

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

LEONARDO ARAUJO OLIVEIRA

**MOBILIZAÇÃO DE COMPOSTOS DE RESERVA EM SEMENTES DE CAFÉ
PRODUZIDAS EM DIFERENTES ALTITUDES E FACES DE EXPOSIÇÃO DA
MONTANHA**

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2017

LEONARDO ARAUJO OLIVEIRA

**MOBILIZAÇÃO DE COMPOSTOS DE RESERVA EM SEMENTES DE CAFÉ
PRODUZIDAS EM DIFERENTES ALTITUDES E FACES DE EXPOSIÇÃO DA
MONTANHA**

**Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Viçosa como parte das
exigências para a obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo. Modalidade: trabalho científico.**

Orientador: Edgard Augusto de Toledo Picoli

**Coorientadores: Genaina Aparecida de Souza
Isabel Reis Guesdon**

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2017

LEONARDO ARAUJO OLIVEIRA

**MOBILIZAÇÃO DE COMPOSTOS DE RESERVA EM SEMENTES DE CAFÉ
PRODUZIDAS EM DIFERENTES ALTITUDES E FACES DE EXPOSIÇÃO DA
MONTANHA**

**Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Viçosa como parte das
exigências para a obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo. Modalidade: trabalho científico.**

APROVADO: 28/06/2017

Prof. Edgard Augusto de Toledo Picoli
(Orientador)
(DBV/UFV)

**Ao meu amado pai Judézio Ventura
de Oliveira, in memoriam.**

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

A minha mãe Marilza Araujo da Silva, a meu padrasto José Velten e a minha irmã Letícia Araujo Vitória, pelo amor, carinho, apoio, compreensão e por estarem sempre ao meu lado.

Ao Professor Edgard Augusto de Toledo Picoli, pela oportunidade e orientação.

A minha coorientadora Genaina pelo convívio, apoio, compreensão, amizade e conselhos que foram tão importantes tanto em minha vida acadêmica quanto pessoal.

A minha coorientadora Isabel Reis Guesdon pelos ensinamentos.

Aos meus amigos Bruno Tavares da Silva, Alexmiliano Vogel de Oliveira, Antônio Augusto Gomes Rocha, Matheus da Costa Queiroz e Pedro Henrique Ferreira pela ajuda neste trabalho e companheirismo.

Aos pesquisadores da EPAMIG Marcelo de Freitas Ribeiro e Sérgio Maurício Lopes Donzeles pela ajuda com o fornecimento de material para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso contribuindo na melhoria de minha formação.

À Fapemig pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Ao Consórcio Pesquisa Café.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho e em minha jornada na universidade.

RESUMO

A semente de café é constituída pelo embrião, endosperma, um envoltório denominado “película prateada”, e o endocarpo (pergaminho). O endosperma é a estrutura mais importante na constituição do grão do café, tanto econômica como fisiologicamente. Esta estrutura é constituída por proteínas, alcalóides, óleos, açúcares, dextrina, pentosanas, celulose, lipídios, ácidos derivados da cafeína e outros ácidos orgânicos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a morfologia e a histoquímica de sementes de café, produzidas em diferentes condições de altitude e insolação, e acompanhar a mobilização das reservas dessas sementes durante a germinação. Foram avaliadas sementes de *Coffea arabica* L. cultivar Catuaí colhidas em 20 locais distribuídos em 10 cidades da região das Matas de Minas. As avaliações foram realizadas a partir de sementes com 0, 3, 6, 12, 24, 33 e 45 dias de embebição, parte das amostras foram retiradas e fixadas em formalina neutra tamponada e em sulfato ferroso em formalina, enquanto outra parte foi congelada em nitrogênio líquido e mantidas em Ultrafreezer a -80°C , para posterior análise enzimática. As amostras fixadas foram seccionadas transversalmente em criomicrotomo, para realização de testes histoquímicos para amido, lipídeos, óleos essenciais e oleorresinas, proteínas, compostos fenólicos, polissacarídeos neutros, alcaloides, β -1,3 e β -1,4 glucanos e lignina. As amostras congeladas foram utilizadas para a revelação da atividade da enzima superóxido dismutase e malato desidrogenase por eletroforese. Em geral o comportamento das sementes quanto a histoquímica e atividade enzimática foram semelhantes, independente da condição de cultivo. Durante a germinação houve intensa mobilização dos compostos de reserva, começando a partir da região próxima ao embrião. A mobilização se intensifica após a protrusão radicular, a partir dos 12 dias e, aos 33 dias, pouca reserva foi observada no endosperma. Aos 45 dias as folhas cotiledonares se encontram expandidas e o sistema radicular composto por raiz principal e raízes laterais bem estabelecidos.

Palavras chave: *Coffea arabica*, germinação, consumo de reservas.

ABSTRACT

A coffee seed consists of embryo, endosperm, a wrap called "silver film", and the endocarp (parchment). The endosperm is the most important structure in the constitution of the coffee bean, both economically and physiologically. This structure consists of proteins, alkaloids, oils, sugars, dextrans, pentosans, cellulose, lipids, acids derived from caffeine and other organic acids. The aim of this work was to characterize the morphology and histochemistry of coffee seeds, produced under different conditions of altitude and insolation, and to accompany the reserves mobilization of these seeds during the germination. Seeds of *Coffea arabica* L. cultivar Catuaí were harvested at 20 sites distributed in 10 cities in the Matas de Minas region. The evaluations were performed from 0, 3, 6, 12, 24, 33 and 45 days of imbibition seeds and samples of seeds were taken out and fixed in buffered neutral formalin and ferrous sulphate in formalin, while other samples were frozen in Nitrogen liquid and kept in Ultrafreezer at -80°C , for further enzymatic analysis. The fixed samples were sectioned in cryomicrotome for histochemical tests for starch, lipids, essential oils and oleoresins, proteins, phenolic compounds, neutral polysaccharides, alkaloids, β -1,3 and β -1,4 glucans and lignin. The frozen samples were used for the revelation of the enzymes activity: superoxide dismutase and malate dehydrogenase by electrophoresis. In general, the behavior of the seeds according the histochemistry and enzymatic activity were similar, independent of growing conditions. During the germination, there was intense reserve compounds mobilization, starting from the region next to the embryo. The mobilization intensifies after the root protrusion, from 12 days, and at 33 days, small quantity of reserve was observed. At 45 days the cotyledonary leaves are expanded and the root system composed by the main root and lateral roots were established..

Key words: *Coffea arabica*, germination, consumption of reserves.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 9 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 11 |
| 3 RESULTADOS..... | 13 |
| 3.1 Padrão de embebição das sementes de café | 13 |
| 3.2 Compostos presentes nas sementes de café | 14 |
| 3.3 Consumo dos compostos de reserva durante a germinação de sementes de café | 16 |
| 3.4 Ação enzimática durante a germinação | 20 |
| 4 DISCUSSÃO: | 21 |
| 5 CONCLUSÕES | 26 |
| 6 REFERÊNCIAS | 27 |

1 INTRODUÇÃO

O *Coffea arabica* L. pertencente à família Rubiaceae e é originário da Etiópia. Sua semente é plana convexa, elíptica ou oval, sulcada longitudinalmente na face plana e é constituída por embrião, endosperma, um envoltório representado por uma “película prateada”, e endocarpo (pergaminho).

As sementes de café são obtidas a partir de frutos maduros denominados de frutos-cereja, possuem viabilidade irregular, além de apresentar germinação lenta e desuniforme (REIS et al., 2010; RUBIM et al., 2010). A demora na germinação dessas sementes aumenta consideravelmente o período de formação das mudas, o que pode ser atribuído a propriedades das paredes celulares e dos tecidos que compõem as sementes, além de aspectos físicos como a dureza do endosperma. Assim, para que haja germinação, deve ocorrer a degradação dos tecidos que circundam o embrião (endosperma micropilar) (ZONTA et al., 2010), permitindo que a radícula protunda (SILVA et al., 2004).

