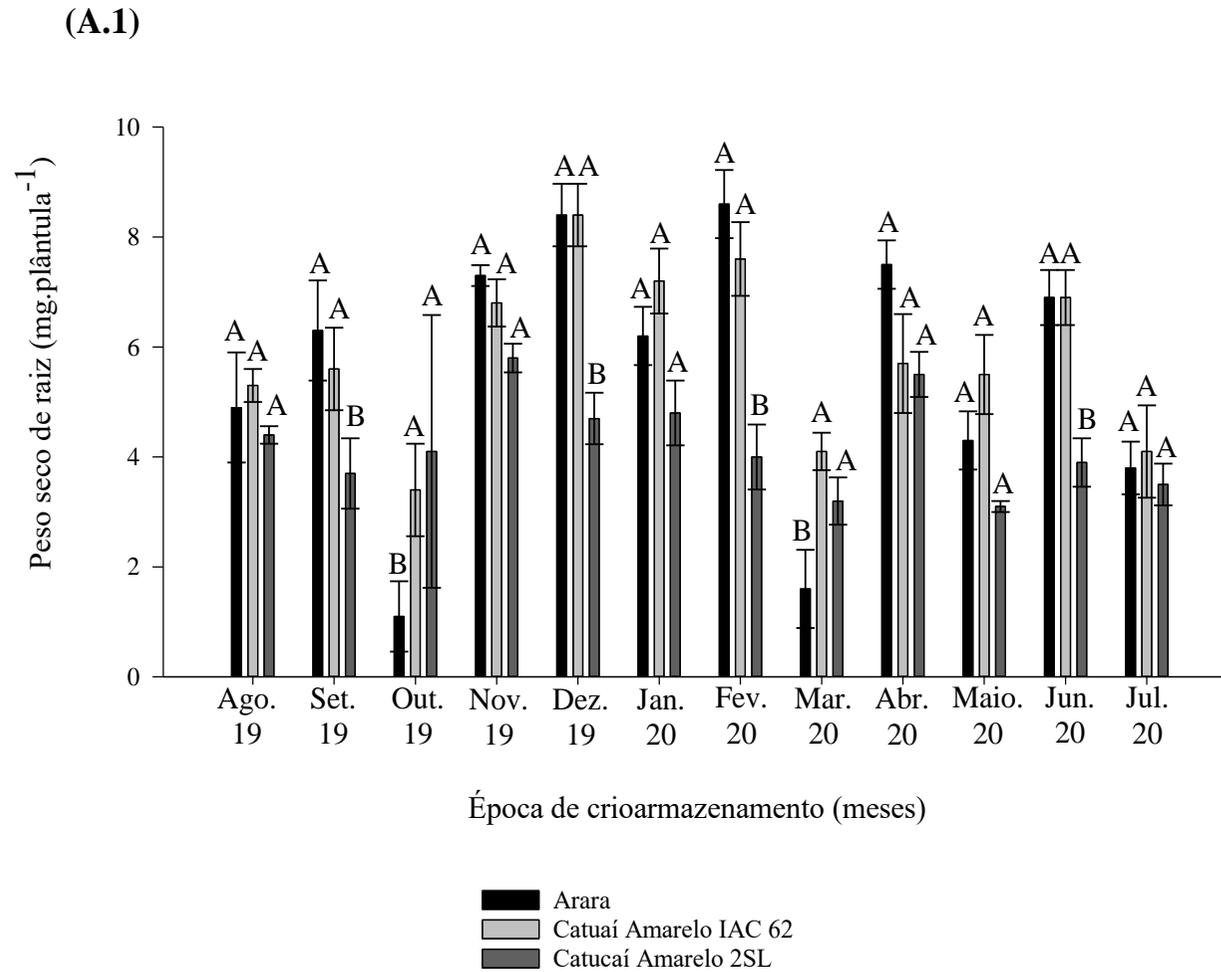
Figura 4. Peso seco de parte aérea de plântulas das três cultivares de *Coffea arabica* L. em cada tempo (meses) de criarmazenamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula dentro de cada época de criarmazenamento (A.1) e minúscula dentro de cada cultivar (A.2) não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Conclusão).



Fonte: Da autora (2023).

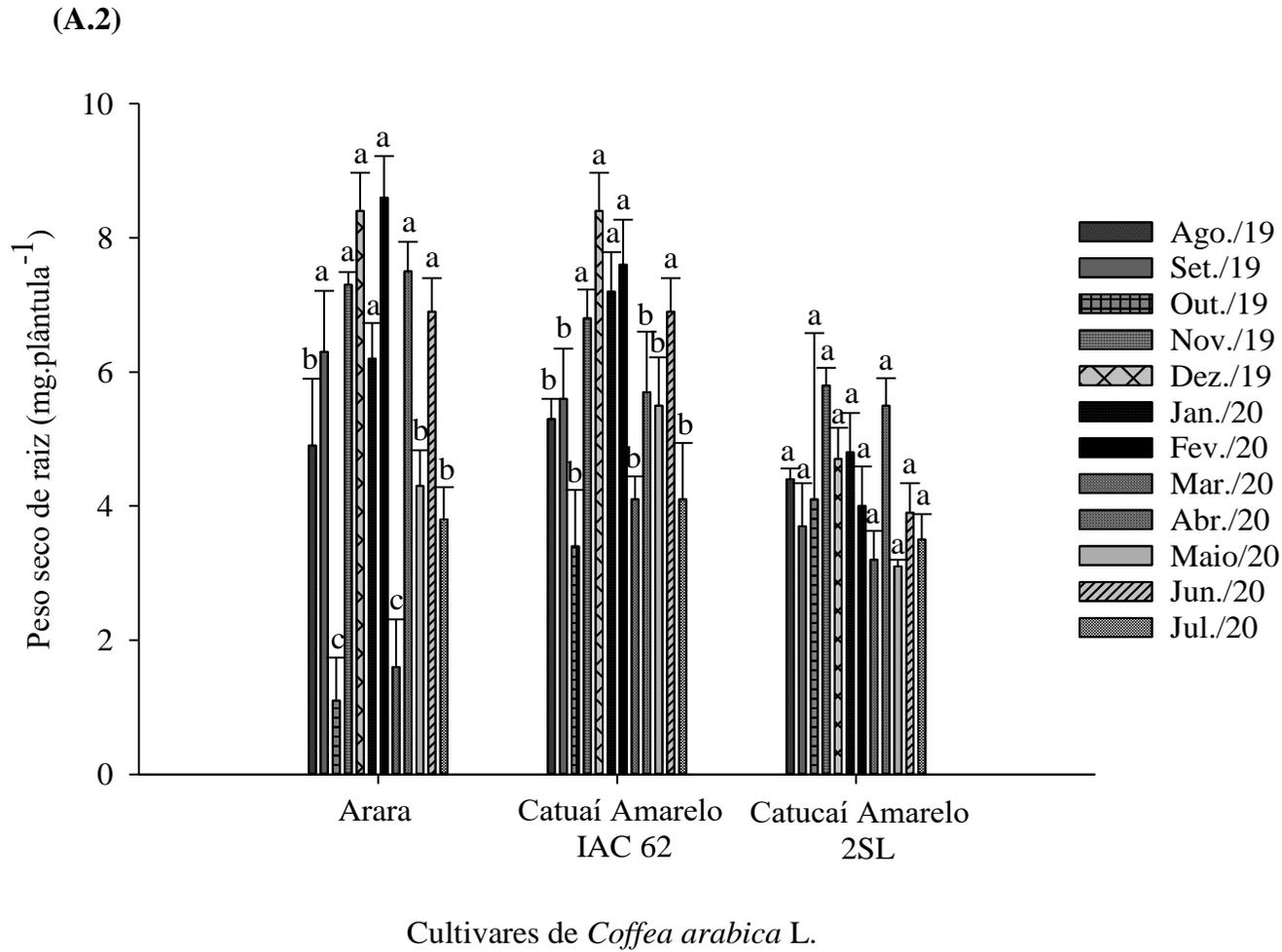
Foi observado que, de modo geral, os meses de setembro/19, novembro/19, fevereiro/20 e junho/20 a cultivar Catucaí Amarelo '2SL' se diferiu significativamente das demais cultivares, apresentando as menores médias de peso seco de raiz (FIGURA 5, A.1). Assim como, houve redução do vigor das sementes crioarmazenadas, como observado no peso seco de raiz da Cultivar Catucaí Amarelo '2SL', cujo as médias foram inferiores das cultivares Arara e Catuaí Amarelo 'IAC 62', apesar que não houve diferenças significativas entre os meses estudados (FIGURA 5, A.2).

Figura 5. Peso seco de raiz de plântulas das três cultivares de *Coffea arabica* L. em cada tempo (meses) de criarmazenamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula dentro de cada época de criarmazenamento (A.1) e minúscula dentro de cada cultivar (A.2), não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Continua).



Fonte: Da autora (2023).

Figura 5. Peso seco de raiz de plântulas das três cultivares de *Coffea arabica* L. em cada tempo (meses) de criarmazenamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula dentro de cada época de criarmazenamento (A.1) e minúscula dentro de cada cultivar (A.2), não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Conclusão).

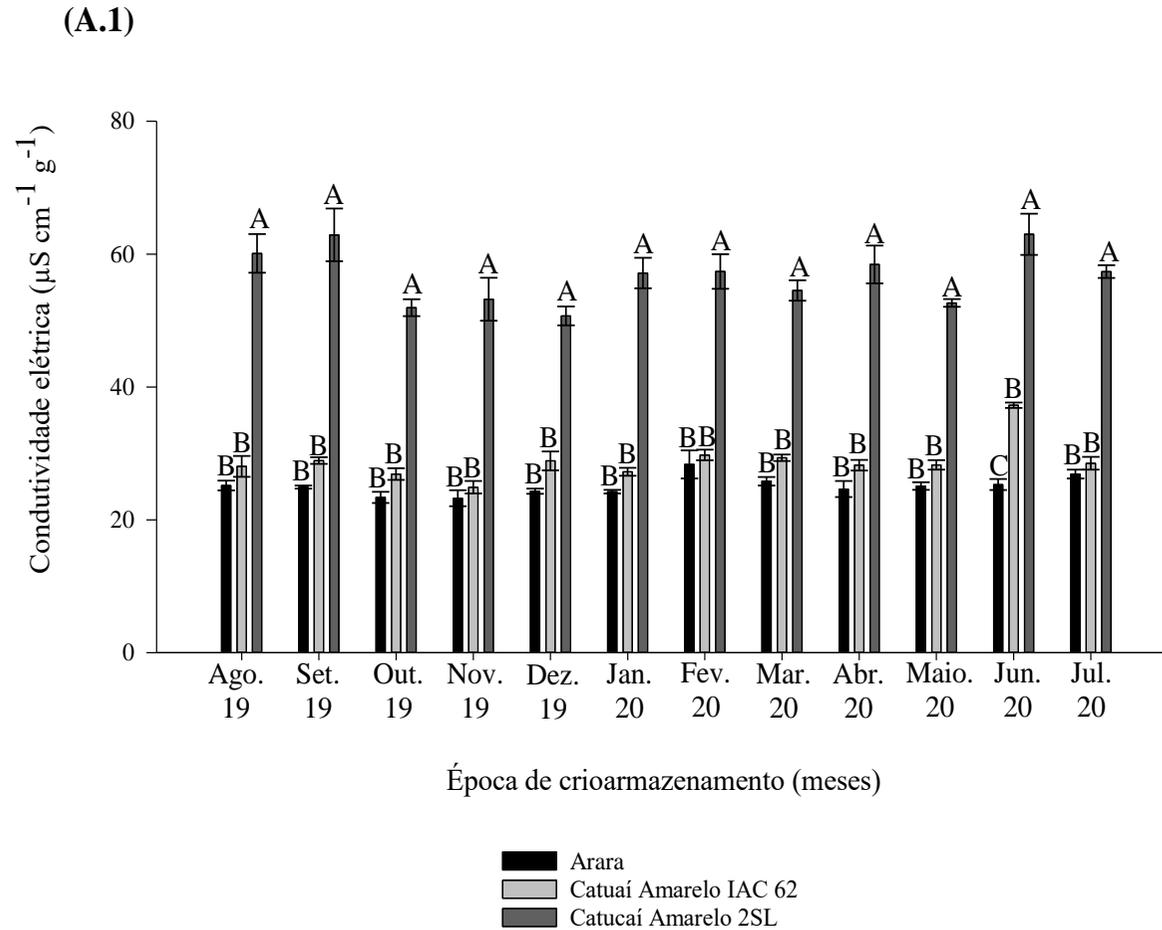


Fonte: Da autora (2023).

De maneira geral, as sementes da cultivar Catucaí Amarelo ‘2SL’ foram as mais sensíveis ao efeito do criarmazenamento em todas as épocas estudadas, com base nos resultados da condutividade elétrica (FIGURA 6, A.1). As sementes criopreservadas da cultivar Catucaí Amarelo ‘IAC 62’ no mês de junho/20 apresentaram maior lixiviação de exsudados, resultando em maior condutividade elétrica, todavia, para a cultivar Arara não houve diferenças significativas entre os meses de criarmazenamento das sementes (FIGURA 6, A.2). Figueiredo et al. (2021) relataram baixos resultados de condutividade elétrica, nos estudos sobre aspectos fisiológicos, bioquímicos e ultraestruturais de sementes criopreservadas de *C. arabica* L., submetidas a diferentes protocolos de desidratação, pré-resfriamento, resfriamento, reaquecimento e uso de água catódica.

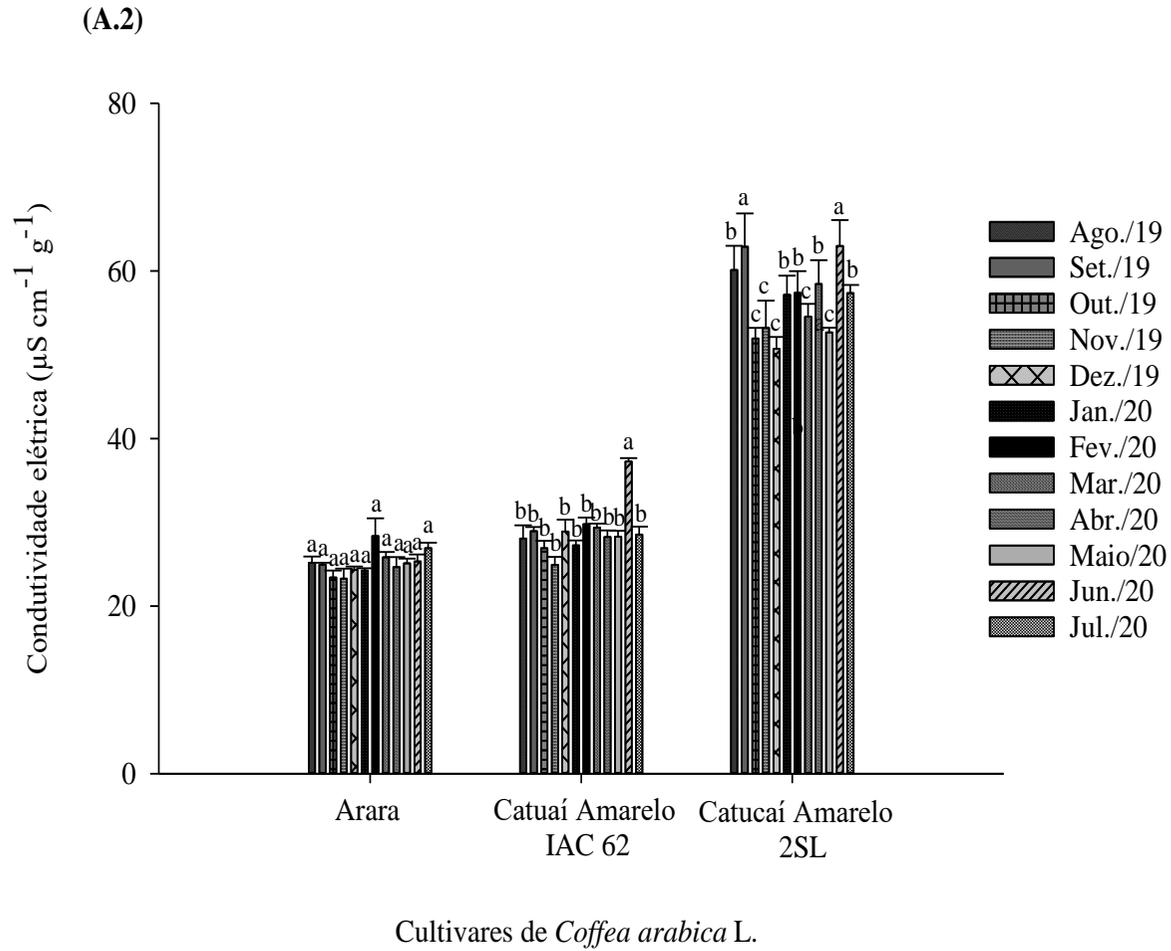
Neste sentido, o teste de condutividade elétrica avalia indiretamente a qualidade das sementes por meio da medição da quantidade de solutos lixiviados na solução, ligado diretamente com a integridade da membrana das sementes, ou seja, membranas danificadas ou mal estruturadas tendem a ceder mais lixiviados à solução obtendo leituras altas no condutímetro (KRZYŻANOWSKI et al., 2021).

Figura 6. Condutividade elétrica de sementes das três cultivares de *Coffea arabica* L. em cada época (meses) de criarmazenamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula dentro de cada época de criarmazenamento (A.1) e minúscula dentro de cada cultivar (A.2) não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Continua).



Fonte: Da autora (2023).

Figura 6. Condutividade elétrica de sementes das três cultivares de *Coffea arabica* L. em cada época (meses) de criarmazenamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula dentro de cada época de criarmazenamento (A.1) e minúscula dentro de cada cultivar (A.2) não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Conclusão).



Fonte: Da autora (2023).

3.2 Expressão eletroforética de isoenzimas

Independentemente da cultivar, em todos os tempos de criarmazenamento das sementes, ocorre alta expressão da enzima catalase (FIGURA 7). Ressalta-se que para esta enzima, nos meses iniciais de criarmazenamento agosto, setembro e outubro de 2019, as sementes apresentaram menor expressão da catalase para as cultivares Arara e Catuaí Amarelo ‘IAC 62’, o que não ocorre na Cultivar Catuaí Amarelo ‘2SL’. De maneira geral, observou-se maior expressão da catalase em sementes com melhor desempenho fisiológico.

Figura 7. Expressão eletroforética da enzima catalase de sementes das cultivares *de Coffea arabica* L., criarmazenadas por até um ano.



Fonte: Da Autora (2023).

A enzima catalase atua na remoção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) das células, e sua maior atividade pode estar relacionada à diminuição de mecanismos de prevenção de danos oxidativos (BAILLY et al., 1996). Diferentemente do que foi observado no estudo, tem sido reportado aumento na expressão da catalase, em sementes de café submetidas aos estresses do processo de secagem e durante a imersão em nitrogênio líquido. Brandão Júnior et al. (2002) observaram uma diminuição na atividade da catalase em sementes de café que apresentaram menor desempenho fisiológico, resultante de dessecação. Analisando-se os perfis eletroforéticos de isoenzimas, Figueiredo et al. (2021) observaram que houve um aumento da expressão da CAT em sementes secadas em solução saturada de $(NH_4)_2SO_4$ até 17% (bu), submetidas ao resfriamento lento e imersas em nitrogênio líquido, indicando que esta enzima é ativada sob condições de estresse. Estresses causados às sementes podem causar aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, estimulando a geração de peróxido de hidrogênio.

Com relação a enzima peroxidase, observa-se expressão mais intensa nas sementes da cultivar Arara, que apresentaram o melhor desempenho fisiológico após criopreservação, e da cultivar Catuaí Amarelo 2SL, com os piores desempenhos (FIGURA 8). Isto indica pouca associação entre a atividade da peroxidase e a qualidade das sementes criopreservadas. Nas

sementes da cultivar Arara ocorre alta expressão em todos os tempos de criarmazenamento principalmente nos meses de novembro e dezembro de 2019, quando as sementes apresentaram altas porcentagens de germinação, de 81 e 85% (TABELA 2). Já nas sementes criopreservadas de Catuaí Amarelo 2SL, com o pior desempenho fisiológico após criopreservação, a maior atividade da peroxidase não está associada aos maiores percentuais de germinação, ou seja, nos meses de novembro/2019 e abril/2020. Em sementes da cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’ foi observada baixa expressão em todos os meses estudados para o criarmazenamento.

No presente estudo, as sementes das três cultivares apresentavam desempenhos fisiológicos diferentes ao longo dos meses de criarmazenamento, sendo que a expressão da enzima peroxidase não foi coerente com a qualidade fisiológica. A expressão dessa enzima está associada aos mecanismos de defesa das sementes, por utilizar peróxidos como aceptor de hidrogênio, podendo contribuir para o aumento dos mecanismos de defesa e prevenção de perda de qualidade (DUSSERT; ENGELMANN, 2006).

Figura 8. Expressão eletroforética da enzima peroxidase de sementes das cultivares de *Coffea arabica* L., criarmazenadas por até um ano.

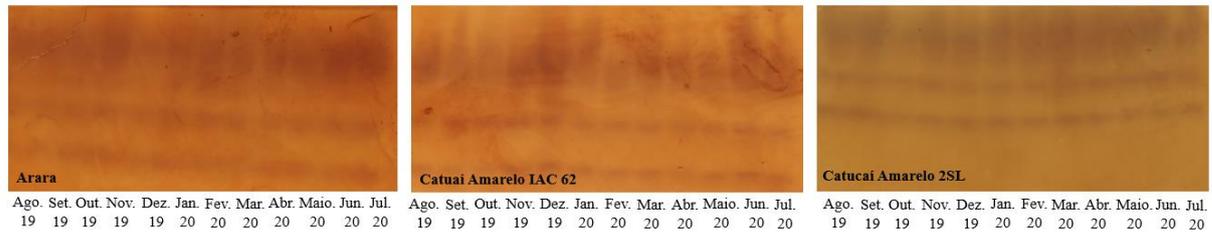


Fonte: Da Autora (2023).

A associação da expressão da peroxidase com o desempenho fisiológico de sementes de café após estresses de secagem ou armazenamento em nitrogênio líquido já foi investigado e de acordo com os resultados esta enzima é ativada sob condições de estresse (COELHO et al., 2017a; COELHO et al., 2017b; FIGUEIREDO et al., 2021).

Diferentemente da peroxidase, a enzima glutamato oxaloacetato transaminase apresentou padrão de expressão semelhante nas sementes de todas as cultivares analisadas, mas também com pouca associação aos diferentes desempenhos fisiológicos apresentados. Não ocorreram alterações na intensidade da expressão eletroforética da enzima glutamato oxaloacetato transaminase, ao longo dos meses de criarmazenamento das sementes para todas as cultivares em estudo (FIGURA 9).

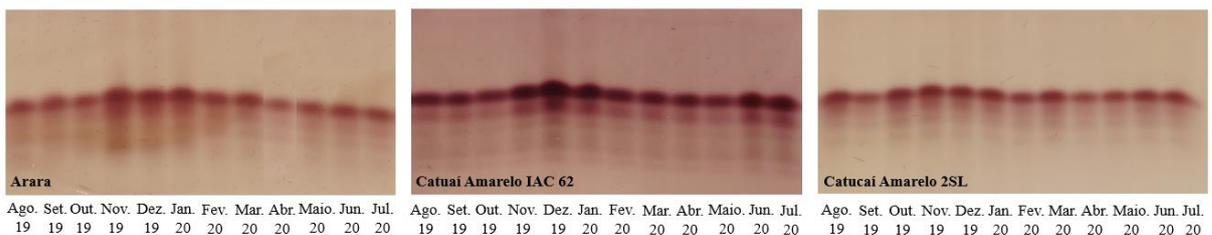
Figura 9. Expressão eletroforética da enzima glutamato oxaloacetato transaminase de sementes das cultivares de *Coffea arabica* L., criarmazenadas por até um ano.



Fonte: Da Autora (2023).

Na expressão da enzima esterase, também foi observado padrão semelhante, em todas as cultivares criarmazenadas, sendo que na cultivar Catuai Amarelo ‘IAC 62’, ocorreu maior intensidade. Assim como foi observado na expressão da enzima catalase, nota-se que nos meses de novembro e dezembro de 2019 e janeiro, junho e julho de 2020, as sementes apresentaram maior intensidade dessa enzima. Nestes períodos, estão também os tratamentos (tempos de criarmazenamento) em que as sementes apresentaram os melhores desempenhos fisiológicos, independentemente do nível de qualidade da cultivar. As sementes da cultivar Catuai Amarelo ‘IAC 62’ apresentaram alta expressão da esterase, principalmente nos meses de novembro/19, dezembro/19, janeiro/20 e fevereiro/20, ou seja, aqueles que apresentaram maiores médias de plântulas normais no teste de germinação (FIGURA 10).

Figura 10. Expressão eletroforética da enzima esterase de sementes das cultivares de *Coffea arabica* L., criarmazenadas por até um ano.



Fonte: Da Autora (2023).

Ressalta-se que é esperado que a conservação em nitrogênio líquido não altere a qualidade fisiológica das sementes ao longo do tempo de armazenamento. Assim, muito embora as sementes das diferentes cultivares investigadas no presente estudo tenham apresentado alterações no desempenho fisiológico, em função do tempo de criarmazenamento, este comportamento não foi evidenciado por alterações consistentes nos perfis de expressão das enzimas estudadas. Neste estudo, a avaliação fisiológica e bioquímica a cada mês, das sementes

das três diferentes cultivares crioarmazenadas, foram observadas alterações durante o período de um ano. No entanto, considerando o desempenho das sementes na última época de avaliação, em julho/2020, em que todas as cultivares apresentaram a melhor qualidade quando retiradas do criotânque, pode-se afirmar que a criopreservação foi uma forma segura para conservar sementes de café neste estudo. Com base nos resultados do presente estudo com diferentes cultivares crioarmazenadas por até um ano, as sementes de café arábica podem ser conservadas com manutenção da qualidade fisiológica, apesar das diferenças nas porcentagens de germinação entre as amostras de sementes retiradas do criotânque durante o período de armazenamento. No processo de criopreservação, todas as etapas requerem muito cuidado, sendo crucial a etapa de reaquecimento das sementes, a qual deve ser realizada o mais rapidamente quanto possível, para que não haja tempo de ocorrência da formação de cristais de gelo.

4 CONCLUSÕES

O criarmazenamento das sementes de *Coffea arabica* L. por até um ano mantém a qualidade fisiológica das sementes.

A atividade das enzimas catalase, peroxidase e esterase em *Coffea arabica* L. apresenta alterações durante o criarmazenamento, porém com pouca associação com o desempenho fisiológico das sementes.

REFERÊNCIAS

- ABREU, G. F. et al. Antioxidant enzymes preserving coffee quality in refrigerate environment. **Biociencia Vegetal**, v. 18, n. 3, p. 151-159, 2018.
- 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. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. 627 p.
- 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.
- 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.
- 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. Departamento Nacional de Produção Vegetal. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 399 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**, Brasília, 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. et al. Cryopreservation of *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner seeds: importance of drying rate and moisture content. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 8, p. 1335-1342, 2019.
- COELHO, S. V. B. et al. Cryopreservation of coffee seeds: a simplified method. **Seed Science and Technology**, v.45, n.3, p. 1-12, 2017. (b)
- COELHO, S. V. B. et al. Tolerance of *Coffea arabica* L. seeds to sub zero temperatures. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 4, n. 3, p. 312-321, 2017. (a)

- DEVI, S. D.; KUMARIA, S.; DAS, M. C. Development of cryopreservation protocol for *Aquilaria Malaccensis* Lam., a recalcitrant seeded tropical tree species. **Cryoletters**, v. 40, n. 1, p. 18-27, 2019.
- 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 seeds of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, v. 8, p. 9-15, 1998.
- 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.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behavior? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.
- FÁVARIS, N. A. B. et al. Protein profile in arabica coffee seeds in electrophoresis gel: importance of freeze-drying. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 44, e202244017, p.1-13, 2022.
- FERRARI, E. A. P. et al. Degree of moisture in seeds for the cryopreservation of orchids native to Brazil. **Ciência Rural**, v. 50, n. 8, p. 1-7, 2020.
- FIGUEIREDO, M. A. de et al. Exploratory studies for cryopreservation of *Coffea arabica* L. seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 39, n. 2, p. 150-158, 2017.
- FIGUEIREDO, M. A. de et al. Physiological, biochemical, and ultrastructural aspects of *Coffea arabica* L. seeds under different cryopreservation protocols. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 45, e027020, p. 1-14, 2021.
- KARTHA, K. K. Meristem culture and germplasm preservation. In: _____ (Ed.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 115-134.
- KAYA, E. et al. Cryopreservation of citrus seed via dehydration followed by immersion in liquid nitrogen. **Turkish journal of biology**, v. 41, n. 1, p. 242-248, 2017.
- KRYZANOWSKI, F. C. et al. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: **ABRATES**, 2021. 601 p.
- KRZYZANOWSKY, F. C.; FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A. Relatos dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. **Informativo ABRATES**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 15-50, 1991.
- 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.

PENIDO, A. C. et al. Cold coffee seeds storage with different water content. **Coffee Science**, Lavras, v. 16, e161844, p. 1-9, 2021.

R Core Team. **R**: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2022.

RICALDONI, M. A. **Uso de sementes criopreservadas e cultivo protegido para a produção de mudas de *Coffea arabica* L.** 76f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2019.

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.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2, n. 1, p. 1-26, 2012.

SOUZA, A. C. de. **Aspectos fisiológicos, bioquímicos, biofísicos e ultraestruturais associados à criopreservação em sementes de *Coffea arabica* L.** 103f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2019.

APÊNDICE A - Tabela da análise de variância do capítulo 2

Tabela 1 Resumo da análise de variância dos resultados da protrusão radicular (PR), plântulas normais (PN), plântulas com folhas cotiledonares (FC), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raiz (PSR), embriões viáveis (EV) e condutividade elétrica (CE) de sementes de três cultivares de *Coffea arabica* L., criopreservadas por diferentes períodos, até um ano.

FV	GL	Quadrados Médios						
		PR	PN	FC	PSPA	PSR	EV	CE
Cultivar (C)	2	4921,3*	4276,0*	2945,44*	660,74*	37,341*	333,03 ^{ns}	14209,6*
Meses (M)	11	150,1*	692,5*	1899,26*	382,51*	26,058*	495,07*	63,5*
C x M	22	67,8 ^{ns}	141,2 ^{ns}	275,87*	75,69*	5,433*	108,56 ^{ns}	23,3*
Erro	108	42,9	86,7	100,4	22,39	2,006	127,54	10,2
CV (%)	-	7,77	13,52	18,18	19,09	27,09	13,47	8,68

*: Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns}: não significativo.

Fonte: Da Autora (2023).

CAPÍTULO 3 MUDAS DE SEMENTES CRIOPRESERVADAS DE *Coffea arabica* L.

RESUMO

Na espécie *Coffea arabica* L. as lavouras cafeeiras são implantadas, em quase sua totalidade, por mudas a partir da sementeira de sementes recém-colhidas, sendo que a qualidade e o momento de obtenção das mudas, adequados ao plantio, são de suma importância. Neste sentido a utilização de sementes criopreservadas é uma opção inovadora, visto que os cafeicultores podem obter as mudas a qualquer época e não apenas da forma usual, em que utilizam sementes colhidas no mesmo ano de sementeira. Esse estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a produção de mudas de *C. arabica* L., a partir da sementeira em todos os meses do ano, em dois diferentes ambientes, viveiro e casa de vegetação, e três cultivares. Sementes das cultivares Arara, Catuaí Amarelo 'IAC 62' e Catuaí Amarelo '2SL' foram submetidas à secagem em sílica em gel até o teor de água de 17% (base úmida) e, em sequência, foram diretamente imersas em nitrogênio líquido, onde permaneceram por período de 12 meses. A cada mês durante esse período, amostras foram retiradas, reaquecidas em banho-maria e sementeiras para a produção das mudas em dois ambientes (em casa de vegetação e em viveiro). A avaliação das mudas foi realizada quando pelo menos uma das mudas em uma parcela experimental apresentasse seis pares de folhas verdadeiras totalmente expandidas. Avaliou-se o diâmetro médio do caule, altura média da muda, área foliar, número de pares de folhas verdadeiras e peso seco de parte aérea e de raízes. A utilização de sementes criopreservadas possibilita a produção de mudas *Coffea arabica* L. em qualquer época do ano, sendo a casa de vegetação, o ambiente que proporciona melhor desempenho das mudas, em comparação às produzidas em viveiro. A sementeira de sementes criopreservadas nos meses de janeiro a março requer maior tempo para a formação de mudas, as quais também apresentam desempenho fisiológico aquém do desempenho das iniciadas nos meses de maio a julho. Mudas produzidas com sementes criopreservadas durante todos os meses do ano apresentam desempenho igual ou superior ao das produzidas com sementes recém-colhidas e não imersas em nitrogênio líquido.

Palavras-chave: Café arábica. Nitrogênio líquido. Produção de mudas. Propagação.

ABSTRACT

In the species *C. arabica* L., coffee plantations are mostly established from seedlings obtained from freshly harvested seeds. The quality and timing of obtaining seedlings suitable for planting are of utmost importance. In this regard, the use of cryopreserved seeds is an innovative option, as coffee growers can obtain seedlings at any time, not just using seeds harvested in the same year of sowing. This study aimed to evaluate the production of *C. arabica* L. seedlings by sowing seeds in all months of the year in two different environments, nursery and greenhouse, using three cultivars. Seeds from the Arara, Catuaí Amarelo 'IAC 62', and Catucaí Amarelo '2SL' cultivars were dried with silica gel until reaching a moisture content of 17% (wet basis), and then directly immersed in liquid nitrogen for a period of 12 months. Samples were taken every month during this period, rewarmed in a water bath, and sown to produce seedlings in two environments (greenhouse and nursery). The evaluation of the seedlings was conducted when at least one seedling in an experimental plot had six fully expanded pairs of true leaves. The average stem diameter, average height of the seedling, leaf area, number of pairs of true leaves, and dry weight of the shoot and roots were measured. The use of cryopreserved seeds allows the production of *C. arabica* L. seedlings at any time of the year, with the greenhouse environment providing better performance compared to nursery-produced seedlings. Sowing cryopreserved seeds from January to March requires more time for seedling formation, and these seedlings also exhibit lower physiological performance compared to those initiated from May to July. Seedlings produced from cryopreserved seeds throughout the year show equal or superior performance to those produced from freshly harvested seeds not immersed in liquid nitrogen.

