

CRISTIANA DE NORONHA BEGNAMI

ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS, ULTRAESTRUTURAIS E
BIOQUÍMICAS DURANTE A PERDA DE
VIABILIDADE EM SEMENTES DE
Coffea arabica cv. CATUAÍ VERMELHO

VOLUME 1

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Cristiana de Noronha Begnami
e aprovada pela Comissão Julgadora
02/12/98 H. Dolder

Orientador: Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Campinas - SP

1998

B394a
v.1
36550/BC

CM-00120932-7

1. Café. 2. Sementes-viabilidade. 3. Ultraestrutura. I. Dolder, Mary Anne Heidi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 02 de dezembro de 1998

BANCA EXAMINADORA

Titulares

Profa Dra. Mary Anne Heidi Dolder (Orientadora)

M. A. H. Dolder

Prof. Dr. Ivany Ferraz Marques Válio

I. F. M. Válio

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo

A. L. Cortelazzo

Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima

E. W. Kitajima

Profa. Dra. Márcia Regina Braga

M. R. Braga

Suplentes

Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato

Profa. Dra. Telma Regina Gabriel da Silva

T. R. G. da Silva

Aos meus pais, Selvílio (in memorian) e Lucila,
por todo apoio, carinho e compreensão
e ao meus filhos Frederico e Helena
por tudo o que significam para mim.

AGRADECIMENTOS

Em todas as fases da elaboração deste trabalho, contei com o apoio de pessoas e instituições. Deste modo agradeço a todos os que colaboraram, de forma direta e indireta, ao longos destes anos de trabalho, especialmente:

- A Profa. Dra. Mary Anne Heide Dolder, pela sua orientação, apoio e incentivo nos momentos difíceis;

- Ao Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo, pela amizade, incentivo constante e as valiosas sugestões feitas durante a pré-banca;

- Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera, pelo auxílio prestado em vários momentos durante a elaboração deste trabalho, e pelas valiosas sugestões feitas durante a pré-banca;

- Ao Prof. Dr. Elliot Kitajima, pela leitura crítica e sugestões durante a pré-banca;

Ao Instituto Agronômico de Campinas - IAC, pelo fornecimento das sementes de café;

Ao NAP/MEPA (Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária) - ESALQ, na pessoa do Prof. Dr. Elliot Kitajima, pela permissão do uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão;

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP - Botucatu, na pessoa da Profa. Dra. Eliza A. Gregório, pela permissão do uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão;

Ao Departamento de Química Aplicada - IQ - UNICAMP, na
pessoa do Prof. Dr. Fernando Galenbek, pela permissão do uso
do Microscópio Eletrônico de Transmissão;

Ao Dr. Marco Antônio Teixeira Zullo, da Seção de
Fitoquímica - IAC, pela quantificação e análise dos
lipídios;

Ao CERMAV (Centre de Recherches sur les Macromolécules
Végétales) por ter possibilitado a realização das análises
de carboidratos.

Aos professores e funcionários do Departamento de
Biologia Celular, sempre solícitos em ajudar;

A Isabel e Cláudia, amigas de todas as horas;

Aos meus irmãos, pelo amor e apoio irrestritos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado.

ÍNDICE

Resumo.....	i
Summary.....	iv
1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	14
3. Material e métodos.....	15
3.1. Material vegetal.....	15
3.2. Condições de estocagem.....	15
3.3. Determinação do conteúdo de água das sementes...	15
3.4. Teste de Germinação.....	16
3.5. Análise Citoquímica.....	17
3.5.1. Fixação e processamento.....	16
3.5.2. Hematoxilina -Floxina.....	18
3.5.3. Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0.....	18
3.5.4. Xylidine Ponceau (XP) a pH 2,5.....	18
3.5.5. Método do PAS.....	19
3.5.6. Microscopia de Polarização.....	19
3.6. Análise Ultraestrutural.....	20
3.6.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	20
3.6.2. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	21
3.7. Análises Bioquímicas.....	21
3.7.1. Carboidratos: Polissacarídeos.....	21
3.7.2. Lipídios.....	23

4. Resultados.....	25
4.1. Determinações da massa e conteúdo de água.....	25
4.2. Germinação.....	25
4.3. Análises estrutural e ultraestrutural.....	27
4.3.1. Célula parenquimática de estocagem.....	27
4.3.2. Embrião.....	35
4.4. Análises Bioquímicas.....	43
4.4.1. Carboidratos: Polissacarídeos.....	43
4.4.2. Lipídios.....	44
5. Discussão.....	51
5.1. Germinação.....	51
5.2. Aspectos estruturais e ultraestruturais.....	53
6. Conclusões.....	81
7. Referências Bibliográficas.....	85

RESUMO

No presente trabalho, a perda de viabilidade de sementes de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho hidratadas e após estocagem em condições dessecantes foi estudada através do emprego de vários métodos citoquímicos, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão, bem como análises bioquímicas de algumas de suas reservas. Estas técnicas foram utilizadas a fim de se verificar as alterações estruturais, ultraestruturais e bioquímicas que ocorrem durante a perda de viabilidade das sementes estocadas em condições dessecantes. As sementes de café tornaram-se completamente inviáveis após 9 meses de estocagem, quando apresentavam um conteúdo de umidade igual a 8,95%.

A análise citoquímica relevou paredes celulares metacromáticas nas células parenquimáticas do endosperma, cotiledonares e do eixo embrionário, e esta metacromasia diminuiu apenas nas células do endosperma. As paredes celulares do endosperma de sementes viáveis são birrefringentes. Com a perda de viabilidade verificou-se uma diminuição desta birrefringência, indicando que alterações estruturais e bioquímicas estão relacionadas com o processo. A análise ao microscópio eletrônico de varredura mostrou, no

endosperma de sementes inviáveis, separação de paredes celulares adjacentes e ruptura parcial ou total das fibrilas que as compõem; já as paredes celulares das células do embrião de sementes inviáveis apresentaram-se retraídas. O microscópio eletrônico de transmissão revelou paredes celulares das células parenquimáticas mais finas e dissociação das microfibrilas que constituem a parede secundária. As paredes celulares das células cotiledonares são retraídas e as do eixo embrionário apresentaram aspecto vacuolizado. No entanto, a dosagem bioquímica não revelou uma diminuição significativa dos polissacarídeos das paredes celulares.

Foi detectada nas células do endosperma de sementes inviáveis uma alteração no estado de agregação e no padrão de distribuição do material protéico, com aparente redução desta reserva. Ocorreu ainda, nas sementes inviáveis como um todo, uma maior deposição de polifenóis, principalmente no espaço perimembranoso. Outra alteração ultraestrutural observada foi o aumento no número de vacúolos nas células do endosperma e do embrião, decorrente da perda de viabilidade. Nas células do embrião observou-se uma degeneração do citoplasma, onde os glóbulos de lipídios tornaram-se confluentes. A análise bioquímica dos ácidos graxos do embrião revelou uma diminuição de ácido linoléico e um aumento de ácido palmítico. As células do eixo embrionário

de sementes inviáveis apresentaram membranas rompidas, levando a perda da integridade dos compartimentos celulares e total dissolução de sua estrutura citoplasmática. Sementes de *C. arabica* inviáveis apresentaram núcleos com compactação crescente da cromatina e alguns núcleos picnóticos foram observados tanto nas células do endosperma como nas células do embrião. Nas células cotiledonares a cromatina está condensada e vacuolizada, e no eixo o nucléolo não foi observado.

SUMMARY

In this study, the viability of seeds of *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho were analyzed in a fresh hydrated state or after drying during storage. Various methods, including cytochemistry, scanning and transmission electron microscopy, as well as biochemical analysis of some of the seed's reserves. These techniques were used to identify any structural, ultrastructural and biochemical alterations which might occur during viability loss for seeds stored in drying conditions. These seeds became completely inviable after nine months of storage, with a humidity content of 8,95%.

Cytochemical analysis revealed metachromatic cell walls for the parenquimal cells of the endosperm, the cotyledons and the embryonic axis, and the metachromasy diminished only in the endosperm cell walls. The endosperm cell walls are birrefringent and with the loss of viability, the birrefringence diminished, indicating biochemical and structural alterations during this period. Scanning electron microscopy showed the separation of adjacent cell walls and the partial or total rupture of fibrils which were retracted in inviable seeds. The transmission electron microscope revealed parenquimal cells with thinner walls and

dissociated fibrils in the secondary cell wall. The walls of cotyledon cells are retracted while those of the embryo appear to be vacuolized. However, biochemical dosage did not reveal a significant reduction of cell wall polysaccharides.

In endosperm cells of inviable seeds, no alteration of the aggregation and distribution of protein was detected with apparent loss of this reserve component. In general, a higher phenolic content was found especially in the perimembrane space of inviable seed endosperm. Another ultrastructural modification observed was the increase in number of vacuoles in the endosperm and embryo, with loss of viability. In embryonic cells there is a degeneration of the cytoplasm with confluence of the lipid globules. Biochemical analysis of the embryo's fatty acids revealed a loss of linoleic acid and an increase of palmitic acid. The embryonic axis cells of inviable seeds have ruptured membranes which destroy the integrity of the cell compartments and disorganize their cytoplasmic structure. In viable *C. arabica* seeds presented nuclei with progressively more compacted chromatin and a few pyknotic nuclei were observed in both endosperm and embryo cells. In cotyledon cells, the chromatin is condensed and vacuolized, while the nucleolus was not observed in the embryonic axis.

1. INTRODUÇÃO

As primeiras referências botânicas sobre o café datam do século XVI. Inicialmente, o café foi considerado fruto de diferentes famílias (*Celastraceae*, *Rutaceae*, *Oleaceae*) e, em 1753, Linneu descreveu a única espécie conhecida, dando-lhe o nome de *Coffea arabica* e classificando-a na família *Rubiaceae* (Carvalho, 1946).

O fruto do café é uma drupa, normalmente contendo duas sementes. As sementes são elípticas, plano-convexas, possuindo um sulco longitudinal sobre a superfície plana. A casca da semente é representada por um pergaminho argênteo que ontogeneticamente origina-se do integumento do óvulo. O endosperma é formado por células poliédricas que apresentam paredes celulares muito espessas. Este espessamento é devido à presença de uma hemicelulose que desempenha um importante papel de reserva. O endosperma é classificado em endosperma duro, que fica na periferia do grão e endosperma mole, que apresenta células alongadas e localiza-se próximo ao eixo hipocótilo-radicular. O embrião é pequeno e localiza-se na base da semente, sendo representado pelo hipocótilo e dois cotilédones cordiformes. Muito raramente encontram-se embriões com três ou quatro cotilédones (Dedeca, 1959).

Uma das características morfológicas que distingue a maioria dos grãos de café da maioria dos outros grãos

oleaginosos é a espessura das suas paredes celulares. Elas são maciças e de aspecto nodular característico, o que indica a presença de material de reserva nesta estrutura (Dentan, 1985b).

As células parenquimáticas do endosperma constituem a parte essencial do grão de café. São células de estocagem do material de reserva do grão. No seu citoplasma são encontrados lipídios, proteínas, carboidratos e quantidades significativas de cafeína, ácido clorogênico e sais minerais (Dedeca, 1959; Clifford, 1985; Poisson, 1979; Dentan, 1985b).

As principais substâncias de reserva de sementes são carboidratos, proteínas e lipídios. A proporção com que cada composto de reserva é encontrado, pode variar de forma intraespecífica ou mesmo interespecífica. Assim, podemos classificar as sementes em dois grupos aquelas cujas principais reservas são carboidratos e proteínas e aquelas que armazenam principalmente lipídios e proteínas (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989).

Os carboidratos podem ser armazenados na forma de amido, que é a principal reserva de sementes de algumas plantas cultivadas, como trigo, arroz, milho e feijão (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989). Em outras espécies, como em sementes de *Coffea* spp, os principais carboidratos de reserva não são formados por amido. São constituídos principalmente por mananos, galactomananos e xiloglicanos. Mananos são também encontrados no endosperma de algumas espécies de *Palmae*,

Umbeliferae e Leguminosae; os galactomananos são bastante abundantes no gênero *Lupinus*, enquanto que os xiloglicanos são encontrados principalmente em cotilédones de sementes de Caesalpinaceae (Meier & Reid, 1982).