Porém, pouco se sabe sobre as causas da perda da qualidade fisiológica das sementes de café e seu comportamento durante o processo germinativo. Esse processo inicia-se com a absorção de água, que varia de acordo com a espécie, permeabilidade do tegumento, disponibilidade de água, temperatura, pressão hidrostática, área de contato semente/água, forças intermoleculares, composição química e condição fisiológicas das sementes (CARVALHO et al., 2012).

O endosperma é a estrutura mais importante na constituição do grão do café, tanto econômica como fisiologicamente (GOULART et al., 2007). Esta estrutura é constituída de proteínas, alcalóides, óleos, açúcares, dextrina, pentosanas, celulose, lipídios, ácidos derivados da cafeína e outros ácidos (DEDECCA, 1957). A presença e a proporção de cada um destes componentes estão diretamente ligadas a produção de um café com bebida de qualidade superior e sementes mais vigorosas. Estes componentes são afetados pelas variáveis ambientais, tais como altitude, que podem ampliar o ciclo de formação do grão (DAMATTA et al., 2004).

A mobilização efetiva das reservas de armazenamento de sementes e sua degradação durante a germinação é um processo fisiológico crucial no ciclo de vida das plantas (OTEGUI, et al., 2006), sendo assim, pesquisas que forneçam informações a respeito da composição histoquímica das sementes, principalmente sua dinâmica durante a germinação podem fornecer informações relevantes a respeito da qualidade fisiológica das sementes.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar morfo e histoquimicamente as sementes de café em diferentes condições de altitude e insolação, bem como acompanhar a mobilização das reservas dessas sementes durante a germinação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas sementes de café coletadas na região das Matas de Minas, em Minas Gerais, Brasil. Para isto, foram coletadas amostras de *C. arabica* cultivar Catuaí em 20 locais (Fig. 1). Os frutos foram colhidos manualmente no estágio 88 na escala BBCH para café, com maturidade fisiológica completa. Os frutos foram colhidos em duas altitudes: abaixo de 750 m (L) e acima de 900 m (H) e duas faces de exposição da montanha: Soalheira quente, com alta intensidade luminosa (SQ) e Noruega Fria, com baixa intensidade luminosa (NF).

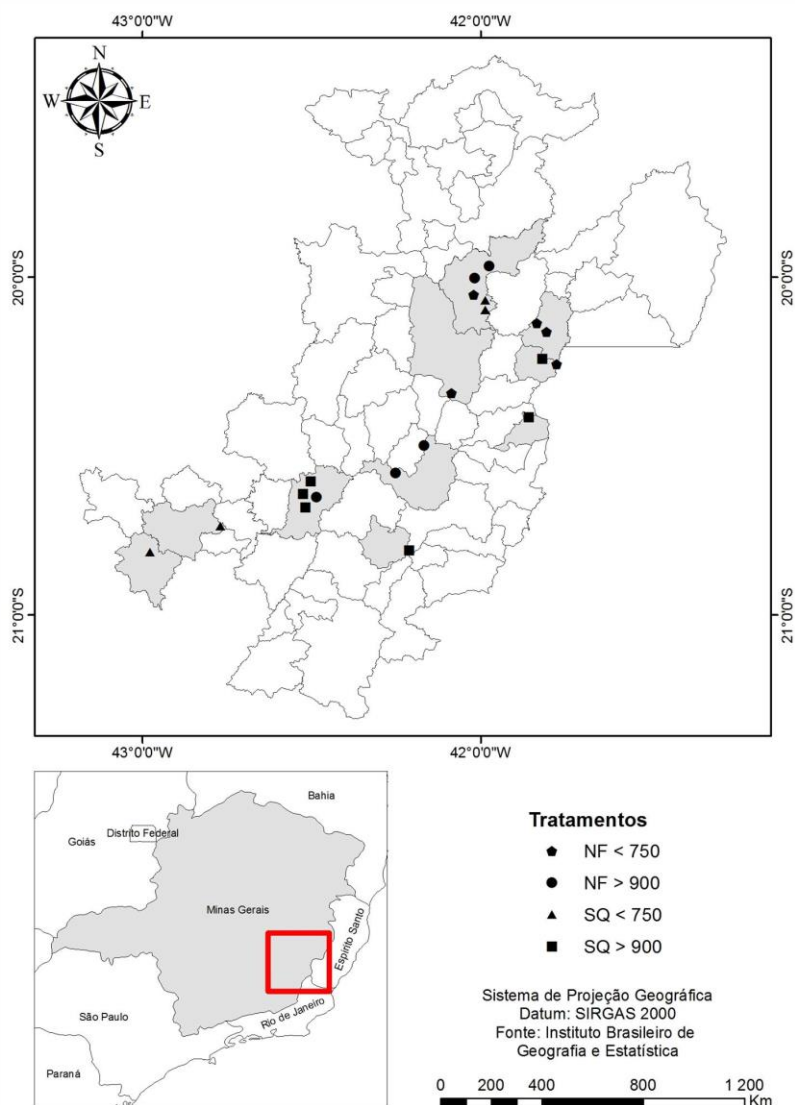


Figura 1: Representação dos pontos de coleta das sementes de *C. arabica* nas diferentes altitudes e faces de insolação na região das Matas de Minas, Minas Gerais, Brasil. Nas faces Soalheira Quente (SQ) e Noruega Fria (NF), em altitudes inferiores a 750m e superiores a 900m.

Após a colheita, os frutos foram transportados para a Unidade de Beneficiamento de Sementes da Universidade Federal de Viçosa, despulpados em despulpador manual e desmucilados por fermentação natural em água, durante 24 h, em temperatura ambiente. Em seguida, as sementes foram lavadas e secas à sombra, sobre papel e seu endocarpo (pergaminho) foi retirado.

Após a secagem a sombra foram realizadas as seguintes avaliações:

Teor de umidade foi determinado pelo método da estufa, onde as sementes foram secas por 24 h à $105\pm 3^{\circ}\text{C}$, com quatro repetições de 50 sementes, sendo o teor de água expresso em percentagem (BRASIL, 2009). Para avaliar o comportamento das sementes de café durante a germinação e associá-lo as alterações nos compostos de reserva, a curva de embebição foi avaliada para estabelecimento dos tempos iniciais de coleta.

Curvas de embebição: para avaliar o comportamento das sementes de café durante a germinação e associá-lo as alterações nos compostos de reserva, a curva de embebição foi avaliada. Através da pesagem sistemática de quatro repetições de 25 sementes, em intervalo de 2 h durante as primeiras 48 h e posteriormente em intervalos de 6, 12 e 24 h durante 17 dias. A face plana das sementes foi disposta sobre duas folhas de papel germitest umedecidas com água destilada (2,5 vezes o peso do papel), dentro de caixas gerbox e mantidos em câmara de germinação a 30°C . A pesagem das sementes foi realizada até 4 dias após 50% destas apresentar emissão de radícula. Assim, para a análise histoquímica dos compostos de reserva as sementes foram colocadas para germinar e retiradas nos tempos 0, 3, 6, 12, 24, 33 e 45 dias. Ou seja, antes da embebição, um pouco após a embebição (3 dias), com cerca de metade do tempo da protusão (6 dias), próximo a protusão (12 dias), com o dobro de tempo da protusão (24 dias), no tempo recomendado para encerramento do teste de germinação para café (33 dias) e quando os cotilédones já estavam abertos (45 dias).