Keywords: Arabica coffee. Liquid nitrogen. Seedling production. Propagation.

1 INTRODUÇÃO

Na espécie *Coffea arabica* L. as lavouras cafeeiras são implantadas, em quase sua totalidade, por mudas a partir da semeadura de sementes. Para tal finalidade, a qualidade das mudas é de suma importância, as quais devem apresentar sistema radicular bem formado e desenvolvimento vigoroso (MARTINS et al., 2015). Do mesmo modo, é importante a utilização de sementes com alta qualidade e vigor, associadas ao uso de cultivares com alto potencial produtivo.

A produção de mudas seminíferas de café arábica apresenta limitações devido às características dessas sementes, as quais são classificadas como de comportamento intermediário, ou seja, tem seu armazenamento limitado em bancos de sementes convencionais, por não tolerarem dessecação até baixo teor de umidade e baixas temperaturas, comparadas às sementes ortodoxas que tem mais alta longevidade (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990). Todos esses fatores dificultam a manutenção da viabilidade e vigor na conservação das sementes de café por longos períodos.

Com as limitações para o armazenamento das sementes, muitos trabalhos científicos estão sendo realizados para o desenvolvimento, aprimoramento e utilização da técnica de criopreservação para sementes do gênero *Coffea* (COELHO et al., 2017a; FIGUEIREDO et al., 2017; RICALDONI, 2019; SOUZA, 2019; FIGUEIREDO et al., 2021). Para sementes de *Coffea arabica* L. já foi obtido um protocolo seguro de armazenagem, com alta sobrevivência após a imersão em nitrogênio líquido (COELHO et al., 2017a; FIGUEIREDO et al., 2017).

Neste sentido, a produção de mudas utilizando sementes criopreservadas pode possibilitar um avanço no segmento cafeeiro visto que, de forma usual, os produtores são obrigados a utilizar sementes colhidas no mesmo ano do semeio. Assim, o aperfeiçoamento nesta técnica pode levar a uma inovação tecnológica na cafeicultura, flexibilizando a implementação da lavoura, por permitir a produção das mudas em qualquer época do ano. Também no caso de bancos de germoplasma, a utilização de sementes ainda não é possível, uma vez que as sementes não mantem a qualidade por longos períodos, sendo preservadas *in situ*, o que demanda altos custos de manutenção, grandes extensões de terra e podem ser acometidas pelos desastres climáticos.

Tradicionalmente as mudas são produzidas em viveiros seguindo o padrão de construção estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (MATIELLO et al., 2020). Contudo, as mudas produzidas em viveiros estão sujeitas às condições climáticas

adversas, podendo haver atrasos na germinação, o que pode se estender até 120 dias mediante as baixas temperaturas que ocorrem nos meses de junho a setembro (WENT, 1957; ROSA et al., 2007). Essa exposição das mudas à essas condições ambientais adversas, podendo levar a um risco para a sanidade das mudas, devido à lenta germinação das sementes.

Atualmente, o cultivo protegido vem sendo utilizado como uma alternativa para a proteção de plantas. Nesse ambiente, é possível reduzir os custos de produção com o controle de pragas e doenças, maior crescimento das plantas, redução de estresses fisiológicos e melhoria na qualidade de produção (CHAVARRIA et al., 2007). O cultivo protegido tem se mostrado promissor para a obtenção de mudas de café arábica e, segundo Ricaldoni et al. (2019) crescimento de mudas de *Coffea arabica* L. em casa de vegetação foi superior ao sistema convencional em viveiro na maioria das avaliações. Por outro lado, é um importante insumo agrícola por permitir aumentos de produção das culturas com adoção de tecnologias modernas ao cultivo (ARAÚJO; CASTELLANE, 1996; VIDA et al., 2004; MENDONÇA et al., 2008; REBOUÇAS et al., 2015; RICALDONI, 2019; LIMA, 2021).

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar a produção de mudas de *C. arabica* L., a partir da semeadura em todos os meses do ano, em dois diferentes ambientes, viveiro e casa de vegetação, e três cultivares.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e processamento do material vegetal

Foram utilizados frutos de café, da espécie *Coffea arabica* L., cultivares Arara ‘Catuaí Amarelo ‘IAC 62’’ e ‘Catuaí Amarelo 2SL’, colhidos em lavouras da Fazenda Experimental da Fundação Procafé em Varginha, na safra 2019/2020 e cuidadosamente transportados para Universidade Federal de Lavras. Os frutos foram colhidos no estágio de maturação “cereja”, por meio de colheita seletiva, e na sequência foram submetidos ao processamento via úmida, sendo lavados/imersos em água para separação por densidade e eliminando dos frutos cerejas dos frutos chochos, malformados, brocados e de impurezas. Após a separação, os frutos cerejas foram descascados e as sementes foram despulpadas por meio da fermentação em água durante 24 horas na temperatura de 30 °C e posteriormente pré-secadas à sombra para a retirada da umidade superficial. Para a uniformização do tamanho, foram utilizadas as sementes retidas nas peneiras de crivo circular nº 19, 20 e 21, sendo descartadas aquelas de tamanho acima e abaixo destes.

2.2 Local e condução do experimento

Após o descascamento dos frutos e despulpamento das sementes, o experimento foi conduzido no Setor de Sementes e no Setor de Cafeicultura, ambos do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG. Foram utilizados nesta pesquisa sementes provenientes da safra 2019/2020.

Para a caracterização dos lotes, as sementes foram inicialmente submetidas à determinação do teor de água e à avaliação da qualidade, pelo teste de condutividade elétrica, teste de germinação, peso seco de plântulas e teste de tetrazólio. Em seguida, foram submetidas à secagem até atingirem o teor de água de 17% (base úmida), conforme trabalhos realizados por Figueiredo et al. (2017) e Coelho et al. (2017a). Posteriormente, as sementes foram armazenadas em tanque contendo nitrogênio líquido, em temperatura de -196 °C, até a realização das análises e experimentos.

2.3 Secagem das sementes

Para a secagem das sementes foram utilizadas 60g de sílica gel ativada como agente dessecante, em caixas tipo “gerbox”, as quais foram mantidas em câmaras tipo B.O.D, reguladas em temperatura de 25 °C, na ausência de luz. A perda de água durante a secagem foi monitorada por pesagens contínuas em balança de precisão de 0,001 g, até teor de água de 17% bu.

2.4 Crioarmazenamento das sementes

As sementes das três cultivares, com teor de água de 17% bu, foram condicionadas em sacos de tule e diretamente imersas no nitrogênio líquido (-196 °C), sem pré-resfriamento (COELHO et al., 2017a; FIGUIREIDO et al., 2017). Foram mantidas no criotânque por período de 12 meses, sendo que a cada mês foram retiradas amostras para as avaliações da qualidade e para realização do experimento de formação das mudas. Foram utilizados 12 sacos de tule para cada cultivar, sendo um para cada mês de semeadura, contendo cada um, 640 sementes. As amostras de cada mês foram retiradas, reaquecidas, submetidas à avaliação fisiológica e utilizadas para a formação das mudas.

2.5 Aquecimento das sementes

A cada mês, após cada período de armazenamento no nitrogênio líquido, as sementes de cada cultivar foram retiradas do criotânque e rapidamente imersas em banho-maria por 2 minutos à 40 °C, de acordo com metodologia de Figueiredo et al. (2021). Em seguida, sementes das três cultivares foram submetidas sem os pergaminhos, à avaliação da qualidade fisiológica após criopreservação e semeadas com os pergaminhos, para a produção e a avaliação das mudas.

2.6 Produção e avaliação das mudas de café

2.6.1 Locais

As mudas foram produzidas em viveiro situado no Setor de Cafeicultura e em casa de vegetação, no Setor de Sementes, ambos no Departamento de Agricultura, da UFLA. O viveiro é dotado de cobertura de sombrite de cor preta, permitindo a passagem de 50% da luz, colocada

a dois metros de altura em relação ao solo. A casa de vegetação é dotada de cobertura com filme plástico transparente a três metros de altura em relação ao solo e, possui dimensões de 6,40 m x 12,80 m, totalizando 81,92 m².

Para os dois locais de produção das mudas, os canteiros foram confeccionados com dimensões de 1,20 metros x 4 metros, delimitados com bambus fixos no solo para organizar a disposição das mudas. As regas diárias foram feitas utilizando sistema de irrigação por microaspersão, objetivando o fornecimento de 4,5 mm de água por dia (GUIMARÃES et al., 1998).

Os valores das temperaturas mínima, média, máxima e umidade relativa em casa de vegetação foram monitorados ao longo de todo período experimental utilizando medidor datalogger AKSO 174 portátil, programado para realizar leituras a intervalo de três horas. E em viveiro foram utilizados os dados climatológicos monitorados ao longo de todo período experimental pelo Inmet (2022).

2.6.2. Recipiente, substrato e avaliações

A semeadura foi realizada com duas sementes em cada saco plástico (11 x 22 cm) contendo substrato comercial Maxfértil® e durante todo o período de produção das mudas, foi realizado o manejo recomendado para a formação de mudas (GUIMARÃES et al., 2002). Após a emergência das plântulas, foi realizado o desbaste no estádio “orelha de onça”, restando uma planta em cada saco plástico. O experimento foi realizado em blocos casualizados em três blocos, sendo cada parcela experimental composta por vinte mudas, para cada época de semeadura e cada cultivar e local. As seis mudas centrais de cada parcela foram consideradas úteis para as avaliações e as demais plântulas constituíram as bordaduras das parcelas experimentais.

Semanalmente foi realizada a avaliação das mudas consideradas úteis, para o acompanhamento do desenvolvimento vegetativo em todos os tratamentos e repetições (diferentes épocas de criarmazenamento/épocas de semeadura para cada cultivar e safra), até a época de avaliação final das mudas.

A avaliação final das mudas foi realizada quando pelo menos uma das mudas em uma parcela experimental alcançasse o padrão máximo para a comercialização, ou seja, quando apresentassem seis pares de folhas verdadeiras totalmente expandidas. Neste estádio, as mudas foram submetidas as seguintes avaliações.

Diâmetro médio do caule: foi obtido com auxílio de um paquímetro eletrônico, medindo-se os diâmetros no ponto imediatamente abaixo da inserção das folhas cotiledonares, e calculando-se os diâmetros médios, com os resultados expressos em mm/muda.

Altura média da muda: foi obtida pela medição da região compreendida entre o colo e o ponto de inserção dos brotos terminais das mudas, do ramo ortotrópico, calculando-se a média entre as mudas consideradas úteis, com os resultados expressos em cm/muda.

Área foliar: foi obtida pelo resultado do produto da largura x comprimento x 0,667 (coeficiente de área foliar) x 2 (par de folhas) (BARROS et al., 1973), com os resultados expressos em cm².

Número de pares de folhas verdadeiras: foram computados os números de pares de folhas totais das mudas de cada parcela e calculado o número médio de pares de folhas por muda.

Peso seco de parte aérea e raiz: a parte aérea foi separada das raízes e ambas foram colocadas em sacos de papel e submetidos à secagem em estufa de circulação forçada de ar em 60 °C por 4 a 5 dias ou até massa constante. O peso seco foi determinado em balança de precisão (0,0001 g), com os resultados médios expressos em gramas/muda.

2.7 Delineamento experimental e análise estatística

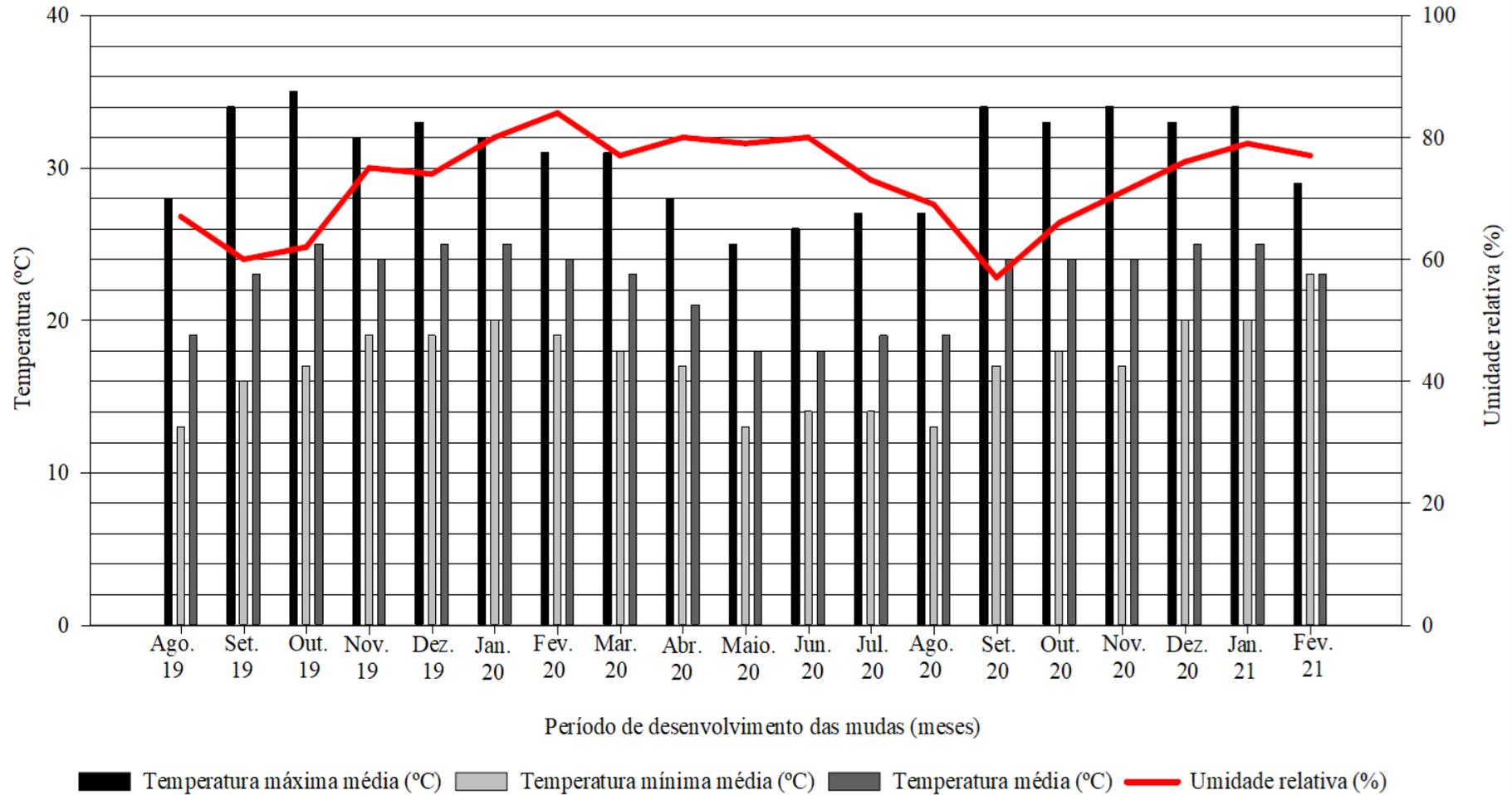
O delineamento experimental foi em blocos casualizados com três repetições para todos os dados da avaliação das mudas, em esquema fatorial 12 X 2, sendo doze épocas de criarmazenamento e dois ambientes (casa de vegetação e viveiro), perfazendo 24 parcelas experimentais. O estudo foi realizado separadamente, para cada uma das três cultivares, Arara, Catuaí Amarelo 'IAC 62' e Catuaí Amarelo 2SL. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade por meio do software R (R CORE TEAM, 2022). As médias de cada cultivar e época de armazenamento foram comparadas as médias do tratamento controle, por meio do teste t de Student, em nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

Nas figuras 1 e 2, estão apresentados os dados climáticos durante o período de desenvolvimento das mudas em casa de vegetação e em viveiro, os quais correspondem às estações do ano definidas pelos meses de junho a setembro, estação do inverno, meses de setembro a dezembro estação da primavera, meses de novembro a março estação do verão e por fim, a estação outono compreendida entre os meses de março a junho.

Conforme esperado, em casa de vegetação, foram observadas temperaturas mais elevadas do que em viveiro, durante todo o período do experimento. Observa-se em casa de vegetação (FIGURA 1), temperaturas médias mensais máximas acima de 30 °C na maioria dos meses, com valores ainda mais altos nas estações da primavera e do verão. Já as temperaturas médias tiveram valores acima de 20 °C na maior parte do período, com decréscimos nos meses do outono e inverno. Quanto à temperatura mínima média, no decorrer dos meses os valores próximos de 12 °C nos meses junho, julho e agosto, coincidente com a estação do inverno.

Figura 1. Médias mensais das temperaturas máximas, médias e mínimas (°C), e de umidade relativa (%) nos meses correspondentes aos períodos de desenvolvimento das mudas de *Coffea arabica* L. em casa de vegetação, safra 2019/2020. UFLA, Lavras, MG, 2022.

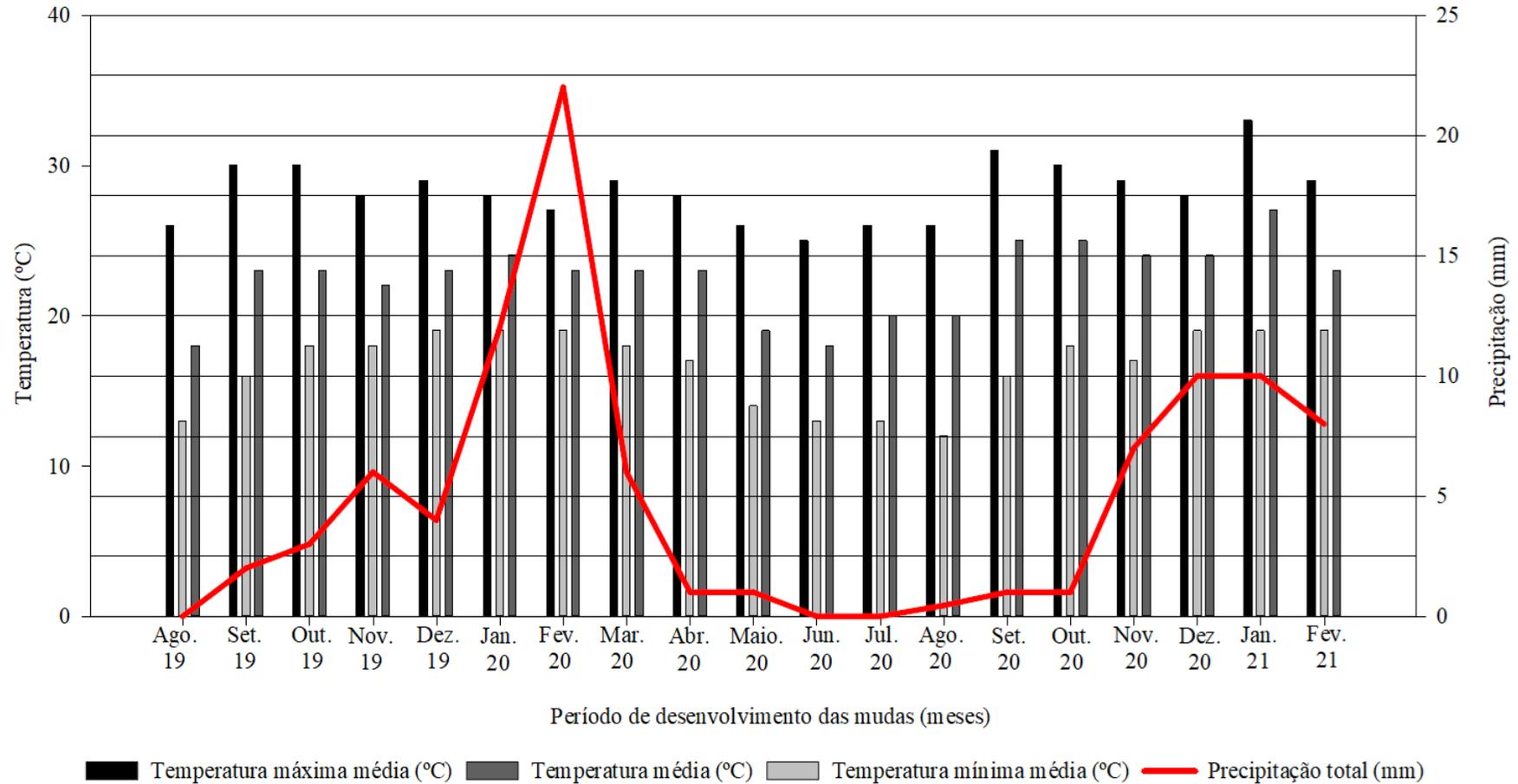


Fonte: Da Autora (2023).

Já em viveiro (FIGURA 2), as temperaturas máximas médias ultrapassaram 30 °C apenas nos meses de setembro/2020 e janeiro/2021, sendo que na maior parte do período estiveram entre 25 °C e 28 °C, assim como, variações nas temperaturas médias e mínimas médias mediante as estações do ano, com as menores temperaturas verificadas na estação do inverno, com valores próximos de 12 °C.

Em relação a precipitação, o ano de 2020 apresentou maior precipitação em relação ao ano de 2021, entre os meses de janeiro e fevereiro, com média mensal de 20 milímetros. Observa-se que, de modo geral, durante o período de desenvolvimento das mudas no viveiro houve menor precipitação na estação outono-inverno, período de seca, ao passo que, o início do período chuvoso coincide com o final da estação do inverno, mês de agosto.

Figura 2. Médias mensais das temperaturas máximas, médias e mínimas (°C), e de precipitação (%) nos meses correspondentes ao período de desenvolvimento das mudas de *Coffea arabica* L. em viveiro, safra 2019/2020. UFLA, Lavras, MG, 2022. Fonte: INMET, 2022.



Fonte: Da Autora (2023).

3.1 Cultivar Arara

Após o processamento das sementes e antes do início do experimento, as sementes da cultivar Arara apresentaram 64% de plântulas normais no teste de germinação (perfil). Após criopreservação por diferentes períodos, até doze meses, procedeu-se com a instalação dos experimentos, com os diferentes tratamentos, conforme detalhamento na tabela 1. Observa os períodos de criarmazenamento das sementes de *Coffea arabica* L., bem como os períodos de obtenção e tempos de avaliação das mudas, nos dois locais de produção. O tempo de formação das mudas da cultivar Arara variou de seis a nove meses, em função das condições climáticas em cada local de produção, da quantidade de água de irrigação ou precipitação e do tempo de criarmazenamento das sementes (TABELA 1).

Observa-se maior tempo para obtenção das mudas, tanto em viveiro quanto em casa de vegetação, quando a semeadura ocorreu nos meses de janeiro a junho de 2020. No entanto, apesar desse maior tempo, deve ser considerado em que estação as mudas atingem padrão para plantio.

Tabela 1. Detalhamento dos tratamentos: períodos de criarmazenamento das sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara; e períodos para a obtenção e avaliação das mudas, em viveiro e em casa de vegetação.

Criarmazenamento das Sementes			Obtenção das Mudanças/Avaliação			
Início	Término	Tempo ⁽¹⁾	Casa de Vegetação		Viveiro	
(mês)	(mês da semeadura)	(meses)	Mês	Tempo ⁽²⁾	Mês	Tempo ⁽²⁾
				(meses)		(meses)
	Agosto/19	0	Fevereiro/20	6	Março/20	7
	Agosto/19	1	Fevereiro/20	6	Março/20	7
	Setembro/19	2	Março/20	6	Março/20	6
	Outubro/19	3	Junho/20	8	Junho/20	8
	Novembro/19	4	Junho/20	7	Junho/20	7
	Dezembro/19	5	Junho/20	6	Julho/20	7
Agosto/19	Janeiro/20	6	Setembro/20	8	Setembro/20	8
	Fevereiro/20	7	Novembro/20	9	Novembro/20	9
	Março/20	8	Novembro/20	8	Novembro/20	8
	Abril/20	9	Dezembro/20	8	Dezembro/20	8
	Mai/20	10	Janeiro/21	8	Janeiro/21	8
	Junho/20	11	Fevereiro/21	8	Fevereiro/21	8
	Julho/20	12	Fevereiro/21	7	Fevereiro/21	7

⁽¹⁾ Tempo que as sementes permaneceram no criotânque em cada tratamento experimental e mudas oriundas de sementes recém-colhidas, sem imersão no nitrogênio líquido.

⁽²⁾ Tempo de duração da formação das mudas em cada tratamento experimental e em cada local.

Fonte: Da Autora (2023).

Na análise de variância dos dados das avaliações das mudas, houve interação significativa dos fatores estudados, época de semeadura e local de produção das mudas para as variáveis diâmetro médio do caule, peso seco de raiz e área foliar. Para altura média das mudas e peso seco da parte aérea, foi constatado efeito significativo isolado dos fatores local de produção das mudas e crioarmazenamento das sementes (APÊNDICE A). Assim, são comparadas as médias de diâmetro médio do caule, peso seco de raiz e área foliar, em que houve diferenças significativas, conforme verificado na tabela 2. Nesta tabela são também comparadas as médias de cada tratamento com o tratamento controle, ou seja, aquelas mudas oriundas de sementes recém-colhidas, antes de serem imersas no nitrogênio líquido.

Tabela 2. Diâmetro médio do caule (DC – mm/muda), peso seco de raiz (PSR – gramas/muda) e área foliar (AF – cm²) de mudas produzidas em casa de vegetação e viveiro, oriundas de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara criopreservadas por até um ano.

Época de semeadura das sementes (meses)	Viveiro			Casa de Vegetação		
	DC	PSR	AF	DC	PSR	AF
Agosto/19	3,32 bA	0,79 aA	257,40 aA	3,28 bA	0,42 bB	231,86 cB
Setembro/19	3,12 bA	0,62 aA	212,01 aA	3,31 bA	0,82 bA	243,83 cB
Outubro/19	2,86 bA	0,67 aA	171,64 aA	4,20 aA	1,38 aA	414,99 aA
Novembro/19	3,54 aA	0,55 aA	213,92 aA	3,31 bA	0,86 bA	253,11 cB
Dezembro/19	3,54 aA	0,70 aA	261,21 aA	3,15 bA	0,71 bB	301,42 bA
Janeiro/20	2,97 bA	0,41 aA	186,72 aA	3,15 bA	0,41 bB	212,04 cB
Fevereiro/20	2,94 bA	0,55 aA	117,68 aA	3,22 bA	0,56 bB	127,35 cB
Março/20	2,77 bA	0,38 aA	105,07 aA	3,09 bA	0,56 bB	131,50 cB
Abril/20	3,31 bA	0,53 aA	174,67 aA	3,19 bA	0,54 bB	196,14 cB
Mai/20	3,84 aA	0,73 aA	274,89 aA	3,70 bA	1,30 aA	302,03 bA
Junho/20	3,99 aA	0,97 aA	228,68 aA	4,43 aA	0,82 bA	365,01 bA
Julho/20	3,70 aA	0,71 aA	237,84 aA	4,23 aA	1,12 aA	459,27 aA
Controle*	2,65A	0,66A	264,77A	3,49A	0,70B	262,19B

Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais ao controle, não diferem entre si, pelo teste t de Student, em nível de 5% de probabilidade.

* Mudas oriundas de sementes recém-colhidas e sem imersão no nitrogênio líquido.

Fonte: Da Autora (2023).

Em viveiro, para as três variáveis estudadas, apenas foram observadas diferenças significativas entre as épocas de semeadura para diâmetro de caule (TABELA 2), sendo que as maiores médias das mudas produzidas em viveiro foram obtidas nos meses de novembro/19, dezembro/19, junho/2020 e julho/2020, obtidas de sementes criopreservadas por quatro, cinco,

onze e doze meses. Também foi observado que não houve diferenças significativas entre as mudas do tratamento controle e as de sementes criopreservadas. As mudas de sementes recém-colhidas apresentaram médias significativamente iguais às mudas oriundas de sementes crioarmazenadas, independentemente da época de plantio das mudas para diâmetro do caule.

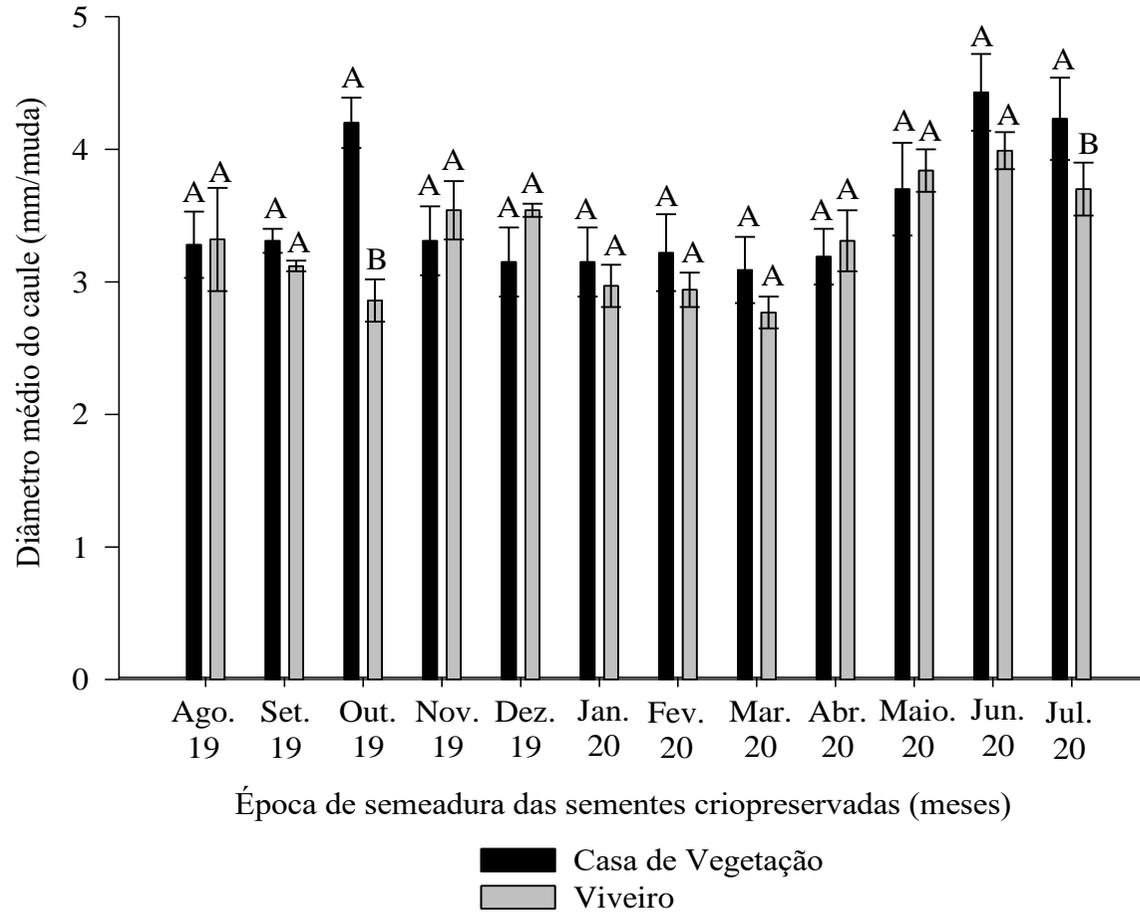
Para peso seco de raiz e área foliar não houve efeito das épocas de plantio das mudas produzidas em viveiro, no entanto, comparando-se essas mudas com as do tratamento controle, ou seja, mudas de sementes recém-colhidas, o mesmo comportamento foi verificado (TABELA 2).

Já em casa de vegetação, houve efeito significativo de época para todas as variáveis (TABELA 2). Avaliando-se estes resultados, observa-se que as maiores médias foram obtidas nos meses de outubro/2019 e julho/2020 para todas as variáveis analisadas (TABELA 2). Foi observado que mudas oriundas do tratamento controle não diferiram das mudas oriundas de sementes crioarmazenadas produzidas em casa de vegetação, independentemente do tempo de crioarmazenamento das sementes para variável diâmetro médio do caule.

Para peso de raiz as maiores médias das mudas produzidas em casa de vegetação foram verificadas nos meses de setembro/2019, outubro/2019, novembro/2019, maio/2020, junho/2020 e julho/2020, diferindo significativamente do tratamento controle. Por outro lado, as maiores médias para variável área foliar foram obtidas nos meses de outubro/2019, dezembro/2019, maio/2020, junho/2020 e julho/2020, também se diferindo do tratamento controle (TABELA 2).

Nas figuras 3 a 5 estão representadas as comparações das médias de diâmetro de caule, peso seco de raiz e de área foliar das mudas produzidas em viveiro e em casa de vegetação, em todas as épocas de semeadura das sementes. Os valores de diâmetro médio do caule das mudas produzidas em casa de vegetação não diferiram estatisticamente das produzidas em viveiro, exceto quando as sementes foram semeadas em outubro/19 e julho/20, quando a casa de vegetação proporcionou maior diâmetro e caule (FIGURA 3). Nesta figura também são ressaltados os piores resultados de diâmetro de caule, em jan, fev e mar/20, e os melhores em jun e jul/20, com onze e doze meses de crioarmazenamento das sementes, podendo este comportamento estar associado às estações da primavera e verão (FIGURA 1 e 2).