Os carboidratos representam 50-60% das reservas do grão verde de café (Wolfrom et al., 1960), e, por hidrólise, são obtidos os monossacarídeos glicose, manose, galactose, arabinose e pequenas quantidades de ramnose e xilose (Wolfrom et al., 1961). Apenas pequenas quantidades de amido são detectadas (Clifford, 1985) em vacúolos localizados no centro das células parenquimáticas, próximos aos lipídios (Dentan, 1985b).

Em sementes de café, os principais polissacarídeos de reserva estão incrustados à parede celular. A parede é formada por microfibrilas de celulose embebidas em uma matriz constituída por lignina, pectina e hemicelulose. Esses polímeros estão intimamente associados através de ligações covalentes (Clifford, 1985). A celulose ocorre na forma fibrilar, desempenhando um papel estrutural que fornece um esqueleto para a parede celular (Bradbury & Halliday, 1987). Hemicelulose é o componente dominante da parede celular, ocorrendo na parede primária e secundária dos grãos verdes, englobando um grande número de heteroglicanos. Em grãos verdes, a hemicelulose dominante é um arabinogalactano, que possui resíduos de arabinofuranose unidos por ligação β 1-3,

apresentando cadeias laterais curtas de galactose (Wolf from & Patin, 1965; Bradbury & Halliday, 1990).

Substâncias pécnicas constituem cerca de 1 a 4% dos componentes da parede primária e lamela média, sendo formadas por uma combinação química de galactanos, arabinanos e galacturanos (Clifford, 1985).

O principal polissacarídeo de reserva é um galactomanano cristalino que ocorre incrustado nas microfibrilas de celulose, podendo também desempenhar um papel estrutural em grãos verdes de *C. arabica*. Este galactomanano possui mananos β 1-4 com 2% de galactoses unidas por ligação α 1-6, formando cadeias laterais curtas (Clifford, 1985). O comprimento médio da cadeia deste galactomanano é de aproximadamente 45 resíduos, o que corresponde a uma massa molecular de cerca de 7.300 (Wolf from et al., 1961). Este polissacarídeo está localizado na parede celular secundária e é mobilizado durante o processo de germinação (Thaler, 1975; Clifford, 1985; Bradbury & Halliday, 1990).

Em sementes, as proteínas de reserva geralmente encontram-se armazenadas em organelas celulares denominadas corpos protéicos, que são delimitados por uma membrana simples (Pernollet, 1982). Em sementes de café, as proteínas são encontradas tanto em corpos protéicos, como difusas no citoplasma (Dentan, 1985b).

De acordo com Thaler (1975), aproximadamente um terço das proteínas do grão verde são encontradas associadas com

arabinogalactanos da parede celular, possuindo alto conteúdo de hidroxiprolina (Eskin, 1979). Além das proteínas associadas às paredes celulares também são detectadas proteínas que permanecem livres no citoplasma. Uma outra classe de proteínas encontradas em grãos verdes de café são aquelas contidas em corpos protéicos, por exemplo, importantes enzimas como a polifenoloxidase (Clifford, 1985).

Os lipídios estão normalmente presentes nas sementes na forma de triacilglicerídeos ou lipídios neutros. São também encontrados nas sementes fosfolipídios, glicerídios e esteróides que podem ter função estrutural ou metabólica nas membranas celulares (Mayer & Poljakoff, 1989; Bewley & Black, 1978; Slabas et al., 1988).

Os corpos lipídicos são a forma de armazenamento dos lipídios citoplasmáticos. Nestes, o principal lipídio presente é o triacilglicerol, embora sejam detectadas pequenas quantidades de diacilgliceróis e ácidos graxos livres (Huang, 1992).

O tamanho dos corpos lipídicos não muda durante o desenvolvimento da semente, sendo o acúmulo de triacilgliceróis acompanhado por um aumento no número de corpos lipídicos. Essas organelas são geralmente delimitadas por uma membrana simples, que também contém fosfolipídios e proteínas denominadas oleosinas (Ohlrogge & Browse, 1995).

Os lipídios representam cerca de 14% das reservas da semente de *Coffea arabica* (Wurziger et al., 1977). Eles

distribuem-se de forma homogênea ao longo do grão (endosperma, embrião e cotilédones), apresentando uma distribuição típica de sementes oleaginosas. Organizam-se na forma de pequenos glóbulos, localizados próximos à membrana plasmática, formando uma camada de espessura variável. Esta camada lipídica está envolvida por uma matriz protéica (Dentan, 1985b).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um componente importante da semente de café. Nas variedades de *C. arabica*, o teor é de aproximadamente 1,2% (Mazzafera, 1990). É encontrada livre no citoplasma ou ligada à parede celular (Zuluaga-Vasco & Tabacchi, 1975; Pfrunder et al., 1980). A cafeína pode ainda estar associada ao ácido clorogênico (Horman & Viani, 1971). Este dado seria então consistente com a localização citoplasmática sugerida por Dentan (1985b) para este complexo. A cafeína estaria conjugada ao ácido clorogênico formando depósitos entre a membrana plasmática e a parede celular.

Toda semente apresenta um conteúdo de umidade que varia em função da espécie e do tipo de reserva presente (Harrington, 1972). No entanto, esse conteúdo sofre oscilações de acordo com as variações de umidade relativa do ar no armazém (Lopes, 1990). Períodos prolongados de estocagem, em condições não ideais de temperatura e umidade, provocam, além da perda da capacidade germinativa e vigor, danos que podem conduzir à morte celular.

Os primeiros sintomas do envelhecimento das sementes são: atraso na germinação, redução na taxa de germinação,

incapacidade de germinar nos extremos de seu limite ambiental, maior susceptibilidade ao ataque por microrganismos nesses extremos, crescimento diminuído, mudança na cor, aumento no número de plântulas anormais e baixa sobrevivência no campo, determinando baixa produtividade (Ching & Schoolcraft, 1968; Delouche, 1968; Harrington, 1972; Grange, 1980).

Inúmeras teorias têm procurado explicar o envelhecimento das sementes. Fatores externos, tais como ataque por fungos e irradiação, além de fatores internos, tais como perda de vitaminas e/ou hormônios, acúmulo de componentes tóxicos, degradação de ácidos nucleicos, proteínas e membranas (Villiers, 1983; Cheah & Osborne, 1978; Parrish & Leopold, 1978; Priestley, 1986; Rao et al., 1988; Begnami, 1991) e peroxidação de lipídios (Simon, 1974; Hartman & Mattick, 1976; Priestley & Leopold, 1979; Priestley et al., 1980; Stewart & Bewley, 1980; Powell & Matthews, 1981; Wilson & McDonald, 1986; Puntarulo & Boveris, 1990) parecem estar envolvidos no fenômeno.

Associada a estes processos, já foi relatada progressiva perda da integridade da membrana plasmática, o que é demonstrada pela perda de eletrólitos do citoplasma para o meio externo, quando as sementes são colocadas em água (Abdul-Baki & Anderson, 1970; Pandey, 1989a; 1989b; Lopes, 1990). Inúmeros autores têm proposto que a perda da integridade das membranas seja decorrente da peroxidação de seus ácidos graxos insaturados e formação de radicais livres (Parrish & Leopold,

1978; Priestley & Leopold, 1979; Priestley et al., 1980; Osborne, 1983; Gidrol et al., 1988; Lopes, 1990).

Também foram detectadas em sementes envelhecidas, perda da integridade de RNAm pré-existente no embrião, responsável pela síntese protéica nas primeiras horas de embebição (Blowers et al., 1980; Osborne, 1983; Gidrol et al., 1988; Petruzzelli & Taranto, 1989) e alterações na atividade de certas enzimas (Puntarulo & Boveris, 1990). Sementes inviáveis de centeio apresentaram diminuição da síntese protéica e deficiência na síntese de moléculas de RNA de baixa massa molecular (4-5S), sugerindo a ocorrência de lesões bioquímicas em componentes do sistema de síntese protéica e de RNA (Osborne, 1983).

Sementes com baixa viabilidade apresentam fragmentação do DNA nuclear e ativação de DNases. A perda de integridade do DNA pode ser responsável por aberrações cromossômicas e diminuição do processo de transcrição (Cheah & Osborne, 1978). Alterações do núcleo e nucléolo, com compactação crescente da cromatina e desagregação do nucléolo foram detectadas em sementes inviáveis (Villiers, 1983; Lopes, 1990; Begnami, 1991; Begnami & Cortelazzo, 1996) e em cotilédones em processo de abscisão (Cortelazzo, 1989).

Um outro evento que ocorre em sementes envelhecidas é a diminuição da atividade respiratória, limitando os processos de síntese (Parrish & Leopold, 1978; Leopold & Musgrave, 1980; Woodstock et al., 1984; Amable & Obendorf, 1986; Ferguson et al., 1990). Este fenômeno pode estar relacionado com a menor

organização das membranas. Associadas a esta alteração estão a perda de atividade de desidrogenases mitocondriais (Pandey, 1989a) e reduzidas taxas de síntese de ATP, com diminuição dos passos metabólicos da síntese protéica dependentes de ATP e GTP (Roberts & Osborne, 1973).

Também foi observada a degradação e fusão dos corpos protéicos em sementes de *Phaseolus vulgaris* e *Senna reticulata* submetidas ao envelhecimento acelerado (Begnami, 1991; Begnami & Cortellazzo, 1996)

Estudos ultraestruturais de diferentes tecidos vegetais submetidos a estresse hídrico e senescência revelaram uma deterioração geral na organização celular, através de uma retração dos cloroplastos e tilacóides (Viera da Silva et al., 1974; Giles et al., 1976), retração mitocondrial e acúmulo de material elétron denso no seu interior e finalmente perda da estrutura mitocondrial (Fellows & Boyer, 1978; Platt-Aloia & Thomson, 1985; Chabot & Leopold, 1985, Rossetto, 1997). A alteração ultraestrutural que pareceu culminar com a morte celular foi a vesiculação e perda da integridade do tonoplasto e/ou membrana plasmática (Ciamporova, 1976; Thomson & Platt-Aloia, 1982; Fellows & Boyer, 1978, Rossetto, 1997).

Com respeito a viabilidade, as sementes podem ser classificadas como sementes ortodoxas ou recalcitrantes. Sementes ortodoxas são aquelas que podem secar naturalmente na planta mãe atingindo um conteúdo de umidade relativamente baixo (20% ou menos). Sementes com esta umidade podem ser colhidas e

secas até conteúdos de umidade que variam de 5 a 1% sem sofrer danos, podendo ser armazenadas neste estado sem perda da sua capacidade germinativa e vigor por longos períodos de tempo. A longevidade dessas sementes depende principalmente da temperatura e conteúdo de umidade durante a estocagem (Roberts, 1973).

A temperatura e umidade são considerados como os principais fatores determinantes da perda total ou parcial da viabilidade (Ellis et al., 1987). Segundo Harrington (1972), em sementes ortodoxas, para um aumento de 1% na umidade, a semente tem sua vida reduzida à metade, isto dentro de uma faixa de 5 a 14% de umidade. Do mesmo modo, um acréscimo de 5°C na temperatura reduz pela metade a viabilidade da semente, sendo esta regra válida na faixa de 0 a 50°C.

Sementes recalcitrantes não secam na planta de origem, e apresentam um valor crítico relativamente alto para o seu conteúdo de umidade, morrendo abaixo desse valor. Essas sementes apresentam longevidade curta mesmo quando armazenadas sob condições de alta umidade relativa (Roberts, 1973). Sementes recalcitrantes são produzidas por algumas espécies aquáticas, muitas espécies que possuem sementes grandes e provavelmente muitas árvores frutíferas tropicais (Roberts & King, 1980). Além disso, muitas sementes recalcitrantes economicamente importantes são de espécies tropicais perenes, como por exemplo, café, cacau, borracha e algumas palmeiras (Roberts & King, 1980).

Sementes ortodoxas e recalcitrantes com conteúdo de umidade elevado são susceptíveis à injúria de congelamento em temperaturas abaixo de 0°C. Sementes ortodoxas com 20% de umidade ou mais sofrem este tipo de injúria, mas, como estas sementes podem ser secas até conteúdos de umidade baixos, elas podem ser congeladas, nesta condição, em uma temperatura de até menos 196°C, sem sofrer injúria (Stanwood & Bass, 1978).