Análises anatômicas e histoquímicas: Amostras de sementes foram fixadas imediatamente em FNT (Formalina neutra tamponada) (KRAUS e ARDUIN 1997, modificado) e em SFF (Sulfato ferroso em formalina) (JOHANSEN, 1940), para identificação dos compostos fenólicos. As demais sementes foram dispostas em papel germitest com três folhas, umedecidas com água destilada (2,5 vezes o peso do papel) e mantidas em câmara de germinação a 30°C , por 3, 6, 12, 24, 33 e 45 dias. Amostras de sementes foram retiradas a cada período de tempo e fixadas imediatamente em FNT e SFF. Posteriormente as sementes foram seccionadas transversalmente em criomicrotomo (LEICA CM 1850), na espessura de $30\ \mu\text{m}$ e coradas com os seguintes reagentes: reagente de lugol (JOHANSEN, 1940) para a detecção de

amido, Sudan Red (BRUNDRETT et al., 1991) para lipídeos, reagente NADI (DAVID & CARDE, 1964) para óleos essenciais e oleorresinas, Reagente de Schiff (O'BRIEN & MCCULLY, 1981) para Polissacarídeos neutros, Azul brilhante de Coomassie (FISHER, 1968) para proteínas, Floroglucina ácida (JOHANSEN, 1940) para compostos fenólicos estruturais (ligninas), Reagente de Wagner (FURR e MAHLVERG, 1981) para alcaloides, calcofluor White (HUGHES & MCCULLY, 1975) para β -1,3 e β -1,4 glucanos e Azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1964). O material foi montado em lâminas histológicas e a documentação fotográfica, foi realizada com auxílio do fotomicroscópio Olympus AX 70 equipado com sistema U-Photo.

Análises enzimáticas por eletroforese: Sementes foram dispostas em papel germitest com três folhas, umedecidas com água destilada (2,5 vezes o peso do papel) e mantidas em câmara de germinação a 30 °C, por 3, 6, 12, 24, 33 e 45 dias. Posteriormente extratos enzimáticos brutos foram obtidos pela maceração das sementes na presença de 20 PVP (polivinilpirrolidona) e nitrogênio líquido em moinho de bola com câmara fechada (MA350), e posteriormente armazenado à temperatura de -86 °C. A corrida eletroforética foi realizada em sistema descontínuo de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados na canaleta do gel 50 μ L do sobrenadante da amostra e a corrida efetuada a 150 V por 5 h. No final da corrida, os géis foram revelados para as enzimas malatodesidrogenase (MDH- EC 1.1.1.37.) e superóxido dismutase (SOD- EC.1.15.1.1.).

3 RESULTADOS

3.1 Padrão de embebição das sementes de café

Durante a curva de embebição o peso fresco das sementes aumentou rapidamente durante a embebição inicial, Fase I, chegando ao platô na Fase II, onde se manteve constante até aproximadamente dez dias. Em seguida houve outro incremento de peso, na fase III, comportamento típico da maioria das sementes. A protrusão da radícula das sementes produzidas em altitudes superiores a 1000 m, ocorreu aos 10,7 dias, enquanto nas produzidas em altitudes inferiores este fenômeno ocorreu aos 11,5 dias.

3.2 Compostos presentes nas sementes de café

O fruto de café é constituído de casca ou exocarpo; mesocarpo, contendo a polpa e mucilagem e o grão, recoberto pelo pergaminho; o endocarpo. Em geral, são encontradas duas sementes por fruto, compostas por endosperma e embrião. Com as análises histoquímicas realizadas nas sementes de café, foi possível verificar a presença de diversos compostos (Tabela 1). Observamos também que as células que compõe o endosperma possuem parede celular espessas com formatos irregulares (Fig. 2A, 2B e 2C), enquanto as células do embrião são mais isodiamétricas (Fig. 2G).

Tabela 1. Testes histoquímicos aplicados em sementes de *C. arabica* durante a embebição aos 0, 3, 6, 12, 24, 33e 45 dias.

| Grupo de compostos | Reagentes | Resultados |
|--|------------------------------|------------|
| Proteínas | Azul de comassie | + |
| Alcalóides | Reagente de Wagner | + |
| Compostos fenólicos | Sulfato ferroso em formalina | + |
| Lipídeos | Sudan red | + |
| Óleos essenciais e oleoresina | Reagente NADI | + |
| Polissacarídeos totais | Reagente de Schiff | + |
| β -1,3 e β -1,4 glucanos | Calcofluor White | + |
| Compostos fenólicos estruturais (ligninas) | Floroglucina ácida | - |
| Amido | Lugol | - |

As sementes apresentam composição química semelhante, independente da condição de cultivo, sendo identificados compostos fenólicos estruturais e não estruturais, lipídios, óleo resina, proteínas, alcaloides e carboidratos estruturais de parede (Fig. 2). Foi possível observar grande presença de corpos lipídicos, em geral bem distribuídos por toda célula (Fig. 2C). Parte desse material lipídico reage positivamente ao teste para detecção de óleo resina, um dos compostos responsáveis pelas características organolépticas do café, como o aroma (Fig. 2E). Os polissacarídeos neutros, celulose e hemicelulose, estão bem evidentes na estrutura das paredes celulares que reagiram fortemente com PAS. No entanto, a presença de amido nas

amostras durante os tempos após a embebição avaliados não foi verificada mediante teste com lugol.

Adicionalmente a presença de β -1,3 e β -1,4 glucanos é observada pela reação com o Calcofluor White (Fig. 2 G). Também são observados estreitamentos e ou variação na espessura da parede celular (Fig. 2 B, D e F).

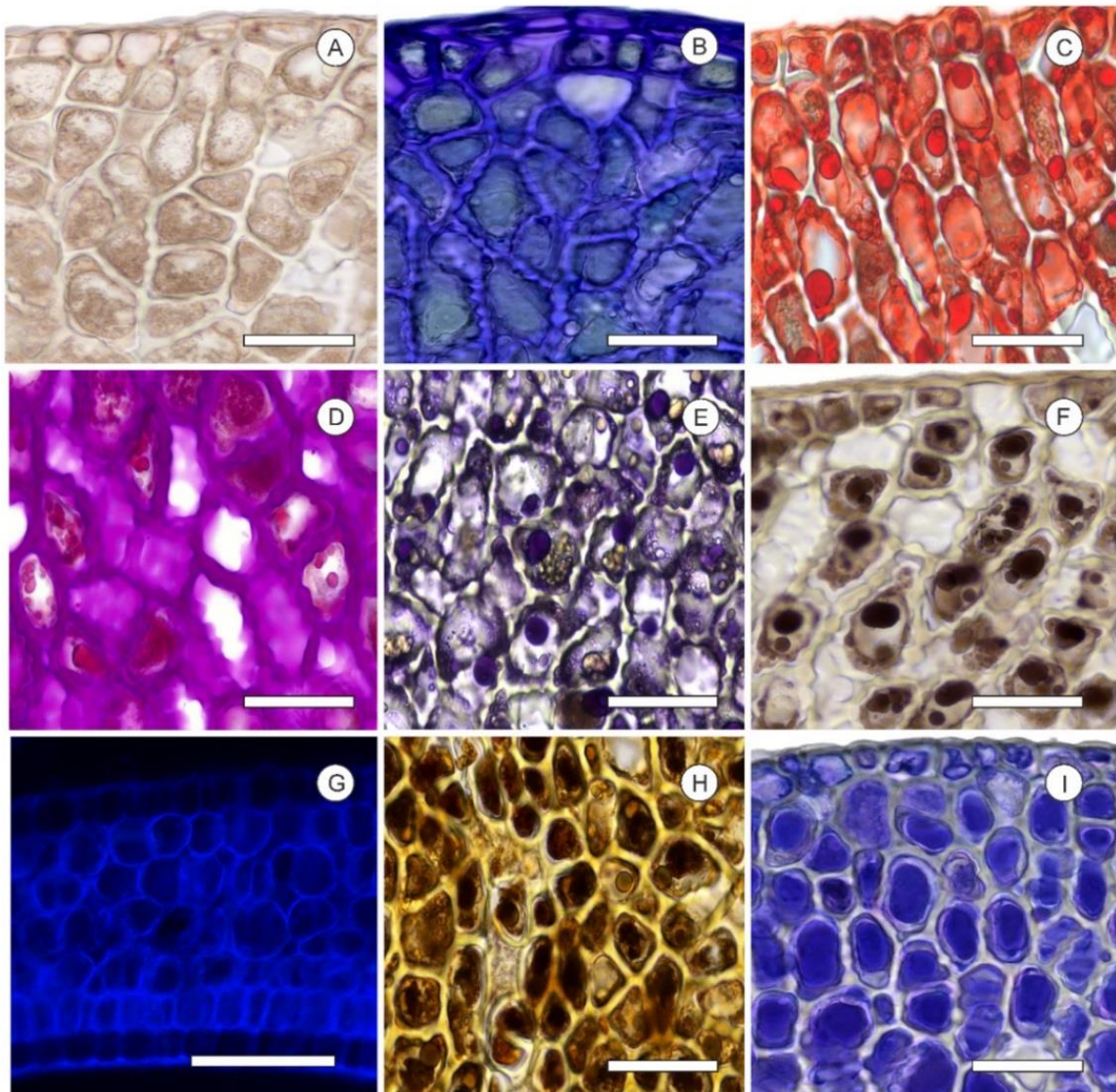


Figura 2: Seções transversais de sementes de café para detecção de composição química. Branco (A), coradas com Azul de toluidina (B), Sudan red (C), PAS (D), reagente de NADI (E), Sulfato ferroso em formalina (F), Calcofluor white (G), reagente de Wagner (H) e azul brilhante de Comassie (I). Barras = 100 μ m.