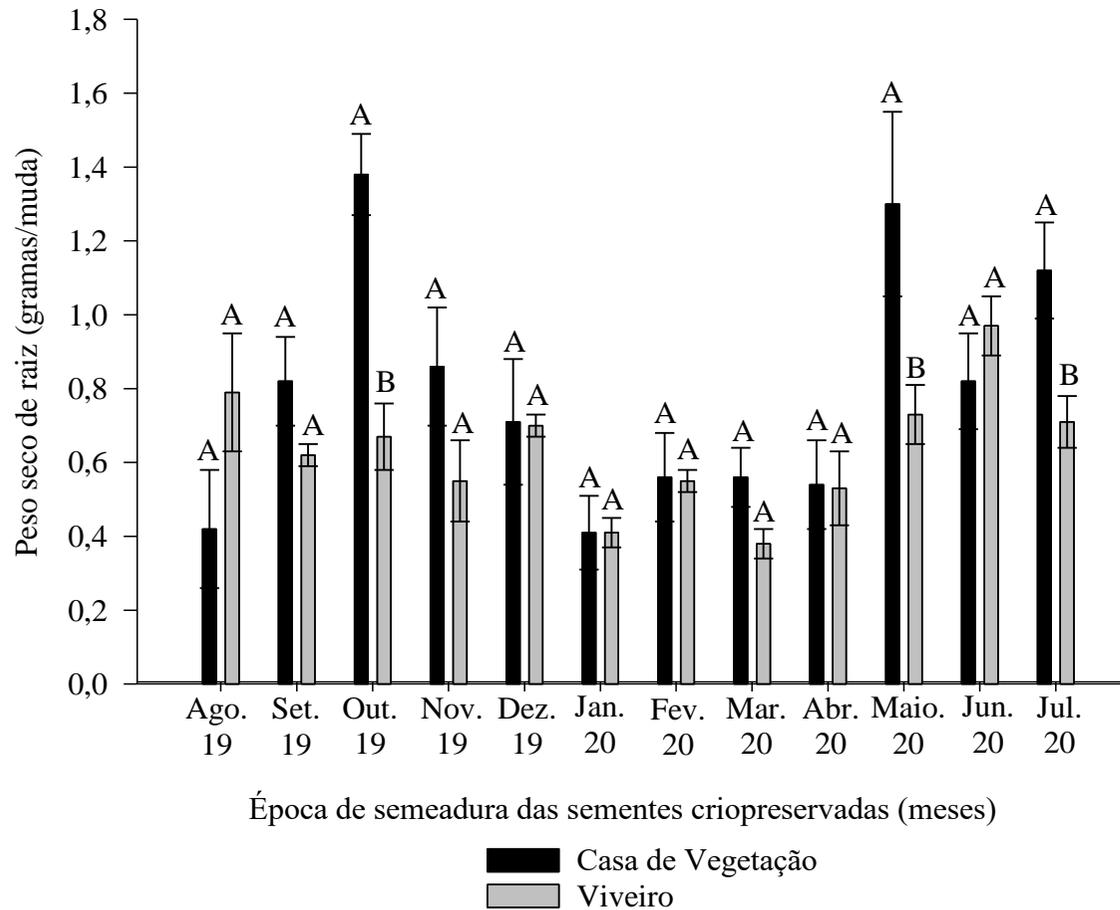
Figura 3. Diâmetro médio do caule de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da sementeira de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara criopreservadas por até um ano. Letras maiúsculas comparam locais de produção das mudas e médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da Autora (2023).

Na avaliação de peso seco de raízes (FIGURA 4) e de área foliar (FIGURA 5), das mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, observa-se resultados semelhantes aos do diâmetro de caule (FIGURA 3). Em todas as épocas de semeadura das sementes crioarmazenadas, observa-se maiores médias de peso seco de raiz em mudas produzidas em casa de vegetação (FIGURA 4). Este resultado pode estar associado às médias máximas de temperatura e de umidade relativa mais altas ocorridas nesse local de produção, durante todo o período de desenvolvimento das mudas (FIGURA 1), em comparação com o viveiro.

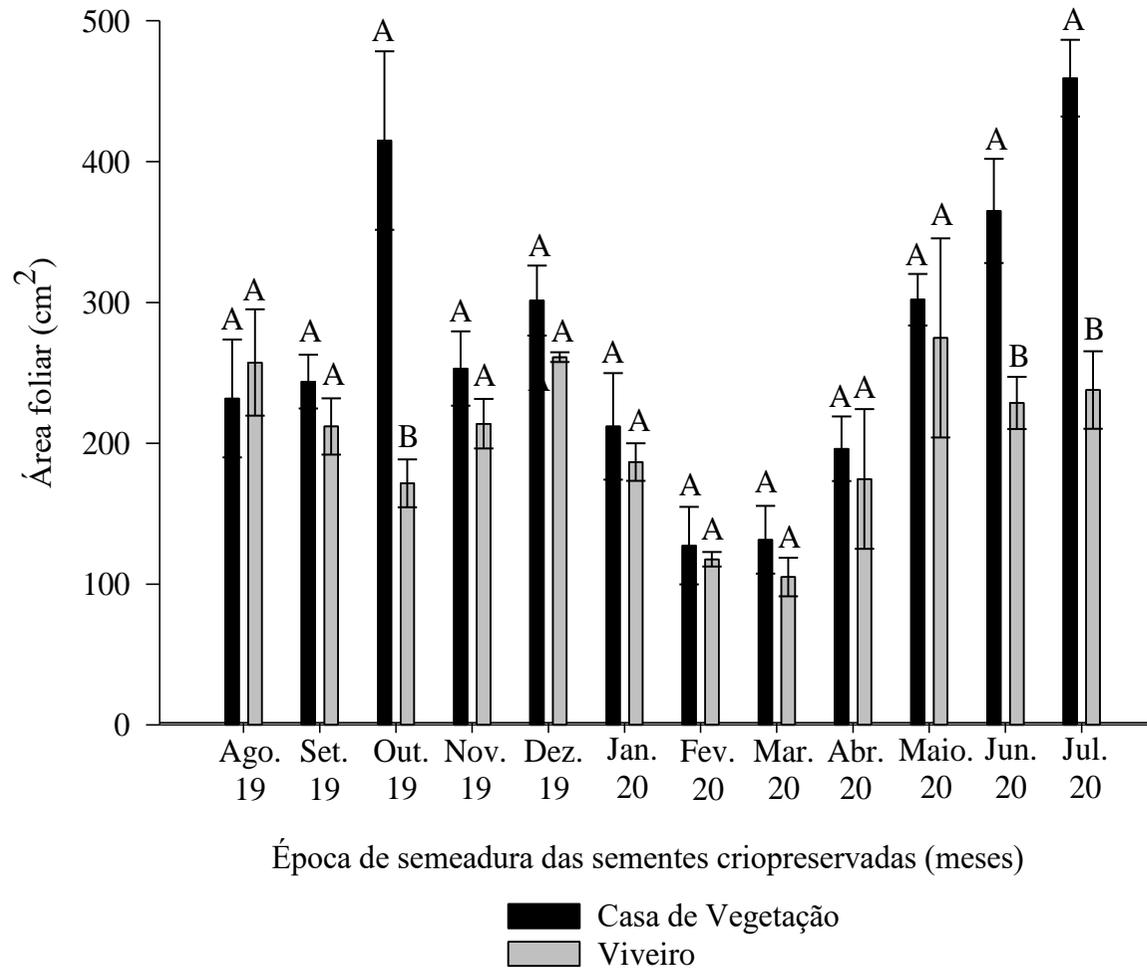
Figura 4. Peso seco de raiz de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da sementeira de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara criopreservadas por até um ano. Letras maiúsculas comparam locais de produção das mudas e médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da Autora (2023).

Referente aos resultados de área foliar das mudas produzidas em viveiro e em casa de vegetação (FIGURA 5), na maioria das épocas de semeadura (tempos de criopreservação das sementes), os valores foram estatisticamente iguais em viveiro e em casa de vegetação, exceto nos meses de out/2019, jun e jul/2020, com maiores valores em casa de vegetação, assim como nos resultados anteriores, de diâmetro de caule e peso seco de raiz (FIGURAS 3 e 4). Também é possível observar que as sementes retiradas do criotank nos meses de fevereiro/20 e março/20, com sete e oito meses de armazenamento, apresentaram as menores médias independentemente do local de produção das mudas, todavia, não houve diferenças significativas (FIGURA 5), conforme já descrito na tabela 2. Este fato se deve, ao período de desenvolvimento das mudas coincidente com a estação do ano, inverno, nas quais as mudas foram submetidas às temperaturas mínimas próximas de 10 °C, com valores neste período, de 80% para umidade relativa na casa de vegetação (FIGURA 1) e sem precipitação no viveiro (FIGURA 2).

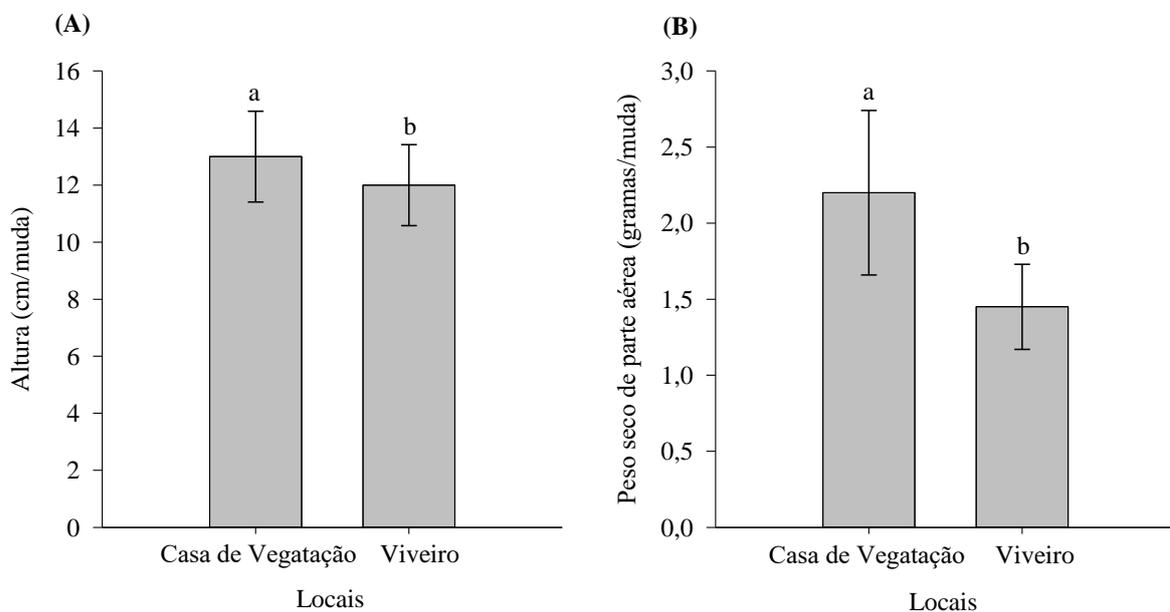
Figura 5. Área foliar de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da semeadura de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara criopreservadas por até um ano. Letras maiúsculas comparam locais de produção das mudas e médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da Autora (2023).

Na análise das variáveis altura média das mudas (FIGURA 6A) e peso seco de parte aérea (FIGURA 6B) não houve interação entre os fatores épocas de semeadura e local de produção das mudas, mas efeitos isolados destes fatores. Observa-se na figura 6, o melhor desempenho das mudas produzidas em casa de vegetação, quanto a altura e peso seco de parte aérea das mudas.

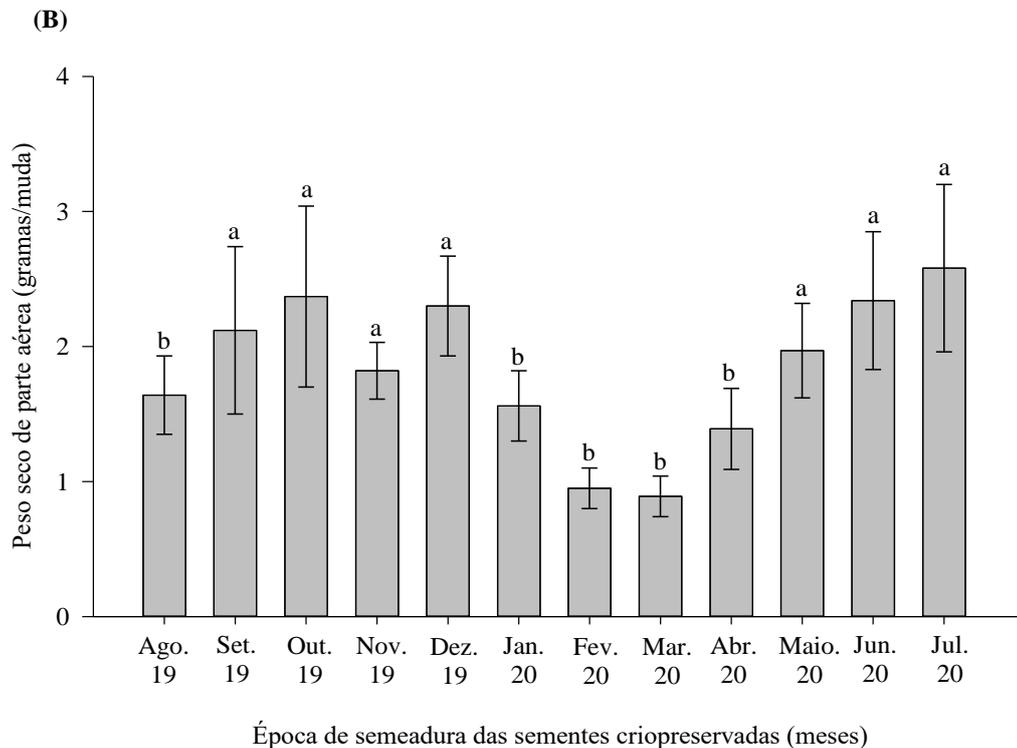
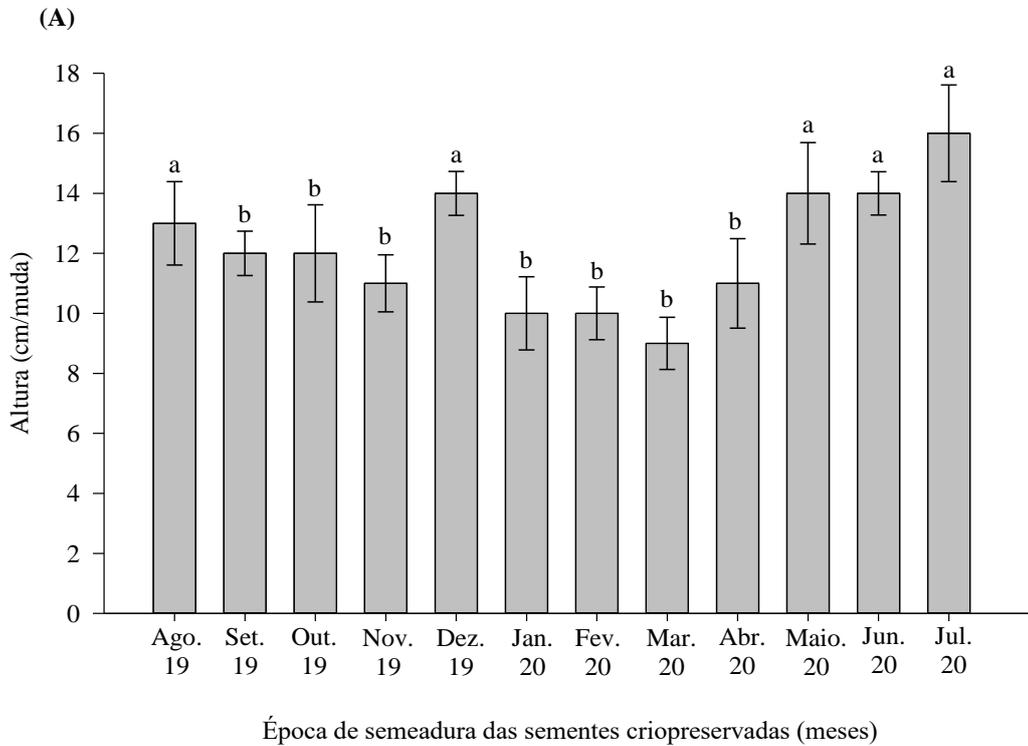
Figura 6. Altura média das mudas (A) e peso seco de parte aérea (B) de mudas produzidas em casa de vegetação e viveiro, oriundas da semeadura de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara criomazenadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da Autora (2023).

Quanto ao efeito das épocas de semeadura, observa-se na figura 7A os resultados de altura média e na figura 7B, os de peso seco de parte aérea, com diferenças significativas entre as médias. As maiores médias de altura das mudas foram obtidas nos meses de agosto/19, dezembro/19, maio/20, junho/20 e julho/20 com um, cinco, dez, onze e doze meses de criomazenamento das sementes. Já para a variável peso seco de parte aérea, os melhores resultados foram verificadas nos meses de setembro/19, outubro/19, novembro/19, dezembro/19, maio/20, junho/20 e julho/20 (FIGURA 7B).

Figura 7. Altura média das mudas (A) e peso seco de parte aérea (B) de mudas produzidas em viveiro ou casa de vegetação, oriundas da semeadura de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara criopreservadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da Autora (2023).

Para a cultivar Arara foram constatados diferentes desempenhos das mudas produzidas a partir da sementeira de sementes criopreservadas em diferentes meses do ano. Conforme os resultados apresentados foi constatado melhor desempenho das mudas produzidas em casa de vegetação, principalmente nos meses de sementeira a partir de maio até dezembro, verificado por meio de todas as variáveis estudadas. Ressaltam-se as melhores condições climáticas na casa de vegetação, o que certamente proporcionou melhores resultados.

3.2 Cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’

As sementes da cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’ apresentaram 80% de plântulas normais no teste de germinação (perfil), após o processamento das sementes e antes do início do experimento. Em sequência, após a criopreservação das sementes por até 12 meses, iniciou-se a instalação do experimento, com diferentes tratamentos, conforme apresentado na tabela 3. Para as mudas oriundas da cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’, de modo geral, o período de formação foi de cinco a nove meses, até a avaliação final, variando em função do tempo de armazenamento das sementes e das condições climáticas de cada local de produção (TABELA 3). Verifica-se menor tempo de obtenção das mudas, tanto em casa de vegetação e viveiro quando a sementeira ocorreu em setembro de 2019, todavia, as mudas oriundas do local de produção casa de vegetação desenvolverem com menor tempo.

Tabela 3. Detalhamento dos tratamentos: períodos de criarmazenamento das sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’; e períodos para a obtenção e avaliação das mudas, em viveiro e em casa de vegetação.

Criarmazenamento das Sementes			Obtenção das Mudanças/Avaliação			
Início	Término	Tempo ⁽¹⁾	Casa de Vegetação		Viveiro	
(mês)	(mês da semeadura)	(meses)	Mês	Tempo ⁽²⁾	Mês	Tempo ⁽²⁾
				(meses)		(meses)
	Agosto/19	0	Março/20	7	Março/20	7
	Agosto/19	1	Fevereiro/20	6	Março/20	7
	Setembro/19	2	Fevereiro/20	5	Março/20	6
	Outubro/19	3	Junho/20	8	Junho/20	8
	Novembro/19	4	Junho/20	7	Junho/20	7
	Dezembro/19	5	Junho/20	6	Julho/20	7
Agosto/19	Janeiro/20	6	Setembro/20	8	Agosto/20	7
	Fevereiro/20	7	Novembro/20	9	Novembro/20	9
	Março/20	8	Novembro/20	8	Novembro/20	8
	Abril/20	9	Dezembro/20	8	Dezembro/20	8
	Maio/20	10	Janeiro/21	8	Janeiro/21	8
	Junho/20	11	Fevereiro/21	8	Fevereiro/21	8
	Julho/20	12	Fevereiro/21	7	Fevereiro/21	7

⁽¹⁾ Tempo que as sementes permaneceram no criotânque em cada tratamento experimental e mudas oriundas de sementes recém-colhidas, sem imersão no nitrogênio líquido.

⁽²⁾ Tempo de duração da formação das mudas em cada tratamento experimental e em cada local.

Fonte: Da Autora (2023).

Na tabela 4, estão apresentados os resultados das variáveis, para as quais houve interação significativa dos fatores estudados para cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’, de acordo com a análise de variância (Apêndice A). Observa-se diferenças significativas entre as épocas de plantio das mudas oriundas de sementes criarmazenadas produzidas em viveiro e casa de vegetação para todas as variáveis, onde também, são comparadas com o tratamento controle, ou seja, mudas oriundas de sementes recém-colhidas, antes de serem imersas no nitrogênio líquido.

Tabela 4. Altura média das mudas (A - cm/muda), diâmetro médio do caule (DC – mm/muda), peso de parte aérea (PSPA – gramas/muda), peso seco de raiz (PSR – gramas/muda) e área foliar (AF – cm²) de mudas produzidas em casa de vegetação e viveiro, oriundas de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’ criopreservadas por até um ano.

Época de plantio das mudas (meses)	Viveiro					Casa de Vegetação				
	A	DC	PSPA	PSR	AF	A	DC	PSPA	PSR	AF
Agosto/19	10 cB	2,36 aB	0,97 cB	0,43 bB	193,10 bB	14 aB	3,36 aA	1,48 aA	0,42 aB	207,34 aA
Setembro/19	13 aA	2,76 aB	1,42 bB	0,72 bB	210,15 bA	7 aB	2,01 aB	0,82 aB	0,24 aB	112,33 aB
Outubro/19	9 cB	2,91 aB	1,19 cB	0,41 bB	153,52 cB	14 aB	3,80 aA	2,57 aA	1,17 aA	305,51 aA
Novembro/19	12 aA	3,45 aA	1,73 bA	0,73 bA	210,23 bA	12 aB	3,34 aA	1,61 aA	0,45 aB	219,44 aA
Dezembro/19	12 aA	3,13 aB	1,62 bB	0,65 bB	186,01 bB	14 aB	3,18 aA	1,84 aA	0,67 aB	246,03 aA
Janeiro/20	10 cB	3,00 aB	1,71 bA	0,55 bB	188,36 bB	8 aB	2,21 aB	1,24 aA	0,34 aB	150,46 aA
Fevereiro/20	10 cB	2,94 aB	0,81 cB	0,50 bB	115,17 cB	11 aB	2,85 aA	0,94 aB	0,44 aB	117,11 aB
Março/20	7 cB	2,35 aB	0,47 cB	0,30 bB	71,45 cB	9 aB	2,38 aB	0,77 aB	0,43 aB	93,18 aB
Abril/20	10 cB	3,00 aB	0,95 cB	0,46 bB	130,39 cB	6 aB	2,17 aB	0,71 aB	0,17 aB	91,86 aB
Mai/20	17 aA	4,20 aA	2,57 aA	1,28 aA	321,01 aA	4 aB	0,86 aB	0,39 aB	0,26 aB	51,21 aB
Junho/20	7 cB	2,61 aB	0,36 cB	0,28 bB	63,37 cB	13 aB	3,26 aA	1,91 aA	0,88 aA	276,08 aA
Julho/20	13 aA	3,32 aA	1,35 bB	0,78 bA	191,90 bB	11 aB	2,69 aA	1,75 aA	0,45 aB	237,19 aA
Controle*	10B	2,26 B	1,04B	0,33B	165,91B	16A	3,21 A	2,09A	0,64B	268,59A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade.

As médias seguidas de letras maiúsculas iguais à do controle, não diferem entre si, pelo teste t de Student, em nível de 5% de probabilidade.

* Mudas oriundas de sementes recém-colhidas, ou seja, mudas de sementes antes de serem imersas no nitrogênio líquido.

Fonte: Da Autora (2023).

Para variável altura média das mudas produzidas em viveiro (TABELA 4), as maiores médias foram observadas nos meses de setembro/2019, novembro/2019, novembro/2019, maio/2020 e julho/2020. Já para altura média das mudas, comparada às mudas do tratamento controle, somente nestes meses mencionados as mudas se diferiram significativamente das demais épocas de plantio, apresentando as maiores médias.

De acordo com os resultados do diâmetro médio do caule, não houve diferenças significativas entre as épocas de plantio das mudas produzidas em viveiro, ou seja, independentemente do tempo de criarmazenamento das sementes as médias obtidas foram iguais (TABELA 4). Todavia, as mudas de sementes criopreservadas produzidas em viveiro apresentaram as maiores médias para diâmetro médio do caule nos meses de novembro/2019, maio/2020 e julho/2020 com quatro, dez e doze meses de criarmazenamento das sementes, em relação ao tratamento controle, ou seja, mudas de sementes recém-colhidas.

Verifica-se que para as variáveis peso seco de parte aérea, peso seco de raiz e área foliar das mudas produzidas em viveiro (TABELA 4), as maiores médias foram obtidas no mês de maio/2020, se diferenciando significativamente das demais épocas de plantio. Foi observado que as mudas oriundas de sementes do tratamento controle não diferiram significativamente das oriundas de sementes criarmazenadas e produzidas em viveiro, para todas as épocas de plantio, a avaliação do peso seco de parte aérea, exceto nos meses de novembro/2019, janeiro/2020 e maio/2020, quando apresentaram as maiores médias.

Avaliando-se os resultados das variáveis peso de raiz e área foliar das mudas produzidas em viveiros e comparando-se as mudas do tratamento controle, verifica-se que para a maioria dos meses estudados as mudas apresentaram comportamento semelhante àquelas oriundas de sementes recém-colhidas, exceto nos meses de novembro/2019, maio/2020, julho/2020 e setembro/2019, novembro/2019 e maio/2020, respectivamente (TABELA 4).

Em todas as variáveis estudadas, independentemente da época de plantio das mudas, verifica-se que as mudas produzidas em casa de vegetação não diferiram significativamente entre os meses estudados (TABELA 4). No entanto, comportamento diferenciado foi verificado para variável altura média das mudas produzidas em casa de vegetação, em que as mudas oriundas de sementes criopreservadas apresentaram menores médias em relação às mudas do tratamento controle, ou seja, mudas oriundas de sementes recém-colhidas.

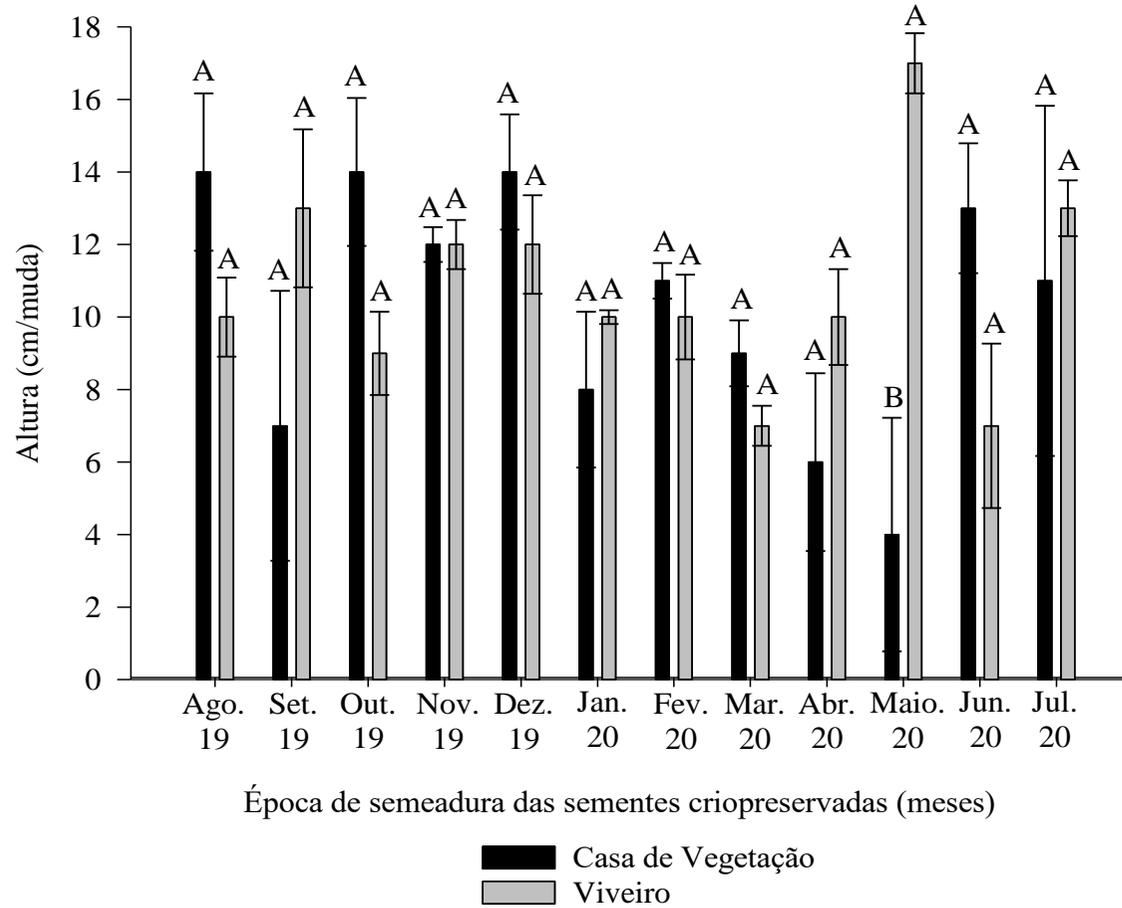
Com relação as variáveis diâmetro médio do caule, peso seco de parte aérea e área foliar das mudas produzidas em casa de vegetação (TABELA 4), observa-se que na maioria dos meses, as mudas oriundas de sementes criarmazenadas não diferiram significativamente das

mudas oriundas do tratamento controle. Entretanto, para variável peso seco de raiz as mudas oriundas sementes criarmazenadas produzidas em casa de vegetação apresentaram médias semelhantes em relação ao tratamento controle, exceto para as épocas de plantio de outubro/2019 e junho/2020.

Pela análise de variância da avaliação das mudas para a cultivar Catuaí Amarelo 'IAC 62', houve interação significativa entre todos os fatores estudados para todas as variáveis analisadas, exceto para variável número de pares de folhas verdadeiras, onde foi constatado efeito significativo apenas do fator local de produção das mudas (APÊNDICE A).

As mudas produzidas em casa de vegetação apresentaram comportamento semelhante àquelas produzidas em viveiro para a variável altura média das mudas, exceto no mês de maio/20, que se diferiu significativamente das demais épocas de plantio (FIGURA 8). Desse modo, as sementes com 10 meses de criarmazenamento, ou seja, plantadas no mês maio/20, durante o período de desenvolvimento das mudas foram influenciadas por todas as estações climáticas do ano e em sua grande maioria com temperatura máxima média de 30 °C e coincidente com o período chuvoso (FIGURA 2), o que explica as maiores médias nas mudas produzidas em viveiro neste mês.

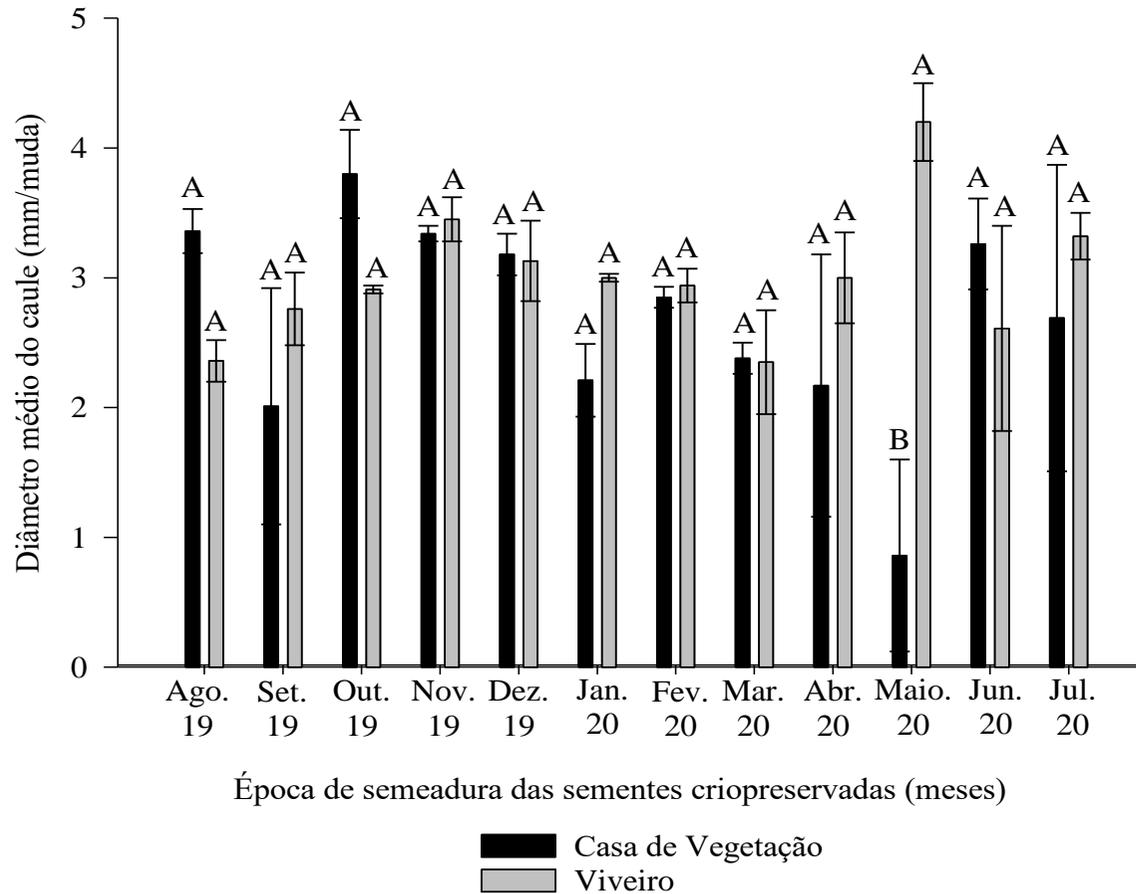
Figura 8. Altura média de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da semeadura de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’ criopreservadas por até um ano. Letras maiúsculas comparam locais de produção das mudas e médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da Autora (2023).

A análise dos dados de diâmetro médio do caule das mudas (FIGURA 9) nos diferentes locais de produção, foi semelhante à variável altura média das mudas, em que não houve efeito significativo de tempo de criarmazenamento das sementes. Para esta variável, as mudas produzidas em viveiro apresentaram comportamento semelhante ao longo dos tempos de criarmazenamento das sementes, provavelmente devido as condições climáticas, que este local de produção proporcionou ao longo do período de desenvolvimento das mudas (FIGURA 2).