Como sementes recalcitrantes não podem ser secas sem que se tornem inviáveis, elas não podem ser congeladas sem que sofram injúria de congelamento. Além deste fato, algumas espécies tropicais, como manga e cacau, são susceptíveis a injúrias de resfriamento quando em temperaturas entre 10 a 15°C (Roberts & King, 1980).

King & Roberts (1979) classificaram sementes de café como recalcitrantes, mas Roberts et al. (1984) sugeriram que elas não apresentariam um comportamento totalmente recalcitrante sendo portanto ortodoxas. Esta dúvida surgiu a partir de estudos com sementes ortodoxas de *Lactuca sativa* L. (alface) totalmente hidratadas, que apresentaram uma grande longevidade (Villiers & Edgcumbe, 1975). Conteúdos de umidade intermediários levam a uma diminuição da longevidade destas sementes (Ibrahim et al., 1983). Comparações destes resultados com aqueles obtidos por Vossen (1979) para sementes de café estocadas com 10 até 40% de umidade, em que sementes com conteúdos de umidade intermediários deterioraram mais

rapidamente, indicavam uma similaridade de resposta entre essas duas plantas cultivadas.

Sementes de café estocadas em várias condições de umidade apresentaram respostas semelhantes àsquelas encontradas para sementes ortodoxas. A longevidade de sementes de café estocadas com 10 e 20% de umidade foi inversamente proporcional ao conteúdo de umidade (Bacchi, 1958). Bendana (1962) não observou perda de viabilidade quando sementes foram estocadas com 5% de umidade, ao passo que Bacchi (1955, 1956) e Huxley (1964) observaram perda de viabilidade em sementes com menos de 8% de umidade. Sementes de *Coffea arabica* com aproximadamente 10% de umidade não perderam sua viabilidade quando estocadas, em condições herméticas, durante 12 meses, a 15°C, mas sementes estocadas em temperatura de congelamento e com conteúdos de umidade menores que 10%, mostraram rápida perda de viabilidade. Estes resultados não são esperados para sementes ortodoxas, que se mantêm viáveis com conteúdos de umidade de 2-8% e em temperatura de congelamento (Ellis et al., 1990).

A viabilidade de sementes de *Coffea arabica* também diminui rapidamente após 2 (robusta) e 6 (arábica) meses de estocagem à temperatura ambiente. Estas sementes têm seu período de estocagem aumentado para 1 ano quando são estocadas com 40-45% de umidade relativa (pergaminho úmido). Vossen (1979) demonstrou que sementes com pergaminho úmido (40-41% de umidade relativa) e alta viabilidade (80% de germinação) podiam ser estocadas por 30 meses em sacos de polietileno, à temperatura

variando entre 15 a 19°C. Temperaturas menores que 10°C e conteúdos de umidade de 13-15% resultaram em rápida perda de viabilidade.

Estes resultados conflitantes dificultam a classificação das sementes de café como recalcitrantes ou ortodoxas. Elas não satisfazem completamente as definições de sementes recalcitrantes, porque sobrevivem mais à dessecação; nem de ortodoxas, porque a redução no conteúdo de umidade e temperatura aumentam a taxa de deterioração das sementes

Um aspecto que deve ser levado em consideração é a impossibilidade de se conseguir estocar sementes de café por longos períodos de tempo, dificultando a manutenção de estoques para um eventual atendimento emergencial. Com isso, a prática mais adotada pelos viveiristas é a de realizar semeaduras logo após a colheita (Silva & Dias, 1985).

Assim, uma questão de grande interesse é a maneira como fatores ambientais, tal como a dessecação, afetam a função celular das sementes de café, culminado com a perda da sua viabilidade e vigor.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Caracterizar citoquimicamente as reservas das células do endosperma e do embrião de sementes viáveis e inviáveis de café.
- Detectar as alterações celulares em nível citoquímico, ultraestrutural e bioquímico que ocorrem nas células do endosperma, cotilédones e eixo embrionário de sementes de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho durante o processo de dessecação.
- Comparar as alterações estruturais, ultraestruturais e bioquímicas encontradas com as existentes na literatura, na tentativa de auxiliar na classificação das sementes de café como recalcitrantes ou ortodoxas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Foram utilizadas sementes quiescentes de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho H-2077-2-5-81 provenientes do Instituto Agronômico de Campinas - IAC, das safras de 1994/95. As cerejas foram depolpadas, as sementes fermentadas por 24 horas, lavadas duas vezes em água, colocadas em peneira e revolvidas várias vezes e durante vários dias até secagem superficial. As sementes foram estocadas em sacos de polietileno quando atingiram 40 - 45% de umidade relativa (pergaminho úmido).

3.2. Condições de estocagem

Sementes quiescentes de *C. arabica* foram estocadas com 40 - 45% de umidade relativa durante nove meses em sacos de polietileno, à temperatura ambiente e no escuro.

Com 0, 5, 8 e 9 meses de estocagem amostras de sementes foram retiradas e utilizadas para determinação do conteúdo de água e porcentagem de germinação.

3.3. Determinação do conteúdo de água das sementes:

Determinou-se a massa fresca individual de 50 sementes em balança analítica. Cada semente foi colocada em um frasco numerado e os frascos foram então colocados em estufa a 80°C

por 48 horas. Após este período as sementes foram novamente pesadas, determinando-se assim sua massa seca.

O teor de água das sementes foi calculado com base na sua massa fresca e seca, através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{massa fresca} - \text{massa seca} \times 100}{\text{massa fresca}}$$

3.4. Testes de germinação:

Sementes foram secas à temperatura ambiente até alcançar um conteúdo de umidade próximo a 10%. Com o objetivo de avaliar a viabilidade, sementes com 45,30, 12,84, 10,06 e 8,95% de umidade foram então submetidas a testes de germinação a 30°C, em câmaras de crescimento "Forma Scientific", modelo 24, no escuro, em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido com água. Foram utilizadas quatro replicatas de 25 sementes, e consideradas germinadas aquelas que apresentavam protrusão de radícula. Os testes de germinação foram sempre finalizados apenas após 7 dias sem ocorrer nenhuma germinação.

3.5. Análise citoquímica:

Para todas as colorações foram utilizados cortes de 0,2µm de espessura e os cortes de sementes viáveis e inviáveis foram processados juntos para evitar possíveis diferenças temporais ou de concentração das soluções empregadas.

3.5.1. Fixação e processamento:

A diferença de dureza dos tecidos que compõem a semente de café, ou seja: endosperma, eixo e cotilédones, impossibilita o corte sem danificar os tecidos mais delicados. O endosperma foi isolado e fixado em pedaços menores a 2mm^3 , devido a presença das suas paredes celulares excepcionalmente espessas que dificulta a fixação. Frente a esta opção de preparo do material, os tecidos isolados não apresentaram diferentes estruturas que poderiam se beneficiar do corte em série.

Eixos embrionários, cotilédones e secções de endosperma (com aproximadamente $0,5\text{ cm}^3$) com 45,30 e 8,95% de umidade, foram fixados com solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0 durante 96 horas a 5°C (Dentan, 1985a). Após a fixação, os materiais foram lavados em água durante 1 hora e pré-infiltrados em uma mistura 1:1 (v/v) de etanol absoluto-GMA (2-hidroxietil metacrilato) por 2 horas. A seguir, foram transferidos para uma solução infiltradora (GMA contendo catalizador XCL), sem acelerador, durante 12 horas, e então incluídos em cápsulas, na mesma solução infiltradora contendo acelerador. A polimerização da resina (Tecnovit 7100) ocorreu à temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas.

Cortes semi-finos, com aproximadamente $0,2\mu\text{m}$, foram obtidos em ultramicrotômo LKB. A seguir, os cortes foram secos em estufa a 40°C por 24 horas.

3.5.2. Hematoxilina-floxina (HF) para vizualização geral

Os cortes foram corados com Hematoxilina para Gill durante 15 min. A seguir, foram rapidamente lavados em água destilada e contracorados com floxina por 4 min. Os cortes foram então lavados com água, secos ao ar e montados em Entelan.

3.5.3. Azul de toluidina a pH 4,0 (AT) para a detecção de radicais aniônicos e metacromasia.

Os cortes foram corados com azul de Toluidina 0,025% em tampão McIlvaine a pH 4,0, durante 15 min., à temperatura ambiente, seguindo-se 3 banhos rápidos em água destilada, secagem ao ar e montagem em Entelan (Vidal, 1977).

3.5.4. Xylidine Ponceau a pH 2,5 para a detecção de radicais catiônicos

Os cortes semi-finos foram corados por 15 min. à temperatura ambiente, com solução aquosa de Xylidine Ponceau 0,1%, em ácido acético a 3%, pH 2,5, seguindo-se lavagem em ácido acético a 2% durante 30 min, água destilada por 5 min e secagem ao ar. As lâminas foram então montadas em Entelan (Cortelazzo & Vidal, 1991).

3.5.5. Método de PAS para detecção de polissacarídeos e glicoproteínas

Os cortes foram previamente tratados com glicina 0,15mM em tampão fosfato 0,05M a pH 7,0 por 2 horas, a fim de bloquear os grupamentos aldeídicos do fixador.

A seguir, os cortes foram oxidados durante 10 min em ácido periódico a 0,5%, lavados em água, secos ao ar e colocados em reativo de Schiff (Lillie, 1954), por 8 min, no escuro. A seguir foram submetidos a 3 banhos consecutivos de 3 min cada em água sulfurosa (1 parte de HCL 1N, 1 parte de metabissulfito de sódio a 10% e 18 partes de água destilada), lavados em água e secos ao ar. A seguir as lâminas foram montadas em Entelan (Cortelazzo, 1992).

Como controle do método, as lâminas contendo os materiais analisados foram imersas em Reativo de Schiff, sem terem sido oxidadas pelo ácido periódico, procedendo-se às demais etapas do método, como descrito acima.

3.5.6. Microscopia de Polarização

Para a detecção da birrefringência das paredes celulares, cortes do endosperma de sementes viáveis e inviáveis foram analisados em microscópio de polarização POL ZEISS, com analisador e polarizador cruzados.

3.6. Análise ultraestrutural:

3.6.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET):

Sementes com 45,30 e 8,95% de umidade foram fixadas com uma solução de glutaraldeído a 6,5% em tampão cacodilato 0,15M, pH 6,8 a 4°C durante 16 horas. Após serem lavadas várias vezes no mesmo tampão, foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato 0,15M, pH 6,8, por 4 horas, a 4°C. Os tecidos foram então lavados várias vezes em água destilada, corados por uma noite em acetato de uranila 0,5% e desidratados em uma sequência de soluções com concentrações crescentes de etanol. Após desidratação, os materiais foram imersos em solução de acetona P.A./etanol 100°GL por 5 min, e então colocados em acetona P.A. durante 5 min, por 3 vezes. A embebição em resina epoxi Spurr (Spurr, 1969) foi feita em solução 1:1 da resina em acetona, durante 20 horas, em recipiente aberto e à temperatura ambiente. A seguir, foram incluídos em resina Spurr e a polimerização ocorreu em estufa a 60°C, por 72 horas (Dentan, 1985a).

Cortes semi-finos e ultrafinos, foram obtidos em ultramicrotômo LKB, com navalhas de vidro. Os cortes ultrafinos foram contrastados com solução aquosa de acetato de uranila a

2%, durante 30 min e solução alcalina (NaOH 1N) de citrato de chumbo, a 0,2% durante 5 min (Venable & Coggeshall, 1965) e observados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900.

3.6.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM):

Eixos embrionários, cotilédones e secções de endosperma (com aproximadamente $0,5\text{cm}^3$) com 45,30 e 8,95% de umidade, foram fixados com glutaraldeído 6,5% em tampão cacodilato 0,15M, pH 6,8 a 4°C durante 16 horas. A seguir foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato, por 4 horas a 4°C e desidratados em uma sequência de soluções com concentrações crescentes de etanol (Dentan, 1985a).

Os materiais fixados e desidratados foram secados em aparelho de ponto crítico Balzers CPD-030, onde o etanol 100% foi substituído por CO_2 líquido, posteriormente vaporizado. A seguir foram cobertos com ouro no "Sputter Coater" Balzers e observados em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM-T300.