3.3 Consumo dos compostos de reserva durante a germinação de sementes de café

O consumo de reservas nas sementes de café em relação as condições em que se desenvolveram (altitude e face da montanha) são semelhantes entre si.

Após o processo de embebição aos três e seis dias, pouca diferença quanto ao consumo dessas reservas é observada, porém a partir dos 12 dias foi observado o consumo das reservas presentes nas paredes celulares e citoplasma, principalmente na região mais próxima ao embrião (Fig. 3). Essa mobilização ficou mais evidente aos 33 dias, quando maior consumo de reservas ocorre tanto na parte do endosperma mais próxima ao embrião quanto na região mediana (Fig. 3). Aos 45 dias já não se observam reservas no citoplasma e praticamente estavam ausentes nas paredes celulares, associadas à menor espessura das paredes celulares do endosperma (Fig. 3). Foi observado também que a mobilização ocorre de dentro para fora no endosperma, ou seja, percebemos maior desgaste das paredes celulares nas regiões próximas ao embrião (Fig. 3 B, D e F). Adicionalmente, verifica-se que as reservas das paredes celulares da periferia do endosperma foram mobilizadas mais intensamente aos 45 dias (Fig. 3 F).

De acordo com a alteração da coloração da parede das células do endosperma observadas na Figura 3, verificamos uma alteração da constituição final da parede em decorrência da germinação. Concomitante ao consumo das reservas no citoplasma das células, é observado uma alteração estrutural e química das paredes, refletindo respectivamente, o colapso celular e a degradação das hemiceluloses e pectinas (Fig. 3).

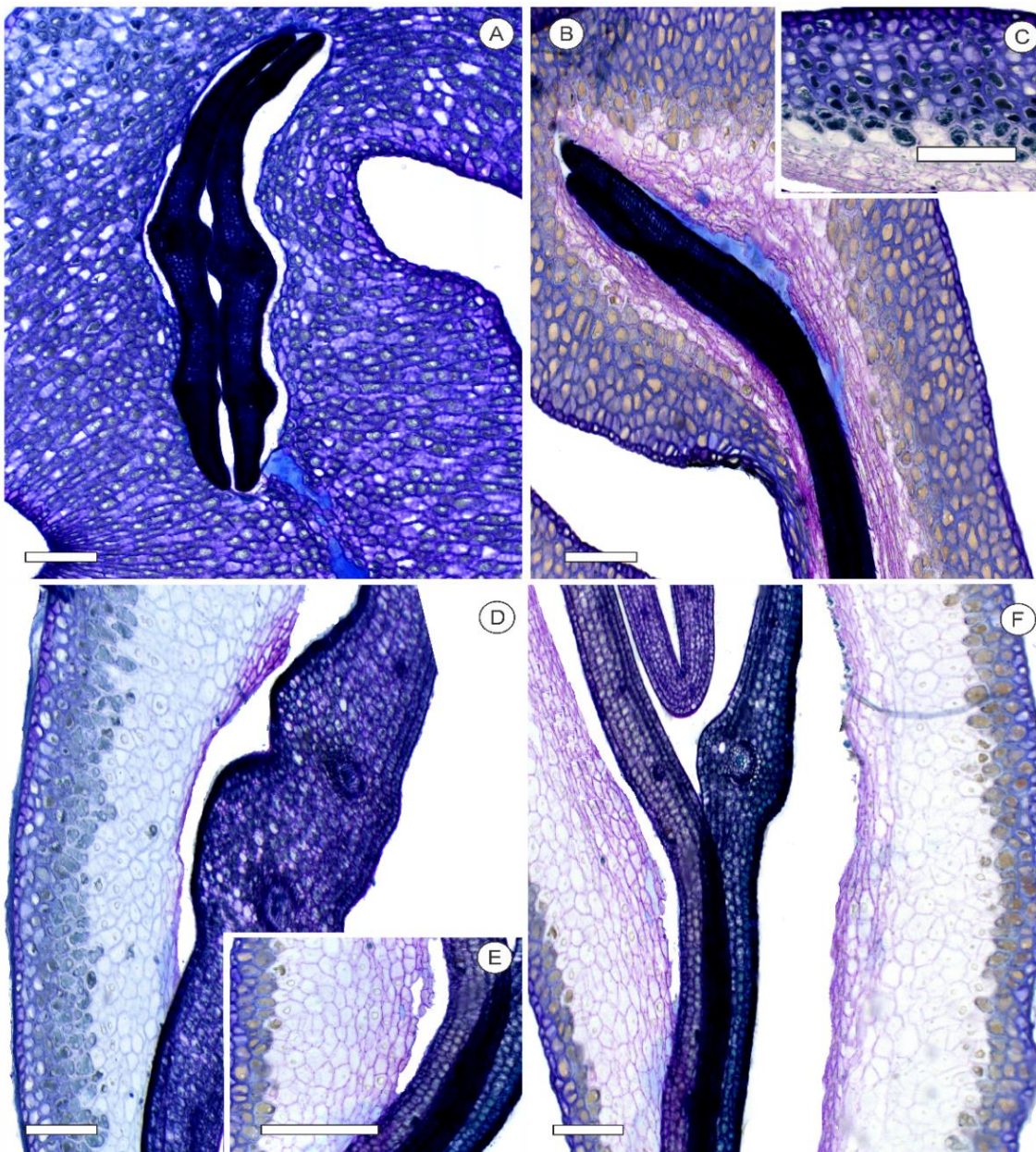


Figura 3: Seções transversais de sementes de café durante a germinação coradas com azul de toluidina, antes da embebição (A), aos 12 dias de embebição (B e C), aos 33 dias (D e E) e aos 45 dias (F). Barras = 300 μ m.

Antes da embebição, as sementes apresentavam cerca de 35% de umidade, o local onde se encontrava o embrião, é identificado devido a leve coloração esbranquiçada na região próxima ao topo da semente (Fig. 4 A). Aos 3 dias pouca diferença é observada, enquanto aos 6 dias após a embebição, a coloração branca do embrião pode ser facilmente constatada (Fig. 4 B e 4 C). Aos 12 dias é possível observar a protrusão da radícula (Fig. 4 D), fase onde

observamos nitidamente a mobilização das reservas do endosperma (Fig. 5 C, 5 J e 5 N). Aos 24 dias é observada a presença de raiz bem desenvolvida, podendo ser identificada a raiz principal e demais raízes em formação, a integridade das sementes ainda estava intacta (Fig. 4 E). Posteriormente, aos 33 dias, é observado crescimento do sistema radicular e alongamento do hipocótilo, adicionalmente foi observado amolecimento da semente, devido ao consumo das reservas do endosperma (Fig. 4 F). Finalmente, aos 45 dias de embebição, observamos sistema radicular bem desenvolvido, abertura das folhas cotiledonares e o resíduo da semente, praticamente sem reservas (Fig. 4 G).



Figura 4: Germinação de sementes de *C. arabica* antes da embebição (A), aos 3 (B), 6(C), 12 (D), 24 (E), 33 (F) e 45 dias (G). Barras = 1 cm.