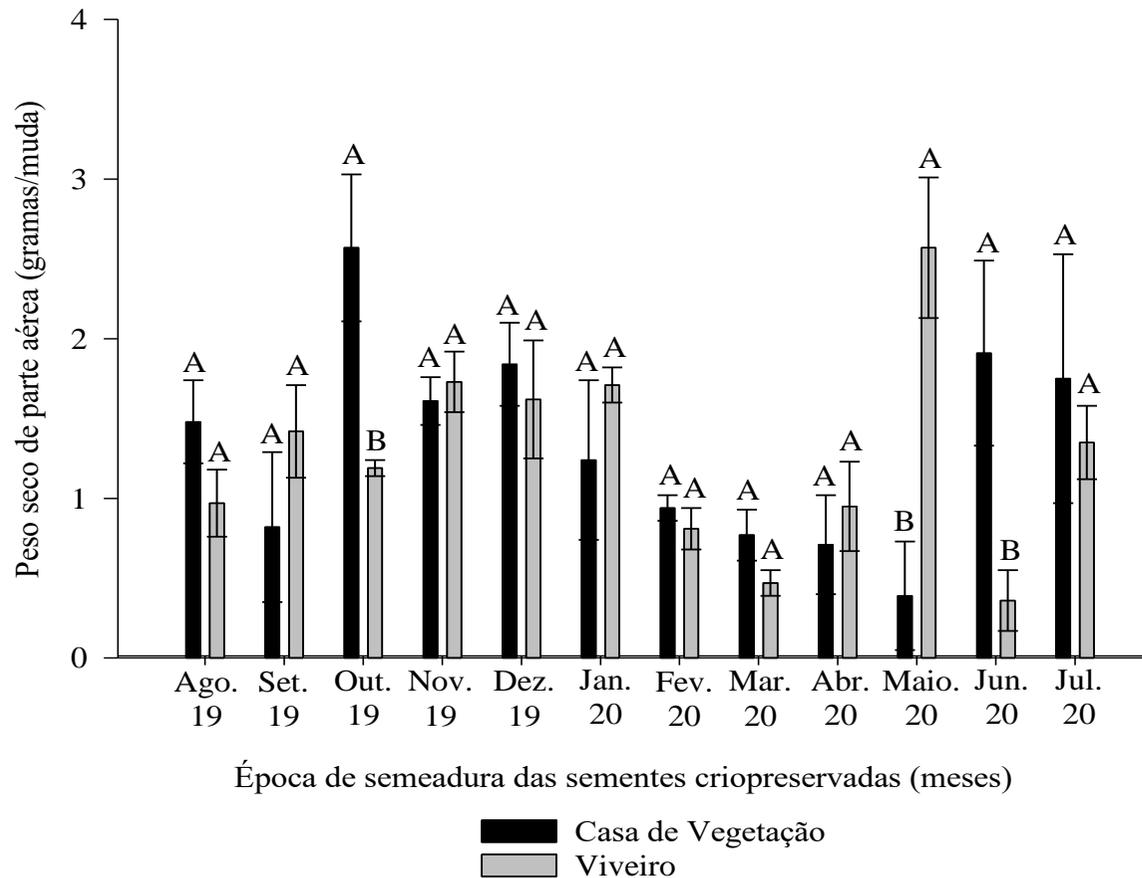
Figura 9. Diâmetro médio do caule de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da sementeira de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo 'IAC 62' criopreservadas por até um ano. Letras maiúsculas comparam locais de produção das mudas e médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da Autora (2023).

As menores médias em ambos os locais de produção das mudas foram observadas nos meses de fevereiro/20, março/20 e abril/20 com sete, oito e nove meses de armazenamento das sementes não diferindo significativamente para a variável peso seco de parte aérea (FIGURA 10). Esse resultado mostra que a condição climática é um fator determinante na produção de mudas cafeeiras, ou seja, o desenvolvimento das mudas foi prejudicado pela estação do inverno tanto em casa de vegetação (FIGURA 1), como, em viveiro (FIGURA 2).

Figura 10. Peso seco de parte aérea de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da sementeira de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo 'IAC 62' criopreservadas por até um ano. Letras maiúsculas comparam locais de produção das mudas e médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.

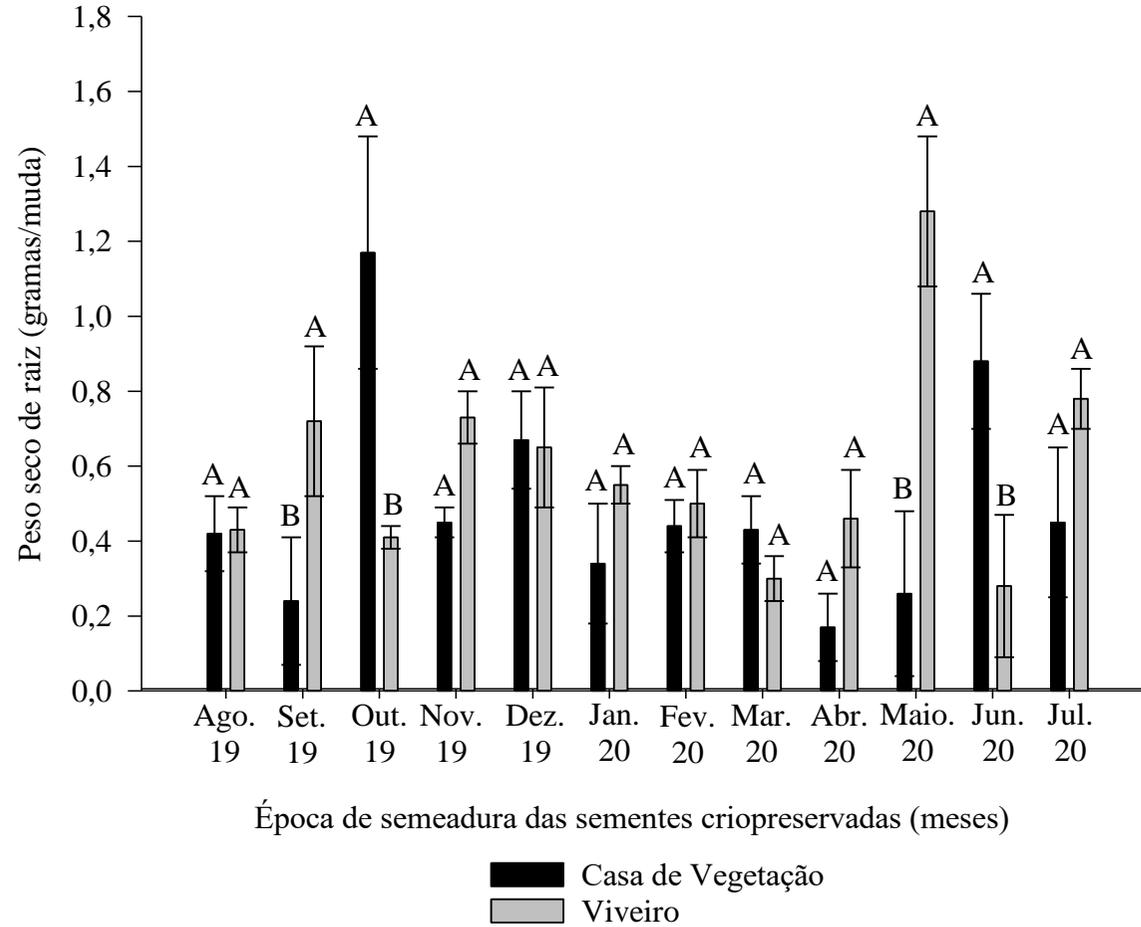


Fonte: Da Autora (2023).

Em relação a variável peso seco de raiz (FIGURA 11), a maior média para as mudas produzidas em casa de vegetação, foi observada no mês de outubro/19, enquanto que, a maior média para as mudas produzidas em viveiro foi observada no mês de maio/20.

Esse resultado se deve à condição climática à que as mudas foram submetidas durante o período de desenvolvimento. Quando as sementes foram semeadas em outubro/19, as mudas de café se desenvolveram sob condições mais favoráveis à produção em casa de vegetação (FIGURA 1), enquanto que, as mudas semeadas em maio/20 foram prejudicadas pela estação do inverno em viveiro (FIGURA 2).

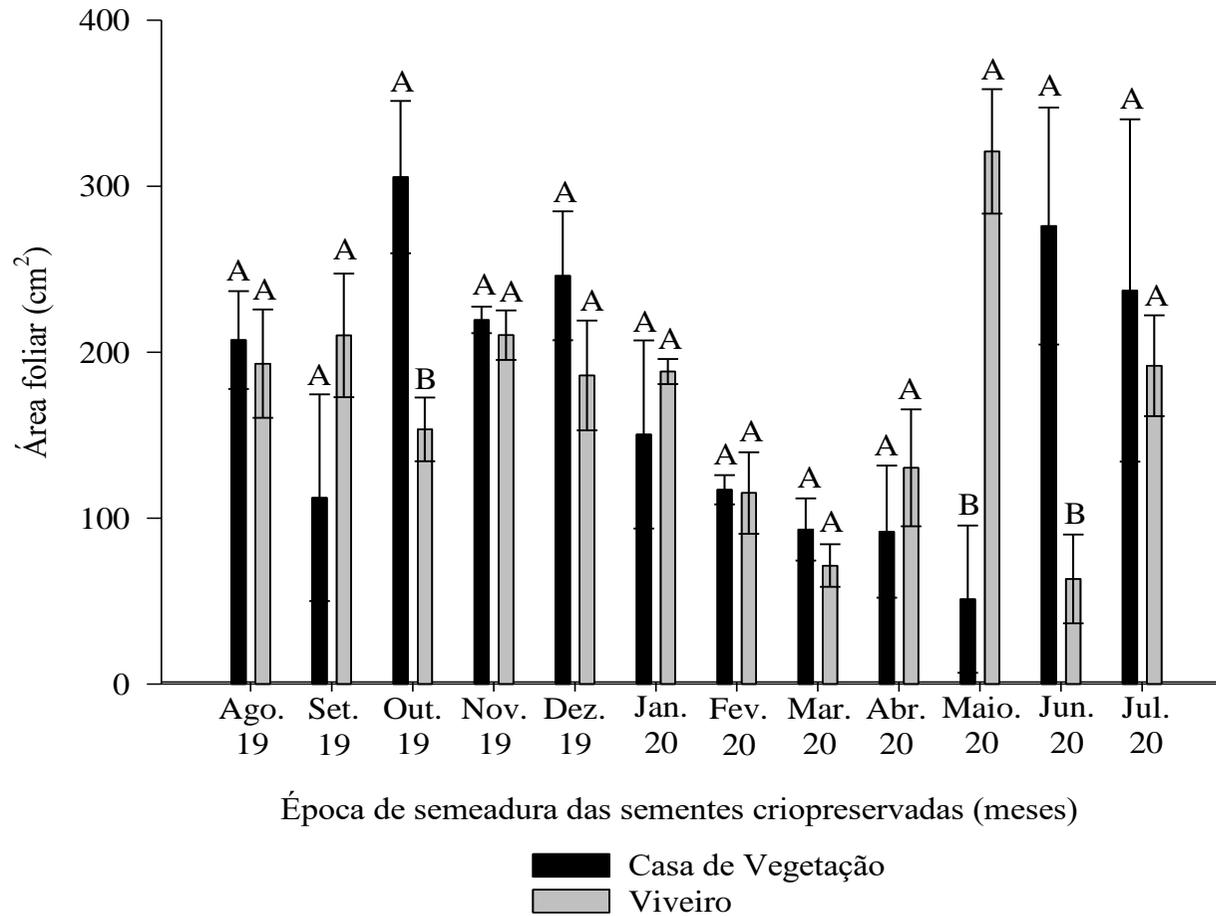
Figura 11. Peso seco de raiz de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da sementeira de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo 'IAC 62' criopreservadas por até um ano. Letras maiúsculas comparam locais de produção das mudas e médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da Autora (2023).

De maneira geral, não houve diferenças significativas entre os locais de produção das mudas, exceto para os meses de outubro/19, maio/20 e junho/20 para variável aérea foliar (FIGURA 12).

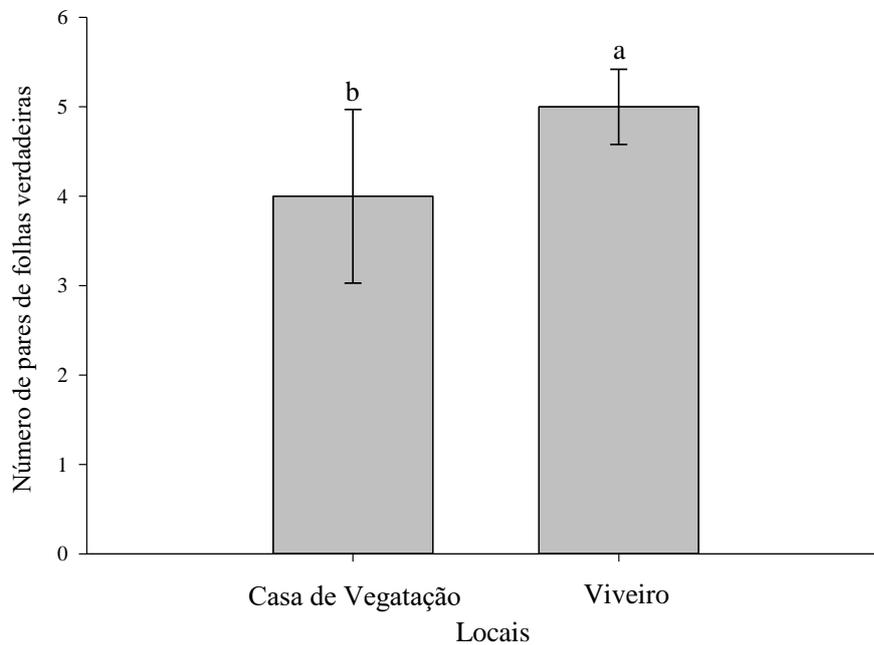
Figura 12. Área foliar de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da semeadura de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo 'IAC 62' criopreservadas por até um ano. Letras maiúsculas comparam locais de produção das mudas e médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da Autora (2023).

Para variável número de pares de folhas verdadeiras (FIGURA 13) houve efeito apenas de local de produção, sendo que as maiores médias foram encontradas em mudas produzidas em viveiro em relação as mudas produzidas em casa de vegetação, independentemente do tempo de crioarmazenamento das sementes.

Figura 13. Número de pares de folhas verdadeiras de mudas produzidas em casa de vegetação e viveiro, oriundas da semeadura de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catucaí Amarelo ‘IAC 62’ crioarmazenadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias



Fonte: Da Autora (2023).

3.3 Cultivar Catucaí Amarelo ‘2SL’

Os resultados das avaliações das sementes da cultivar Catucaí Amarelo ‘2SL’ recém-colhidas, após o processamento e antes de serem imersas em nitrogênio líquido, apresentaram 76% de plântulas normais no teste de germinação. Na tabela 5 estão apresentados os resultados do período de desenvolvimento das mudas após crioarmazenamento das sementes, assim como, o tempo de avaliação das mudas nos dois locais de produção. Foi observado que, de modo geral, as mudas produzidas em casa de vegetação e viveiro da cultivar Catucaí Amarelo ‘2SL’ apresentaram comportamento semelhante na avaliação final das mudas, variando de cinco

a nove meses o período de desenvolvimento, em função das condições climáticas em cada local de produção e do tempo de criarmazenamento das sementes (TABELA 5). As mudas oriundas de sementes criopreservadas em ambos os locais de produção apresentaram maior tempo para atingir o padrão máximo de comercialização das mudas, quando a semeadura ocorreu nos meses de janeiro a junho de 2020.

Tabela 5. Detalhamento dos tratamentos: períodos de criarmazenamento das sementes de *Coffea arabica* L., Cultivar Catucaí Amarelo ‘2SL’; e períodos para a obtenção e avaliação das mudas, em viveiro e em casa de vegetação.

Criarmazenamento das Sementes			Obtenção das Mudanças/Avaliação			
Início	Término	Tempo ⁽¹⁾	Casa de Vegetação		Viveiro	
(mês)	(mês da semeadura)	(meses)	Mês	Tempo ⁽²⁾	Mês	Tempo ⁽²⁾
				(meses)		(meses)
	Agosto/19	0	Fevereiro/20	6	Março/20	7
	Agosto/19	1	Fevereiro/20	6	Março/20	7
	Setembro/19	2	Fevereiro/20	5	Março/20	6
	Outubro/19	3	Junho/20	8	Junho/20	8
	Novembro/19	4	Junho/20	7	Junho/20	7
	Dezembro/19	5	Junho/20	6	Julho/20	7
Agosto/19	Janeiro/20	6	Setembro/20	8	Agosto/20	7
	Fevereiro/20	7	Novembro/20	9	Novembro/20	9
	Março/20	8	Novembro/20	8	Novembro/20	8
	Abril/20	9	Janeiro/21	9	Janeiro/21	9
	Mai/20	10	Janeiro/21	8	Janeiro/21	8
	Junho/20	11	Fevereiro/21	8	Fevereiro/21	8
	Julho/20	12	Fevereiro/21	7	Fevereiro/21	7

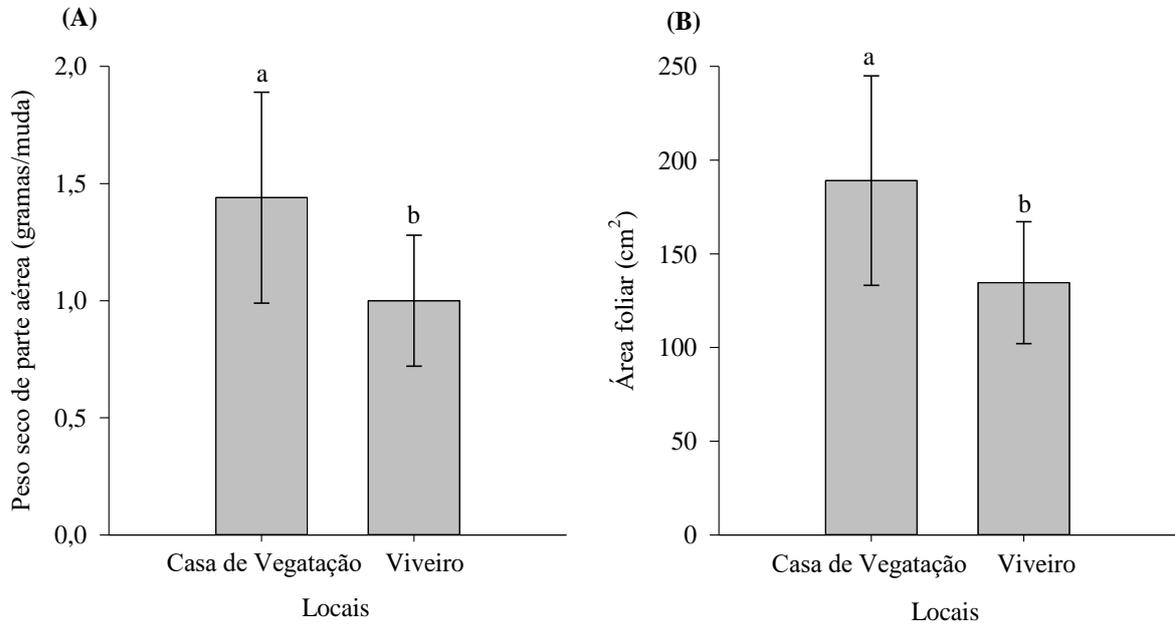
⁽¹⁾ Tempo que as sementes permaneceram no criotank em cada tratamento experimental e mudas oriundas de sementes recém-colhidas, sem imersão no nitrogênio líquido.

⁽²⁾ Tempo de duração da formação das mudas em cada tratamento experimental e em cada local.

Fonte: Da Autora (2023).

Na análise de variância dos dados, constatou-se efeito isolado do fator local de produção das mudas para as variáveis peso seco de parte aérea e área foliar. Já para a variável peso seco de raiz foi apenas constatado efeito significativo de tempo para os meses de criarmazenamento das sementes (APÊNDICE A). Com estes resultados observa-se que de uma forma geral, as maiores médias foram verificadas nas mudas produzidas em casa de vegetação em relação as mudas produzidas no viveiro, para as variáveis peso seco de parte aérea (FIGURA 14A) e área foliar (FIGURA 14B). Este resultado pode estar associado as condições climáticas obtidas na casa de vegetação, com temperatura máxima média de 25 °C e umidade relativa acima de 60% ao longo do período de desenvolvimento das mudas (FIGURA 1), favorecendo as mudas produzidas neste local.

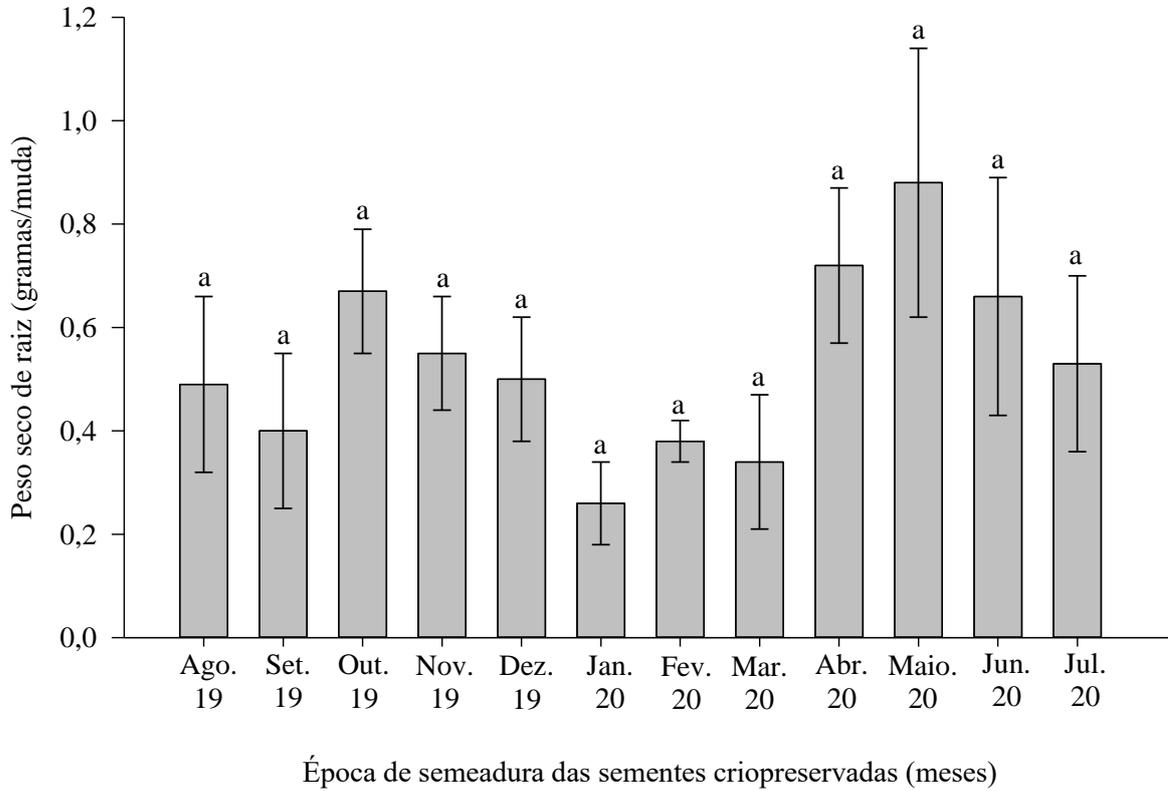
Figura 14. Peso seco de parte aérea (A) e área foliar (B) de mudas produzidas em casa de vegetação e viveiro, oriundas da semeadura de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catucaí Amarelo ‘2SL’ criomarmazenadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da Autora (2023).

Para a variável peso seco de raiz (FIGURA 15), as maiores médias foram verificadas nos meses de outubro/19, abril/20, maio/20 e junho/20, no entanto, não houve diferenças significativas entre as épocas de semeadura das sementes, independentemente do local de produção.

Figura 15. Peso seco de raiz de mudas produzidas em casa de vegetação e viveiro, oriundas da sementeira de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catucaí Amarelo '2SL' criopreservadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da Autora (2023).

4 DISCUSSÃO

É importante ressaltar que os diferentes desempenhos das mudas ao longo das diferentes épocas de semeadura, resultantes da interação entre tempo de criopreservação e local de produção, podem também, ter sido afetado pelas diferenças na qualidade fisiológica das sementes utilizadas. A criopreservação é tida como uma técnica de armazenamento, em que não ocorrem alterações na qualidade ao longo do tempo e, de fato, este comportamento pode ser confirmado pelo melhor desempenho das sementes criopreservadas pelo maior tempo nesse estudo, de doze meses. Este fato pode levar à constatação de que durante o período de armazenamento, podem ter ocorridos problemas metodológicos, não relacionados à técnica de criopreservação em si, mas relativas a outros fatores durante a retirada do nitrogênio, o reaquecimento das sementes e sua utilização para a produção das mudas.

Os resultados deste estudo mostram que as sementes da espécie *Coffea arabica* L. criopreservadas por até um ano e utilizadas para produção de mudas por diferentes épocas de semeadura, independentemente da cultivar, apresentaram qualidade superior quando produzidas em casa de vegetação em relação ao viveiro. Em estudos preliminares referentes a utilização de sementes criopreservadas de café arábica por período de seis meses para produção de mudas, Ricaldoni (2019) verificou melhores resultados para a maioria das variáveis das mudas produzidas em casa de vegetação em todos os tratamentos avaliados, em relação as mudas produzidas em viveiro. Teixeira et al. (2001) estudando os parâmetros de crescimento e a produção de cafeeiros cultivados em casa de vegetação e viveiro, observaram resultados superiores para o cultivo em casa de vegetação em todas as avaliações realizadas.

Os resultados satisfatórios das mudas produzidas em casa de vegetação estão também associados à maior temperatura média máxima observada ao longo dos meses de desenvolvimento das mudas, que foi de 30°C, enquanto no viveiro, esta esteve entre 25 e 28°C. O fator temperatura afeta todas as reações bioquímicas da fotossíntese, assim como, a integridade de membranas em cloroplastos, não surpreendendo que as respostas à temperatura sejam complexas e, as taxas de respiração aumentam em função da temperatura (TAIZ; ZEIGER, 2017). Em temperaturas mais baixas, a fotossíntese C3 pode também ser limitada por fatores como a disponibilidade de fosfatos no cloroplasto. As sínteses de amido e sacarose diminuem rapidamente com o decréscimo da temperatura, reduzindo a demanda por trioses fosfato e causando a limitação de fosfatos (TAIZ; ZEIGER, 2017).

De maneira geral, as mudas produzidas em casa de vegetação e viveiro apresentaram variações ao longo das épocas de semeadura das sementes criopreservadas para as três cultivares estudadas para variável altura.

Segundo Thomaziello et al. (2000), para uma muda de café que se desenvolveu normalmente, quando apresentar quantidade de folhas ideal para o plantio, que são de 5 ou 6 pares, estará com altura aproximada de 15 cm. Entretanto, as médias das mudas obtidas no estudo na maioria dos meses foram observados menores médias.

De acordo com os resultados da variável diâmetro médio do caule, não houve diferenças significativas das mudas oriundas de sementes criopreservadas e/ou mudas convencionais, ou seja, mudas oriundas de sementes recém-colhidas, nos dois locais de produção para cultivar Arara. Todavia, para cultivar Catuaí Amarelo 'IAC 62' comportamento diferenciado foi verificado. O diâmetro médio do caule é um importante indicador de vigor da muda e se correlaciona diretamente com a capacidade fotossintética da planta (FAVARIN et al., 2002; SILVA, 2003).

Diferentemente das outras variáveis em estudo, o número de pares de folhas verdadeiras apresentou as maiores médias nas mudas oriundas do local de produção viveiro. O número de folhas é um importante indicativo para determinar a prontidão das mudas para serem comercializadas e plantadas, bem como, o padrão mínimo de comercialização das mudas de café arábica estabelecido pelo MAPA é de no mínimo três pares de folhas definitivas (BRASIL, 2012). As plantas oriundas de ambientes de maior radiação, a taxa de crescimento do caule diminui, as folhas expandem e os cloroplastos se desenvolvem a partir de etioplastos, e as folhas se tornam verdes com o acúmulo da clorofila (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Segundo Taiz et al. (2017) a auxina produzida nos meristemas apicais regula o geotropismo e fototropismo envolvido no crescimento e desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. Durante a fase de produção de mudas é importante avaliar o local de acúmulo de peso de matéria seca nas suas diversas partes, e não só o peso da matéria seca total, sendo essa característica importante na avaliação do desenvolvimento de plantas (COVRE et al., 2013; PAIVA et al., 2009). As variáveis peso seco de parte aérea e raiz das mudas produzidas em casa de vegetação e viveiro apresentaram comportamento diferenciado em todas cultivares estudadas, ora apresentando interação entre todos os fatores trabalhados e ora com ausência de interação.

A área foliar, variável também estudada, é um indicador útil na compreensão do desenvolvimento vegetal e possui grande importância principalmente nos aspectos relacionados

à produção (AMARAL et al., 2009; SILVA et al., 2011). Os maiores valores de área foliar representam maior superfície de interceptação de luz, relacionada as maiores taxas fotossintéticas proporcionando elevado crescimento vegetativo (PARTELLI et al., 2006; PEDÓ et al., 2018). Neste estudo, as maiores médias de área foliar foram observadas em mudas produzidas em casa de vegetação para as cultivares Arara, Catuaí Amarelo ‘IAC 62’ e Catucaí Amarelo 2SL, na maioria das épocas de semeadura das sementes criopreservadas.

No entanto, apesar das três cultivares terem apresentado diferente qualidade fisiológica inicial, o desempenho das mudas cuja semeadura ocorreu nos meses de janeiro a março/abril foi inferior às demais épocas. Por outro lado, os melhores resultados ocorreram quando as sementes foram semeadas nos meses de maio a agosto, considerando a maioria das variáveis. Nesse período são também tradicionalmente produzidas as mudas de arábica, nas principais regiões produtoras de café do país. Com a semeadura nesse período foi constatado no presente estudo, que o tempo para a formação das mudas é menor do que as iniciadas nos meses de janeiro a março (TABELAS 1, 3 e 5, cultivares Arara, Catuai Amarelo IAC 62 e Catucaí Amarelo 2SL, respectivamente), com maior período de formação, além de piores desempenhos.

Assim, foi constatado pelos resultados do estudo, que a época tradicional de semeadura proporcionou a formação de mudas de sementes criopreservadas mais vigorosas, apesar das mesmas estarem aptas ao plantio em época de clima menos propício ao plantio, com menor precipitação pluviométrica. Já quando a semeadura é realizada a partir de setembro/outubro, em que o tempo de formação foi maior, as mudas apresentaram pior desempenho, mas atingem padrão em época de clima mais favorável ao plantio. Importante observar também que as mudas de sementes criopreservadas apresentaram desempenho igual ou melhor do que as mudas de sementes recém-colhidas e não imersas no nitrogênio líquido (tratamento controle), considerando a grande maioria das variáveis.

Finalmente, ressalta-se que os experimentos foram realizados durante os anos de 2019 e 2020, em plena pandemia da Covid 19, o que acarretou dificuldades enormes para a condução dos trabalhos, tendo inclusive, inviabilizado a realização do estudo com sementes de uma segunda safra, o que é ideal e recomendado para estudos dessa natureza. Apesar dessas dificuldades, os rigores requeridos para a condução dos trabalhos e a realização das análises estatísticas foram observados, sem prejuízos aos resultados e conclusões. Sendo assim, recomenda-se que estudos posteriores sejam realizados para investigar o pegamento das mudas no campo e o desenvolvimento dos cafeeiros, tendo em vista a diferente qualidade das mudas produzidas nas diferentes épocas do ano, bem como as condições climáticas nessas épocas.

5 CONCLUSÕES

A utilização de sementes criopreservadas possibilita a produção de mudas *Coffea arabica* L. em qualquer época do ano, sendo a casa de vegetação, o ambiente que proporciona melhor desempenho das mudas, em comparação às produzidas em viveiro.

A semeadura de sementes criopreservadas nos meses de janeiro a março requer maior tempo para a formação de mudas, as quais também apresentam desempenho fisiológico aquém do desempenho das iniciadas nos meses de maio a julho.

Mudas produzidas com sementes criopreservadas durante todos os meses do ano apresentam desempenho igual ou superior ao das produzidas com sementes recém-colhidas e não imersas em nitrogênio líquido.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, J. A. T.; AMARAL, J. F. T.; SCHMILDT, E. R.; COELHO, R. I. Métodos de análise quantitativa do crescimento de plantas. *In*: FERREIRA, A.; LIMA, A. B. P.; MATTA, F. P.; AMARAL, J. A. T.; LOPES, J. C.; PEZZOPANE, J. E. M.; FERREIRA, M. F. S.; POLANCZYK, R. A.; SOARES, T. C. B. (Org.). **Tópicos especiais em produção vegetal I**. Alegre: CCA-UFES, 2009. p. 259-276.
- ARAÚJO, J. A. C.; CASTELLANE, P. D. **Recentes avanços da pesquisa agrônômica na plasticultura brasileira**. *In*: ARAUJO, J. A.C.; CASTELLANE, P. D. (Eds.) Dez anos de plasticultura na F.C. A.V. Jaboticabal: Ed: FUNEP, 1996. 67-68 p.
- BARROS, R. S. et al. Determinação de área de folhas do café (*Coffea arabica* L. cv. ‘Bourbon Amarelo’). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 20, n. 107, p. 44-52, 1973.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 35, de 29 de novembro de 2012**. Estabelece normas para a produção e comercialização de material de propagação de cafeeiro (*Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) e os seus padrões, com validade em todo o território nacional, visando à garantia de sua identidade e qualidade. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 3 dez. 2012. Seção 1, p. 11-23.
- CHAVARRIA, G. et al. Incidência de doenças e necessidade de controle em cultivo protegido de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 477-482, 2007.
- COELHO, S. V. B. et al. Tolerance of *Coffea arabica* L. seeds to sub zero temperatures. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 4, n. 3, p. 312-321, 2017. (a)
- COVRE, A.M. et al. Crescimento e desenvolvimento inicial de genótipos de café Conilon. **Agro@mbiente**, Boa Vista, v. 7, n. 2, p. 193-202, 2013.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behavior? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.
- FAVARIN, J. L. et al. Equações para a estimativa do índice de área foliar do cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.6, p.769-773, 2002.
- FIGUEIREDO, M. A. de et al. Exploratory studies for cryopreservation of *Coffea arabica* L. seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 39, n. 2, p. 150-158, 2017.
- FIGUEIREDO, M. A. de et al. Physiological, biochemical, and ultrastructural aspects of *Coffea arabica* L. seeds under different cryopreservation protocols. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 45, e027020, p. 1-14, 2021.
- GUIMARÃES, R. J. et al. Efeitos da citocinina, giberelina e remoção do endocarpo na germinação de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 22, n. 3, p. 390-396, 1998.

GUIMARÃES, R. M. et al. Tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 128-139, 2002.

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. **Dados meteorológicos**. Disponível em: <<https://tempo.inmet.gov.br/TabelaEstacoes/A001/>>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2022.

LIMA, A. E. **Técnicas inovadoras na produção de mudas de café por sementes e estacas**. 97f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2021.

MARTINS, L. D. et al. The nutritional efficiency of *Coffea* spp. A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 9, p. 728-734, 2015.

MATIELLO, J. B. et al. **Cultura de café no Brasil: manual de recomendações**. Varginha: FUNDAÇÃO PROCAFÉ, 2020. 728 p.

MENDONÇA, V. et al. Diferentes ambientes e Osmocote® na produção de mudas de tamarindeiro (*Tamarindus indica*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 391-397, 2008.

PAIVA, A.V. et al. Crescimento de mudas de espécies arbóreas nativas, adubadas com diferentes doses de lodo de esgoto seco e com fertilização mineral. **Scientia Forestalis**, v. 37, n. 84, p. 499-511, 2009.