3.7. Análises Bioquímicas:

3.7.1. Carboidratos: Polissacarídeos

Endospermas, embriões e pergaminhos de sementes com 45,30 e 8,95% de umidade foram liofilizados separadamente durante 48h

a -50°C e 100 mTorr de pressão. Após liofilização, os materiais foram moídos em moinho de bolas (aço inoxidável) separadamente. Cerca de 10mg de endospermas, embriões e pergaminhos foram colocados em tubos de ensaio com 0,18ml de ácido sulfúrico a 72% e deixados durante 16h. Após esse tempo foram adicionadas 4ml de água destilada contendo 0,6 mg de inositol ou alose. Os tubos foram selados e mantidos a 100°C durante 6 h. Após esse tempo, as soluções foram neutralizadas com carbonato de bário e filtradas sob vácuo.

Amostras contendo os açúcares já monomerizados e o padrão (inositol ou alose) foram reduzidas com boroidreto de sódio (NaBH_4) em uma concentração aproximada de 1mg/mg de açúcar e até pH básico, durante um mínimo de 3h e máximo de 16h. A seguir procedeu-se a neutralização do pH pela adição de 2-3 gotas de ácido acético a 50%, seguida de evaporação em evaporador rotatório a 30°C em trompa de vácuo. Os materiais secos dessa forma foram então lavados com HCl 1% em metanol por 3 vezes, seguindo adição de Piridina (1ml/10mg açúcar) e anidrido acético (1ml/100mg açúcar), durante 1-2h a 100°C sob refluxo para processamento da acetilação. Após 3 lavagens em água destilada, seguidas de evaporação, foi adicionado etanol 95% e, em seguida 0,3 a 1ml de clorofórmio para injeção de 0,1ml de amostra em cromatógrafo a gás (Joseleau et al., 1992).

3.7.2. Lipídios

Diferenciação qualitativa e quantitativa de ácidos graxos

Os lipídios foram extraídos a partir de embriões de sementes de café com 45,30 e 8,95% de umidade relativa pelo método de Folch et al. (1957). O extrato foi lavado, seco em N₂ e dissolvido em hexano/2-propanol/água 40:54:6.

Parte da fração lipídica livre de hexano foi dissolvida em tolueno e trans-esterificada por refluxo em ácido sulfúrico 1% metanólico. Os ésteres metílicos resultantes foram identificados e quantificados por cromatografia gasosa através de um cromatógrafo Pie-Unicam PU-4600, equipado com coluna megabore de polidimetilsiloxano, operando com detector de ionização de chama a 280°C, injetor a 180°C, com programação de temperatura da coluna de 180°C a 220°C, a 2°C/minuto e 5 minutos a 220°C, utilizando hidrogênio com gás de arraste, a 1ml/minuto. Os ésteres metílicos foram identificados por comparação de seus tempos de retenção com os obtidos de padrões autênticos, e suas porcentagens relativas na amostra foram obtidas por integração eletrônica.

Identificação dos ácidos graxos

A identificação de ésteres metílicos de ácidos graxos oriundos de α -oxidação, obtidos como descrito anteriormente, foram submetidos à cromatografia gasosa seguida de

espectrometria de massa. A amostra foi analisada em cromatógrafo acoplado a espectrômetro de massa Shimadzu QP-5000, operando com coluna capilar de polidimetilsiloxano, com injetor a 180°C, programação de coluna de 180°C a 220°C a 2°C/minuto e 5 minutos a 220°C, utilizando Hélio como gás de arraste, a 1ml/minuto. A temperatura da interface com o espectrômetro de massa foi mantida a 230°C, assim como da câmara de ionização, que operou a 70eV. Os espectros de massa obtidos foram comparados com padrões autênticos ou os constantes na espectrootecas NIST e WILEY.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação das massas e umidades relativas das sementes

Sementes quiescentes apresentaram um conteúdo de umidade de $45,30\% \pm 2,35$ (Tabela 1). Após 5 meses de estocagem em sacos de polietileno a temperatura ambiente, o conteúdo de umidade das sementes era de $12,84\% \pm 1,77$. Com 8 e 9 meses de estocagem, nas mesmas condições, este conteúdo caiu respectivamente para $10,06\% \pm 1,59$ e $8,95\% \pm 0,92$.

4.2. Germinação

Sementes quiescentes, com 45,30% de umidade, apresentaram 99% de germinação. Após 5 meses de estocagem nas condições descritas no item 3.1., as sementes apresentaram 98% de germinação. Com 8 meses de estocagem, sementes com 10,06% de umidade apresentaram apenas 15% de germinação.

As sementes tornaram-se completamente inviáveis após 9 meses de estocagem nas mesmas condições, apresentando uma taxa de germinação igual a 0% (Tabela 1).

Tabela 1: Porcentagens de germinação e umidades relativas de sementes de *Coffea arabica* durante 9 meses de estocagem

Tempo de estocagem (meses)	Umidade relativa (%) *	Germinação (%) **
0	45,30 $\pm$ 2,35	99,0 $\pm$ 0,75
5	12,84 $\pm$ 1,77	98,0 $\pm$ 0,50
8	10,06 $\pm$ 1,59	15,0 $\pm$ 14,75
9	8,95 $\pm$ 0,92	0

Obs: *Os valores representam as médias das massas de 50 sementes $\pm$ erro padrão.

** Os valores representam as médias de 4 repetições de 25 sementes cada $\pm$ erro padrão

4.3. Análises estrutural e ultraestrutural

4.3.1. Células parenquimáticas de estocagem:

Representam o endosperma da semente de café, responsável pelo armazenamento do material de reserva do grão. O citoplasma destas células contém lipídios, proteínas, carboidratos e quantidades significativas de cafeína, ácido clorogênico e sais minerais. Apresentam paredes celulares espessadas dotadas de nodosidades características.

Os resultados das análises microscópicas do endosperma, são encontrados nas figuras 1 a 12 e serão apresentados segundo as suas estruturas e compostos presentes.

Paredes Celulares

A coloração pela Hematoxilina mostrou que as paredes celulares do endosperma de sementes quiescentes e de sementes inviáveis são bastante espessas, com lamela média evidente, não apresentando espaços intercelulares (Figs. 1a e 1b).

A coloração pelo AT a pH 4,0 revelou a metacromasia das paredes celulares, mais acentuada que na região da lamela média nas sementes viáveis (Fig. 2a). Com a perda de viabilidade observou-se uma acentuada diminuição na metacromasia das paredes e aumento da coloração arroxeada na lamela média (Fig. 2b).

A fraca coloração das paredes celulares de sementes viáveis e inviáveis, coradas pelo XP revela a pequena

quantidade de proteínas existente nesta estrutura (Figs. 3a e 3b).

O método do PAS evidenciou os açúcares neutros das paredes celulares, bastante espessas no material quiescente (Fig. 4a). Com a perda de viabilidade observou-se uma alteração na intensidade de coloração, isto é, vermelho no caso das sementes viáveis e magenta nas inviáveis, o que sugere uma lateração no seu conteúdo de polissacarídeos (Fig. 4b).

As paredes celulares de todas as sementes apresentam nodosidades que foram evidenciadas em todos os métodos de coloração (Figs 1-4).

A microscopia de polarização reforçou estas observações mostrando nas paredes celulares nodosidades mais birrefringentes (Fig. 5a). Com a perda de viabilidade das sementes observou-se uma diminuição dessa birrefringência, como mostrado na figura 5b.

A análise ao microscópio eletrônico de varredura das paredes celulares das células parenquimáticas de sementes quiescentes (Fig. 6) revelou que elas são espessas e distendidas (Figs. 6b e 6c), apresentando espessamento secundário que origina as nodosidades (Fig. 6a e 6d).

Sementes inviáveis analisadas ao microscópio eletrônico de varredura apresentaram alterações como separação entre paredes adjacentes (Fig. 6d) e ruptura parcial ou total das fibrilas que as compõem (Figs. 6e e 6f). Estas alterações não foram

observadas nos cortes de sementes viáveis submetidas ao mesmo preparo do material.

A análise ao microscópio eletrônico de transmissão de células parenquimáticas de sementes viáveis confirmou as observações feitas ao microscópio de luz, mostrando paredes celulares espessas, homogêneas e uma lamela média evidente e sem espaços intercelulares (Fig. 7a), onde cada parede mede $3\mu\text{m}$ entre as nodosidades. Sementes inviáveis apresentaram paredes celulares menos espessas e parede secundária com aspecto fibrilar (Fig. 7b), onde cada parede mede $2\mu\text{m}$ entre as nodosidades.

Reserva de Polissacarídeos neutros e glicoproteínas

Cortes submetidos à coloração pelo reativo de Schiff após prévia oxidação pelo ácido periódico apresentaram coloração vermelha intensa nas paredes celulares. Foi ainda observada a presença de um conteúdo citoplasmático PAS-positivo assim como a presença de glóbulos de diferentes tamanhos PAS-negativos (Fig. 4a). Com a perda de viabilidade observou-se uma alteração na coloração das paredes celulares, agora com cor magenta de intensidade média. O conteúdo citoplasmático corou-se com a mesma intensidade tanto nas sementes viáveis como inviáveis (Figs. 4a e 4b).

A análise ao microscópio eletrônico de varredura revelou a presença de filamentos formando uma rede citoplasmática que pode estender-se de uma parede celular a outra (Fig. 8a).

Segundo Dentan (1985b) estes filamentos são constituídos por polissacarídeos.

Aderidos aos filamentos são visualizados pequenos glóbulos (Figs. 8b, 8c e 8d), semelhantes aos glóbulos de lipídios descritos por Dentan (1985b, c). Apesar deste aspecto ter sido observado tanto nas sementes viáveis como nas inviáveis, as últimas apresentaram um menor conteúdo de filamentos, correspondendo aos polissacarídeos citoplasmáticos (Figs. 8b e 8d).

Reserva de Proteínas

Foram observados glóbulos e material difuso no citoplasma, corados pela Floxina em magenta e pelo AT a pH 4,0 em azul esverdeado (Figs. 1a e 2a). Esses glóbulos ortocromáticos foram intensamente corados pelo XP a pH 2,5 evidenciando a natureza protéica do seu conteúdo (Fig 3a).

A coloração pelo XP mostra que as proteínas de reserva podem ser encontradas na forma de corpos protéicos limitados por membrana localizados preferencialmente na periferia do citoplasma ou em uma forma difusa, preenchendo o centro do mesmo (Fig. 3a). A coloração pela HF mostrou um aumento na intensidade de coloração das proteínas difusas e uma aparente diminuição no número de corpos protéicos no material inviável (Fig. 1b) o que foi confirmado pela coloração com AT (Figs. 2a e 2b).

A diminuição do material protéico durante a perda de viabilidade foi confirmada pela coloração pelo XP (Fig. 3b). Sementes viáveis apresentaram um conteúdo citoplasmático XP-positivo bastante homogêneo, na forma de corpos protéicos e material difuso no citoplasma (Fig. 3a). Cortes de sementes inviáveis mostraram uma diminuição acentuada na intensidade de coloração de todo o material XP-positivo (Fig. 3b).

Cortes do endosperma de sementes viáveis e inviáveis submetidas ao método de PAS mostraram glóbulos citoplasmático intensamente corados (Figs. 4a e 4b). Estes glóbulos correspondem aqueles corados pelo XP, evidenciando assim a natureza glicoprotéica das proteínas citoplasmáticas

Análise ao microscópio eletrônico de varredura revelou a presença de glóbulos citoplasmáticos com superfície recoberta por polissacarídeos e glóbulos de lipídios (Fig. 9a) ou lisa (Figs. 9b e 9d), segundo Dentan (1985b) estes glóbulos são corpos protéicos. As figuras 9c e 10c mostraram o conteúdo denso e bastante compacto destes corpos protéicos tanto em sementes viáveis como inviáveis.

O exame ao microscópio eletrônico de transmissão confirmou os resultados obtidos através da coloração pelo XP a pH 2,5. Nas células parenquimáticas de sementes viáveis as proteínas de reservas são armazenadas na forma de corpos protéicos delimitados por uma membrana única (Figs. 11a e 11b). Estes corpos situam-se geralmente próximos à parede celular e tendem a formar uma estrutura em forma de cacho (Fig. 11a).