O consumo dos compostos de reserva, presentes no citoplasma, seguiram a mesma tendência das reservas da parede. Observamos a mobilização dos lipídios, proteínas e óleos essenciais durante a germinação de sementes de café mais evidente a partir dos 12 dias. Com maior intensidade aos 33 dias, aos 45 dias é possível observar pouca reação para proteína e praticamente nenhuma reserva de lipídios e óleo resina (Fig. 5).

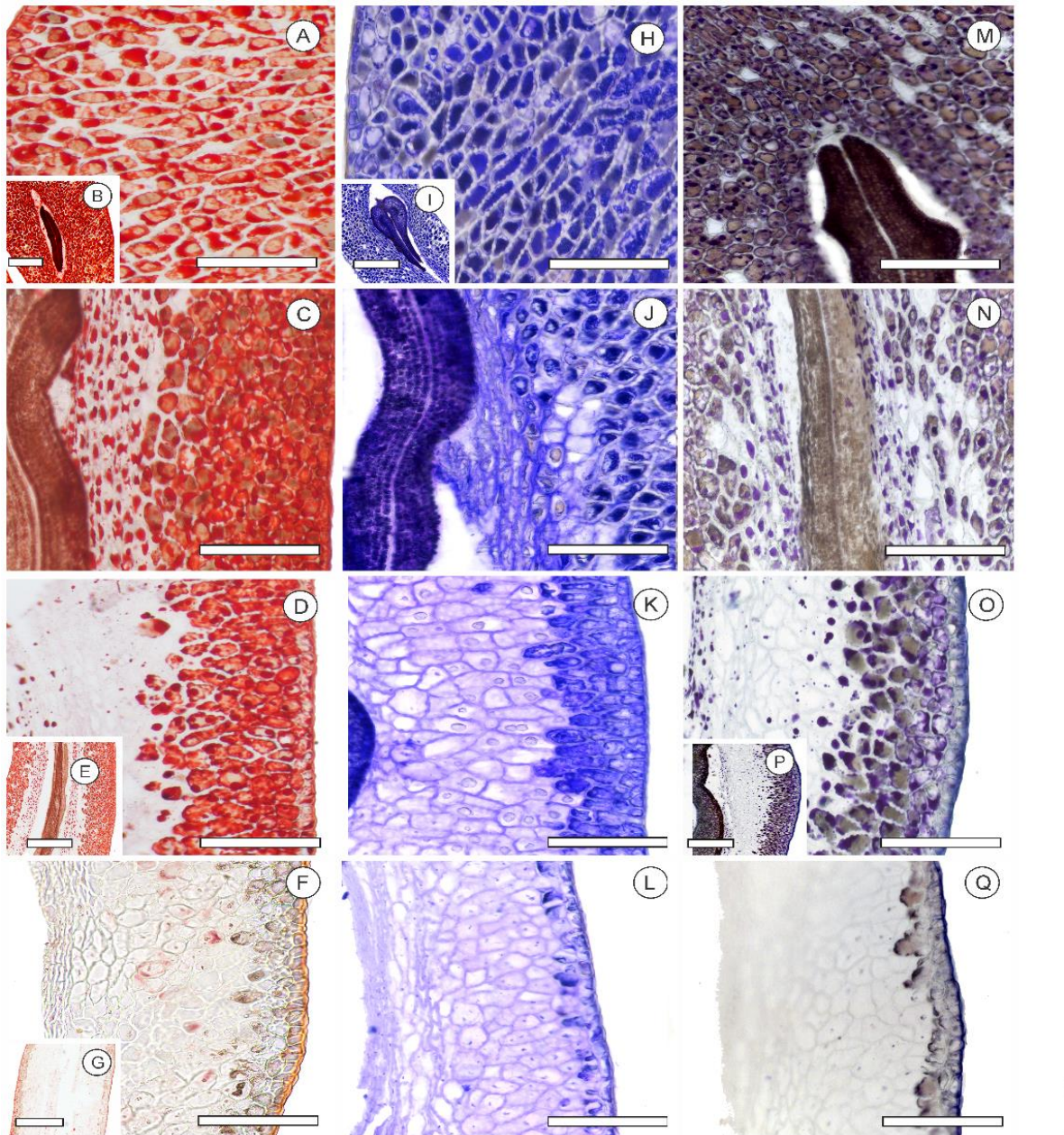


Figura 5: Seções transversais de sementes de café durante a germinação, lipídios (A-G), proteínas (H-L) e óleo resina (M-Q). Aos 0, primeira linha; 12, segunda linha; 33, terceira linha e 45 dias de embebição, quarta linha. Barras: imagens em maior destaque = 300 μm e em menor = 600 μm .

3.4 Ação enzimática durante a germinação

Para detectar possíveis alterações no metabolismo celular das sementes durante a germinação foram analisadas a expressão das enzimas malato desidrogenase (MDH) e superóxido dismutase (SOD). No perfil enzimático de MDH, observamos diferenças significativas na expressão durante a germinação das sementes de café. Maior expressão da MDH no controle e nos primeiros 12 dias de embebição ocorre para todos os tratamentos testados (Fig. 6A). Pouca ou nenhuma expressão dessa enzima é observada a partir dos 33 dias de embebição (Fig. 6A). Comportamento contrário ao apresentado pela SOD, onde a maior expressão é observada nos tempos mais avançados de embebição, aos 33 e 45 dias, enquanto aos 24 dias há pouca expressão, enquanto aos 0 e 12 a expressão é praticamente ausente (Fig. 6B).

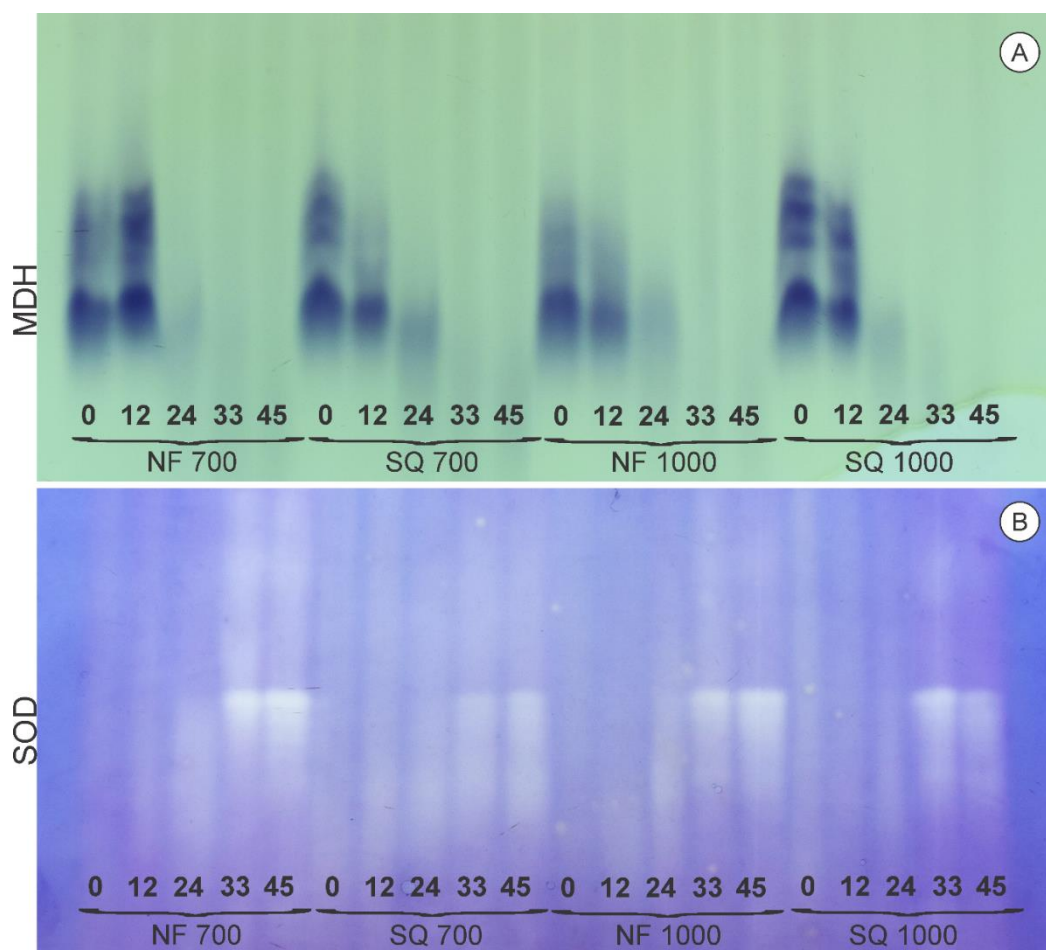


Figura 6: Padrões eletroforéticos de enzimas malato desidrogenase (A) e superóxido dismutase (B). Nas faces Soalheira Quente (SQ) e Noruega Fria (NF), em altitudes inferiores a 750 m e superiores a 900 m, durante os tempos 0, 12, 24, 33 e 45 dias de germinação.