PARTELLI, F. L. et al. Produção e desenvolvimento radicular de plantas de café ‘Conilon’ propagadas por sementes e por estacas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 6, p. 949-954, 2006.

PEDÓ, T. et al. Plant growth and vigor of bean seeds in response to the exogenous application of gibberellic acid. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 41, n. 3, p. 181-190, 2018.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2022.

REBOUÇAS, P. M. et al. Radiação solar e temperatura do ar em ambiente protegido. **Revista Agrogeambiental**, Pouso Alegre, v. 7, n. 2, p. 115-125, 2015.

RICALDONI, M. A. **Uso de sementes criopreservadas e cultivo protegido para a produção de mudas de *Coffea arabica* L.** 76f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2019.

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

SILVA, J. I. Produção de mudas de café (*Coffea canephora*) em diferentes recipientes e substratos. Campos dos Goytacazes, 2003.

SILVA, W. Z. et al. Métodos de estimativa de área foliar em cafeeiro. Enciclopédia **Biosfera**, v. 7, n. 13, p. 746-759, 2011.

SOUZA, A. C. de. **Aspectos fisiológicos, bioquímicos, biofísicos e ultraestruturais associados à criopreservação em sementes de *Coffea arabica* L.** 103f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2019.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TEIXEIRA, M.B. et al. Avaliação comparativa dos parâmetros de crescimento e a produção de cafeeiros cultivados em casa de vegetação e a céu aberto irrigados por gotejamento. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2001, 2., Vitória. **Anais...** Brasília, DF: EMBRAPA Café, 2001.

THOMAZIELLO, R. A. et al. **Café arábica:** cultura e técnicas de produção. Campinas: Instituto Agrônomo, 2000. 82 p. (Boletim Técnico, 187).

VIDA, J. B. et al. Manejo de Doenças de Plantas em Cultivo Protegido. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 29, n. 4, p. 355-372, 2004.

WENT, F. W. **The experimental control of plant growth:** with special reference to the Earhart Plant Research Laboratory at the California Institute of Technology. New York: The Ronald, 1957. 343 p.

APÊNDICE A - Tabela da análise de variância do capítulo 3

Tabela 1 Resumo da análise de variância dos resultados de número de pares de folhas verdadeiras (NPA), altura média das mudas (A), diâmetro médio do caule (DC), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raiz (PSR) e área foliar (AF) de mudas oriundas de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara criopreservadas por diferentes períodos, até um ano produzidas em casa de vegetação e viveiro.

FV	GL	Quadrados Médios					
		NPA	A	DC	PSPA	PSR	AF
Bloco	2	4 ^{ns}	2 ^{ns}	3 ^{ns}	2 ^{ns}	3 ^{ns}	3 ^{ns}
Local (L)	1	6 ^{ns}	3*	5*	6*	6*	6*
Meses (M)	11	5 ^{ns}	4*	6*	5*	5*	4*
L x M	11	2 ^{ns}	6 ^{ns}	4*	4 ^{ns}	4*	2*
Erro	46	3	5	2	3	2	5
CV (%)	-	11,25	19,26	13,07	37,11	32,39	27,32

*: Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns}: não significativo.

Fonte: Da Autora (2023).

APÊNDICE A - Tabela da análise de variância do capítulo 3

Tabela 2 Resumo da análise de variância dos resultados de número de pares de folhas verdadeiras (NPA), altura média das mudas (A), diâmetro médio do caule (DC), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raiz (PSR) e área foliar (AF) de mudas oriundas de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo 'IAC 62' criopreservadas por diferentes períodos, até um ano produzidas em casa de vegetação e viveiro.

FV	GL	Quadrados Médios					
		NPA	A	DC	PSPA	PSR	AF
Bloco	2	2 ^{ns}	4 ^{ns}	2 ^{ns}	4 ^{ns}	3 ^{ns}	4 ^{ns}
Local (L)	1	3 [*]	6 ^{ns}	5 ^{ns}	2 ^{ns}	5 ^{ns}	5 ^{ns}
Meses (M)	11	5 ^{ns}	3 ^{ns}	3 ^{ns}	5 [*]	4 ^{ns}	2 [*]
L x M	11	6 ^{ns}	5 [*]	6 [*]	6 [*]	6 [*]	3 [*]
Erro	46	4	2	4	3	2	6
CV (%)	-	31,15	37,86	33,86	51,45	53,26	47,76

*: Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns}: não significativo.

Fonte: Da Autora (2023).

APÊNDICE A - Tabela da análise de variância do capítulo 3

Tabela 3 Resumo da análise de variância dos resultados de número de pares de folhas verdadeiras (NPA), altura média das mudas (A), diâmetro médio do caule (DC), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raiz (PSR) e área foliar (AF) de mudas oriundas de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catucaí Amarelo '2SL' criopreservadas por diferentes períodos, até um ano produzidas em casa de vegetação e viveiro.

FV	GL	Quadrados Médios					
		NPA	A	DC	PSPA	PSR	AF
Bloco	2	2 ^{ns}	5 ^{ns}	2 ^{ns}	2 ^{ns}	2 ^{ns}	3 ^{ns}
Local (L)	1	3 ^{ns}	6 ^{ns}	3 ^{ns}	6*	3 ^{ns}	5*
Meses (M)	11	6 ^{ns}	2 ^{ns}	4 ^{ns}	5 ^{ns}	6*	4 ^{ns}
L x M	11	5 ^{ns}	4 ^{ns}	6 ^{ns}	4 ^{ns}	5 ^{ns}	2 ^{ns}
Erro	46	4	3	5	3	4	6
CV (%)	-	27,28	40,07	32,69	59,92	56,17	52,36

*: Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns}: não significativo.

Fonte: Da Autora (2023).

CAPÍTULO 4 AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA DE MUDAS PRODUZIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO E EM VIVEIRO

RESUMO

A tradicional prática para a obtenção de mudas de café baseia-se na utilização de sementes, cuja qualidade é essencial. Sendo a técnica de criopreservação uma opção inovadora para o armazenamento seguro das sementes, permitindo a semeadura em qualquer época do ano, a investigação da produção das mudas com sementes criopreservadas e em diferentes ambientes, associando as características agrônômicas aos aspectos fisiológicos, se constitui em avanço tecnológico para o segmento cafeeiro. Assim, o estudo foi realizado com o objetivo de avaliar aspectos fisiológicos de mudas de *Coffea arabica* L., produzidas durante dez meses do ano, em viveiro e em casa de vegetação, a partir da semeadura de sementes armazenadas em nitrogênio líquido. Sementes das cultivares Arara, Catuaí Amarelo 'IAC 62' e Catuaí Amarelo '2SL' foram submetidas à secagem em sílica em gel até o teor de água de 17% (base úmida) e diretamente imersas em nitrogênio líquido, onde permaneceram por período de 10 meses. A cada tempo de criopreservação estudado, as amostras foram retiradas do nitrogênio líquido, reaquecidas em banho-maria e semeadas para produção das mudas nos dois ambientes. A avaliação fisiológica das mudas foi realizada quando estas apresentavam o terceiro ou quarto par de folhas verdadeiras totalmente expandidas. Foram avaliadas a condutância estomática, os teores relativos das clorofilas a, b e clorofila total. Os teores de clorofila a, b, total e condutância estomática sofreram pequenas modificações relacionadas à época de semeadura das sementes criopreservadas, independentemente do local de produção das mudas. A semeadura de sementes criopreservadas nos meses de fevereiro e março apresentaram pior desempenho fisiológico das mudas que as semeadas nos demais meses estudados.

Palavras-chave: Café arábica. Criopreservação. Produção de mudas. Fotossíntese.

ABSTRACT

The traditional practice for obtaining coffee seedlings is based on the use of seeds, whose quality is essential. As cryopreservation is an innovative technique for the safe storage of seeds, allowing for year-round sowing, investigating the production of seedlings with cryopreserved seeds in different environments, and associating agronomic characteristics with physiological aspects represents a technological advancement for the coffee industry. Therefore, this study aimed to evaluate the physiological aspects of *C. arabica* L. seedlings produced during ten months of the year in a nursery and a greenhouse, using seeds stored in liquid nitrogen. Seeds from the Arara, Catuaí Amarelo 'IAC 62', and Catuaí Amarelo '2SL' cultivars were dried with silica gel until reaching a moisture content of 17% (wet basis) and then directly immersed in liquid nitrogen for a period of 10 months. At each studied cryostorage time, samples were taken out of liquid nitrogen, warmed in a water bath, and sown to produce seedlings in both environments. The physiological evaluation of the seedlings was conducted when they had the third or fourth pair of fully expanded true leaves. Stomatal conductance and the relative contents of chlorophylls a, b, and total chlorophyll were evaluated. The relative contents of chlorophylls a, b, total chlorophyll, and stomatal conductance underwent minor modifications related to the sowing time of the cryopreserved seeds, regardless of the seedling production location. Sowing cryopreserved seeds in February and March resulted in poorer physiological performance of the seedlings compared to those sown in the other studied months.

Keywords: Arabica coffee. Cryopreservation. Seedling production. Photosynthesis.

1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura brasileira tem destaque no cenário agrícola em razão da importância econômica e social, gerando exportações e empregando, direta ou indiretamente, mão-de-obra nas diferentes etapas do processo evolutivo do agronegócio café. A produção nacional de café, no ano de 2022 foi de 50,92 milhões de sacas beneficiadas, correspondendo a um terço de todo o café produzido no mundo (CONAB, 2023).

A tradicional prática para obtenção de mudas na cafeicultura baseia-se na utilização de sementes e, desta forma, a boa qualidade inicial das sementes é essencial para formação das mudas, refletindo diretamente na longevidade das plantas, aspecto desejável, por ser uma cultura perene. As sementes de *Coffea arabica* L. são classificadas como intermediárias (ELLIS et al., 1990), além disso, apresentam baixa longevidade, germinação lenta e desuniforme (ABREU et al., 2014; COELHO et al., 2015). Essas limitações dificultam a manutenção da viabilidade e vigor na conservação das sementes de café por longos períodos.

Neste contexto, uma alternativa viável para o armazenamento das sementes do gênero *Coffea* é a criopreservação -196°C (COELHO et al., 2017a; FIGUEIREDO et al., 2017; RICALDONI, 2019; SOUZA, 2019; FIGUEIREDO et al., 2021), sendo mantidas em nitrogênio líquido, por tempo indeterminado. De acordo com o protocolo ajustado para sementes de *Coffea arabica* L., a forma indicada para criopreservação é a secagem em sílica gel até 20% (base seca) ou 17% (base úmida) e posteriormente, a imersão direta em nitrogênio líquido (COELHO et al., 2017a; FIGUEIREDO et al., 2017). Assim a produção de mudas utilizando sementes criopreservadas possibilita um avanço no segmento cafeeiro.

A produção de mudas de café arábica acontece predominantemente em viveiros com o cultivo tradicional, mas segundo Matiello et al. (2020), existe necessidade de novas técnicas visando obtenção de mudas vigorosas que apresentem melhores características agronômicas, sendo o cultivo protegido uma alternativa para proteção das plantas. De acordo com Taiz e Zeiger (2017), o desenvolvimento de plantas em casa de vegetação apresenta diminuição da taxa de crescimento do caule, as folhas expandem e os cloroplastos se desenvolvem a partir de etioplastos, e as folhas se tornam verdes com o acúmulo da clorofila.

Neste sentido, estudar diferentes ambientes associados as características agronômicas para a produção de mudas é desejável, uma vez que a demanda por mudas é crescente no segmento cafeeiro. Vários fatores ambientais, como luz, podem causar alterações estruturais e funcionais nas folhas, e conseqüente alteração no padrão de crescimento e produção das plantas.

Em pesquisas cafeeiras na fase de produção da cultura, a produção total de clorofila e proporção de clorofilas a/b pode não alterar conforme as diferentes intensidades luminosas (ARAÚJO et al., 2008; CHAVES et al., 2008).

Tendo em vista que é desejável o desenvolvimento de novas tecnologias para produção de mudas e que a utilização de sementes criopreservadas na cafeicultura é uma possibilidade viável, objetivou-se, avaliar aspectos fisiológicos de mudas de *Coffea arabica* L., produzidas durante dez meses do ano, em viveiro e em casa de vegetação, a partir da semeadura de sementes armazenadas em nitrogênio líquido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e processamento do material vegetal

Frutos de café da espécie *Coffea arabica* L., cultivares Arara ‘Catuaí Amarelo’ IAC 62 e ‘Catuaí Amarelo 2SL’ foram colhidos em lavouras da Fazenda Experimental da Fundação Procafé em Varginha, na safra 2019/2020 e cuidadosamente transportados para Universidade Federal de Lavras. Os frutos foram colhidos no estágio de maturação “cereja”, por meio de colheita seletiva, e na sequência foram submetidos ao processamento via úmida, sendo lavados/imersos em água para separação por densidade e eliminação dos frutos cerejas dos frutos chochos, malformados, brocados e de impurezas. Após a separação, os frutos cerejas foram descascados e as sementes foram despulpadas por meio da fermentação em água durante 24 horas na temperatura de 30 °C e posteriormente pré-secadas à sombra para a retirada da umidade superficial. Para a uniformização do tamanho, foram utilizadas as sementes retidas nas peneiras de crivo circular nº 19, 20 e 21, sendo descartadas aquelas de tamanho acima e abaixo destes.

Após o descascamento dos frutos e despulpamento das sementes, no Setor de Cafeicultura, o experimento foi conduzido no Setor de Sementes, ambos no Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG.

Para a caracterização dos lotes, as sementes foram inicialmente submetidas à determinação do teor de água e à avaliação da qualidade, pelo teste de condutividade elétrica, teste de germinação, peso seco de plântulas e teste de tetrazólio. Em seguida, foram submetidas à secagem até atingirem o teor de água de 17% (base úmida), conforme trabalhos realizados por Figueiredo et al. (2017) e Coelho et al. (2017a). Posteriormente, as sementes foram armazenadas em tanque contendo nitrogênio líquido, em temperatura de -196 °C, até a realização das análises e experimentos.

2.2 Secagem das sementes

Para a secagem das sementes foram utilizadas 60g de sílica gel ativada como agente dessecante, em caixas tipo “gerbox”, as quais foram mantidas em câmaras tipo B.O.D, reguladas em temperatura de 25 °C, na ausência de luz. A perda de água durante a secagem foi

monitorada por pesagens contínuas em balança de precisão de 0,001 g, até teor de água de 17% bu.

2.3 Crioarmazenamento das sementes

As sementes das três cultivares, condicionadas em sacos de tule, foram armazenadas no nitrogênio líquido (-196 °C), onde foram mantidas por período de 12 meses, sendo que a cada mês foram retiradas amostras para as avaliações da qualidade. Foram utilizados 12 sacos de tule para cada cultivar, sendo um saco para mês de semeadura, contendo cada um, 640 sementes com teor de água de 17% bu (COELHO et al., 2017a; FIGUIREIDO et al., 2017). As sementes foram imersas diretamente no nitrogênio líquido (-196 °C), sem pré-resfriamento e, a cada mês, amostras foram retiradas, reaquecidas e utilizadas para a formação das mudas.

2.4 Aquecimento das sementes

A cada mês, após cada período de armazenamento no nitrogênio líquido, as sementes de cada cultivar foram retiradas do criotânque e rapidamente imersas em banho-maria por 2 minutos à 40 °C, de acordo com metodologia de Figueiredo et al. (2021). Em seguida, sementes das três cultivares foram submetidas sem os pergaminhos, à avaliação da qualidade fisiológica após criopreservação. As sementes criopreservadas foram, então, semeadas com os pergaminhos, para a produção e avaliação das mudas.

2.5 Produção e avaliação fisiológica das mudas de café

A produção de mudas foi realizada em cada época e locais, completando as 12 épocas de armazenamento para cada cultivar. No entanto, as avaliações fisiológicas das mudas foram realizadas em dez épocas de armazenamento para cada cultivar e local.

2.5.1 Local de produção das mudas

As mudas foram produzidas em viveiro situado no Setor de Cafeicultura e em casa de vegetação, no Setor de Sementes, ambos no Departamento de Agricultura, da UFLA. O viveiro é dotado de cobertura de sombrite de cor preta, permitindo a passagem de 50% da luz, colocada

a dois metros de altura em relação ao solo. A casa de vegetação é dotada de cobertura com filme plástico transparente a três metros de altura em relação ao solo e, possui dimensões de 6,40 m x 12,80 m, totalizando 81,92 m².

Para os dois locais foram confeccionados os canteiros com dimensões de 1,20 metros x 4 metros, delimitado com bambus fixos no solo para organizar a disposição das mudas. As regas foram feitas diariamente, utilizando sistema de irrigação por microaspersão, objetivando o fornecimento de 4,5 mm de água por dia (GUIMARÃES et al., 1998).

Os valores das temperaturas mínima, média, máxima e umidade relativa em casa de vegetação foram monitorados ao longo de todo período experimental utilizando medidor datalogger AKSO 174 portátil, programado para realizar leitura a intervalo de três horas. E em viveiro, os valores das temperaturas mínima, média, máxima e precipitação foram monitorados ao longo de todo período experimental pelo Inmet (2022).

2.5.2 Recipiente, substrato e avaliações

A semeadura foi realizada com duas sementes em cada saco plástico (11 x 22 cm) contendo substrato comercial Maxfértil® e durante todo o período de produção das mudas, foi realizado o manejo recomendado para a formação de mudas (GUIMARÃES et al., 2002). Após a emergência das plântulas, foi realizado o desbaste no estádio “orelha de onça” (folhas cotiledonares), restando uma planta em cada saco plástico. O experimento foi realizado em blocos casualizados em três blocos, sendo cada parcela experimental composta por vinte mudas, para cada época de semeadura, cada cultivar e local. As seis mudas centrais de cada parcela foram consideradas úteis para as avaliações e as demais plântulas constituíram as bordaduras das parcelas experimentais.

Para as análises fisiológicas das mudas, foram selecionadas folhas totalmente expandidas, do terceiro ou quarto par de folhas verdadeiras totalmente expandidas, das seis plantas consideradas úteis de cada época, para cada cultivar e locais. Assim, foram realizadas as seguintes avaliações.

Avaliação da troca gasosa: foi obtida por um sistema portátil “Leaf Porometer” (Decagon Devices, versão 1.0) em que foi avaliada a condutância estomática (μmol) na face abaxial das folhas. A avaliação foi realizada entre 9 e 11 horas da manhã.

Avaliação dos teores relativos das clorofilas a, b e total: a determinação indireta dos teores relativos foram obtidos por meio do medidor portátil de clorofila ClorofiLOG (Falker

Automação Agrícola, Brasil), que fornece valores denominados índices de clorofila Falker (ICF) proporcionais à absorvência das clorofilas.

2.6 Delineamento experimental e análise estatística

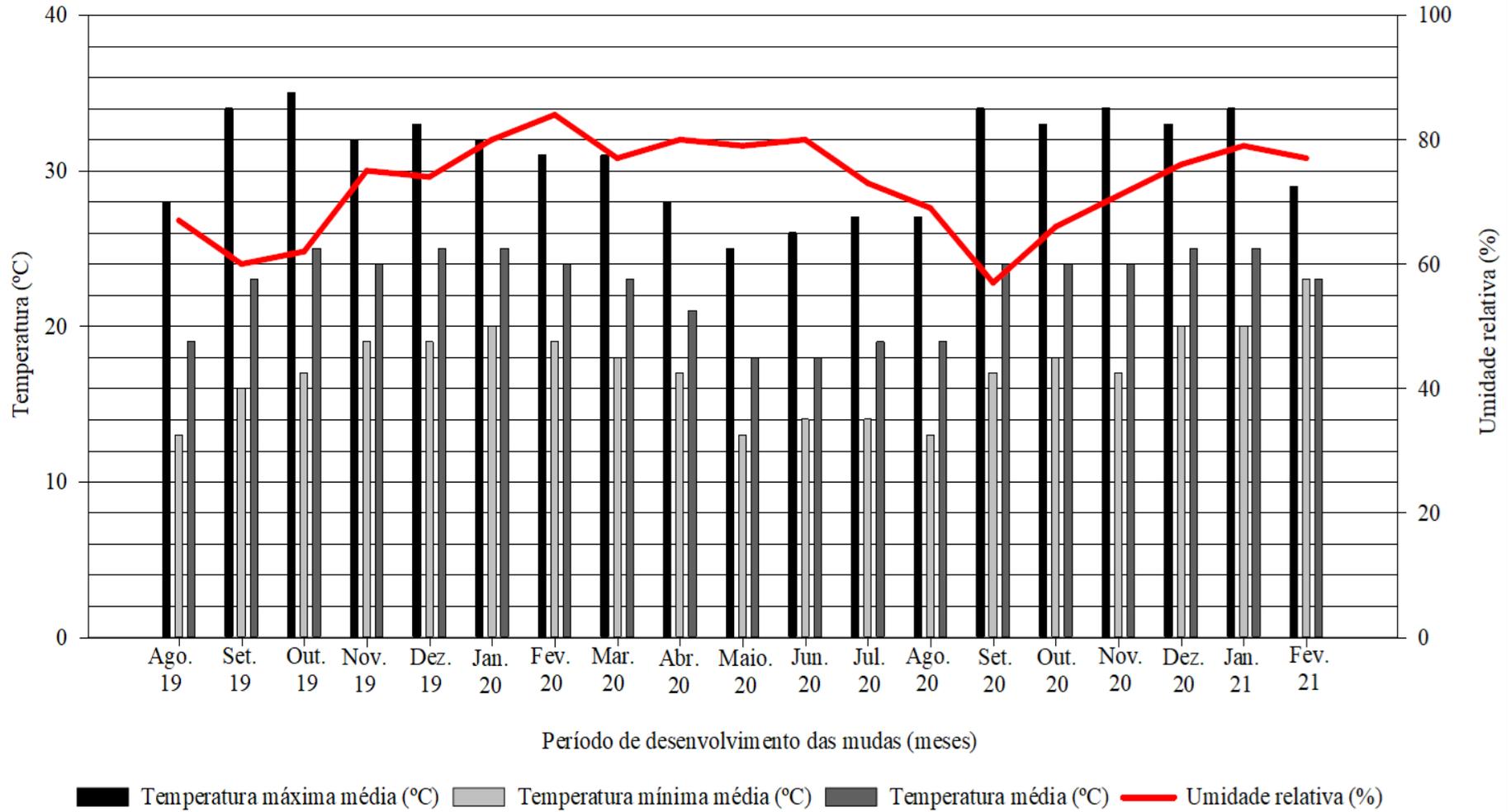
O delineamento experimental foi em blocos casualizados com três repetições para todas as análises. Os resultados das avaliações fisiológicas das mudas foram analisados em esquema fatorial 10 X 2, sendo dez épocas de criarmazenamento e dois ambientes (casa de vegetação e viveiro), para cada uma das três cultivares (Arara, Catuaí Amarelo 'IAC 62' e Catuaí Amarelo 2SL), perfazendo 18 parcelas experimentais. Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade por meio do software R (R CORE TEAM, 2022).

3 RESULTADOS

Nas figuras 1 e 2, estão apresentados os dados climáticos durante o período de desenvolvimento das mudas em casa de vegetação e em viveiro, os quais correspondem às estações do ano definidas pelos meses de junho a setembro, estação do inverno, meses de setembro a dezembro estação da primavera, meses de dezembro a março estação do verão e por fim, a estação outono compreendida entre os meses de março a junho.

Conforme esperado, em casa de vegetação, foram observadas temperaturas mais elevadas do que em viveiro, durante todo o período do experimento. Observa-se em casa de vegetação (FIGURA 1), temperaturas médias mensais máximas acima de 30 °C na maioria dos meses, com valores ainda mais altos nas estações da primavera e do verão. Já as temperaturas médias tiveram valores acima de 20 °C na maior parte do período, com decréscimos nos meses do outono e inverno. Quanto à temperatura mínima média, no decorrer dos meses os valores próximos de 12 °C nos meses junho, julho e agosto, coincidente com a estação do inverno, mas foram superiores a 14°C, nos outros meses.

Figura 1. Médias mensais das temperaturas máximas, médias e mínimas (°C), e de umidade relativa (%) nos meses correspondentes aos períodos de desenvolvimento das mudas de *Coffea arabica* L. em casa de vegetação, safra 2019/2020. UFLA, Lavras, MG, 2022.

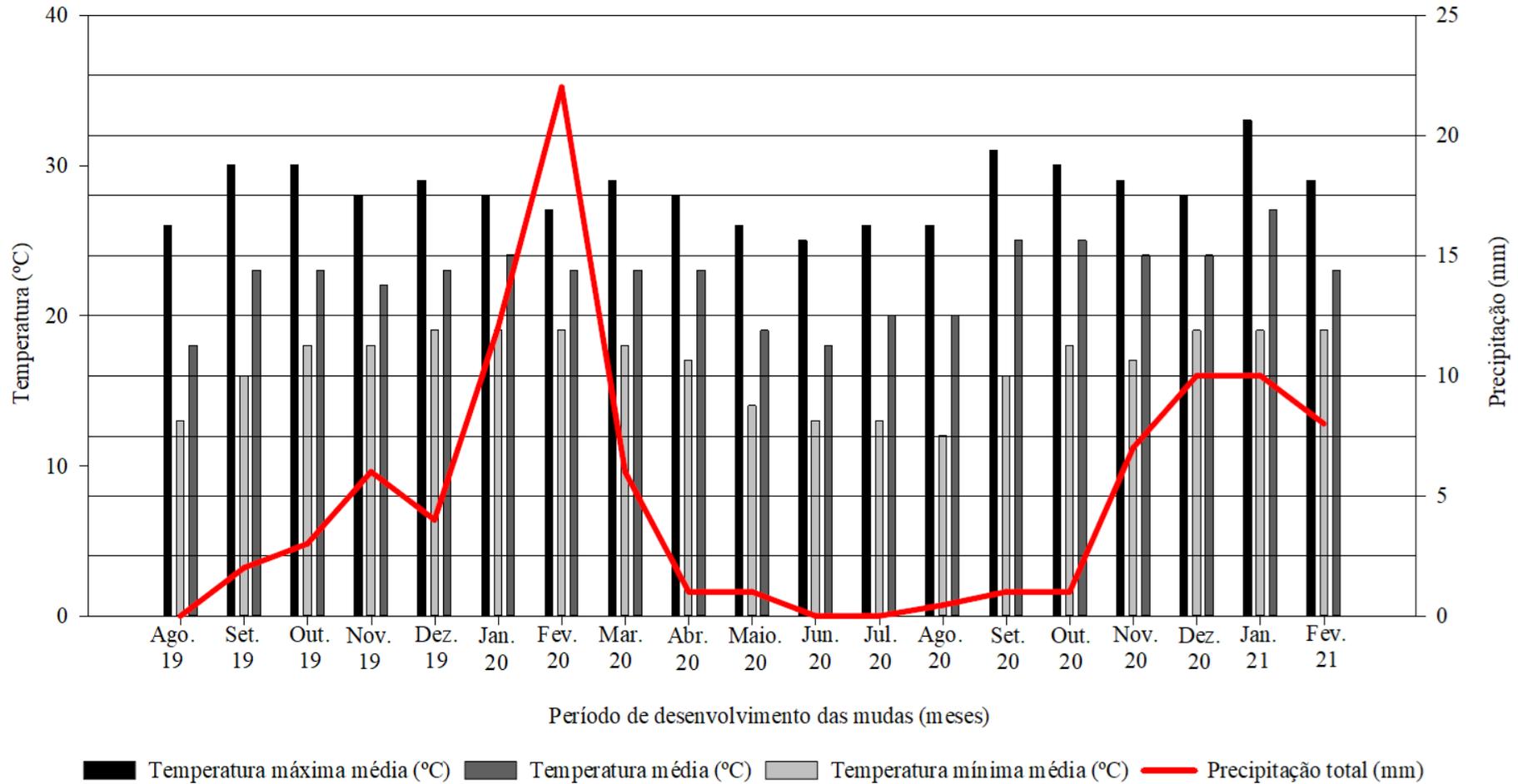


Fonte: Da Autora (2023).

Já em viveiro (FIGURA 2), as temperaturas máximas médias ultrapassaram 30 °C apenas nos meses de setembro/2020 e janeiro/2021, sendo que na maior parte do período estiveram entre 25 °C e 28 °C, assim como, variações nas temperaturas médias e mínimas médias mediante as estações do ano, com as menores temperaturas verificadas na estação do inverno, com valores próximos de 10 °C.

Em relação a precipitação, o ano de 2020 apresentou maior precipitação em relação ao ano de 2021, entre os meses de janeiro e fevereiro, com média mensal de 20 milímetros. Observa-se que, de modo geral, durante o período de desenvolvimento das mudas no viveiro houve menor precipitação na estação outono-inverno, período de seca, ao passo que, o início do período chuvoso coincide com o final da estação do inverno, mês de agosto.

Figura 2. Médias mensais das temperaturas máximas, médias e mínimas (°C), e de precipitação (%) nos meses correspondentes ao período de desenvolvimento das mudas de *Coffea arabica* L. em viveiro, safra 2019/2020. UFLA, Lavras, MG, 2022. Fonte: INMET, 2022.



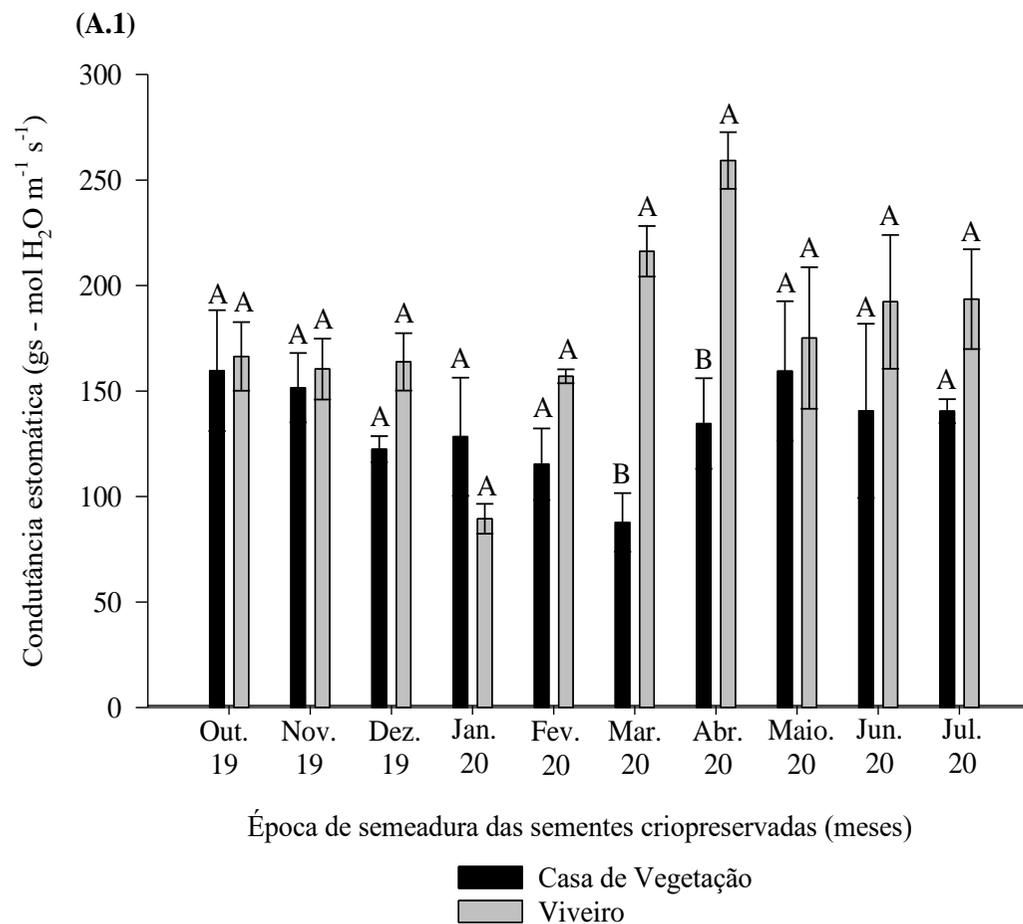
Fonte: Da Autora (2023).

3.1 Cultivar Arara

Pela análise de variância da avaliação fisiológica das mudas para a cultivar Arara, houve interação significativa entre os fatores estudados para as variáveis condutância estomática, teores relativos das clorofilas a e total. Para teor relativo da clorofila b, foi constatado efeito significativo apenas do fator local de produção das mudas e o crioarmazenamento das sementes (APÊNDICE A).