Outra forma para o armazenamento das proteínas de reserva em endosperma de café foi observada, com o material envolvendo de forma difusa os glóbulos de lipídios e preenchendo o centro do citoplasma (Figs. 11a, 11b e 11c). Sementes inviáveis apresentaram estrutura e distribuição das proteínas semelhante aquela observada para as sementes viáveis (Figs. 12a, 12b e 12c). Em apenas um corte de semente inviável foi possível observar a presença de um corpo protéico apresentando membrana retraída (Fig. 12d).

Reserva de Lipídios:

Nos cortes transversais de sementes viáveis quiescentes corados com HF, XP a pH 2,5 ou PAS, os glóbulos de lipídios aparecem em imagem negativa, sempre localizados na proximidade da membrana plasmática (Figs. 1a, 3a e 4a). Formando pequenas massas mais ou menos esféricas localizadas na periferia do citoplasma. Esta camada de glóbulos de lipídio está envolvida por uma fina matriz protéica, que foi melhor visualizada no material submetido à coloração pelo XP e pela microscopia eletrônica de transmissão (Figs. 3a, 11a, 11b e 11c).

O exame ao microscópio eletrônico de varredura confirmou a distribuição parietal dos glóbulos de lipídios, além de revelar a presença de material filamentoso entre os mesmos (Figs. 8a, 9a e 10d).

Nos cortes analisados ao microscópio eletrônico de transmissão foram observados, entre os glóbulos de lipídios ou

próximos a eles, grânulos osmiofílicos, com provável conteúdo de fenóis (Fig. 11a), corpos protéicos (Fig. 11b) e vacúolos contendo material granular (Fig. 11c).

Nos cortes transversais de sementes inviáveis submetidos à coloração pela HF e AT a pH 4,0 não foi possível detectar a presença dos glóbulos de lipídio (Figs. 1b e 2b). Os cortes submetidos a coloração pelo XP a pH 2,5 revelaram um menor número destes glóbulos (Fig. 3b).

A análise do material inviável ao microscópio eletrônico de varredura sugere que, com a perda de viabilidade, o número de glóbulos de lipídios diminui (Figs. 9b, 10a, 10b e 10c).

Ao microscópio eletrônico de transmissão as células parenquimáticas do endosperma de sementes inviáveis apresentaram, entre os glóbulos de lipídios, vacúolos de tamanho variado (Fig. 12a).

Cortes transversais de endosperma de semente inviável mostram uma membrana plasmática sinuosa e com vesículas de superfície (Fig. 12a). Observa-se ainda o aspecto mais fibrilar da camada mais interna da parede celular.

Compostos Fenólicos

Nos cortes de sementes viáveis foram observadas vesículas fortemente osmiofílicas, localizadas preferencialmente no espaço perimembranoso ou incluídas na camada lipídica (Figs. 11a e 11c). Dentan (1977) também observou, entre a parede celular e a membrana plasmática, importantes depósitos amorfos, fortemente osmiofílicos. Colorações específicas para fenóis mostraram, ao microscópio óptico tratar-se de compostos fenólicos, possivelmente ácido clorogênico.

Quando sementes inviáveis foram analisadas quanto ao seu conteúdo de polifenóis, o que se observou foi uma maior deposição de material osmiofílico no espaço perimembranoso (Figs. 12a e 12c) e depósitos osmiofílicos citoplasmáticos maiores que aqueles encontrados nas sementes viáveis (Fig. 12d).

Núcleo e Nucléolo

Núcleos e nucléolos de células parenquimáticas do endosperma foram evidenciados através da coloração pela Hematoxilina e AT a pH 4,0 (Figs. 1a e 2a).

Em sementes viáveis, a cromatina apresentou-se mais distendida com algumas regiões mais compactadas. O núcleo geralmente foi encontrado em uma posição periférica, próximo à membrana plasmática e nucléolos foram observados (Figs. 1a e

2a). Nas sementes inviáveis os núcleos mostraram uma maior compactação cromatínica (Figs. 1b e 2b).

A análise ultraestrutural do núcleo de sementes viáveis revelou a presença do envoltório nuclear, cromatina frouxa, apresentando apenas alguns segmentos com grau de compactação maior (Fig. 11d) semelhante a nucléolos. Nos cortes ultra-finos de sementes inviáveis analisados não foram observados núcleos.

4.3.2. Embrião:

Do mesmo modo que no caso do endosperma, os resultados estão dispostos a partir da figura 13 até a 28, e as estruturas e compostos observados serão tratados em separado.

O embrião é constituído pelos cotilédones e pelo eixo embrionário formando uma estrutura contínua que está mergulhada no endosperma (Figs. 21a - 21d).

As células do eixo embrionário são icosaédricas e as cotiledonares são parcialmente esféricas, ambas apresentando paredes celulares finas e regulares (Fig. 13a). Nestes dois tipos celulares, lipídios, proteínas e carboidratos são encontrados no citoplasma.

Paredes celulares

A coloração pela Hematoxilina mostrou que as paredes celulares das células do eixo embrionário de sementes viáveis são finas e regulares apresentando plasmodesmas (Figs. 13a e 14a).

Células do eixo embrionário tiveram suas paredes celulares intensamente coradas pela Hematoxilina (Figs. 13a e 14a). Com a perda de viabilidade, observou-se uma aparente diminuição na intensidade de coloração destas paredes (Figs. 13b e 14b).

A coloração pelo AT a pH 4,0 revelou metacromasia das paredes, tanto nas células cotiledonares como nas células do embrião (Figs. 15a e 16a). Esta metacromasia não se alterou com a perda de viabilidade das sementes (Figs. 15b e 16b).

As paredes celulares das células cotiledonares e do eixo de sementes viáveis foram coradas pelo XP a pH 2,5 (Figs. 17a e 18a). Sementes inviáveis aparentemente não apresentaram alteração na intensidade de coloração (Figs. 17b e 18b). Essas paredes celulares mostraram-se PAS-positivas (Figs. 19a e 20a). Com a perda de viabilidade verificou-se uma diminuição na intensidade de coloração das mesmas (Figs. 19b e 20b).

Nas células da epiderme do cotilédone de sementes viáveis, observadas ao microscópio eletrônico de varredura, as paredes celulares mostraram-se mais distendidas. Com a perda de viabilidade observou-se uma retração destas paredes (Figs. 22a e 22b).

Ao microscópio eletrônico de transmissão as paredes celulares das células do eixo embrionário e dos cotilédones de sementes viáveis apresentaram-se finas e distendidas, contendo espaços intercelulares (Figs. 25a, 25b, 25c e 27c).

Em sementes inviáveis, as células cotiledonares apresentaram paredes celulares levemente retraídas (Figs. 26a e

26c), ao passo que no eixo elas mostraram distendidas e com conteúdo não homogêneo (Figs. 28a, 28b e 28d).

Reserva de Polissacarídeos neutros e glicoproteínas

Cortes do cotilédone e do eixo embrionário de sementes viáveis submetidos à coloração pelo reativo de Schiff após prévia oxidação pelo ácido periódico apresentaram paredes celulares intensamente coradas, bem como pequenos grânulos citoplasmáticos PAS-positivos e uma fina granulação de fundo tenuamente corada (Figs. 19a e 20a).

Com a perda de viabilidade observou-se uma diminuição na intensidade de coloração das paredes celulares. O material citoplasmático PAS-positivo não mostrou alterações quando comparado com as sementes viáveis (Figs. 19b e 20b).

A análise de secções de cotilédones e eixo embrionário de sementes viáveis ao microscópio eletrônico de varredura revelou a presença de filamentos de carboidratos formando uma rede citoplasmática, localizada entre as reservas (Figs. 23a, 23c e 24a). Estes filamentos também foram observados em cotilédones inviáveis, porém em menor número (Fig. 23b).

Ao microscópio eletrônico de transmissão, nos cortes de sementes viáveis, os polissacarídeos neutros das células cotiledonares foram encontrados na forma de plastoglóbulos localizados próximos aos glóbulos de lípidios (Fig. 25c) ou ocupando posição central no citoplasma (Fig. 25d).

Plastoglóbulos também foram observados nas células do eixo de sementes viáveis, localizados no interior de um vacúolo central (Fig. 27a).

Nas sementes inviáveis não foi possível identificar a presença de plastoglóbulos ou de vacúolos contendo sacarídeos.

Reserva de Proteínas

No citoplasma das células cotiledonares e do eixo embrionário de sementes viáveis foram observados grânulos corados pela Floxina em magenta (Figs. 13a e 14a).

O AT a pH 4,0 revelou, nas células do embrião, glóbulos citoplasmáticos corados em azul. Com a perda de viabilidade não se verificou alterações no estado de agregação desta reserva (Figs. 15 a 16).

Nos cortes do embrião de sementes viáveis submetidos à coloração com XP à pH 2,5, as paredes celulares apresentaram-se fracamente coradas, e no citoplasma observou-se a presença de um material finamente granular XP-positivo pouco corado e de alguns glóbulos intensamente corados (Figs. 17a e 18a).

Esses resultados foram confirmados pela coloração com HF onde observou-se a presença de um material homogêneo F-positivo ocupando a região central do citoplasma, além de um grânulo intensamente corado, localizado próximo à parede celular (Figs. 13b e 14b).

Nas sementes inviáveis observou-se que as paredes celulares permaneceram coradas, entretanto, um conteúdo

citoplasmático fracamente corado pelo XP e um grânulo intensamente corado passaram a ocupar posição parietal, sendo que o conteúdo citoplasmático que ocupava a região central foi XP-negativo (Figs. 17b e 18b).

As proteínas citoplasmáticas das células do embrião de sementes viáveis, tanto difusas como aquelas inclusas em corpos protéicos, foram pouco coradas pelo método do PAS (Figs. 19a e 20a). Aparentemente a perda de viabilidade não acarretou alteração na intensidade de coloração desta reserva (Figs. 19b e 20b).

O exame ao microscópio eletrônico de varredura confirmou os resultados obtidos com a coloração pelo XP a pH 2,5 para o embrião, ou seja, presença de corpos protéicos entre os glóbulos de lipídios (Figs. 23a, 23b e 24a). Com a perda de viabilidade observou-se uma aparente redução no número de corpos protéicos e estes passaram a ocupar posição parietal (Figs. 23b, 23d, 24b e 24d).

A análise ao microscópio eletrônico de transmissão revelou nas células cotiledonares e do eixo embrionário a presença de proteínas não inclusas em corpos protéicos constituindo uma matriz protéica. A camada lipídica encontrou-se imersa nesta matriz protéica, apresentando-se mais elétron-densa nesta região (Figs. 25a, 25b, 27a, 27b e 27c).

Nas sementes inviáveis não se verificaram alterações ultraestruturais das proteínas dispersas pelo citoplasma nas células cotiledonares (Figs. 26b e 26c). No eixo verificou-se

uma aparente redução na quantidade de proteínas difusas (Figs. 28a, 28b e 28d). Com a perda de viabilidade, estas proteínas dispersas no citoplasma, passam a apresentar aspecto mais granular (Figs. 28b e 28c).

Reserva de Lipídios

A coloração pela HF revelou, tanto nos cortes de cotilédones como do eixo embrionário de sementes viáveis, a presença de glóbulos não corados distribuídos por todo o citoplasma (Figs. 13a e 14a). Nos cortes de sementes inviáveis este método não possibilitou a observação destes glóbulos (Figs. 13b e 14b).

A análise ao microscópio eletrônico de varredura das células do cotilédones e do eixo embrionário de sementes viáveis mostrou que os lipídios são encontrados na forma de pequenos glóbulos localizados próximos à parede celular (Figs. 23a, 23c 24a e 24c). Sementes inviáveis apresentaram um menor número de glóbulos de lipídios, tanto nos cotilédones como no eixo, embora eles continuem a ocupar posição parietal (Figs. 23c, 23d, 24a e 24d).

Nos cortes de cotilédones de sementes viáveis analisados ao microscópio eletrônico de transmissão foram observados entre os glóbulos de lipídios ou próximos a eles, algumas mitocôndrias (Figs. 25a e 25b), vacúolos de diferentes tamanhos (Figs. 25a e 25b), plastoglóbulos (Fig. 25c) e proteínas não inclusas em corpos protéicos (Figs. 25a, 25b e 25c).

Cotilédones de sementes inviáveis apresentaram um maior número de pequenos vacúolos entre os glóbulos de lipídios ou próximos a eles (Figs. 26b e 26c).