4 DISCUSSÃO:

As sementes de café são semi-elípticas com formato oval, possuem um sulco na superfície plana, sendo coberta completamente pela película prateada (WATERS et al., 2017). O endosperma é constituído de células vivas com formato poliédricas (Fig. 2D), dividido em duas regiões, sendo que a mais externa é mais dura, enquanto a região próxima ao embrião é mais macia (WATERS et al., 2017). As paredes celulares do endosperma são constituídas de celulose, pectina e hemicelulose, como pode ser observado pelos testes histoquímicos (Fig. 2). Também contém proteínas e lipídios no citoplasma (DA SILVA et al., 2005; PRÉ et al., 2008; DA ROSA et al., 2010), além de óleo resina, compostos fenólicos e alcaloides (Fig. 1). Embora os testes com lugol não tenham identificado a presença de grânulos de amido nas sementes de café durante os tempos amostrados, a reação com PAS que ocorreu no citoplasma sugere tanto a presença de polissacarídeos neutros, de forma transitória, podendo ser o amido.

A presença dos carboidratos estruturais de parede é evidenciada com o teste de PAS pela coloração rosa (Fig. 2 D). Além disso, a coloração com Azul de toluidina reforça o resultado quanto a composição da parede celular das sementes (Fig. 2B). A coloração azulada evidencia a presença de celulose enquanto o aspecto translúcido está relacionado à presença marcante das hemiceluloses, que não se coram com toluidina, mas que tem papel estrutural e de reserva nas sementes de café. Isto é uma característica das sementes de café, as quais apresentam parte das reservas armazenadas nas paredes celulares do endosperma. Esses polissacarídeos de parede celular representam cerca de 48-60% do peso seco das sementes e consistem principalmente em galactomananos e proteínas de arabinogalacturonanas (CLIFFORD, 1985).

As formas regulares e bem delimitadas das gotas de lipídios encontrados sugerem que o café utilizado neste estudo tem potencial para uma bebida de boa qualidade, como sugerido por Goulart et al. (2007). Adicionalmente, verificou-se que essas reservas se encontravam bem distribuídas no endosperma e estavam presentes próximo a parede celular. Durante a torrefação, estes corpos lipídicos funcionam como uma barreira seletiva retendo parte dos compostos aromáticos formados pela pirólise durante o aquecimento, favorecendo a retenção do aroma, melhorando assim a qualidade do produto (GOULART et al., 2007; AGUIAR et al., 2005). As demais reservas, como as proteínas que são armazenados durante o final do desenvolvimento das sementes, são hidrolisadas e mobilizadas para o crescimento do embrião durante a germinação.

Semelhante ao descrito por Goulart et al. (2007) e Dedecca (1957), foi observado também que independente das condições de cultivo, as sementes de café apresentam grande quantidade de reservas no citoplasma e carboidratos estruturais na parede celular, além de compostos como óleo resina, compostos fenólicos e alcaloides (Fig. 3). Os compostos de reserva, como celulose, lipídios e proteínas são mobilizados durante a germinação das sementes, essa mobilização iniciou-se na região próxima ao embrião, facilitando o fornecimento de energia para seu crescimento (Fig. 3).

A germinação das sementes começa com a absorção de água e termina com a protrusão da radícula através dos tecidos que envolvem o embrião (BEWLEY et al., 2013), sendo uma consequência da interação concorrente entre o potencial de crescimento do embrião e a força mecânica limitante dos tecidos ao seu entorno (NAMBARA et al., 2010; ZHANG et al., 2014). Durante a germinação de sementes de café, foram descritas duas fases de enfraquecimento do endosperma (DA SILVA et al., 2004), que constitui a força mecânica dos tecidos ao redor do embrião. Durante a primeira fase, a água absorvida pelas paredes celulares do endosperma é gradualmente transmitida para o embrião, que aumenta seu potencial de pressão (DA SILVA et al., 2004, 2008), caracterizando seu potencial de crescimento. Gradualmente, a estrutura do endosperma é enfraquecida e suas paredes celulares são degradadas, isso ocorre para nutrir o embrião em crescimento.

Durante a segunda fase, o potencial de pressão do embrião é liberado e ocorre uma protuberância na região onde ocorrerá a protrusão da radícula (WATERS et al., 2017). Esse enfraquecimento da região do endosperma gera espaços vazios e reduz a integridade das células nessa região, permitindo a emissão da radícula ao mesmo tempo em que a mobilização dos compostos presentes tanto no citoplasma quanto nas paredes celulares fornecem energia para a divisão celular e alongamento das células do embrião. A hidratação das células que compõe o endosperma lateral das sementes de café ocorre de forma mais lenta que as células do endosperma micropilar, após os cinco primeiros dias de hidratação (DA SILVA et al., 2008).

De acordo com Da Rosa et al. (2010), a germinação *sensu stricto* de sementes de café ocorre após os sete dias de embebição, enquanto que para Camargo et al. (1998), ocorre aos nove dias, semelhante ao observado no presente estudo. Justificando assim, a maior mobilização das reservas observadas após a protrusão da radícula que ocorre aqui próximo aos dez e doze dias. Pouca mobilização dos compostos de reserva é observada aos seis dias de embebição, enquanto que aos 12 dias, a mobilização é mais evidente na região próxima ao embrião (Fig. 3). A mobilização de reserva após essa data provavelmente está ligada a protrusão

da radícula, necessitando de maior suprimento de energia para desenvolvimento da plântula. Observamos que aos 24 e 33 dias de embebição há maior mobilização das reservas e aos 45 dias as reservas estão praticamente ausentes no endosperma (Fig. 3 e 5). Semelhantemente ao descrito por Da Rosa et al. (2010), aos 24 e aos 33 dias as plântulas, apresentam bom desenvolvimento da raiz principal e de raízes secundárias, enquanto aos 45 dias as folhas cotiledonares se encontram expandidas (Fig. 4).

Até aos doze dias também há maior atividade da MDH (Fig. 6A) e provavelmente de outras enzimas relacionadas a quebra de reservas no início da embebição, o que contribui para a maior mobilização das reservas a partir dos 12 dias, uma vez que a protrusão da radícula é observada entre 10 e 12 dias de embebição. A maior parte do consumo energético ocorre em eventos de pós-germinação para suprir o desenvolvimento inicial antes das plântulas se tornarem autotróficas (MAYER & SHAIN 1974; BICALHO et al., 2016). Esta observação está de acordo com a cinética dos compostos de reserva observados para as sementes de café, nas quais a mobilização de reservas ocorre, após a germinação *sensu strictu*, quando os compostos, incluindo os de parede celular, foram degradadas para fornecer carboidratos para os tecidos em desenvolvimento (BEWLEY et al., 2013).

Reservas citoplasmáticas, como lipídios e proteínas, são mobilizadas mais rapidamente que os compostos presentes nas paredes celulares. Comportamento evidenciado pela manutenção da integridade da semente, principalmente da região tegumentar até próximo do fim das análises (Fig. 4 e Fig. 5D e 5K). Reservas mais acessíveis, como as proteínas, são necessárias para os primeiros eventos durante a germinação fornecendo esqueletos de carbono para formação de carboidratos de alto peso molecular, aminoácidos e enzimas (BEWLEY et al. 2013).