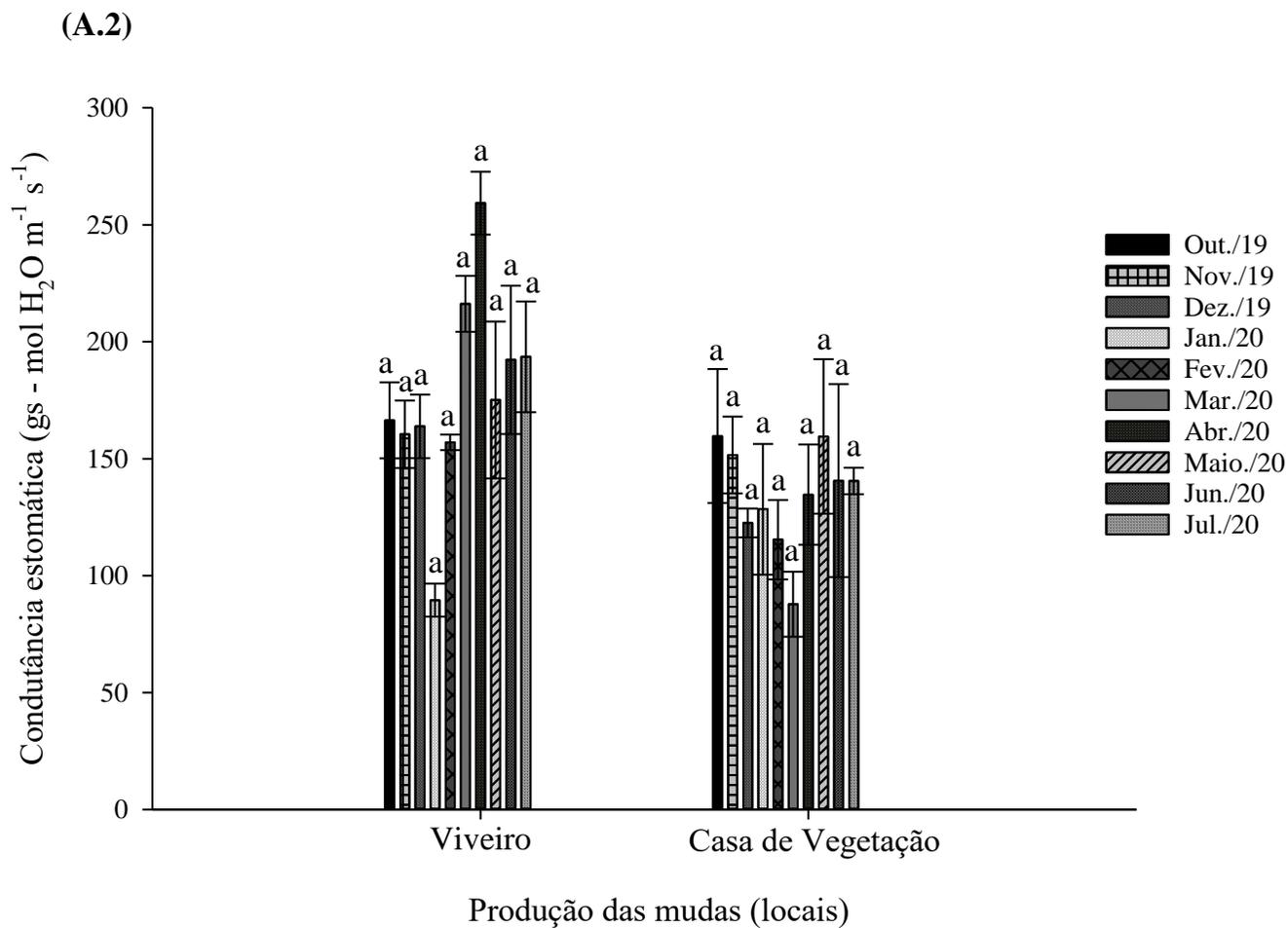
De maneira geral, observa-se que as maiores médias para variável condutância estomática foram verificadas nas mudas produzidas em viveiro, principalmente o mês de março/20 e abril/20 (FIGURA 3, A.1). Este resultado relaciona as condições climáticas durante o período de desenvolvimento das mudas, com altas precipitações coincidentes com o período chuvoso, o que explica as maiores médias nas mudas produzidas em viveiro neste mês. Independentemente do tempo de crioarmazenamento das sementes, as maiores médias foram verificadas nas mudas produzidas em viveiro, no entanto, não houve diferenças significativas entre os meses estudados em ambos os locais de produção (FIGURA 3, A.2).

Figura 3. Condutância estomática de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da semeadura de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara criopreservadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, no local de produção das mudas (A.1) e minúsculas, tempo de criarmazenamento das sementes (A.2), não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Continua).



Fonte: Da Autora (2023).

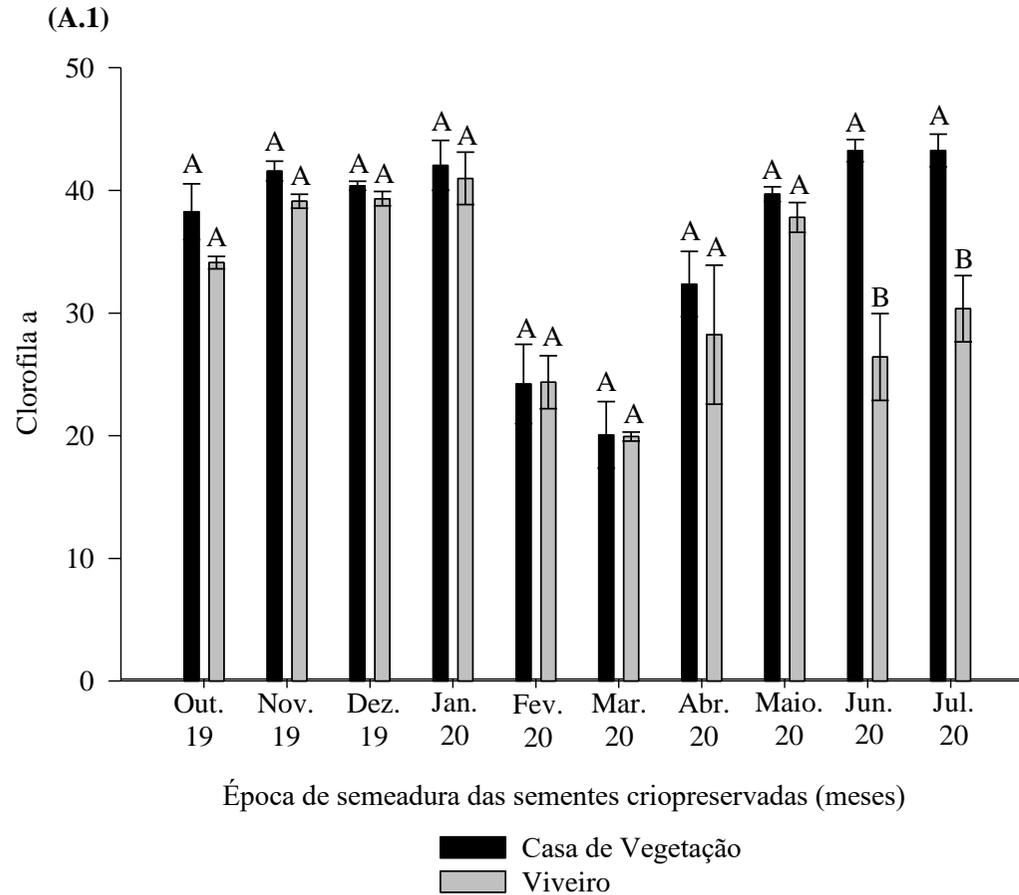
Figura 3. Condutância estomática de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da semeadura de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara criopreservadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, no local de produção das mudas (A.1) e minúsculas, tempo de criarmazenamento das sementes (A.2), não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Conclusão).



Fonte: Da Autora (2023).

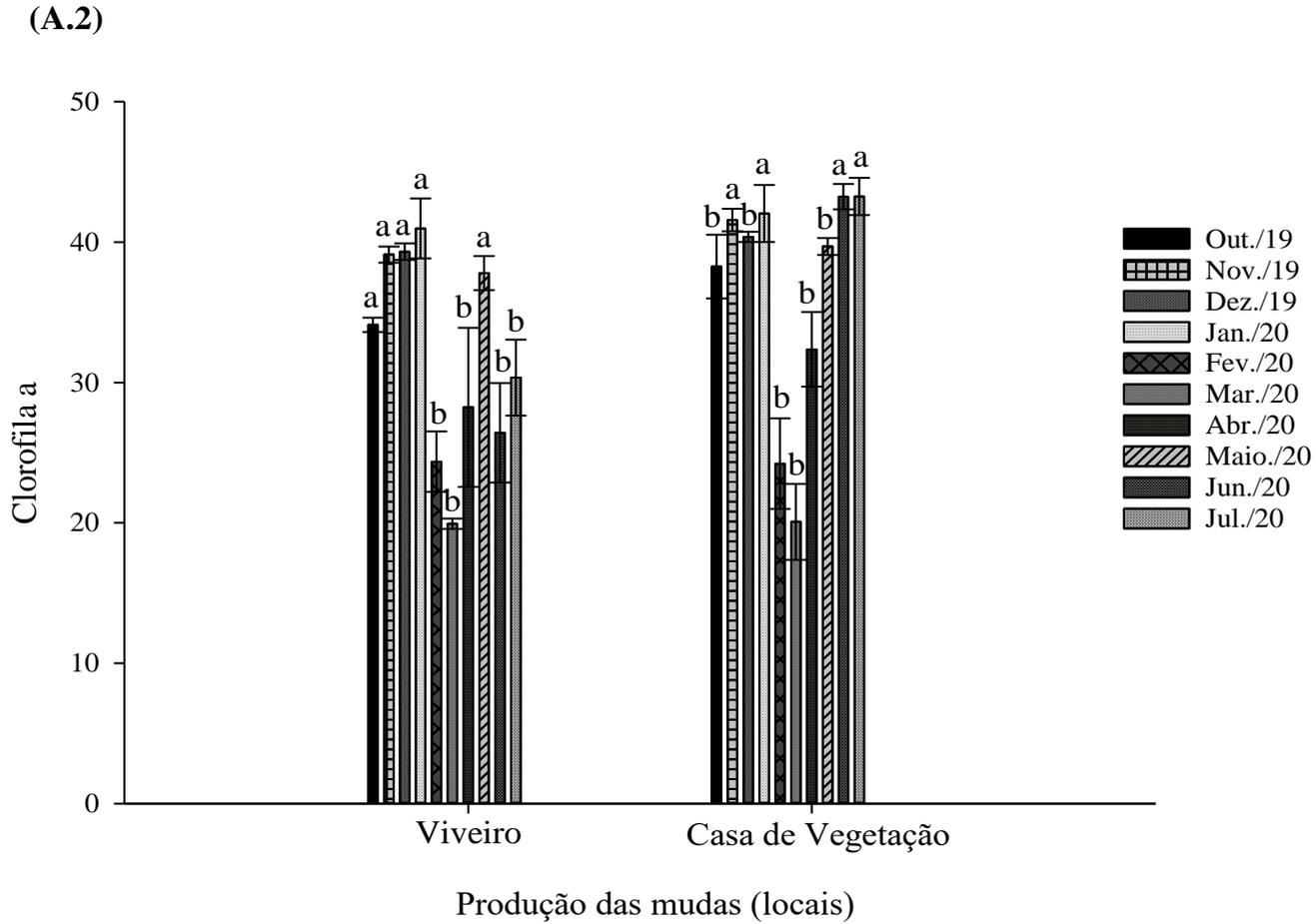
Para a variável teor relativo da clorofila a (FIGURA 4, A.1), não foram observadas diferenças significativas entre as mudas produzidas em casa de vegetação e viveiro, exceto para os meses de junho/20 e julho/20. As maiores médias foram verificadas nos meses de outubro/19, novembro/19, dezembro/19, janeiro/20 e maio/20 com três, quatro, cinco, seis e dez meses de armazenamento das sementes para as mudas produzidas em viveiro, e em casa de vegetação as maiores médias foram observadas nos meses de novembro/19, janeiro/20, junho/20 e julho/20 com quatro, seis, onze e doze meses de armazenamento das sementes (FIGURA 4, A.2).

Figura 4. Clorofila a de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da sementeira de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara criopreservadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, no local de produção das mudas (A.1) e minúsculas, tempo de criarmazenamento das sementes (A.2), não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Continua).



Fonte: Da Autora (2023).

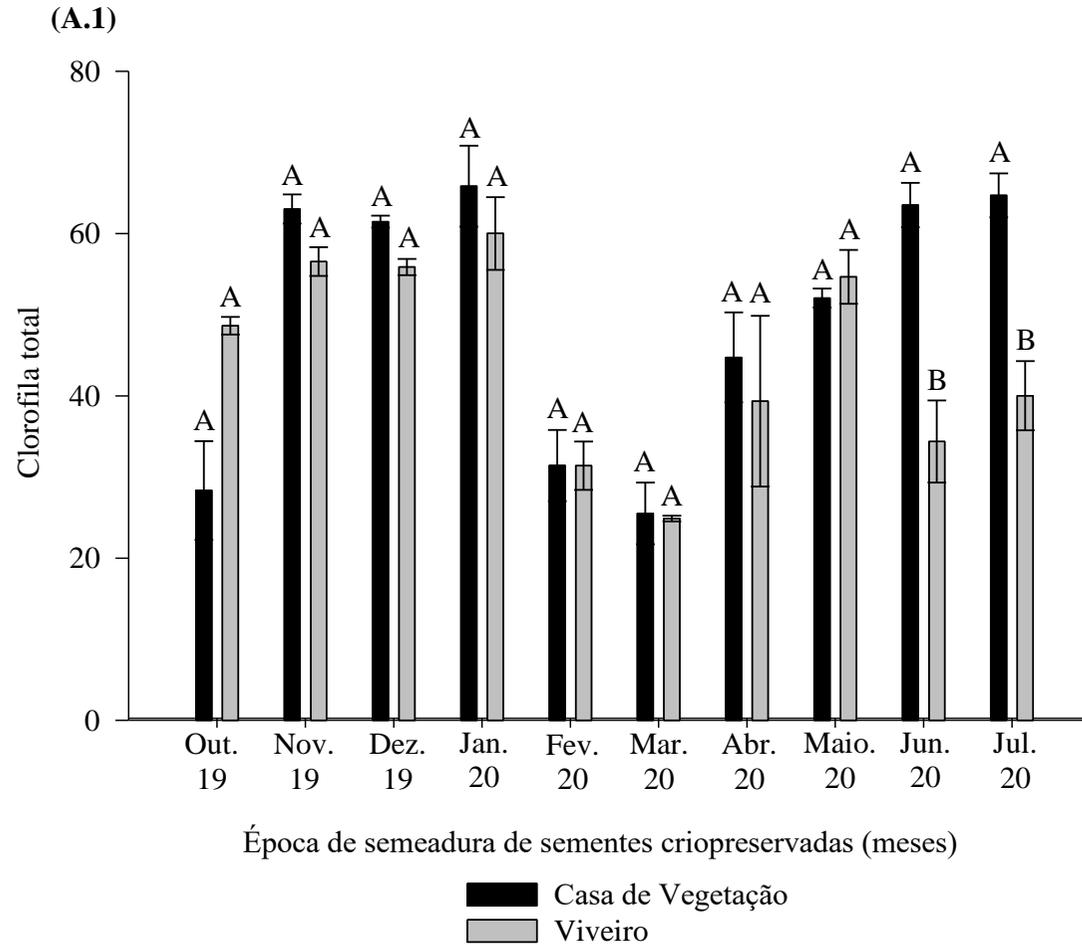
Figura 4. Clorofila a de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da sementeira de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara criopreservadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, no local de produção das mudas (A.1) e minúsculas, tempo de criarmazenamento das sementes (A.2), não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Conclusão).



Fonte: Da Autora (2023).

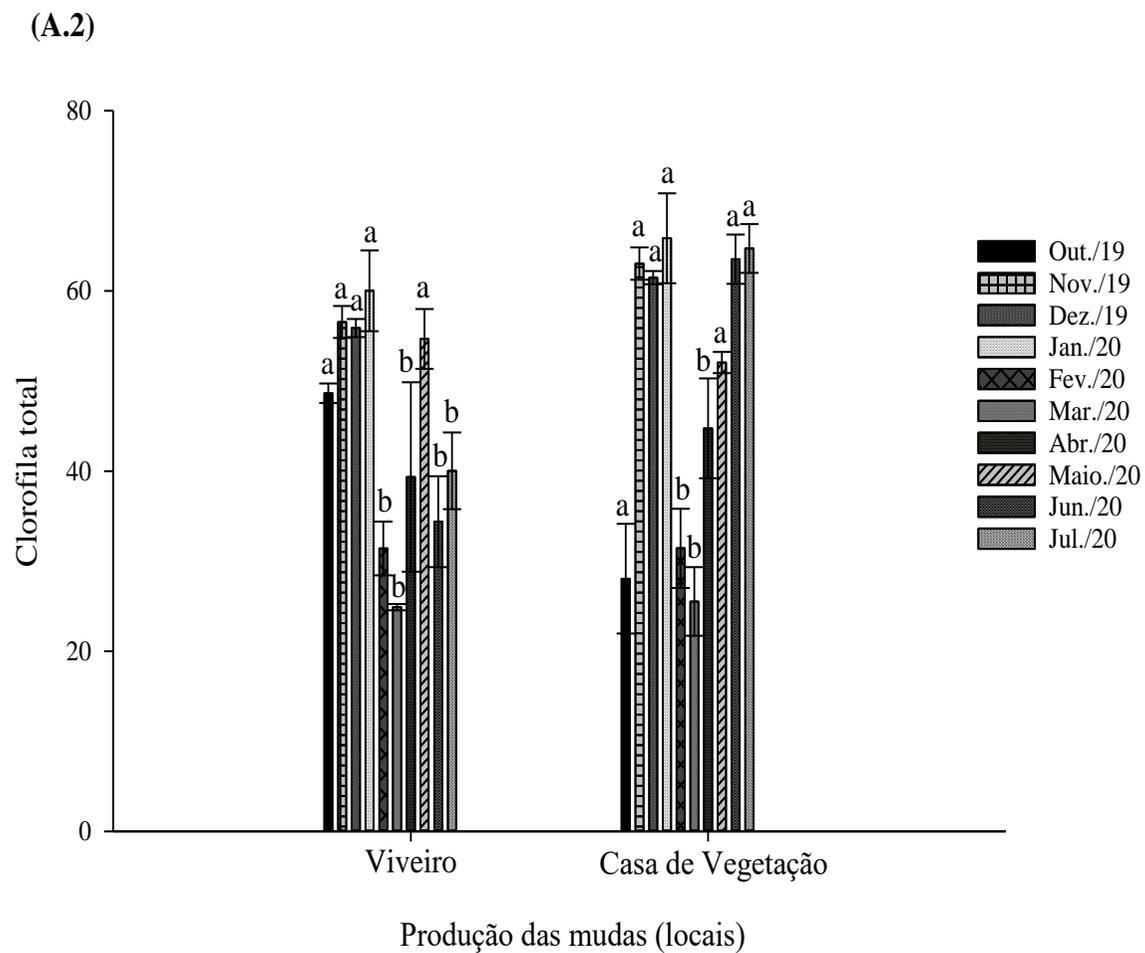
Assim como os resultados do teor relativo da clorofila a, o teor relativo da clorofila total também não foram observadas diferenças significativas entre as mudas produzidas em casa de vegetação e viveiro, exceto para os meses de junho/20 e julho/20 (FIGURA 5, A.1). Os meses de outubro/19, novembro/19, dezembro/19, janeiro/20 e maio/20 com três, quatro, cinco, seis e dez meses de armazenamento das sementes, apresentaram as maiores médias de clorofila total, independentemente do local de produção das mudas (FIGURA 5, A.2).

Figura 5. Clorofila total de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da sementeira de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara criopreservadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, no local de produção das mudas (A.1) e minúsculas, tempo de criarmazenamento das sementes (A.2), não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Continua).



Fonte: Da Autora (2023).

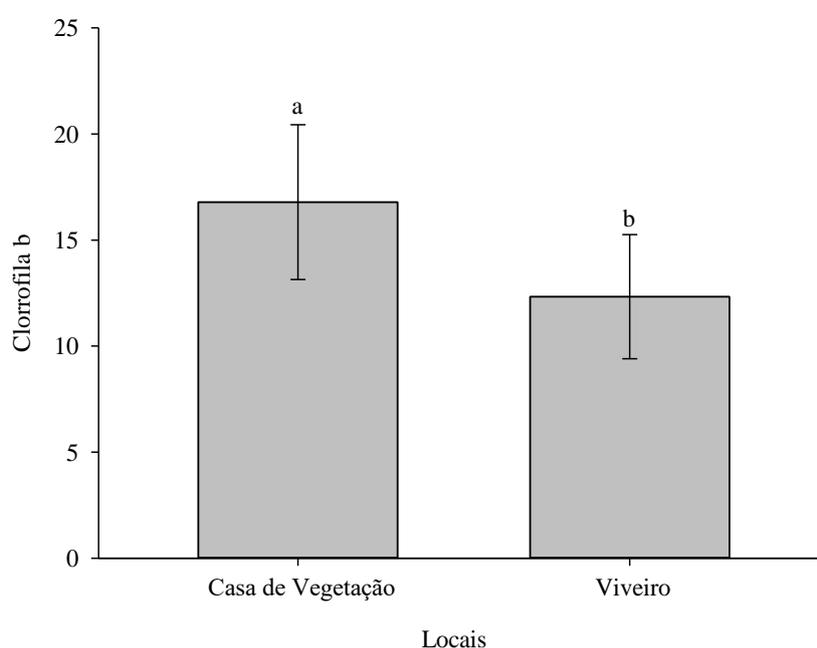
Figura 5. Clorofila total de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da sementeira de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara criopreservadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, no local de produção das mudas (A.1) e minúsculas, tempo de criarmazenamento das sementes (A.2), não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Conclusão).



Fonte: Da Autora (2023).

De acordo com a figura 6, verifica-se que as maiores médias para teores de clorofila b foram obtidas nas mudas produzidas em casa de vegetação, independentemente do tempo de crioarmazenamento das sementes.

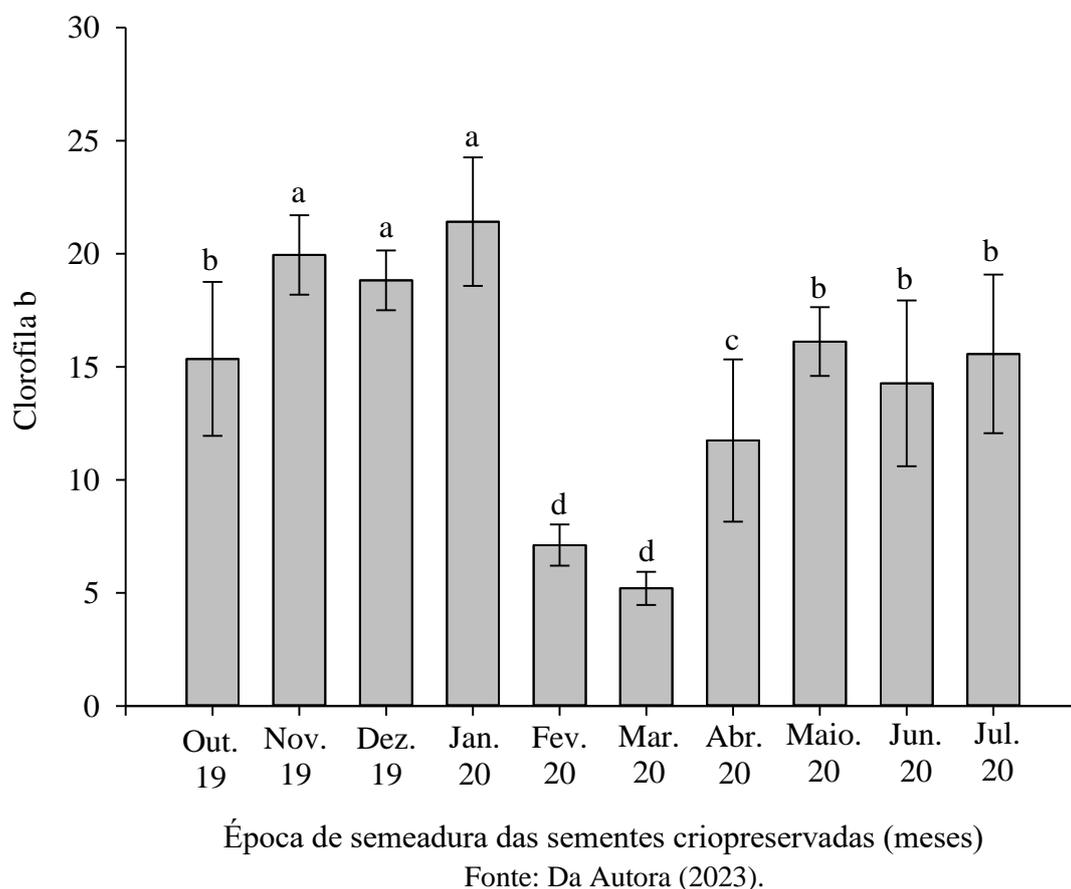
Figura 6. Clorofila b de mudas produzidas em casa de vegetação e viveiro, oriundas da semeadura de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara crioarmazenadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da Autora (2023).

Para variável teor relativo da clorofila b (FIGURA 7), em que o fator tempo de crioarmazenamento das sementes foi significativo isoladamente, observou-se as maiores médias para os meses novembro/19, dezembro/19 e janeiro/20, se diferenciando significativamente das demais épocas de plantio.

Figura 7. Clorofila b de mudas produzidas em viveiro ou casa de vegetação, oriundas da semeadura de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara criopreservadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



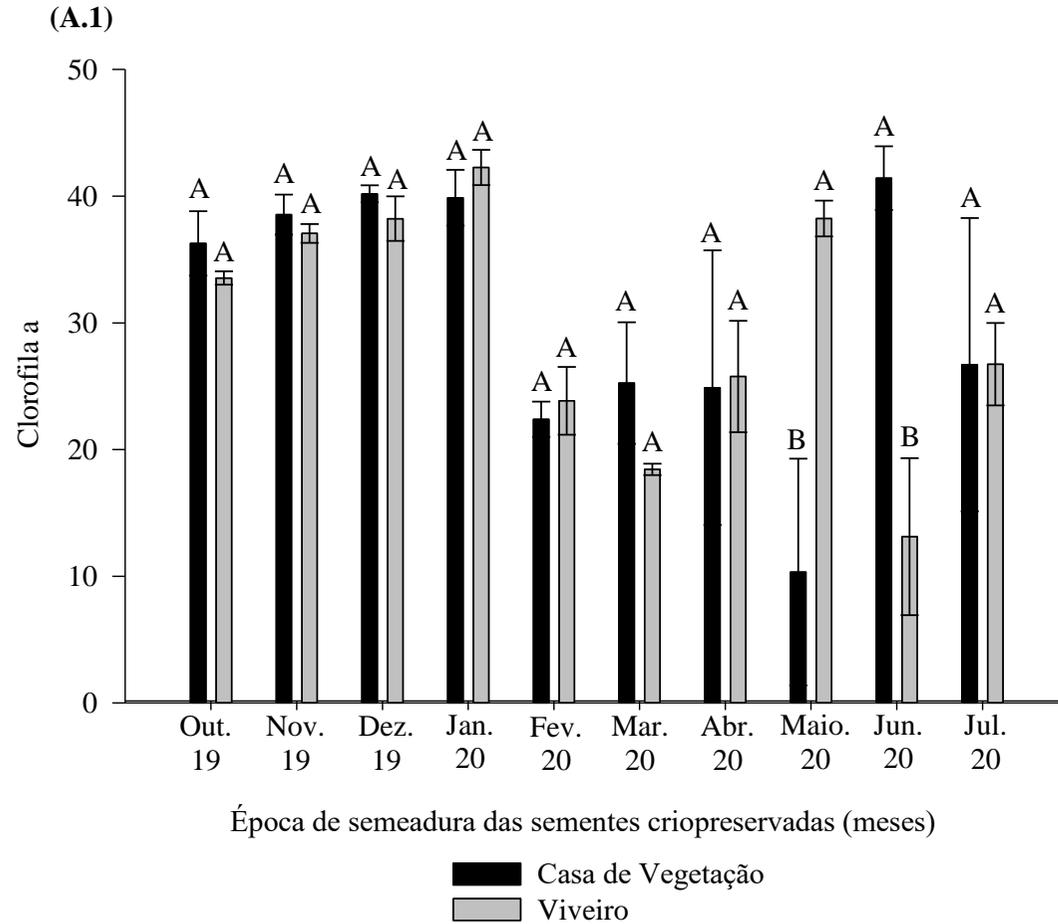
Pelos resultados das avaliações fisiológicas das mudas da cultivar Arara, as maiores médias foram observadas nos meses de novembro/19, dezembro/19, janeiro/20, maio/20, junho/20 e julho/20 para as variáveis teores relativos das clorofilas a e total, independentemente do local de produção das mudas. Assim como, para teor relativo da clorofila b, as maiores médias também foram verificadas nos meses de novembro/19, dezembro/19 e janeiro/20. Este fato se deve, provavelmente, as condições ambientes nos quais as mudas foram submetidas durante o período de desenvolvimento, coincidente com as estações verão-outono, caracterizado pelas altas temperaturas máximas médias e altas precipitações.

3.2 Cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’

Para cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’, pela análise de variância houve interação significativa entre os fatores estudados para as variáveis teores relativos da clorofila a, b e total. Para condutância estomática, foi constatado efeito significativo apenas do fator local de produção das mudas (APÊNDICE A). Analisando as variáveis teores relativos da clorofila a (FIGURA 8, A.1), clorofila b (FIGURA 9, A.1) e clorofila total (FIGURA 10, A.1), foi possível observar que, de maneira geral, não houve diferenças significativas entre as mudas produzidas em casa de vegetação e viveiro, exceto para os meses de maio/20 e junho/20.

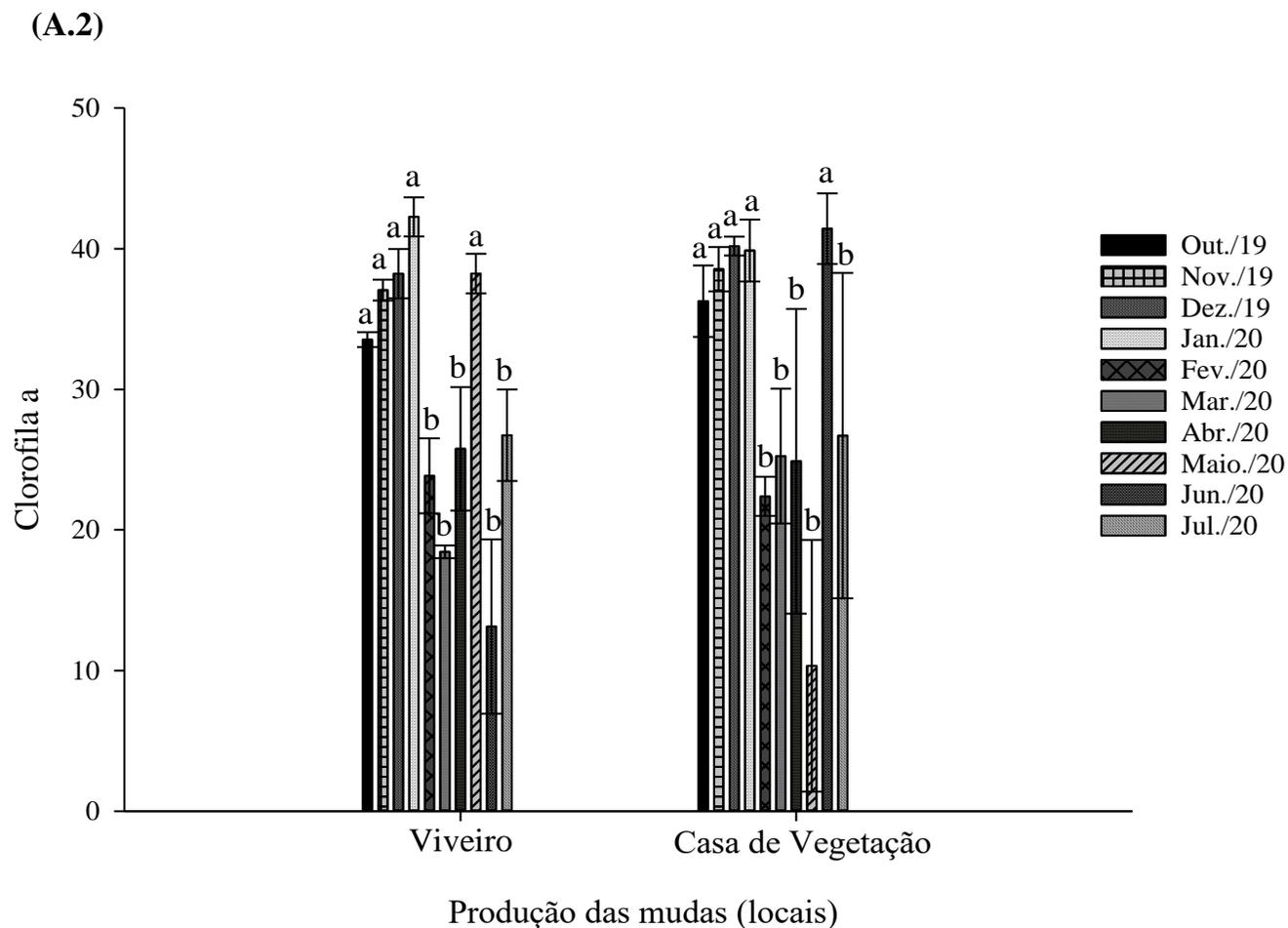
Independentemente do tempo de crioarmazenamento das sementes, as maiores médias foram verificadas nos meses de outubro/19, novembro/19, dezembro/19 e janeiro/20 com três, quatro, cinco e seis meses de armazenamento em ambos os locais de produção das mudas, para as variáveis teores relativos da clorofila a (FIGURA 8, A.2), clorofila b (FIGURA 9, A.2) e clorofila total (FIGURA 10, A.2).

Figura 8. Clorofila a de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da sementeira de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’ criopreservadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, no local de produção das mudas (A.1) e minúsculas, tempo de criarmazenamento das sementes (A.2), não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Continua).



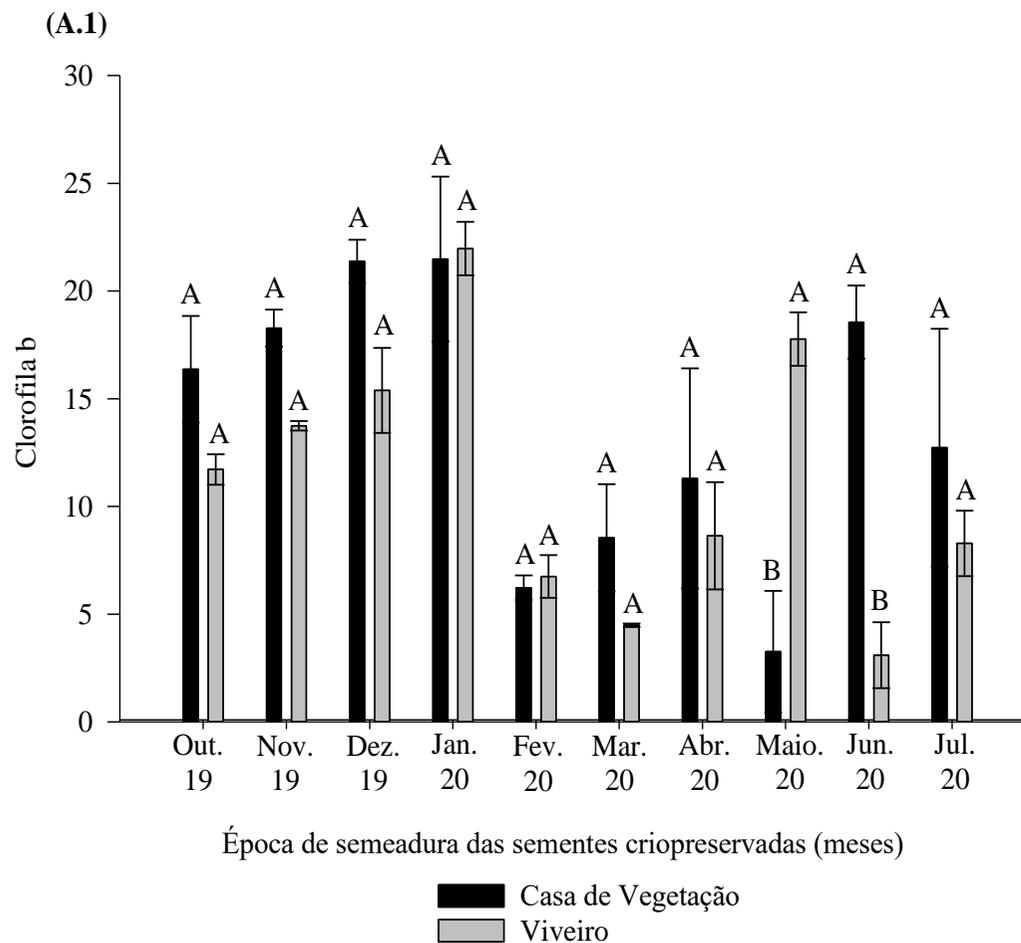
Fonte: Da Autora (2023).