Na figura 26a observa-se a presença de glóbulos de lipídios maiores que poderiam estar indicando a fusão dos pequenos glóbulos dessa reserva.

As análises ao microscópio eletrônico de transmissão de cortes do eixo embrionário de sementes viáveis confirmaram os resultados obtidos ao microscópio eletrônico de varredura. Os lipídios foram observados na forma de glóbulos imersos em uma matriz protéica ocupando posição parietal (Figs. 27a e 27c). Entre os glóbulos de lipídios ou próximos a eles encontramos algumas mitocôndrias (Fig. 27c) e vacúolos com conteúdo mais ou menos granular (Figs. 27a e 27c). Na região central do citoplasma foram observados proteínas não inclusas em corpos protéicos, além dos corpos protéicos típicos (Fig. 27b), vacúolos com conteúdo heterogêneo destacando-se a presença de plastoglóbulos e vesículas com conteúdo granular (Figs. 27a e 27c).

Sementes inviáveis mostraram um menor número de glóbulos de lipídios e uma aparente fusão dos mesmos dando origem a glóbulos de maior tamanho (Figs. 28a e 28b). Com a perda de viabilidade observou-se, também no eixo, o aparecimento de inúmeros pequenos vacúolos elétron-transparentes entre os glóbulos de lipídios (Figs. 28a e 28c). Também foram observados

vacúolos periféricos que se originaram, provavelmente, da fragmentação da membrana plasmática (Figs. 28a e 28c).

Compostos Fenólicos

Por analogia com os resultados obtidos para as células parenquimáticas do endosperma concluimos que os grânulos osmiofílicos depositados próximos à parede celular ou entre os glóbulos de lipídios (Figs. 25b, 25c, 27a e 27c) nas células que compõem o embrião nas sementes viáveis são compostos fenólicos.

Em células cotiledonares de sementes inviáveis observou-se um aumento na deposição de grânulos osmiofílicos no espaço perimembranoso (Figs. 26a e 26c). No entanto, cortes de células do eixo embrionário não apresentaram esta resposta, não sendo aí observado a presença de polifenóis (Figs. 28a, 28c e 28d).

Núcleo e Nucleólo

Núcleos e nucleólos das células do eixo embrionário foram evidenciados através da coloração pela He e AT a pH 4,0.

O núcleo geralmente ocupa posição parietal e, nas células do embrião de sementes viáveis, a cromatina é frouxa com algumas regiões mais compactadas (Figs. 13a, 14a, 15a e 16a).

Nas sementes inviáveis os núcleos mostraram uma maior compactação cromatínica e alguns núcleos picnóticos foram observados (Figs. 13b, 14b, 15b e 16b).

A análise ultraestrutural do núcleos das células cotiledonares e do eixo embrionário de sementes viáveis revelou a presença de envoltório nuclear com complexos de poro e cromatina frouxa, com algumas regiões cromáticas mais condensadas. O nucléolo é único e bastante evidente (Figs. 25d e 27d).

Nas sementes inviáveis os núcleos das células do cotilédone apresentaram cromatina condensada e vacuolizada e nucléolo mais granular (Fig. 26d). No núcleo das células do eixo de sementes inviáveis encontramos uma cromatina mais densa e nucléolo pouco evidente (Fig. 28d)

3.3.3. Análises Bioquímicas

Carboidratos: Polissacarídeos

A análise cromatográfica dos endospermas das sementes revelaram conteúdos de carboidratos similares para as sementes viáveis (45,30% de umidade) e inviáveis (8,95% de umidade). Esta estrutura apresentou cerca de 35% de polissacarídeos neutros, sendo evidente uma grande quantidade de manose (43,6% do total) e galactose (21%), numa relação Man/Gal de 2:1. Essa relação não foi alterada com a perda de viabilidade (Tabela 2 e 3). Também foi notada grande quantidade de glicose, representando cerca de 27% do total de açúcares. Para o material seco, apesar dos valores absolutos de xilose serem

pequenos, houve um aumento significativo nas quantidades relativas deste açúcar, de 0,8% a 3,6% do total (Tabela 3).

Nos embriões foi notada uma maior quantidade de glicose (aproximadamente 15g/100g) o que representou cerca de 67% do total dos açúcares analisados. Pôde-se notar ainda aparente diminuição no conteúdo de ramnose e aumento em manose (Tabelas 2 e 3).

Os pergaminhos apresentaram muita glicose (cerca de 54%) e xilose (cerca de 41%) e algum conteúdo de ribose. Esse açúcar, bem como o teor de arabinose, apresentaram um aumento relativo para o material com 8,95% de umidade (Tabelas 2 e 3).

Dosagem de lipídios

Os cromatogramas obtidos a partir da cromatografia gasosa-espectroscopia de massa permitiu identificar os principais ácidos graxos encontrados em embriões de sementes de café (Figuras 29 e 30). Foram observados 7 picos tanto para sementes viáveis (45,30% de umidade) quanto para inviáveis (8,95% de umidade) (Figs. 29 e 30). Entretanto para sementes inviáveis apenas 6 picos foram integrados pelo aparelho (Fig. 30).

A cromatografia gasosa permitiu quantificar os ácidos graxos presentes em embriões viáveis e inviáveis. Nos embriões viáveis encontramos 48,4% de ácido palmítico, 9,1% de ácido esteárico, 9,9% de ácido oleico, 30,1% de ácido linoleico e 2,3% de ácido araquídico. Em embriões de sementes inviáveis as

quantidades relativas destes ácidos graxos foram: 65,9% de ácido palmítico, 9,1% de ácido esteárico, 8,9% de ácido oléico, 15,9% de ácido linoléico, e traços de ácido araquídico. Portanto, com a perda de viabilidade, verificou-se apenas uma diminuição significativa no teor de ácido linoléico e um aumento de ácido palmítico (Tabela 4).

As sementes inviáveis apresentaram um índice de peróxidos menor que o observado para os embriões de sementes viáveis (Tabela 4).

Tabela 2: Concentrações de açúcares em g/100g em sementes de café (*Coffea arabica*) úmidas e secas

Umidade	Endosperma		Embrião		Pergaminho	
	45,30%	8,95%	45,30%	8,95%	45,30%	8,95%
Ram	TC	0,1	0,9 a A	0,6 a F	0,6 a B	0,6 a
Fuc	TC	TC	TC	TC	—	—
Rib	—	—	—	—	0,3 a	0,6 b
Ara	3,1 a A	3,3 a	2,3 a B	2,9 a	0,3 a C	0,6 b
Xyl	0,3 a B	1,3 b	0,6 a B	0,6 a	15,7a A	18,6 a
Man	15,4a A	14,5 a	0,9 a B	1,3 b	TC	TC
Gal	7,4 a A	6,9 a	2,0 a B	2,3 a	0,3 a C	0,4 a
Gli	9,2 a C	10,5 a	13,4a B	16,1 a	21,6a A	23,6 a
Total	35,3a A	36,5 a	20,1a B	23,8 a	38,7a A	44,4 a

TC - Traços

Letras minúsculas iguais na mesma linha para as diferentes umidades de uma mesma região não apresentam diferenças significativas ($P = 0,01$).

Letras maiúsculas iguais para sementes úmidas de diferentes regiões não apresentam diferenças significativas ($P = 0,01$).

Tabela 3: Porcentagem de açúcares em sementes de café (*Coffea arabica*) úmidas e secas

Umidade	Endosperma		Embrião		Pergaminho	
	45,30%	8,95%	45,30%	8,95%	45,30%	8,95%
Ram	TC	0,3	4,5 a A	2,5 a	1,3 a B	1,4 a
Fuc	—	—	TC	TC	—	—
Rib	—	—	—	—	0,8 a	1,4 b
Ara	8,8 a B	9,0 a	11,4a A	12,2 a	0,8 a C	1,4 b
Xyl	0,8 a C	3,6 b	3,0 a B	2,5 a	40,6a A	41,9 a
Man	43,6a A	39,7 a	4,5a B	5,5 a	—	—
Gal	21,0a A	18,9 a	10,0a B	9,6 a	0,8 a C	0,9 a
Gli	26,1a B	28,8a	66,7a A	67,6 a	55,8a A	53,2 a

TC - Traços

Letras minúsculas iguais na mesma linha para as diferentes umidades de uma mesma região não apresentam diferenças significativas ($P = 0,01$).

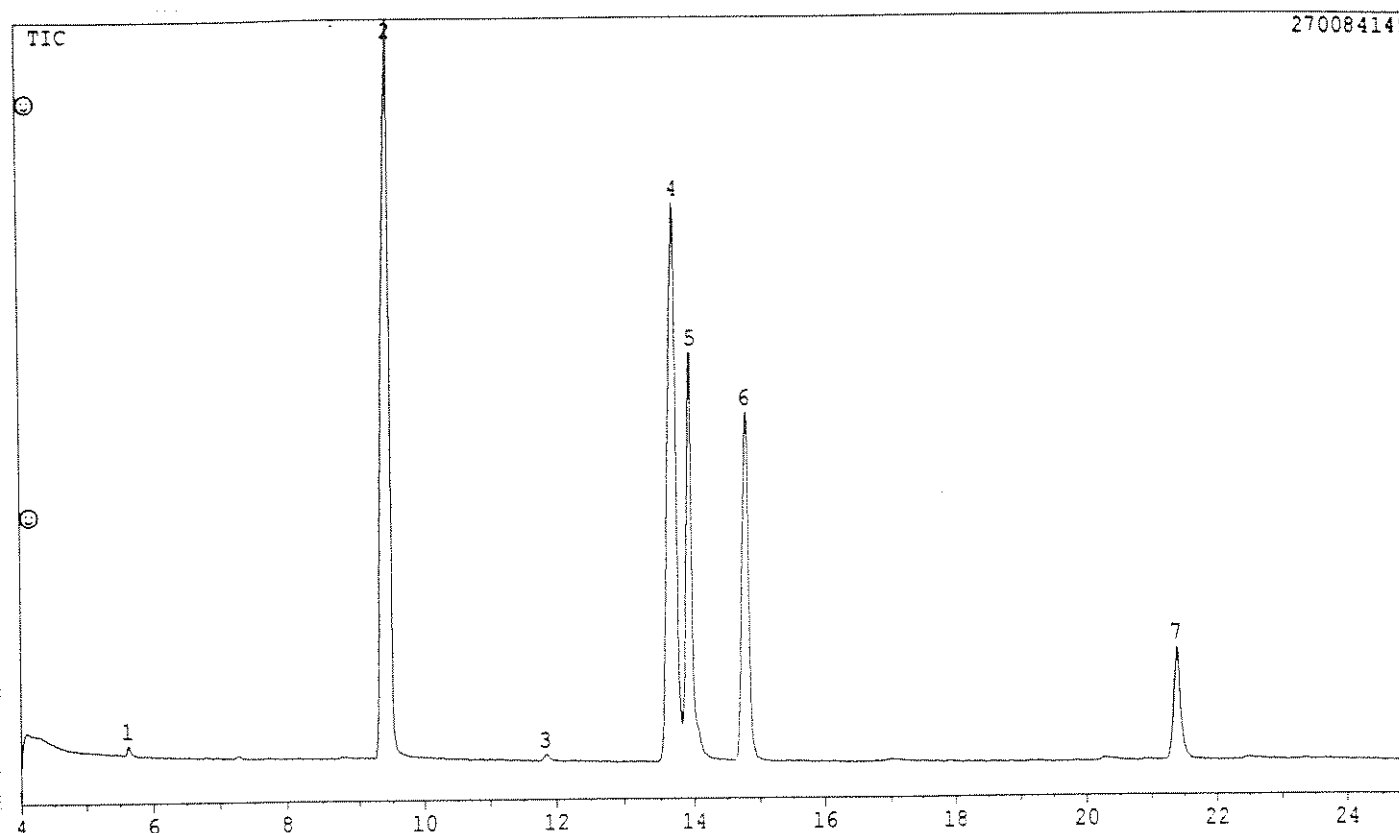
Letras maiúsculas iguais para sementes úmidas de diferentes regiões não apresentam diferenças significativas ($P = 0,01$).