A utilização de reservas proteicas, seguidas pela utilização dos lipídios, antes da mobilização das reservas de parede celular também foi relatada em sementes de macaúba (BICALHO et al., 2016). Assim como mobilização precoce de reservas de proteínas em *B. capitata* (OLIVEIRA et al., 2013), as proteínas foram consideradas biomarcadores de germinação em eventos posteriores à fase inicial de embebição (NONOGAKI et al., 2010).

Uma redução rápida do conteúdo lipídico durante a germinação de sementes de *Helianthus annuus* L., também foi observada (MUNSHI et al., 2007). Essa redução, ocorre não só para o fornecimento de energia, mas também para o fornecimento de ácidos graxos usados para formação de lipídios de membrana para os embriões em crescimento (ABBADÉ e TAKAKI, 2012).

A germinação das sementes começa com a absorção de água durante a embebição e termina com a protrusão da radícula através do endosperma e do tegumento (BEWLEY et al., 2013). A protrusão da radícula, por sua vez, é resultado da interação concorrente entre o potencial de crescimento do embrião, proporcionada pelo alongamento e divisão celular e da força mecânica limitante dos tecidos da região da micrópila (NAMBARA et al., 2010; ZANG et al., 2014). O início do processo germinativo acontece a partir da embebição das sementes, que permite a retomada do metabolismo celular reduzido a partir de um período de latência após a colheita e secagem (MARCOS FILHO, 2005).

O suprimento de água permite a rápida recuperação do metabolismo celular durante a embebição, podendo gerar um estado redox inadequado para a sobrevivência das sementes (WEITBRECHTET al., 2011). Aumentando a concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que em excesso são nocivas, ao metabolismo celular. Porém, descobertas recentes sugerem que essas moléculas são sinalizadores envolvidos na ativação de processos que promovam germinação (EL-MAAROUF-BOUTEAU e BAILLY, 2008; GOMES e GARCIA, 2013). O que sugere, que o aumento na concentração de EROs no início da embebição é utilizada para facilitar a germinação, pois facilitam a degradação da parede celular e morte celular programada, processos fundamentais que regulam a protrusão radicular promovendo o afrouxamento dos tecidos da região da micrópila (ROSENTAL et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

Por outro lado, alterações posteriores no equilíbrio redox promovem o aumento da atividade de enzimas do estresse oxidativo, para retornar ao equilíbrio, fundamental para a atividade das enzimas do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (ATC) e da cadeia de transporte de elétrons (VAN DONGEN et al., 2011). Mantendo dessa forma, o metabolismo respiratório para quebra de reservas e fornecimento de energia para o crescimento do embrião e da plântula. A mudança no estado redox também reduz as ligações dissulfureto das proteínas através da atividade de tiorredoxina, essa modificação na proteína contribui para a degradação de compostos de reserva (ALKHALFIOUI et al., 2007) facilitando sua mobilização para suprir a germinação e o crescimento da plântula, pois essa modificação permite a degradação de amido e proteínas por promover a susceptibilidade as protease e amilases (ALKHALFIOUI et al., 2007).

A enzima malato desidrogenase (MDH), que pertence ao ciclo do ATC teve sua atividade aumentada no início da germinação, principalmente até aos 12 primeiros dias (Fig. 6A). Período no qual observamos o início da mobilização de reservas (Fig. 3, 4 e 5). Essa enzima além de

participar do ciclo ATC, participa da gliconeogênese (ALKHALFIOUI et al., 2007). Justificando sua maior atividade nos períodos iniciais da embebição, onde, considerando a umidade das sementes em torno de 35%, ainda há condições para atividade metabólica nos tecidos seminais.

Além disso, a MDH é um importante marcador enzimático positivamente relacionado com a respiração (DAY et al., 2004). A diminuição gradual na sua atividade pode resultar em diminuição da respiração, redução do metabolismo e pode ser associada ao envelhecimento de sementes (XIN et al., 2014). Neste caso sua maior atividade até aos 12 dias de germinação indica altas taxas respiratórias ligadas a quebra de reservas, enquanto sua menor expressão a partir de 24 dias indica menor necessidade da atividade dessa enzima, ou seja, menor relação dessa enzima com a quebra de reservas. Isto sugere a participação de outras enzimas, como a endo- β -mananase, α -galactosidases, poligalacturonases e pectinametilesterase que são hidrolases que contribuem para o enfraquecimento do endosperma micropilar (BEWLEY & BLACK, 1994; ZANG et al., 2014). Essas enzimas também atuam no enfraquecimento da parede celular mediante a mobilização de reservas armazenadas na parede, permitindo e ou contribuindo para a protrusão da radícula (ZHANG et al., 2014, BORGES et al., 2015).

A maior expressão de bandas da enzima SOD observada aos 33 e 45 dias após o início da germinação (Fig. 6B), pode ser atribuída tanto a maior atividade mitocondrial retomada durante a embebição quanto ao esgotamento das reservas. Esse esgotamento faz com que alterações metabólicas sejam necessárias para que a plântula se torne autotrófica. Uma vez que, durante a germinação a maior parte das EROs se formam devido a retomada do metabolismo respiratório, sendo a atividade da mitocôndria sua principal fonte (NOCTOR et al., 2007; GOMES e GARCIA, 2013). Isso ocorre porque os elétrons transportados pela cadeia de transporte de elétrons (ETC) possuem energia livre suficiente para reduzir diretamente o O_2 , principalmente nos complexos I e II que são as principais fontes de substrato da SOD. Portanto requerendo aumento em sua atividade para dismutar o O_2^- em H_2O_2 (RODRIGUEZ-SERRANO et al. 2009). Esse aumento da atividade da SOD, também pode se relacionar com o estresse causado pelo tempo de permanência das sementes nas condições de embebição. Essas condições de umidade e temperatura, permitem a manutenção do metabolismo alto e proliferação de microrganismos que aumentam o estresse celular das plântulas.

5 CONCLUSÕES

Semelhança dos compostos de reserva nas sementes produzidas nas diferentes condições de altitude e face de insolação avaliadas.

Durante a germinação de sementes de café, há intensa mobilização de todos os compostos presentes, começando a partir da região próxima ao embrião.

A mobilização das reservas citoplasmáticas ocorre primeiro, seguida das reservas presentes nas paredes das células do endosperma.

A maior mobilização ocorre após a protrusão radicular, a partir dos 12 dias e aos 33 dias pouca reserva é observada. Aos 45 dias as folhas cotiledonares se encontram expandidas e o sistema radicular composto por raiz principal e raízes laterais bem estabelecidos.

A mobilização de reservas citoplasmáticas e da parede celular refletem em alterações químicas e estruturais que contribuem para suprir a demanda energética e fornecer condições para o crescimento e desenvolvimento da plântula ainda associada à semente, durante a germinação.

6 REFERÊNCIAS

- ABBADE, L.C.; TAKAKI, M. Mobilization of reserves during germination of seeds of *Tabebuia roseo-alba* (Bignoniaceae) **Seed Science. & Technology**, 40, 259-264. 2012.
- AGUIAR, A.P.; CHIARELLO, A.G.; MENDES, S. L.; MATOS, E.N. Os Corredores Central e da Serra do Mar na Mata Atlântica brasileira. In: GALINDO-LEAL, C. & CÂMARA, I.G. (Eds.). **Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas**. Belo Horizonte: Fundação SOS Mata Atlântica Conservação Internacional. p. 119-132. 2005.
- ALKHALFIOUI, F.; RENARD, M.; VENSEL, W. H.; WONG, J.; TANAKA, C. K.; HURKMAN, W. J.; BUCHANAN, B. B.; MONTRICHARD, F. Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds. **Plant Physiology**. 144 1559–1579. 2007.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press. 445 p, 1994.
- BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3rd ed. New York: Springer. 392p. 2013.
- BICALHO, E. M.; MOTOIKE, S. Y.; BORGES, E. E. L.; ATAÍDE, G. M.; GUIMARÃES, V. M. Enzyme activity and reserve mobilization during Macaw palm (*Acrocomia aculeata*) seed germination. **Acta Botanica Brasilica** - 30(3): 437-444. 2016.
- BORGES, E. E. L.; FLORES, A. V.; ATAÍDE, G. M.; MATOS, A. C. B. Alterações fisiológicas e atividade enzimática em sementes armazenadas de *Melanoxylon brauna* Schott. **CERNE**. vol.21, n.1, pp.75-81.2015.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília. 398p. 2009.