Figura 8. Clorofila a de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da semeadura de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’ criopreservadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, no local de produção das mudas (A.1) e minúsculas, tempo de criarmazenamento das sementes (A.2), não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Conclusão).



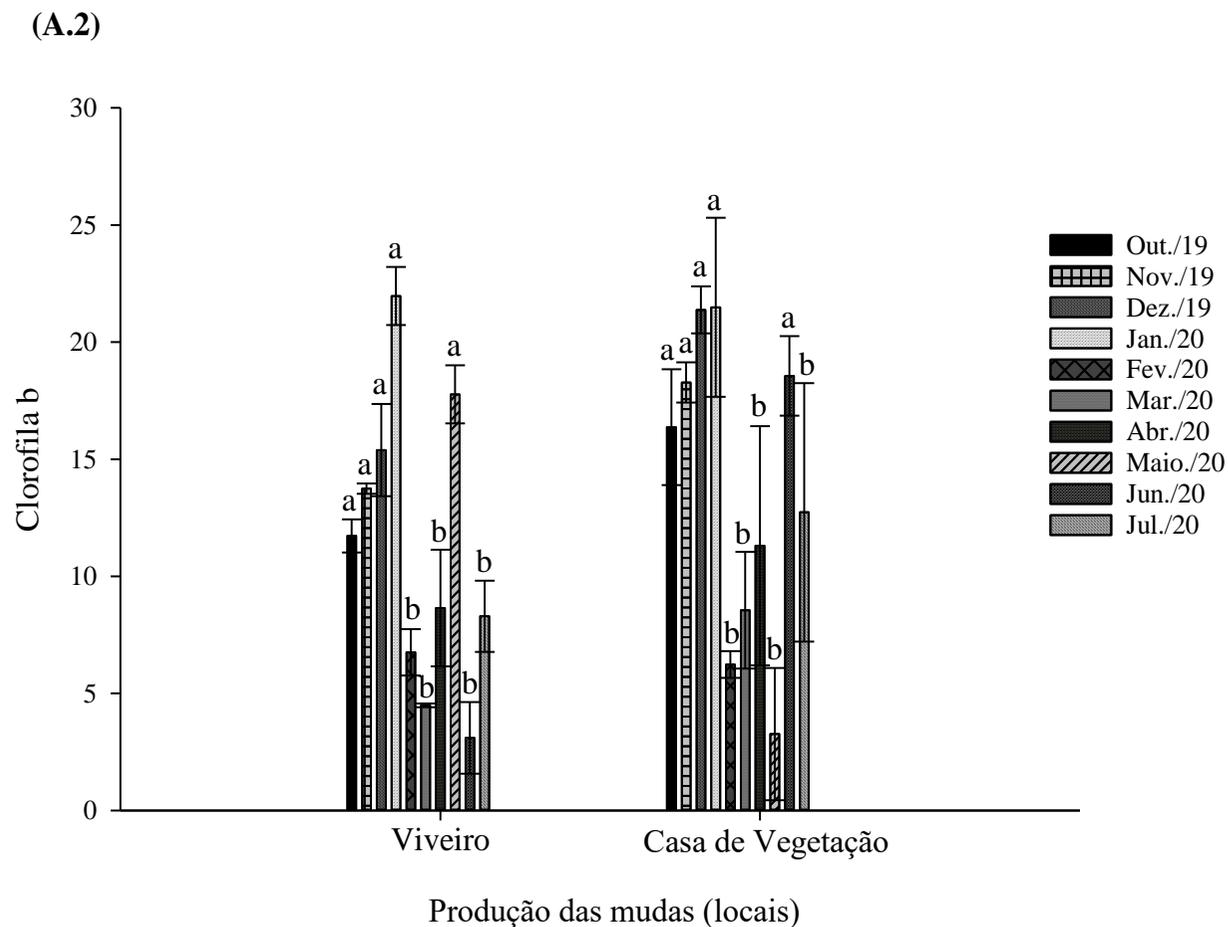
Fonte: Da Autora (2023).

Figura 9. Clorofila b de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da sementeira de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’ criopreservadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, no local de produção das mudas (A.1) e minúsculas, tempo de criopreservação das sementes (A.2), não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Continua).



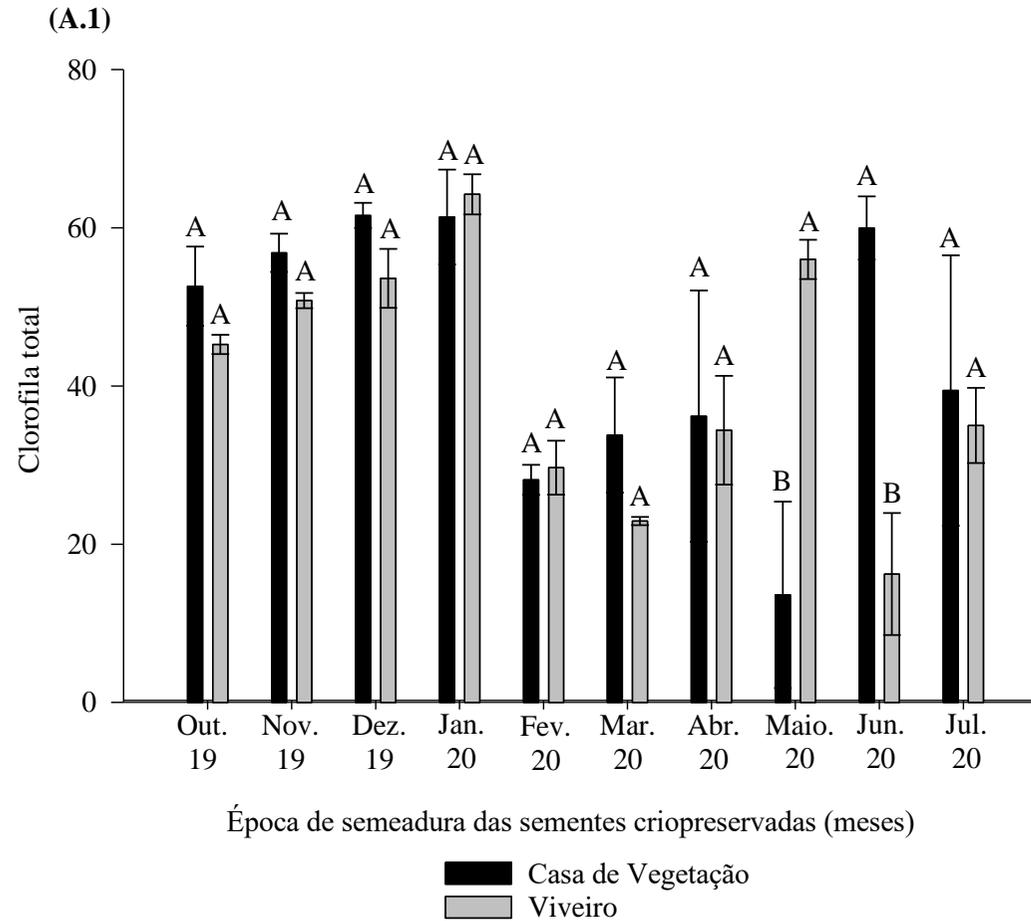
Fonte: Da Autora (2023).

Figura 9. Clorofila b de mudas produzidas em casa de vegetação e viveiro, oriundas de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo 'IAC 62' criopreservadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, no local de produção das mudas (A.1) e minúsculas, tempo de criarmazenamento das sementes (A.2), não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Conclusão).



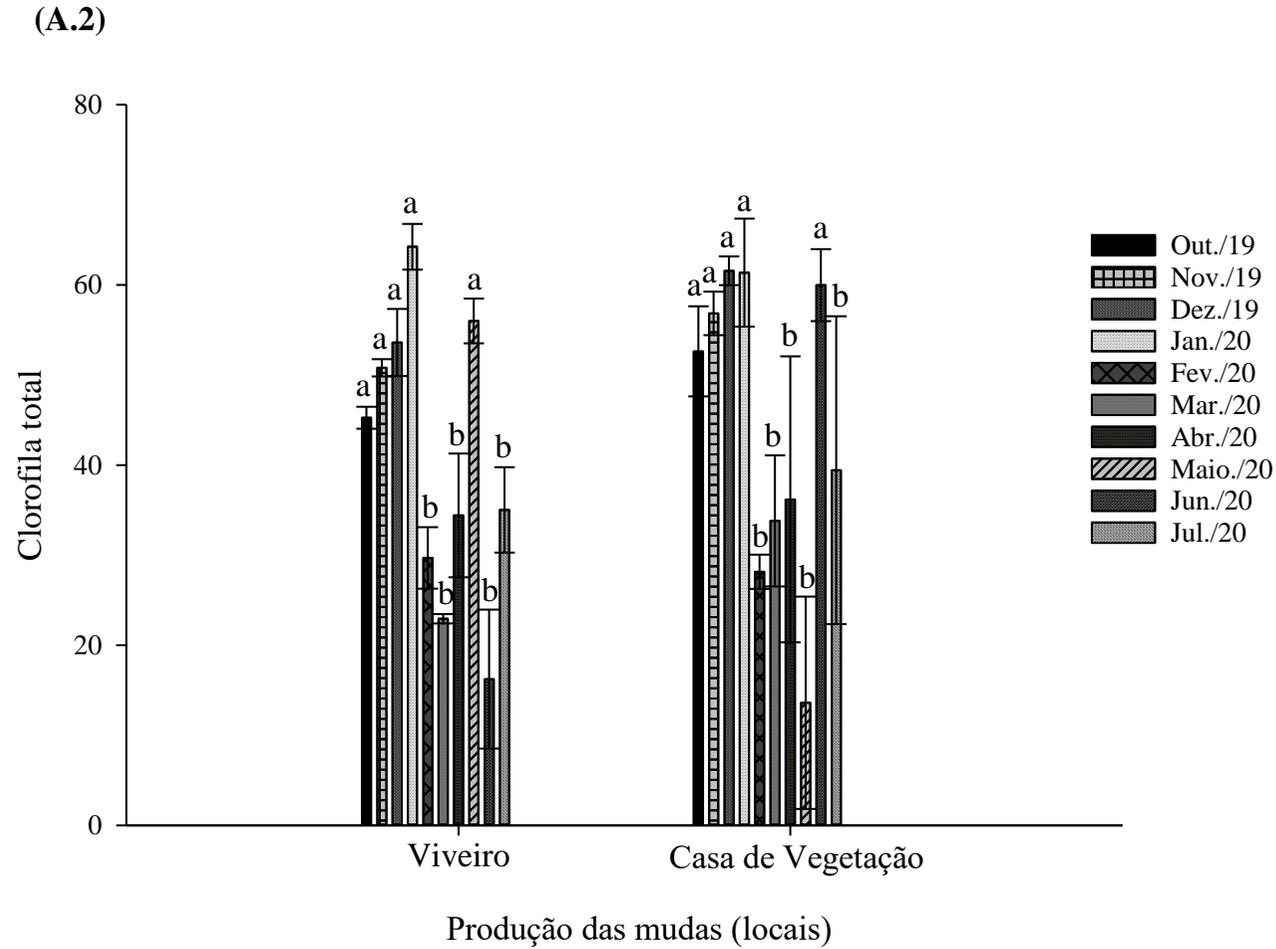
Fonte: Da Autora (2023).

Figura 10. Clorofila total de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da sementeira de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo 'IAC 62' criopreservadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, no local de produção das mudas (A.1) e minúsculas, tempo de criarmazenamento das sementes (A.2), não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Continua).



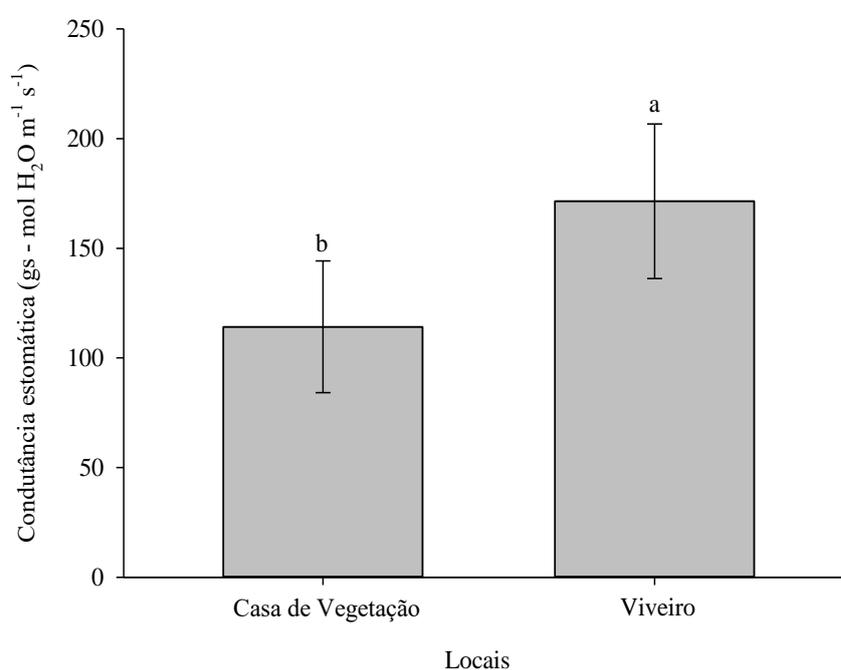
Fonte: Da Autora (2023).

Figura 10. Clorofila total de mudas produzidas em casa de vegetação e em viveiro, oriundas da semeadura de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo 'IAC 62' criopreservadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, no local de produção das mudas (A.1) e minúsculas, tempo de criarmazenamento das sementes (A.2), não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias (Conclusão).



Em relação a variável condutância estomática, na qual houve efeito isolado do fator local de produção das mudas, as maiores médias foram obtidas em mudas produzidas no viveiro, independentemente do tempo de crioarmazenamento das sementes (FIGURA 11).

Figura 11. Condutância estomática de mudas produzidas em casa de vegetação e viveiro, oriundas da sementeira de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’ crioarmazenadas por um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da Autora (2023).

Para cultivar Catuaí Amarelo ‘IAC 62’, de modo geral, as maiores médias para os teores relativos da clorofila a, b e total foram observados nos meses de outubro/19, novembro/20, dezembro/20 e janeiro/20. Estes resultados estão associados as condições climáticas em cada local de produção, coincidente com as estações do ano primavera-verão, período caracterizado por altas temperaturas máximas médias e altas precipitações.

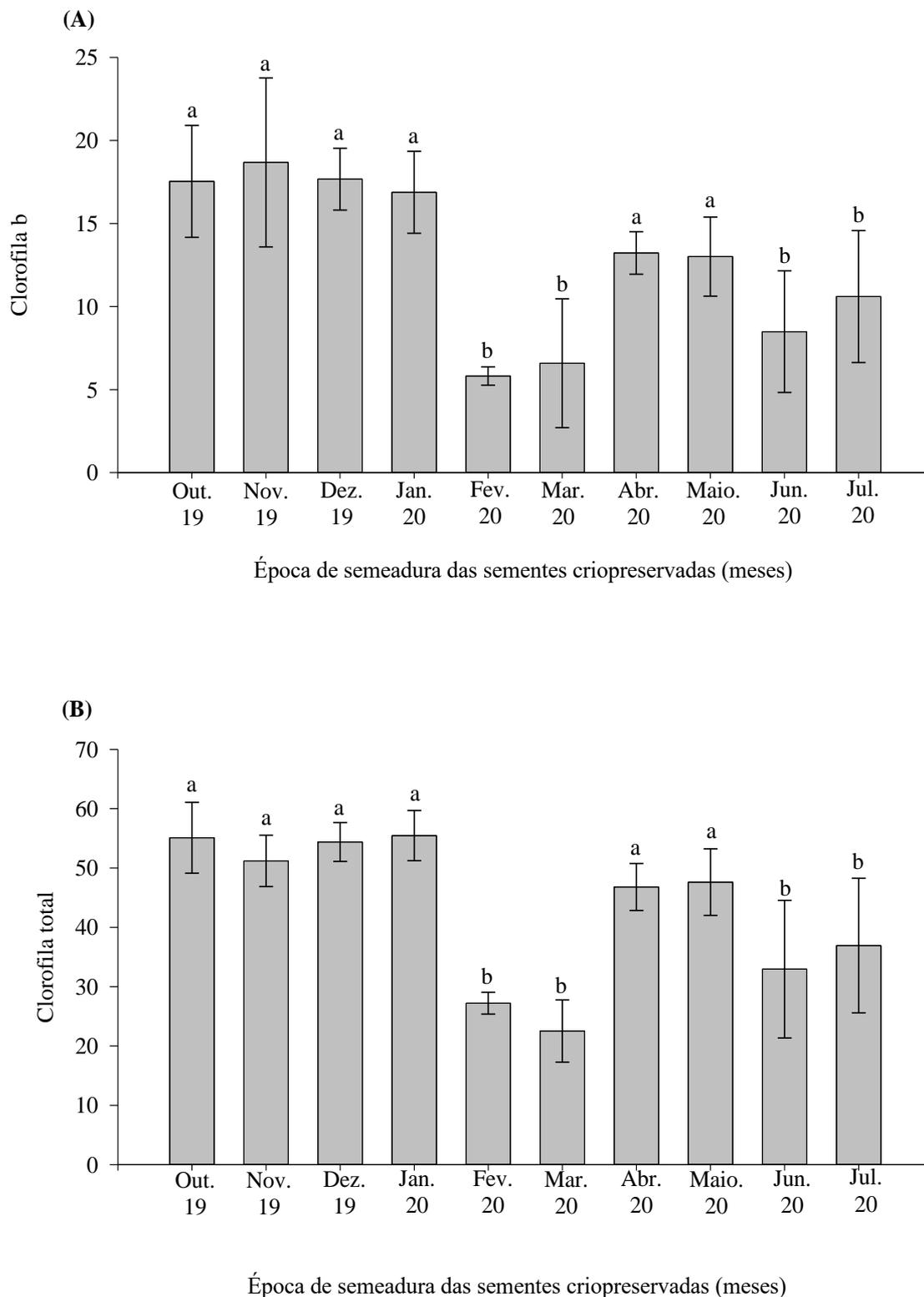
3.3 Cultivar Catucaí Amarelo ‘2SL’

Na análise de variância dos dados, constatou-se efeito isolado do fator meses de crioarmazenamento das sementes para as variáveis teores relativos da clorofila b e total

(APÊNDICE A). Na figura 10, observa-se de modo geral, que as maiores médias para as variáveis teores relativos da clorofila b (FIGURA 12A) e clorofila total (FIGURA 12B) foram verificadas nos meses de outubro/19, novembro/19, dezembro/19, janeiro/20, abril/20 e maio/20 com três, quatro, cinco, seis, nove e dez meses de crioarmazenamento das sementes, independentemente do local de produção das mudas.

Esses resultados podem ser explicados pelas condições climáticas durante o período de desenvolvimento das mudas, sendo os meses descritos são caracterizados pelas estações do ano primavera, verão e outono, com temperaturas médias acima de 20 °C e alta precipitação.

Figura 12. Clorofila b (A) e clorofila total (B) de mudas produzidas em viveiro ou casa de vegetação, oriundas da semadura de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catucaí Amarelo '2SL' criopreservadas por até um ano. Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da Autora (2023).

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com a utilização de sementes criopreversadas, com o propósito de produção de mudas em dois locais para espécie *Coffea arabica* L. mostraram que esta técnica pode ser utilizada para conservação das sementes e subsequente semeadura, sem causar danos as características fisiológicas. As variáveis fisiológicas apresentaram comportamento distinto em relação as cultivares Arara, Catuaí Amarelo 'IAC 62' e Catucaí Amarelo 2 SL nos locais de produção de mudas. Em relação a variável condutância estomática resultados contrastantes foram verificados entre as cultivares, onde as maiores médias foram observadas em viveiro para cultivar Arara e em casa de vegetação para Catuaí Amarelo 'IAC 62', na maioria das épocas de semeadura das sementes criopreservadas.

Segundo Craparo et al. (2017), o monitoramento da condutância estomática fornece informações sobre a interação das plantas com o microambiente. A transpiração e a condutância estomática estão relacionadas com a perda de água. A regulação estomática é um processo fundamental para o desenvolvimento de plantas de café, e está intrinsecamente relacionado à fotossíntese e às relações hídricas, além de auxiliar no entendimento sobre a adaptação, sobrevivência e o crescimento da planta (CRAPARO et al., 2017).

Gomes et al. (2008) verificaram que entre as estações do ano foi verificado excedente hídrico, disponibilizando considerável quantidade água no solo na estação chuvosa, proporcionando aumento da condutância estomática e transpiração das plantas. Resultados divergentes foram encontrados neste estudo já que as maiores médias para cultivar Arara foram obtidas no viveiro nas épocas de semeadura das sementes criopreservadas de março e abril de 2020, não coincidente com estação chuvosa.

No entanto, em condições com escassez de água, os genótipos de café tendem a reduzir a condutância estomática para evitar excesso de transpiração (DAMATTA et al., 2003; DIAS et al., 2007; PINHEIRO et al., 2004), fato este não encontrando em estudo. A condutância estomática pode ser afetada por estresse hídrico, de temperatura e sombreamento (FREITAS et al., 2003; TATAGIBA; PEZZOPANE; REIS, 2007; BATISTA-SANTOS et al., 2011; CASTANHEIRA et al., 2019). Em produção de mudas de café Freitas et al. (2003), observaram aumento dos valores de condutância estomática com o aumento do nível de sombreamento. Segundo Costa e Marengo (2007) valores mais baixos de condutância estomática foram associados a menor taxa de fotossíntese, todavia, esta associação diverge dos resultados encontrados no presente estudo.

De maneira geral, as variáveis clorofila a e total apresentaram comportamento semelhante para as cultivares em estudo, onde não foi observado diferenças nas mudas produzidas em viveiro e casa de vegetação, na maioria das épocas de semeadura das sementes criopreservadas, exceto a cultivar Catucaí 2 SL apresentou efeito isolado do fator meses de criarmazenamento das sementes para as variáveis teores relativos da clorofila b e total. Os teores de clorofila a e b são indicadores úteis envolvidos no metabolismo das plantas que estão positivamente relacionados à ativação do maquinário fotossintético e, conseqüentemente, ao seu desenvolvimento e adaptação a diversos ambientes (RAMÍREZ-OLVERA et al., 2019). Segundo Lichtenthaler et al. (1981) esses parâmetros estão relacionados a uma adaptação do aparato fotossintético para uma melhor eficiência na captação da radiação.

Neste sentido, comportamento diferenciado das mudas foi verificado para variável clorofila total para as cultivares Arara e Catuaí Amarelo 'IAC 62', em ambos os locais de produção, apenas nas épocas de semeaduras de junho a julho/2020 e maio a junho/2020, respectivamente. Este comportamento foi semelhante aos resultados obtidos para variável área foliar, importante indicador na compreensão do desenvolvimento vegetal e possui grande relevância principalmente nos aspectos relacionados à produção (AMARAL et al., 2009; SILVA et al., 2011). As maiores taxas fotossintéticas associadas aos maiores valores de área foliar representam maior superfície de interceptação de luz e, conseqüentemente elevado crescimento vegetativo (PARTELLI et al., 2006; PEDÓ et al., 2018).

A clorofila é constantemente sintetizada e destruída na presença de luz, e a velocidade de decomposição pode ser maior em condições de alta radiação solar (KOZLOWSKI; KRAMER, 1979). Altas taxas fotossintéticas podem ser observadas em plantas com alto teor de clorofila (NOGUEIRA et al., 2013). A clorofila b tem como função a ampliação da faixa de luz utilizada pela fotossíntese, sendo considerado um pigmento acessório. Ao absorver a luz, a clorofila b transfere a energia para uma molécula de clorofila a que vai utilizá-la para a realização da fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2017). Além de, a clorofila b apresenta a capacidade de modificar o tamanho e a localização do complexo antena, envolvido na absorção de energia luminosa e seus maiores níveis podem otimizar o processo fotossintético, portanto, aumentar a produção de biomassa (TANAKA; TANAKA, 2011; VOITSEKHOVSKAJA; TYUTEREVA, 2015).

5 CONCLUSÕES

Os teores de clorofila a, b, total e condutância estomática sofreram pequenas modificações relacionadas à época de semeadura das sementes criopreservadas, independentemente do local de produção das mudas.

A semeadura de sementes criopreservadas nos meses de fevereiro e março apresentam pior desempenho fisiológico das mudas do que aquelas semeadas nos demais meses estudados.

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.
- AMARAL, J. A. T.; AMARAL, J. F. T.; SCHMILDT, E. R.; COELHO, R. I. Métodos de análise quantitativa do crescimento de plantas. *In*: FERREIRA, A.; LIMA, A. B. P.; MATTA, F. P.; AMARAL, J. A. T.; LOPES, J. C.; PEZZOPANE, J. E. M.; FERREIRA, M. F. S.; POLANCZYK, R. A.; SOARES, T. C. B. (Org.). **Tópicos especiais em produção vegetal I**. Alegre: CCA-UFES, 2009. p. 259-276.
- ARAÚJO, W. L. et al. Limitations to photosynthesis in coffee leaves from different canopy positions. **Plant Physiol Biochem**, Paris, v. 46, n. 10, p. 884-890, 2008.
- BATISTA-SANTOS, P. et al. The impact of cold on photosynthesis in genotypes of *Coffea* spp. Photosystem sensitivity, photoprotective mechanisms and gene expression. **Journal of Plant Physiology**, [S.l.], v. 168, p. 792-806, 2011.
- CASTANHEIRA, D. T. et al. Agronomic techniques for mitigating the effects of water restriction on coffee crops. **Coffee science**, Lavras, v. 14, p. 104, 2019.
- CHAVES, A. R. M. et al. Seasonal changes in photoprotective mechanisms of leaves from shaded and unshaded field-grown coffee (*Coffea arabica* L.) trees. **Trees**, Santa Monica, v. 22, n. 3, p. 351-361, 2008.
- 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. et al. Tolerance of *Coffea arabica* L. seeds to sub zero temperatures. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 4, n. 3, p. 312-321, 2017. (a)
- CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira – café: Primeiro levantamento, janeiro 2023 – safra 2023**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2023. Disponível em: <file:///C:/Users/Nath%20C3%A1lia%20Braga/Downloads/site_Boletim_de_Cafe_1o_levantamento.pdf >. Acesso em: 31 janeiro. 2023.
- COSTA, G. F.; MARENCO, R. A. Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 7, n. 2, p. 229-234, 2007.
- CRAPARO A.C.W. et al. Application of thermography for monitoring stomatal conductance of *Coffea arabica* under different shading systems. **Science of the Total Environment**, v. 609, p. 755-763, 2017.
- DAMATTA, F. M. et al. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science**, [S.l.], v. 164, n. 1, p. 111-117, 2003.

- DIAS, P. C. et al. Morphological and physiological responses of two coffee progenies to soil water availability. **Journal of Plant Physiology**, [S.l.], v.164, n. 12, p.1639-1647, 2007.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behavior? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.
- FIGUEIREDO, M. A. de et al. Exploratory studies for cryopreservation of *Coffea arabica* L. seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 39, n. 2, p. 150-158, 2017.
- FIGUEIREDO, M. A. de et al. Physiological, biochemical, and ultrastructural aspects of *Coffea arabica* L. seeds under different cryopreservation protocols. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 45, e027020, p. 1-14, 2021.
- FREITAS, R. B. et al. Influência de diferentes níveis de sombreamento no comportamento fisiológico de cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 804-810, 2003.
- GOMES, I. A. C. et al. Alterações morfofisiológicas em folhas de *Coffea arabica* L. cv. “Oeiras” sob influência do sombreamento por *Acacia mangium* Willd. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 109-115, 2008.
- GUIMARÃES, R. J. et al. Efeitos da citocinina, giberelina e remoção do endocarpo na germinação de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 22, n. 3, p. 390-396, 1998.
- GUIMARÃES, R. M. et al. Tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 128-139, 2002.
- INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. **Dados meteorológicos**. Disponível em: <<https://tempo.inmet.gov.br/TabelaEstacoes/A001/>>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2022.
- KOZLOWSKI, T. T.; KRAMER, P. J. **Physiology of Woody Plants**. 2 ed. Academic Press: New York, 1979.
- LICHTENTHALER, H. K. et al. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis Res.*, v. 2, p. 115-141, 1981.
- MATIELLO, J. B. et al. **Cultura de café no Brasil: manual de recomendações**. Varginha: FUNDAÇÃO PROCAFÉ, 2020. 728 p.
- NOGUEIRA, N. O. et al. Teor de nitrogênio, clorofila e relação clorofila-carotenoide em café arábica em solo submetido a diferentes corretivos de acidez. **Agrária-Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 3., p.390-395, 2013.
- PARTELLI, F. L. et al. Produção e desenvolvimento radicular de plantas de café ‘Conilon’ propagadas por sementes e por estacas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 6, p. 949-954, 2006.

PEDÓ, T. et al. Plant growth and vigor of bean seeds in response to the exogenous application of gibberellic acid. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 41, n. 3, p. 181-190, 2018.

PINHEIRO, H. A. et al. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**, [S.l.], v.167, n. 6, p. 1307-1314, 2004.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2022.

RAMÍREZ-OLVERA, S. M. et al. Silicon stimulates initial growth and chlorophyll *a/b* ratio in rice seedlings, and alters the concentrations of Ca, B, and Zn in plant tissues, **Journal of Plant Nutrition**, v. 42, n. 16, p. 1928-1940, 2019.

RICALDONI, M. A. **Uso de sementes criopreservadas e cultivo protegido para a produção de mudas de *Coffea arabica* L.** 76f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2019.

SILVA, W. Z. et al. Métodos de estimativa de área foliar em cafeeiro. Enciclopédia **Biosfera**, v. 7, n. 13, p. 746-759, 2011.

SOUZA, A. C. de. **Aspectos fisiológicos, bioquímicos, biofísicos e ultraestruturais associados à criopreservação em sementes de *Coffea arabica* L.** 103f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2019.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TANAKA, R.; TANAKA, A. Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, p. 968- 976, 2011.

TATAGIBA, S. D.; PEZZOPANE, J. E. M.; REIS, E. F. Avaliação do crescimento e produção de Eucalyptus submetidos a diferentes manejos de irrigação. **Cerne**, Lavras, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2007.

VOITSEKHOVSKAJA, O.V.; TYUTEREVA, E.V. Chlorophyll b in angiosperms: functions in photosynthesis, signaling and ontogenetic regulation. **Journal of Plant Physiology**, v. 189, p. 51-64, 2015.

APÊNDICE A - Tabela da análise de variância do capítulo 4

Tabela 1 Resumo da análise de variância dos dados referentes condutância estomática (CE), clorofila a (CLA), clorofila b (CLB) e clorofila total (CTL) de mudas oriundas de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Arara criopreservadas por diferentes períodos, até um ano produzidas em casa de vegetação e viveiro.

FV	GL	Quadrados Médios			
		CE	CLA	CLB	CTL
Bloco	2	3482,2 ^{ns}	62,226*	28,614 ^{ns}	165,71 ^{ns}
Local (L)	1	28166,2*	258,089*	298,017*	1081,2*
Meses (M)	9	3249,7 ^{ns}	305,829*	166,399*	919,73*
L x M	9	4014,9*	53,494*	32,26 ^{ns}	162,79*
Erro	38	1799,8	18,096	18,239	64,24
CV (%)	-	27,24	12,46	29,34	16,41

*: Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns}: não significativo.

Fonte: Da Autora (2023).

APÊNDICE A - Tabela da análise de variância do capítulo 4

Tabela 2 Resumo da análise de variância dos dados referentes condutância estomática (CE), clorofila a (CLA), clorofila b (CLB) e clorofila total (CTL) de mudas oriundas de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo 'IAC 62' criopreservadas por diferentes períodos, até um ano produzidas em casa de vegetação e viveiro.

FV	GL	Quadrados Médios			
		CE	CLA	CLB	CLT
Bloco	2	7022 ^{ns}	15,21 ^{ns}	4 ^{ns}	29,52 ^{ns}
Local (L)	1	49174*	11,17 ^{ns}	103,622*	187,69 ^{ns}
Meses (M)	9	3042 ^{ns}	319,02*	149,13*	901,39*
L x M	9	5430 ^{ns}	273,4*	83,693*	648,95*
Erro	38	4179	96,14	24,173	208,04
CV (%)	-	45,26	32,51	39,33	33,87

*: Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns}: não significativo.

Fonte: Da Autora (2023).

APÊNDICE A - Tabela da análise de variância do capítulo 4

Tabela 3 Resumo da análise de variância dos dados referentes condutância estomática (CE), clorofila a (CLA), clorofila b (CLB) e clorofila total (CTL) de mudas oriundas de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catucaí Amarelo '2SL' criopreservadas por diferentes períodos, até um ano produzidas em casa de vegetação e viveiro.

FV	GL	Quadrados Médios			
		CE	CLA	CLB	CTL
Bloco	2	6085,6 ^{ns}	454,78 ^{ns}	1,087 ^{ns}	27,27 ^{ns}
Local (L)	1	8356,8 ^{ns}	1446,68 ^{ns}	84,871 ^{ns}	532,29 ^{ns}
Meses (M)	9	1896,0 ^{ns}	718,06 ^{ns}	138,828*	893,90*
L x M	9	5960,3 ^{ns}	620,03 ^{ns}	28,648 ^{ns}	206,71 ^{ns}
Erro	38	3419,6	438,13	42,783	159,06
CV (%)	-	40,62	63,36	50,89	29,32

*: Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns}: não significativo.

Fonte: Da Autora (2023).