Tabela 4: Porcentagem de ácidos graxos analisados em eixos embrionários viáveis e inviáveis de *Coffea arabica* e Índice de Peróxidos.

n	Ácido Graxo	Viáveis (45,30%)	Inviáveis (8,95%)
16:0	Palmítico	56,3 a A	65,5 a A
18:0	Esteárico	8,2 c D	9,0 c D
18:1	Oléico	8,8 c D	8,5 c D
18:2	Linoléico	31,6 b B	17,1 b C
Índice de		313,0	234,8
Peróxido			

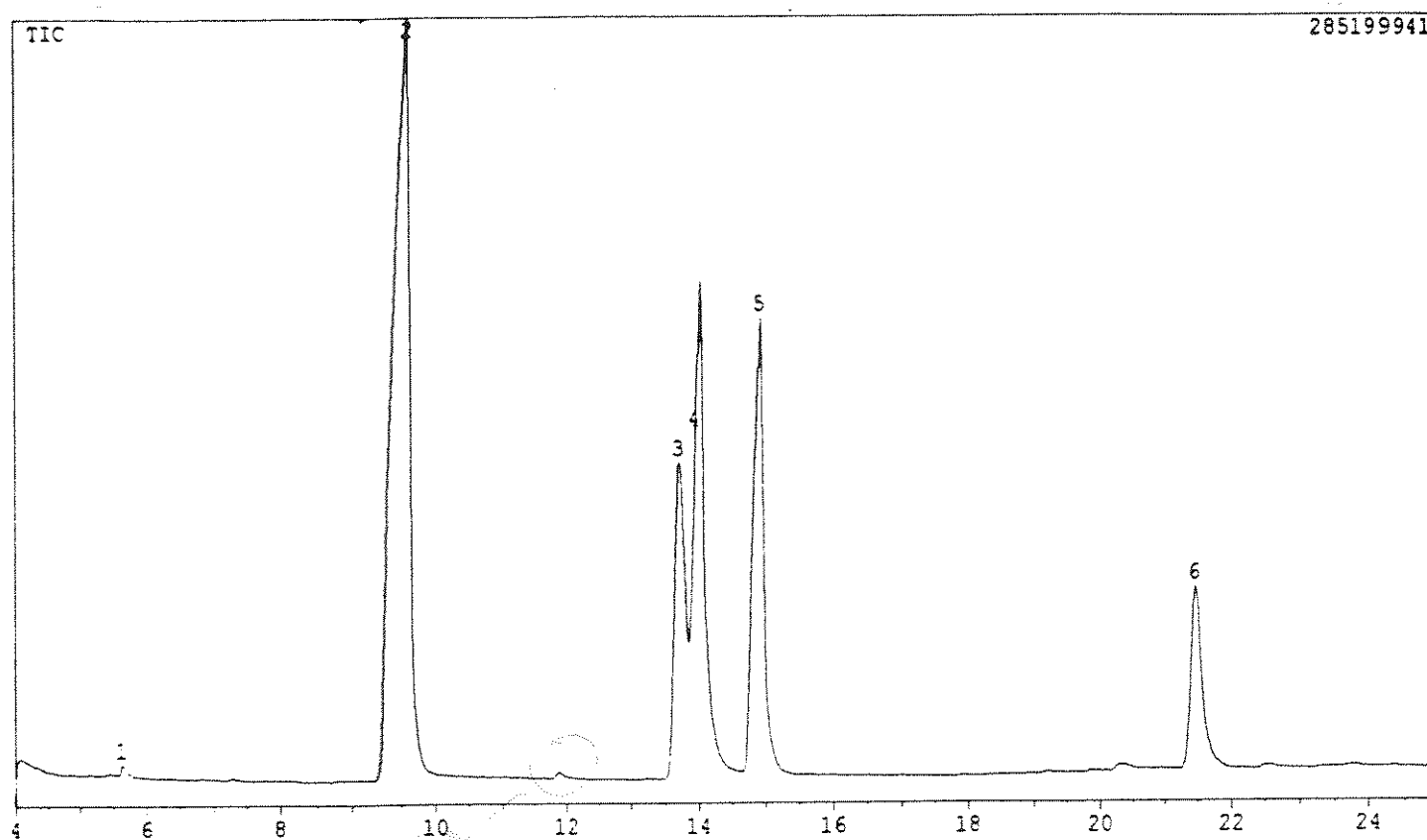
Letras minúsculas iguais em uma mesma coluna ou letras maiúsculas iguais em uma mesma linha mostram valores sem diferenças significativas ($P = 0,01$).

Figura 29: Cromatograma da GLC de embrião de sementes de *C. arabica* com 45,30% de umidade relativa. Nota-se a presença de 7 picos. As concentrações obtidas pelo integrador encontram-se descritas na Tabela 4.



Pico	Ácido Graxo
01	Ácido Mirístico
02	Ácido Palmítico
03	Ácido Margárico
04	Ácido Linoléico
05	Ácido Oléico
06	Ácido Esteárico
07	Ácido Araquídico

Figura 30: Cromatograma da GLC de embrião de sementes de *C. arabica* com 8,95% de umidade relativa. Nota-se a presença de 6 picos. As concentrações obtidas pelo integrador encontram-se descritas na Tabela 4.



Pico	Ácido Graxo
01	Ácido Mirístico
02	Ácido Palmítico
03	Ácido linoléico
04	Ácido Oléico
05	Ácido Esteárico
06	Ácido Araquídico

4. DISCUSSÃO:

4.1. Germinação

Vários fatores podem contribuir para a curta longevidade durante a estocagem de sementes recalcitrantes, como por exemplo: injúria de dessecação, injúria de resfriamento, contaminação microbiana e germinação durante a estocagem (Roberts & King, 1980). Também são reportadas mudanças citológicas, genéticas e metabólicas (Roberts, 1972, 1973) e danos macromoleculares (Villiers, 1983).

Sementes de café (*Coffea arabica*) têm mostrado, em diferentes trabalhos, perda de viabilidade variável em função do tempo e das condições de estocagem. Bacchi (1958) observou que entre 10 e 20% de umidade a longevidade das sementes era inversamente proporcional ao seu conteúdo de umidade. Gonzalez (1973), usando diferentes métodos de estocagem, encontrou uma relação positiva entre conteúdo de umidade das sementes e germinação. Sementes de café com 10% de umidade estocadas em condições herméticas a 15°C mantiveram-se viáveis durante 12 meses (Ellis et al., 1990). Estes autores observaram que a deterioração ocorreu mais rapidamente em temperaturas e conteúdos de umidade menores. Vossen (1979) verificou que sementes de café estocadas com valores intermediários entre 10 e 40% de umidade deterioram mais rapidamente. Bendana (1962) não observou nenhum efeito deletério em sementes com cerca de

5% de umidade, ao passo que Bacchi (1956) e Huxley (1964) reportaram uma perda de viabilidade após dessecação abaixo de 8%. Para Válio (1976), sementes com conteúdo de umidade alto (40%) permaneceram viáveis por um período de tempo muito mais longo que sementes com baixo conteúdo de umidade (15%).

No presente trabalho, as sementes quiescentes de café com 45,30% de umidade relativa apresentaram 99% de germinação. Após 8 meses de estocagem em sacos de polietileno fechados, armazenados à temperatura ambiente, as sementes apresentaram 10,06% de umidade relativa, e uma taxa de germinação igual a 15%. Estas sementes tornaram-se completamente inviáveis apenas após 9 meses estocadas nas mesmas condições, quando seu conteúdo de umidade foi de 8,95%.

Sementes ditas recalcitrantes tornam-se rapidamente inviáveis com a perda de umidade. Por exemplo, sementes de *Araucaria hunsteinii* perderam a viabilidade quando seu conteúdo de umidade foi reduzido abaixo de 32% (Pritchard et al, 1995); sementes de *Avicennia marina*, espécie altamente sensível à dessecação, perdeu rapidamente a viabilidade, independente das condições de estocagem (Farrant et al., 1988); sementes de *Araucaria angustifolia* e *Scadoxus membranaceus* apresentaram declínio nas taxas de germinação após 15 dias de estocagem em condições dessecantes (Farrant et al., 1989). Sementes de *Quercus rubra* apresentaram queda na viabilidade quando o conteúdo de umidade era reduzido abaixo de 30%, e perda completa de viabilidade foi observada com conteúdos de umidade

variando entre 10-15% (Pritchard, 1991). Entretanto, as sementes de *C. arabica* aqui analisadas mantiveram-se viáveis após 5 meses de estocagem quando seu conteúdo de umidade era igual a 12,84% com uma taxa de germinação igual a 98,0%.

No entanto, sementes ditas ortodoxas sobrevivem por longos períodos de tempo com conteúdos de água inferior a 5% (Roberts, 1973). As sementes de café aqui estudadas, não apresentaram este comportamento, perdendo rapidamente sua viabilidade quando seu conteúdo de umidade caiu abaixo de 10%.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho reforçam a classificação das sementes de café feita por Ellis et al. (1990), tendo um comportamento intermediário entre ortodoxas e recalcitrantes, não satisfazendo completamente nenhuma das duas definições .

4.2. Aspectos estruturais e ultraestruturais

Caracterização geral

A Hematoxilina-Floxina é uma associação de corantes que não apresenta caráter citoquímico, uma vez que não existe uma relação estequiométrica entre eles e o substrato por eles corado (Lison, 1963). Portanto, a utilização da Hematoxilina-Floxina permitiu uma caracterização morfológica geral do endosperma e do embrião de sementes viáveis e inviáveis de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho.

Este método possibilitou verificar a presença de paredes celulares, núcleos e nucléolos fortemente corados pela Hematoxilina, usualmente utilizada na detecção destas estruturas (Lison, 1963). Nas células do embrião não foi possível, através deste método, distinguir os nucléolos das regiões de cromatina compactada, devido a grande semelhança em tamanho destas estruturas.

O conteúdo citoplasmático dos vários tipos celulares por nós estudado foi evidenciado pela Floxina, que é um corante ácido usualmente utilizado na visualização geral do citoplasma (Lillie, 1969). Estes conteúdos foram, no entanto, melhor identificados e caracterizados através da utilização de métodos citoquímicos específicos.

Polissacarídeos

As principais reservas de carboidratos encontradas nas sementes são amido, açúcares solúveis, oligo e polissacarídeos das paredes celulares. O amido é o polissacarídeo que ocorre com maior frequência.

Sementes endospermicas de leguminosas não possuem o amido com principal reserva de carboidratos. Nestas sementes, galactomananos e xiloglicanos são os principais polissacarídeos de reserva encontrados como componentes das paredes celulares, do endosperma e dos cotilédones. A hidrólise dos galactomananos, pelas enzimas α -galactosidase e β -mananase resulta em galactose e manose. Estes monossacarídeos são

transportados para o embrião, sendo então transformados em glicose ou sacarose (Meier & Reid, 1982; Bewley et al., 1993).

Semente de café é uma semente endospermica que apresenta como principal carboidrato de reserva uma hemicelulose rica em manose e galactose nas paredes celulares de reserva das células parenquimáticas desse endosperma. Aproximadamente 50 a 60% do peso do grão verde refere-se aos polissacarídeos acumulados nestas paredes (Ouguerram, 1989). Estes polissacarídeos são encontrados na forma de hemicelulose que serve como substância de estocagem e que é metabolizada durante a germinação, sendo ainda responsável pelo espessamento das paredes celulares. Esta hemicelulose pode ser extraída com água, não estando portanto associada à celulose ou ao ácido urônico (Frey-Wissiling, 1959; Fahn, 1974).

A celulose representa o principal constituinte das paredes celulares de plantas superiores, além dos xiloglicanos e das substâncias pécticas (Fry, 1988). No entanto, as paredes celulares das células parenquimáticas do endosperma, não apresentaram um resíduo celulósico clássico, devido ao seu baixo teor em glicose (Ouguerram, 1989). Neste trabalho, endosperma de sementes viáveis e inviáveis apresentaram cerca de 10% de glicose em relação a massa seca das sementes.

A presença de polissacarídeos nas paredes celulares das células parenquimáticas do endosperma e nas células do embrião foram evidenciadas, citoquimicamente, através da reação do PAS.

Este método é geralmente utilizado na detecção de glicanas neutras e em vegetais é utilizado na identificação de celulose, hemiceluloses e amido. Estes são compostos que apresentam hidroxilas vicinais necessárias para que a reação ocorra.