BRUNDRETT, M. C.; KENDRICK, B.; PETERSON, C. A. Efficient lipid staining in plant material with sudan red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. **Biotechnic & Histochemistry**, vol. 66, p. 111-116, 1991.

CAMARGO, R. **Condicionamento fisiológico de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 108p. (Thesis). Universidade Federal de Lavras. Lavras/MG, Brazil. 1998.

CARVALHO, A. M. C. et al. Condicionamento fisiológico em matriz sólida de sementes de café (*Coffea arabica* L.) com e sem pergaminho. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 34, nº 1, p. 094 - 098, 2012.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids Coffee I. Chemistry. **Elsevier Applied Science Publisher**. London, 1985.

DAMATTA, F.M. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. **Field Crops Research**, v. 86, n. 2, p. 99-114, 2004.

DA ROSA, S.D.V.F.; MCDONALD, M.B.; VEIGA, A.D.; VILELA, F. de L.; Ferreira, I.A. Staging coffee seedling growth: a rationale for shortening the coffee seed germination test. **Seed Science and Technology**., 38, 421-431. 2010.

DA SILVA, E. A. A.; TOOROP, P. E.; VAN AELST, A. C.; HILHORST, H. W. M. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee *Coffea arabica* (cv. Rubi) seed germination. **Planta**. 220: 251-261. 2004.

DA SILVA, E. A. A.; TOOROP, P. E.; NIJSSE, J.; BEWLEY, J. D.; HILHORST, H. W. M. Exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination and cause cell death in the embryo. **Journal of Experimental Botany**. 56: 1029-1038. 2005.

DA SILVA, E. A. A.; TOOROP, P. E.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; HILHORST, H. W. M. ABA Inhibits Embryo Cell Expansion and Early Cell Division Events During Coffee (*Coffea arabica* 'Rubi') Seed Germination. **Annals of Botany**. 102: 425-433.2008.

DAVID, R.; CARDE, J. P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences Paris**. Série D 258, 1338–1340, 1964.

DAY, D. A.; MILLAR, A. H.; WHELAN, J. Plant mitochondria: from genome to function. In:GOVINDJEE, S.; THOMAS, D. editors. **Advances in photosynthesis and respiration**. Dordrecht: Kluwer Academic Press. p. 2–7. 2004.

DEDECCA, D.M. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. Typica Cramer. **Bragantia**, v.16, p.315-355, 1957.

EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; BAILLY, C. Oxidative signaling in seed dormancy and germination. **Plant Signal Behav**, 3: 1–8. 2008.

FISHER, D. B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie** 16, 92-96, 1868.

FURR, M.; MAHLBERG, P. G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products** 44, 153-159, 1981.

GOMES, M. P.; GARCIA, Q. S. Reactive oxygen species and seed germination. **Biologia** 68/3: 351—357, 2013.

GOULART, P. F. P.; ALVES, J. D.; DE CASTRO, E. M.; FRIES, D. D.; MAGALHÃES, M. M.; DE MELO, H. C. Aspectos histoquímicos e morfológicos de grãos de café de diferentes qualidades. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.662-666. 2007.

HUGHES, J.; MCCULLY, M. E. The use of an optical brightener in the study of plant structure. **Stain Technology** 50, 1037-1041, 1975.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 198 p. 1997.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005.

MAYER, A. M.; SHAIN, Y. Control of seed germination. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, n.1, p.167-173, 1974.

MUNSHI, S.K.; SANDHU, S.; SHARMA, S. Lipid composition in fast and slow germinating sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. **General and Applied Plant Physiology**, 33, 235-246. 2007.

NAMBARA, E.; OKAMOTO, M.; TATEMATSU, K.; YANO, R.; SEO, M.; KAMIYA, Y. Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. **Seed Science Research**. 20 55–67. 2010.

NOCTOR, G.; DE PAEPE, R.; FOYER, C. H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. **Trends in Plant Science** 12, 125–134. 2007.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLY, J. D. Germination still a mystery. **Plant Science** 179: 574-581. 2010.

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. (Termarcaphi PTY. LTD: Melbourne). 1981.

O'BRIEN, T.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **O Protoplasma** 59, 367-373, 1964.

OLIVEIRA, N. C. C.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; MERCANDANTE-SIMÕES, M. O.; OLIVEIRA, L. A. A.; SILVÉRIO, F. O. Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**. v.27, Issue 6, pp 1633–1645. 2013.

OTEGUI, M. S. HERDER, R.; SCHULZE, J.; JUNG, R.; STAEHELIND, LA. The Proteolytic Processing of Seed Storage Proteins in Arabidopsis Embryo Cells Starts in the Multivesicular Bodies. **The Plant Cell**, Vol. 18, 2567–2581. 2006.

PRÉ, M.; CAILLET, V.; SOBILO, J.; McCARTHY, J. Characterization and expression analysis of genes directing galactomannan synthesis in coffee. **Annals of Botany**. 102(2):207–220. 2008.

REIS, P. R. et al. Manejo integrado das pragas do cafeeiro. In: REIS, P. R.; CUNHA, R. L. da (Ed.). **Café arábica: do plantio à colheita**. Lavras: EPAMIG Sul de Minas, p. 573-688, 2010.

RODRIGUEZ-SERRANO M.; ROMERO-PUERTAS M. C.; PAZMINO D. M.; TESTILLANO P. S.; RISUENO M. C.; DEL RIO L. A.; SANDALIO, L. M. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. **Plant Physiology** 150 229–243 10.1104/pp.108.131524. 2009.

ROSENTAL, L.; NONOGAK, H.; FAIT, A. Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. **Seed Science Research**. V.24. pp 1 - 15. 2014.

RUBIM, R. F. et al. Tratamento com hipoclorito de sódio para remoção do pergaminho e aceleração da germinação de sementes de café conilon. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 4, p.88-98, 2010.

SILVA, F. M. da. **Colheita mecanizada e seletiva do café: cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade**. Lavras: Ufla/Faepe, 75 p, 2004.

VAN DONGEN, J. T.; GUPTAA, K. J.; RAMÍREZ-AGUILAR S. J.; ARAÚJO, W. L.; NESI, A. N.; FERNIE, A. R. Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways. **Journal of Plant Physiology**, v.168, p.1434-1443, 2011.

WATERS, D. M.; ARENDT, E. K.; MORONI, A. V. Overview on the mechanisms of coffee germination and fermentation and their significance for coffee and coffee beverage quality, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 57:2, 259-274. 2017. DOI:10.1080/10408398.2014.902804

WEITBRECHT, K.; MÜLLER, K.; LEUBNER-METZGER, G. First off the mark: early seed germination. **Journal of Experimental Botany**. 2011.

XIN, X.; TIAN, Q.; YIN, G.; CHEN, X.; ZHANG, J.; NG, S.; LU, X. Reduced mitochondrial and ascorbate–glutathione activity after artificial ageing in soybean seed. **Journal of Plant Physiology**. 140– 147. 2014.

ZANG, Y.; CHEN, B.; XU, Z.; SHI, Z.; CHEN, S.; HUANG, X.; CHEN, J.; WANG, X. Involvement of reactive oxygen species in endosperm cap weakening and embryo elongation growth during lettuce seed germination. **Journal of Experimental botany**, Vol. 65, No. 12, pp. 3189–3200, 2014.

ZHANG Y, CHEN B, XU Z, SHI Z, CHEN S, HUANG X, CHEN J, WANG X. Involvement of reactive oxygen species in endosperm cap weakening and embryo elongation growth during lettuce seed germination. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 65, No. 12, pp. 3189–3200, 2014.

ZONTA, J. B.; ARAÚJO, E. F.; ARAÚJO, R. F.; REIS, M. S.; ZONTA, F. M. G. Teste lercafé para sementes de cafeeiro com diferentes teores de água. **Revista Brasileira de Sementes**, Viçosa, MG, v.32, n.1, p. 17-23, 2010.