CAPÍTULO 5 TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA DE SEMENTES DE *Coffea arabica* L. APÓS CRIOARMAZENAMENTO

RESUMO

Devido às dificuldades para o armazenamento de sementes de café, uma alternativa viável para conservação *ex situ* de espécies recalcitrantes ou intermediárias é a criopreservação. A técnica de criopreservação vem sendo pesquisada para sementes de café, sendo que foi obtido protocolo seguro de armazenagem para *Coffea arabica* L., com alta sobrevivência após retiradas do nitrogênio líquido. Protocolos ajustados possibilitam a preservação da diversidade genética, além do armazenamento seguro das sementes para uso em pesquisas ou para a regeneração de cafeeiros. No entanto, torna-se importante investigar o tempo de sobrevivência das sementes após a retirada do criotânque. Assim, esse estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a sobrevivência de sementes de *Coffea arabica* L. após retirada do nitrogênio líquido e reaquecimento. Sementes da cultivar Arara foram submetidas à secagem em sílica em gel até o teor de água de 17% (base úmida) e em sequência diretamente imersas em nitrogênio líquido, onde permaneceram por período de 25 dias. As sementes foram retiradas, reaquecidas em banho-maria e mantidas em bancada de laboratório, em temperatura média de 25 °C, sem controle da umidade relativa do ar. A cada dia, por período de quinze dias, as sementes foram submetidas à avaliação fisiológica, por meio dos testes de germinação e de tetrazólio. Avaliou-se também, a expressão em gel de eletroforese, de isoenzimas do processo antioxidativo. Após a criopreservação, as sementes mantidas em condições ambiente sofrem redução contínua da qualidade fisiológica, sendo que a germinação é mantida dentro dos padrões para a comercialização por período máximo de até dois dias em condição ambiente. As enzimas catalase, esterase e peroxidase são indicadores de qualidade de sementes de café arábica após criarmazenamento.

Palavras-chave: Café arábica. Nitrogênio líquido. Qualidade fisiológica. Isoenzima.

ABSTRACT

Due to the difficulties in storing coffee seeds, cryopreservation is a viable alternative for *ex situ* conservation of recalcitrant or intermediate species. The cryopreservation technique has been researched for coffee seeds, and a safe storage protocol has been developed for *C. arabica* L., with high survival rates after removal from liquid nitrogen. Adjusted protocols enable the preservation of genetic diversity and the safe storage of seeds for research or coffee plant regeneration. However, it is important to investigate the seed survival time after removal from the cryotank. Therefore, this study aimed to evaluate the survival of *C. arabica* L. seeds after removal from liquid nitrogen and re-warming. Seeds of the Arara cultivar were dried with silica gel to a moisture content of 17% (wet basis) and then directly immersed in liquid nitrogen, where they remained for a period of 25 days. The seeds were removed, re-warmed in a water bath, and kept on a laboratory bench at an average temperature of 25°C, without controlling the relative air humidity. For a period of fifteen days, the seeds were subjected to physiological evaluation using germination and tetrazolium tests. The gel electrophoresis expression of antioxidant process isoenzymes was also evaluated. After cryopreservation, seeds kept under ambient conditions experienced a continuous reduction in physiological quality, with germination being maintained within the standards for commercialization for a maximum period of two days under ambient conditions. Catalase, esterase, and peroxidase enzymes are indicators of the quality of arabica coffee seeds after cryostorage.

Keywords: Arabica coffee. Liquid nitrogen. Physiological quality. Isoenzyme.

1 INTRODUÇÃO

No cenário cafeeiro, a espécie *Coffea arabica* L. possui grande importância econômica e social, especialmente para o Brasil, maior produtor e exportador mundial desta *commodity* (ICO, 2022). A propagação comercial de café arábica é em sua totalidade por meio de mudas, a partir da sementeira de sementes. Todavia, as sementes de *Coffea arabica* L. são classificadas como intermediárias (ELLIS et al., 1990), além de apresentarem baixa longevidade, germinação lenta e desuniforme (ABREU et al., 2014; COELHO et al., 2015). Essas limitações dificultam a manutenção da germinação, vigor e a conservação das sementes de café por longos períodos.

Neste sentido, as sementes de café são preservadas *in situ*, com o cultivo de plantas vivas mantidas em coleções de germoplasma no campo. Entretanto, essa preservação requer altos custos de manutenção, grandes extensões de terra e podem ser acometidas pelos desastres climáticos (DUSSERT et al., 2012). Devido a problemática para o armazenamento das sementes de café, uma alternativa viável para conservação *ex situ* para espécies recalcitrantes e intermediárias é a criopreservação (PAMMENTER; BERJAK, 2014; KAYA et al., 2017; COELHO et al., 2017a; FIGUEIREDO et al., 2017; RICALDONI, 2019).

A criopreservação baseia-se na conservação do material vegetal em nitrogênio líquido em -196°C ou em sua fase de vapor (-150°C), garantindo a viabilidade do material armazenado sem que ocorram modificações ou alterações genéticas por um período indeterminado (KARTHA, 1985; SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2005). Devido às vantagens da utilização desta técnica, ela vem sendo pesquisada em sementes de café, sendo que foram obtidos resultados satisfatórios de sobrevivência após imersão em nitrogênio líquido (COELHO et al., 2017a; FIGUEIREDO et al., 2017; RICALDONI, 2019; SOUZA, 2019; FIGUEIREDO et al., 2021). Assim, para criopreservação de sementes de café arábica foi obtido protocolo seguro de armazenagem, com alta sobrevivência a imersão em nitrogênio líquido (COELHO et al., 2017a; FIGUEIREDO et al., 2017).

Porém, a utilização de sementes criopreservadas na cafeicultura é ainda inexistente, muito embora em muitas pesquisas já tenham sido verificado o potencial de utilização da técnica, com protocolo seguro já estabelecido. Entretanto, para que a criopreservação seja uma técnica comumente utilizada são ainda necessários estudos para verificar a qualidade fisiológica e a sobrevivência das sementes, ao longo do tempo, após a retirada do nitrogênio líquido.

A qualidade das sementes de café é obtida por meio do teste oficial, teste de germinação (BRASIL, 2009), assim como, testes complementares de vigor e análises bioquímicas

(DUSSERT; ENGELMANN, 2006; SHARMA et al., 2012; COELHO et al., 2015; COELHO et al., 2017a; COELHO et al., 2017b; ABREU et al., 2018; COELHO et al., 2019, FIGUEIREDO et al., 2021). A expressão de sistemas enzimáticos removedores de radicais livres e espécies reativas de oxigênio constitui-se como possíveis marcadores de qualidade ou da deterioração, para melhor entendimento da qualidade fisiológica das sementes. Diante do exposto, esse estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a sobrevivência de sementes de *Coffea arabica* L. após retirada do nitrogênio líquido e reaquecimento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e processamento do material vegetal

Foram utilizados frutos de café, da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Arara, colhidos em lavoura da Fazenda Experimental da Fundação Procafé em Varginha, na safra 2021/2022, os quais foram cuidadosamente transportados para Universidade Federal de Lavras. Os frutos foram colhidos no estágio de maturação “cereja”, por meio de colheita seletiva, e na sequência foram submetidos ao processamento via úmida, sendo lavados/imersos em água para separação por densidade e eliminação dos frutos cerejas dos frutos chochos, malformados, brocados e de impurezas. Após a separação, os frutos cerejas foram descascados e as sementes foram despulpadas por meio da fermentação em água durante 24 horas na temperatura de 30 °C 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 21 e 22, sendo descartadas aquelas de tamanho acima e abaixo destes.

2.2 Local e condução do experimento

Após o descascamento dos frutos e despulpamento das sementes no Setor de Cafeicultura, o experimento foi conduzido no Laboratório Central de Pesquisa em Sementes, do Setor de Sementes. Ambos os setores são do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG.

Para a caracterização do lote, as sementes foram inicialmente submetidas à determinação do teor de água e à avaliação fisiológica, por meio do teste de germinação, peso seco de plântulas e teste de tetrazólio. Em seguida, foram submetidas à secagem até atingirem o teor de água de 17% (base úmida), conforme trabalhos realizados por Figueiredo et al. (2017) e Coelho et al. (2017a). Posteriormente, as sementes foram armazenadas em criotanque contendo nitrogênio líquido, em temperatura de -196 °C, até a realização das análises e experimentos.

2.3 Secagem das sementes

Para a secagem das sementes foram utilizadas 60g de sílica gel ativada como agente dessecante, em caixas tipo “gerbox”, as quais foram mantidas em câmaras tipo B.O.D, reguladas em temperatura de 25 °C, na ausência de luz. A perda de água durante a secagem foi monitorada por pesagens contínuas em balança de precisão de 0,001 g, até teor de água de 17% bu.

2.4 Crioarmazenamento das sementes

As sementes com teor de água de 17 % bu (COELHO et al., 2017a; FIGUIREIDO et al., 2017) foram acondicionadas em sacos de tule, os quais foram imersos diretamente no nitrogênio líquido (-196 °C), onde foram mantidos por período de 25 dias, até a realização das análises fisiológicas e bioquímicas.

2.5 Aquecimento das sementes

Após retiradas do nitrogênio líquido, as sementes foram rapidamente aquecidas em banho-maria por 2 minutos à 40 °C, de acordo com metodologia de Figueiredo et al. (2021). Em seguida, a avaliação das sementes foi realizada por meio das análises fisiológicas e bioquímica, além da determinação do teor de água. Para as análises fisiológicas e bioquímicas os pergaminhos das sementes foram retirados manual e cuidadosamente.

A determinação do teor de água foi realizada pelo método de estufa a 105 °C, durante 24 horas de acordo com as prescrições da RAS (BRASIL, 2009) com modificações, em duas repetições de cinco sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem com base no peso úmido (bu) das sementes.

2.6 Avaliação fisiológica das sementes de café

Para verificar a sobrevivência das sementes após a crioarmazenamento, as mesmas foram retiradas do nitrogênio e mantidas em temperatura ambiente 25 ± 2 °C sem controle da umidade relativa do ar para a realização das análises fisiológicas diariamente, até o 15º dia, mediante os seguintes testes descritos.

2.6.1 Teste de germinação

Foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes, semeadas em folhas de papel de germinação, umedecidas em água destilada em quantidade equivalente a duas vezes e meia a massa do papel seco, conforme prescrição das RAS (BRASIL, 2009), com modificação. Posteriormente, os rolos contendo as sementes foram mantidos em germinador, em temperatura constante de 30 °C com presença de luz, por 45 dias.

Foram realizadas contagens de plântulas normais aos 15 e aos 30 dias após a semeadura, sendo os resultados expressos em porcentagem. No teste de germinação, foram também, determinadas: a porcentagem de plântulas normais fortes e fracas em relação ao eixo hipocotiledonar, sendo consideradas como plântulas normais fortes aquelas que apresentam alças hipocotiledonares com pelo menos três centímetros e fracas as que se encontravam abaixo deste padrão. Ao final do teste, aos 45 dias, foi determinada a porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas.

2.6.2 Peso seco de plântulas

O peso seco de plântulas foi determinado aos 45 dias após a semeadura. A parte aérea foi separada das raízes, com auxílio de bisturi e o material vegetal foi colocado em sacos de papel, os quais foram submetidos à secagem em estufa de circulação forçada de ar em 60 °C por quatro a cinco dias ou até massa constante. O peso seco foi determinado em balança de precisão (0,0001 g), com os resultados expressos em mg plântula⁻¹.

2.6.3 Teste de tetrazólio

Foram utilizadas quatro repetições de cinco sementes de café embebidas em água destilada por 36 horas, em temperatura de 30 °C (CLEMENTE et al., 2011) com modificação, para extração dos embriões. Os embriões extraídos foram mantidos em solução antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) e, após esta etapa, foram lavados em água destilada e embebidos em solução de tetrazólio 0,5%, em frascos escuros, mantidos em temperatura de 30 °C, por três horas. Os embriões foram avaliados quanto à viabilidade, com auxílio de lupa estereoscópica com aumento de 10 vezes para visualização interna e externa de suas estruturas, obtidas pelo

corte longitudinal ao meio dos embriões. Assim, foram classificados em viáveis e não viáveis, por meio da análise da localização e extensão de danos observados (BRASIL, 2009).

2.7 Expressão eletroforética de isoenzimas

Para a expressão eletroforética de isoenzimas, as sementes foram retiradas do criotank e a cada dia foram utilizadas 50 sementes, até completar o 15º dia em condições ambiente. As amostras foram acondicionadas, identificadas e armazenadas em deep-freezer a -86 °C até a realização das análises. A metodologia proposta por Alfenas (2006) foi utilizada para extração, corrida eletroforética e revelação das isoenzimas do processo antioxidante, catalase (CAT), peroxidase (PO), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) e esterase (EST).

2.8 Delineamento experimental e análise estatística

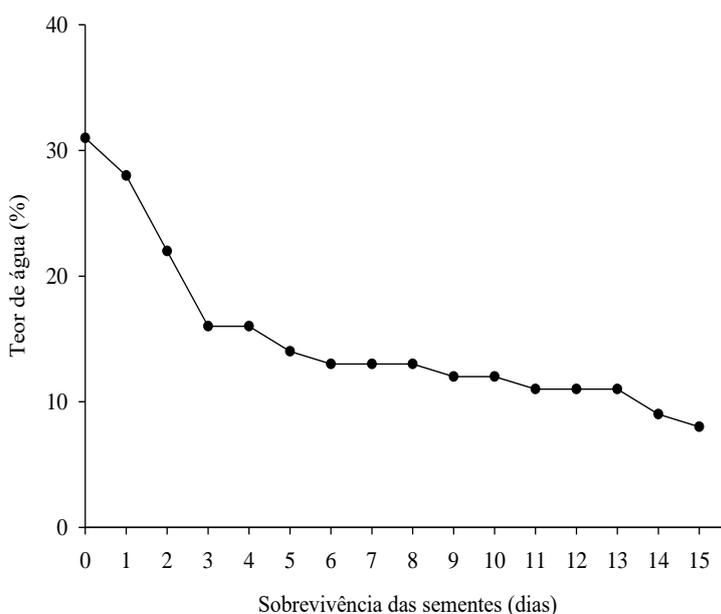
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 16 tratamentos, constituídos pelos dias após crioarmazenamento, com quatro repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias qualitativas comparadas pelo teste de *Scott-Knott* e as médias quantitativas submetidas à análise de regressão, em nível de 5% de probabilidade por meio do software R (R CORE TEAM, 2022). As médias de cada cultivar e época de armazenamento foram comparadas as médias do tratamento controle, por meio do teste t de Student, em nível de 5% de probabilidade. Para as análises bioquímicas, a interpretação dos resultados obtidos para as isoenzimas foi realizada levando-se em consideração a presença/ausência e a intensidade das bandas no gel.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação fisiológica das sementes de café

Na figura 1, encontra-se apresentado o teor de água das sementes de *Coffea arabica* L. até o 15º dia de sobrevivência após crioarmazenamento. Observa-se uma redução do teor de água com o aumento dos dias de sobrevivência das sementes após a retirada do nitrogênio líquido, ao passo que, para o dia zero verifica-se 31% de teor de água das sementes e no 15º dia com 8%, respectivamente, em condições ambientais (FIGURA 1).

Figura 1. Teor de água de sementes de *Coffea arabica* L. até o 15º dia de sobrevivência após crioarmazenamento.



Fonte: Da Autora (2023).

Pelos resultados da análise de variância houve interação significativa para as variáveis plântulas normais, plântulas com folhas cotiledonares expandidas, peso seco de parte aérea e peso seco de raiz (APÊNDICE A). Sementes da cultivar Arara apresentou, após colheita e processamento, 83% de plântulas normais e 80% de embriões viáveis.

Após o crioarmazenamento por período de 25 dias, procedeu-se a instalação do experimento, analisando-se o desempenho fisiológico das sementes até o 15º dia de manutenção em condições ambiente, após retirada do nitrogênio líquido. Observam-se variações nos

resultados obtidos nos diferentes tempos após a criopreservação em todas as variáveis analisadas (TABELA 1). De acordo com resultados do teste de germinação, houve diferenças significativas entre os diferentes tempos de manutenção das sementes após a criopreservação. Avaliando-se os resultados dos testes de vigor, observa-se que as maiores médias foram verificadas até o 11º dia de manutenção das sementes após a retirada do nitrogênio líquido, para as variáveis porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares totalmente expandidas e peso seco de parte aérea (TABELA 1).

Tabela 1. Porcentagem de plântulas normais (PN), porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares totalmente expandidas (FC), peso seco de parte aérea (PSPA) e peso seco de raiz (PSR) de sementes de *Coffea arabica* L. até o 15º dia de sobrevivência após crioarmazenamento.

Sobrevivência das sementes (Dias)	PN (%)	FC (%)	PSPA (mg plântula ⁻¹)	PSR (mg plântula ⁻¹)
0	80 a	65 a	29,20 a	7,95 a
1	76 a	59 a	25,51 a	6,44 a
2	70 a	54 a	24,09 a	5,40 b
3	69 a	50 a	27,18 a	5,03 b
4	68 a	58 a	22,25 a	6,75 a
5	68 a	55 a	25,58 a	5,74 a
6	66 a	56 a	26,64 a	6,54 a
7	65 a	54 a	23,43 a	5,69 a
8	65 a	50 a	22,20 a	5,21 b
9	64 a	59 a	26,64 a	6,19 a
10	63 a	45 b	19,64 b	4,48 b
11	63 a	55 a	25,04 a	5,26 b
12	54 b	40 b	17,09 b	3,76 b
13	48 b	41 b	18,51 b	4,24 b
14	46 b	33 b	13,15 b	3,20 b
15	46 b	40 b	18,24 b	4,38 b
CV (%)	20,99	24,80	23,53	25,40

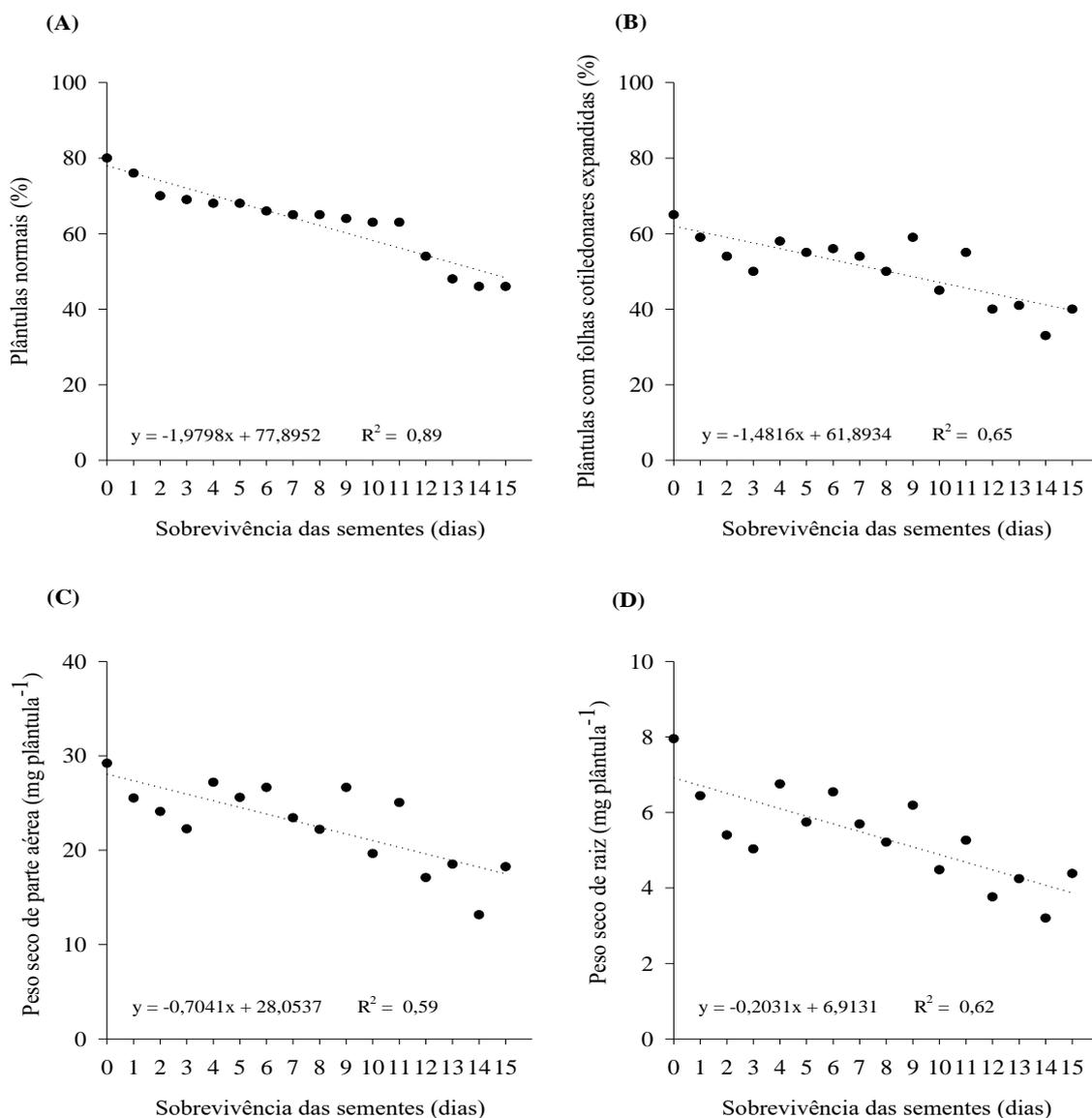
Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da Autora (2023).

De maneira geral, foi observado para todas as variáveis analisadas no presente estudo uma redução linear na qualidade fisiológica das sementes de *Coffea arabica* L. com o avanço dos dias de manutenção das sementes após a crioarmazenamento (FIGURA 2). Imediatamente após a retirada das sementes do criotânque (FIGURA 2A), a porcentagem de plântulas normais foi máxima (80%), sem diferença significativa quando comparada às porcentagens de

germinação das sementes observadas no primeiro e segundo dias, ou seja, de 76 e 70%, respectivamente. No entanto, fica evidenciado que após o criarmazenamento as sementes de café arábica mantém a qualidade fisiológica por período máximo de até dois dias em condições ambientais, corroborando com o padrão mínimo de comercialização das sementes do gênero *Coffea* estabelecido pelo MAPA de 70% (BRASIL, 2009).

Figura 2. Porcentagem de plântulas normais (A), porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares totalmente expandidas (B), peso seco de parte aérea (C) e peso seco de raiz (D) de sementes de *Coffea arabica* L. até o 15º dia de sobrevivência após criarmazenamento.



Fonte: Da Autora (2023).

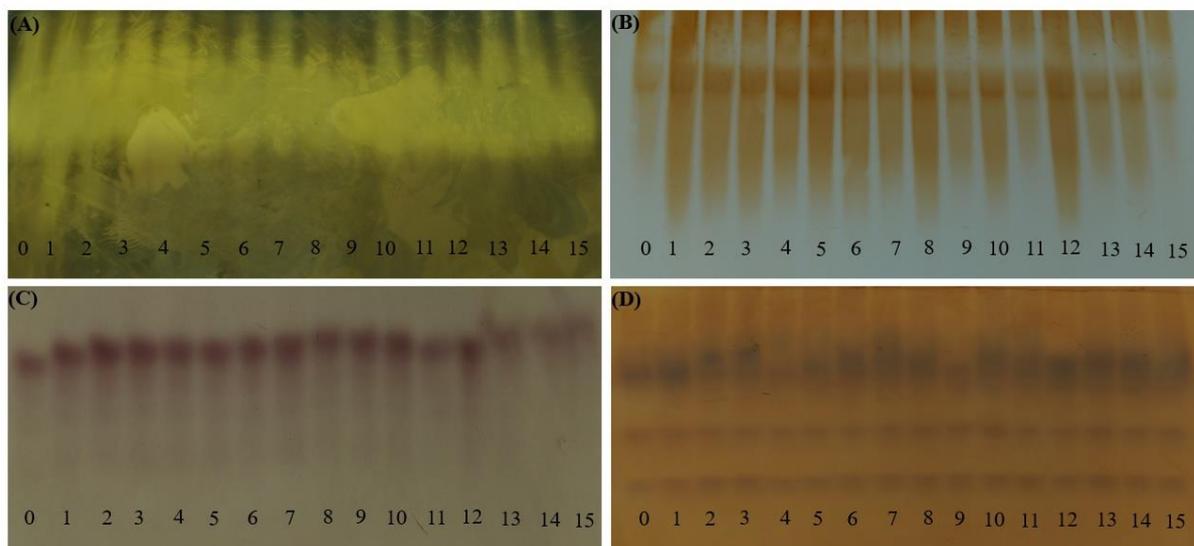
Coelho et al. (2017b) estudando a criopreservação de sementes de *C. arabica* L. secadas em sílica gel observaram uma alta germinação das diferentes cultivares trabalhadas após retirada do crioarmazenamento, corroborando com os resultados deste estudo. Resultados semelhantes foram verificados por Figueirado et al. (2021) onde encontraram alta sobrevivência das sementes de café logo após imersão em nitrogênio líquido. Nota-se uma alta sobrevivência das sementes após a criopreservação, ou seja, altas porcentagens de germinação são verificadas para as sementes, imediatamente após retiradas do nitrogênio líquido.

Avaliando-se os resultados dos testes de vigor (FIGURA 2, B-D), observa-se a mesma tendência do resultado do teste de germinação, ou seja, a maior média foi observada logo após o crioarmazenamento. Este fato se deve a redução da qualidade fisiológica observada com o avanço do tempo de manutenção das sementes de café após a retirada do nitrogênio líquido, até o 15º dia. Pesquisas recentes de criopreservação de sementes do gênero *Coffea* têm demonstrado variações nos resultados em relação aos testes de vigor (COELHO et al., 2017a; FIGUEIREDO et al., 2017; FIGUEIREDO et al., 2021). Todavia, é importante ressaltar que os diferentes resultados da sobrevivência das sementes após imersão em nitrogênio líquido acondicionadas em temperatura ambiente 25 ± 2 °C sem controle da umidade relativa do ar, encontrados nesse estudo, podem também, ter sido afetados pela redução do teor de água.

3.2 Expressão eletroforética de isoenzimas

Observou-se nas sementes de café, variações na intensidade e/ou no aparecimento de novas isoformas, nos perfis enzimáticos em função dos dias de sobrevivência das mesmas após o crioarmazenamento (FIGURA 3). A expressão da enzima catalase apresentou intensidade semelhante em todos os tempos de sobrevivência das sementes após a crioarmazenamento, no entanto, houve o aparecimento de uma nova isoforma no primeiro e segundo dias, ou seja, aqueles que apresentaram maiores médias de plântulas normais no teste de germinação (FIGURA 3A). Observa-se que no primeiro e segundo dias, as sementes apresentaram maior sobrevivência, indicando assim que a expressão da catalase aumenta nos tratamentos de melhor qualidade fisiológica.

Figura 3. Expressão eletroforética das enzimas catalase (A), peroxidase (B), esterase (C) e glutamato oxaloacetato transaminase (D) até o 15º dia de sobrevivência das sementes de *Coffea arabica* L. após crioarmazenamento.



Fonte: Da Autora (2023).

Em estudos recentes em sementes de café, a expressão da enzima catalase tem sido relacionada como possível indicadora de qualidade fisiológica, entretanto, os resultados são divergentes, apresentando ora correlação positiva ora negativa (ABREU et al., 2014; SANTOS et al., 2014; COELHO et al., 2015; COELHO et al., 2017a; FIGUEIREDO et al., 2021). Essa enzima é oxirredutora e atua na remoção de radicais livres, durante estresses oxidativos (DUBEY, 2011), assim a maior atividade pode estar relacionada à redução ou aumento do mecanismo de prevenção contra o dano oxidativo.

Diferentemente da catalase, a expressão da enzima peroxidase apresentou alterações na intensidade em função dos dias de sobrevivência das sementes após a crioarmazenamento, principalmente, uma alta expressão no primeiro, quinto, oitavo e décimo segundo dia (FIGURA 3B). Em estudos sobre a criopreservação das sementes de café arábica sobre a qualidade fisiológica e a atividade bioquímica, foram observadas variações com aumento na expressão da enzima peroxidase durante o processo de secagem (COELHO et al., 2017b). A enzima PO se localiza na parede celular e no vacúolo, apresentando função de redução e exposição dos efeitos do O₂ nos mecanismos de defesa das sementes (DUSSERT; ENGELMANN, 2006).

Com relação a enzima esterase (FIGURA 3C), observou-se variações na intensidade das isoformas em relação ao avanço do tempo de sobrevivência das sementes, sendo que os 13º, 14º e 15º dias apresentaram as menores expressões, correspondendo esses tempos, aos piores

desempenhos fisiológicos. A enzima esterase é um bom indicador da deterioração das sementes, com importante função catalítica na desintoxicação celular, atuando na hidrólise de ésteres e no metabolismo de lipídeos (RUSSEL et al., 2011). Neste estudo, à medida que avança o tempo de sobrevivência ocorre, também, diminuição da expressão da enzima EST.

A expressão da enzima glutamato oxaloacetato transaminase, apresentou intensidades semelhantes entre os tempos de sobrevivência das sementes. Todavia, as menores intensidade foram observadas no 4º, 5º e 9º dias após a retirada do nitrogênio líquido (FIGURA 3D). Segundo Vieira et al. (2009) e Tunes et al. (2010), a enzima GOT apresenta papel importante na germinação das sementes, uma vez que atua na oxidação de aminoácidos fornecendo energia para o ciclo de Krebs ou para a redução do alfa-cetoglutarato para novos aminoácidos destinados ao crescimento do embrião e a síntese proteica.

Assim, ficou evidente a perda de qualidade das sementes de café, após sua retirada do nitrogênio líquido, sendo recomendado que estas sejam utilizadas o mais rapidamente possível, ou que sejam armazenadas adequadamente para posterior uso, de acordo com os resultados do estudo. Nesse estudo não foi avaliado o desempenho fisiológico dessas sementes caso fossem armazenadas em temperaturas mais baixas ou se tivessem sido submetidas à secagem. Desta forma, um estudo mais aprofundado deve ser realizado para uma recomendação mais segura sobre a melhor forma para a manutenção da qualidade das sementes de *Coffea arábica* L. após a sua retirada do tanque de nitrogênio líquido.

4 CONCLUSÕES

Após a criopreservação, as sementes mantidas em condição ambiente sofrem redução contínua da qualidade fisiológica, sendo que a germinação é mantida dentro dos padrões para a comercialização por período máximo de dois dias em condição ambiente.

As enzimas catalase, esterase e peroxidase são indicadores de qualidade de sementes de café arábica após crioarmazenamento.

REFERÊNCIAS

- ABREU, G. F. et al. Antioxidant enzymes preserving coffee quality in refrigerate environment. **Biotecnologia Vegetal**, v. 18, n. 3, p. 151-159, 2018.
- 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. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. 627 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Departamento Nacional de Produção Vegetal. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 399 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**, Brasília, 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. et al. Cryopreservation of *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner seeds: importance of drying rate and moisture content. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 8, p. 1335-1342, 2019.
- COELHO, S. V. B. et al. Tolerance of *Coffea arabica* L. seeds to sub zero temperatures. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 4, n. 3, p. 312-321, 2017. (a)
- COELHO, S. V. B. et al. Cryopreservation of coffee seeds: a simplified method. **Seed Science and Technology**, v.45, n.3, p. 1-12, 2017. (b)
- DUBEY, R. S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **Science Publishers**, v. 9, p.178-203, 2011.
- 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.; 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.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behavior? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.
- FIGUEIREDO, M. A. de et al. Exploratory studies for cryopreservation of *Coffea arabica* L. seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 39, n. 2, p. 150-158, 2017.
- FIGUEIREDO, M. A. de et al. Physiological, biochemical, and ultrastructural aspects of *Coffea arabica* L. seeds under different cryopreservation protocols. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 45, e027020, p. 1-14, 2021.

ICO. INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **A História do Café**. Londres: International Coffee Organization. Disponível em: <<https://www.ico.org/prices/po-production.pdf>>. Acesso em: 01 maio. 2022.

KARTHA, K. K. Meristem culture and germplasm preservation. In: _____ (Ed.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 115-134.

KAYA, E. et al. Cryopreservation of citrus seed via dehydration followed by immersion in liquid nitrogen. **Turkish journal of biology**, v. 41, n. 1, p. 242-248, 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.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2022.

RICALDONI, M. A. **Uso de sementes criopreservadas e cultivo protegido para a produção de mudas de *Coffea arabica* L.** 76f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2019.

RUSSEL, R. J.; SCOTT, C.; JACKSON, C. J.; PANDEY, R.; PANDEY, G.; TAYLOR, M. C.; COPPIN, C. W.; LIU, J. W.; OAKESHOTT, J. G. 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, 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.

SANTOS, F. C.; ROSA, S. D. V. F.; VON PINHO, E. V. R.; CIRILLO, M. A.; CLEMENTE, A. C. S. Desiccation sensitivity from different coffee seed phenological stages. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 1, p. 25-31, 2014.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2, n. 1, p. 1-26, 2012.

SOUZA, A. C. de. **Aspectos fisiológicos, bioquímicos, biofísicos e ultraestruturais associados à criopreservação em sementes de *Coffea arabica* L.** 103f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2019.

TUNES, L. M.; PEDROSO, D. C.; MENEGHELLO, G. E.; CASTRO, M. A. S.; BARROS, A. C. S. A.; BADINELLI, P. G.; MUNIZ, M. F. B. Perfil enzimático em sementes de cevada em reposta a diferentes concentrações salinas. **Interciência**, v. 35, n. 5, p. 369-373, 2010.

VIEIRA, E. S. N.; VON PINHO, E. V. R.; CARVALHO, M. G. G.; SILVA, P. A. Caracterização de cultivares de soja por descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e isoenzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, p. 86-94, 2009.

APÊNDICE A - Tabela da análise de variância do capítulo 5

Tabela 2 Resumo da análise de variância dos dados referentes à protrusão radicular (PR), plântulas normais (PN), plântulas com folhas cotiledonares (FC), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raiz (PSR) e embriões viáveis (EV) da sobrevivência de sementes de *Coffea arabica* L. após criopreservação.

FV	GL	Quadrados Médios					
		PR	PN	FC	PSPA	PSR	EV
Dias	15	48,333 ^{ns}	398,31*	306,56*	76,606*	5,9958*	302,92 ^{ns}
Erro	48	55,208	175,13	158,59	28,714	1,8735	336,46
CV (%)	-	8,55	20,99	24,80	23,53	25,40	37,87

*: Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns}: não significativo.

Fonte: Da Autora (2023).