A reação do PAS baseia-se na oxidação de grupos hidroxila de carbonos vicinais pelo ácido periódico, formando dois grupamentos aldeídicos que se ligam ao reativo de Schiff através de ligações covalentes (Pearse, 1961).

O reativo de Schiff é preparado a partir da fucsina básica, corante de cor magenta. A adição de radicais sulfito em meio ácido (pH 2-3) destrói o grupo cromofórico, tornando a solução incolor. Esta solução tem afinidade pelos grupos carbonila, formados pela oxidação das hidroxilas. As moléculas incolores do corante ligam-se a esses grupos, restabelecendo, assim, a região cromofórica do corante (Mello & Vidal, 1978; Cortelazzo et al., 1983; Vidal 1987).

Células parenquimáticas do endosperma de sementes viáveis apresentaram paredes celulares intensamente coradas em vermelho. Sementes inviáveis apresentaram uma diminuição na intensidade de coloração das paredes celulares, observada pela cor magenta, menos intensa, que substitue a cor vermelha das paredes celulares do material viável. Esta alteração na intensidade de coloração está indicando que celulose e hemiceluloses sofreram modificações que puderam ser visualizadas microscopicamente por esse método. O mesmo

resultado foi observado nas células cotiledonares e do eixo embrionário.

O Azul de Toluidina é um corante básico que possui radicais NH_3^+ livres, sendo utilizado em soluções cujas faixas de pH oscilam entre 2 a 11-12. A pH 4,0, é pequeno o número de grupos carboxila presentes nas proteínas que se encontram desprotonados. Mas, neste pH, íons fosfato, presentes nos ácidos nucléicos, e radicais sulfato e carboxila, presentes nos polissacarídeos ácidos, são corados pelo AT (Lison, 1963; Pearse, 1961, Vidal, 1977).

Uma outra característica associada ao Azul de Toluidina é o fenômeno de metacromasia. Este evento caracteriza-se por um abaixamento no pico de absorção da solução do corante (hipocromismo), em concentrações maiores que 10^{-6}M . Nos cortes, este efeito ocorre devido a um aumento na disponibilidade de grupos aniônicos e maior proximidade dos mesmos no substrato, possibilitando a interação entre moléculas planares do AT, sendo então necessária maior energia para a excitação de seus elétrons (Vidal, 1977). As paredes celulares quando coradas pelo AT apresentam-se metacromáticas devido a presença desses grupos aniônicos nas substâncias pécticas (Lison, 1963; Pearse, 1961).

Células parenquimáticas do endosperma de sementes viáveis de *C. arabica* apresentaram paredes celulares metacromáticas. Está metacromasia estaria indicando uma grande disponibilidade de grupos aniônicos nesta estrutura presentes nas substâncias

pécticas, possibilitando o empilhamento das moléculas do corante e resultando na sua coloração arroxeada. Nas paredes celulares de células parenquimáticas de sementes inviáveis, observou-se uma diminuição da metacromasia sugerindo que a perda de viabilidade promoveu, nestas paredes, uma menor disponibilidade de grupamentos aniônicos próximos. Essa diminuição na disponibilidade, por bloqueio ou por diminuição na quantidade de substâncias pécticas, revela alterações na polarizabilidade da parede celular.

Estes resultados foram confirmados através da microscopia de polarização, onde as paredes celulares das células parenquimáticas do endosperma apresentaram-se birrefridentes, quando observadas sob luz polarizada, com analisador e polarizador cruzados. Nas sementes viáveis a birrefringência de cor branca de primeira ordem apresentada pelas paredes celulares, revela uma alta organização molecular decorrente da disposição ordenada dos biopolímeros que a constituem, principalmente a celulose (Frey-Wissling & Muhlethaler, 1965). A birrefringência das paredes celulares diminuí com a perda de viabilidade, indicando uma diminuição na ordem molecular dos biopolímeros constituintes da parede, reforçando a idéia de que esteja ocorrendo alterações estruturais e/ou bioquímicas nesta estrutura.

A análise das paredes celulares das células parenquimáticas do endosperma de sementes viáveis de café ao microscópio eletrônico de varredura mostra que as paredes são

espessas, maciças, apresentando espessamentos secundários na forma de nódulos e sem espaços intercelulares. A perda de viabilidade destas sementes armazenadas em condições dessecantes levou ao surgimento de alterações estruturais observados ao microscópio eletrônico de varredura, como por exemplo, separação de paredes adjacentes e ruptura parcial ou total das fibrilas que as compõem.

Estas paredes celulares, quando observadas ao microscópio eletrônico de transmissão, revelaram ser muito compactas, não sendo possível distinguir subunidades. Resultados semelhantes foram obtidos por Ouguerram (1989), analisando paredes celulares de endosperma de sementes quiescentes de *C. arabica* sem prévio tratamento extrativo.

Meier (1958), trabalhando com sementes de damasco, e Chanzy et al. (1984) com sementes de corozo, mostraram que os mananos podem apresentar estrutura microfibrilar. Grosrenaud, (1980) e Atkins et al (1988), através de difração de raio-x e espectroscopia, mostraram que uma parte dos mananos e glicomananos pode ter uma estrutura altamente cristalina. Estas moléculas mostram uma estrutura fibrilar típica com diâmetro de aproximadamente 5 μ m, ao passo que as microfibrilas de celulose da parede primária apresentam um diâmetro entre 2 e 3 μ m (Roland et al., 1975).

A análise ultraestrutural do endosperma de sementes inviáveis de café mostrou paredes celulares mais finas. A região próxima a membrana plasmática apresentou-se levemente

dissociada e microfibrilas puderam ser observadas. Este resultado confirmou as alterações observadas na parede celular após coloração com PAS, AT e a análise ao microscópio de polarização, relevando que a perda de água acarreta alterações na estrutura molecular de parte da parede celular.

Ouguerram (1989), observou que paredes celulares das células do endosperma de *C. arabica* também apresentavam esqueleto fibrilar bem visível nas regiões periplasmáticas durante o processo de mobilização das reservas parietais, que tem início 4 a 6 dias após o início da embebição. Nesta fase a plasmalema torna-se sinuosa e produz vesículas de superfície. O ataque enzimático de degradação da parede celular ocorre, então, a partir do citoplasma e progride em direção centrífuga.

No endosperma de sementes inviáveis, observamos também a presença de vesículas que surgem a partir da plasmalema e que se localizam no espaço periplasmático. Estas vesículas poderiam conter hidrolases que agiriam sobre a região periplasmática da parede celular levando a digestão de parte dos seus componentes nesta região.

No entanto, a dosagem bioquímica não revelou uma diminuição significativa de polissacarídeos nas paredes celulares com a perda de viabilidade. No endosperma, o galactomanano encontrado apresentou uma proporção manose/galactose de 2:1. Essa relação não foi alterada durante a dessecação. Portanto, as alterações reveladas pelos diversos métodos de microscopia de luz e eletrônica devem estar

refletindo, na semente como um todo, uma alteração no estado de agregação dos componentes da parede celular, levando a uma menor interação com o corante, mais do que uma redução na quantidade desta reserva.

Com a perda de viabilidade, as paredes celulares das células cotiledonares, quando observadas ao microscópio eletrônico de varredura, apresentaram-se retraídas. Este resultado foi confirmado quando o material foi analisado ao microscópio eletrônico de transmissão. As paredes celulares do eixo apresentaram um conteúdo não homogêneo, podendo este ser um indício de que elas poderiam estar sendo degradada. O ataque enzimático estaria então ocorrendo na forma de bolsas de digestão, produzindo um aspecto corroído da parede celular do eixo embrionário.

A dosagem bioquímica revelou nos embriões uma menor porcentagem de polissacarídeos em função da matéria seca (~20%) o que está de acordo com a morfologia observada em sua paredes, bem mais finas do que no endosperma. O principal polissacarídeo encontrado nestas paredes foi a celulose, uma vez que as dosagens realizadas revelaram um teor de aproximadamente 70% de glicose.

Em termos de tegumento externo (pergaminho), sua composição revelou uma grande quantidade de açúcares neutros e dentre eles, xilose e glicose, sugerindo a predominância de xiloglicanos neste local. Uma característica para sementes permeáveis à água é a de apresentarem grande quantidade de

xiloglicanos (Seno, 1993), em contraste àquelas impermeáveis, como o flamboyant, com apenas 1,8% de xilose (Papp & Cortelazzo, dados não publicados). Isto reforça o fato de que o tegumento nas sementes de café, por esse parâmetro, pode ser considerado permeável a água, não sendo uma barreira para a embebição das sementes.

Segundo Dentan (1985b), os carboidratos citoplasmáticos evidenciados pela reação do PAS e microscopia eletrônica de varredura são encontrados na forma de filamentos e pequenas vesículas com distribuição difusa.

As células parenquimáticas do endosperma de sementes viáveis, coradas pela reação do PAS, apresentaram conteúdo citoplasmático PAS-positivo homogêneo, e com a perda de viabilidade não se verificou alteração na intensidade de coloração desta reserva. Resultados semelhantes foram obtidos para as células que constituem o embrião.

Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível visualizar os filamentos de carboidratos na semente como um todo e verificar que, nas células parenquimáticas e cotiledonares ocorreu uma diminuição no seu conteúdo com a perda de viabilidade. Nas células do eixo embrionário de sementes inviáveis não detectamos a presença dos filamentos de carboidratos.

Como não realizamos colorações específicas para carboidratos para observação ao microscópio eletrônico de transmissão não foi possível identificar, neste nível, este

tipo de reserva. O microscópio eletrônico de transmissão, permitiu identificar com precisão apenas plastoglólulos em algumas células cotiledonares de sementes viáveis.

Portanto, as análises citoquímicas mostraram que as principais reservas de polissacarídeos das sementes de café encontram-se no endosperma, nas paredes celulares, na forma de galactomanano.

Sabe-se que nos galactomananos, as ramificações de galactose aumentam a sua solubilidade (Dea & Morison, 1975), bem como sua capacidade de reter água. Portanto, nas sementes que acumulam galactomananos, este polissacarídeo pode influir a embebição de toda a semente. Esta característica levou Reid & Bewley (1979) a considerarem o galactomanano como uma molécula multifuncional, desempenhando não apenas uma função de reserva de carboidratos, mas também atuando no controle hídrico da semente. No café, o acúmulo de galactomananos nas paredes celulares das células parenquimáticas do endosperma poderiam ser responsáveis pela manutenção do alto teor de umidade das sementes maduras, principalmente se considerarmos seu alto grau de ramificações (1 galactose a cada 2 manoses). Como nesta semente o endosperma envolve completamente o embrião, ele estaria protegendo o mesmo de possível injúria por dessecação.

Nas sementes inviáveis, com baixo conteúdo de água, verificamos que as células que constituem o embrião são as que mais sofreram danos celulares, parecendo perderem a proteção

exercida pelas células parenquimáticas quando no seu estado hidratado.

Proteínas

As proteínas são estocadas nas sementes em organelas denominadas corpos protéicos. Eles podem ser encontrados em tecidos haplóides, diplóides ou triplóides, sendo envolvidos por uma membrana simples. São constituídos principalmente por proteínas, ácido fítico, cátions, ácido ribonucléico e enzimas hidrolíticas, como fosfatases, Rnase, α e β -glicosidades, α -amilase, proteases e fitases. Com baixos teores de umidade, estas enzimas não teriam condições de atuar, o que não seria o caso nas sementes de café ainda com alto teor de água. Lipídios e carboidratos (exceto amido) podem ocorrer em pequenas quantidades. Esta organela é designada através de vários outros termos, tais como, grão de aleurona, proteoplasto e outros, mas corpo protéico é o termo mais amplamente utilizado por ser mais genérico e não implicar na sua precisa localização ou a origem específica do seu material de reserva (Pernollet, 1978; Larkins, 1981; Murray, 1984).

Xylidine Ponceau é um corante aniônico azóico que possui dois radicais sulfato. A partir de pH próximo de 1,0 estes radicais encontram-se desprotonados, ligando-se aos grupos catiônicos disponíveis. A pH 2,5 as proteínas podem ser visualizadas, uma vez que neste pH seus grupos amino encontram-

se protonados unindo-se ao XP através de ligação eletrostática (Cortelazzo & Vidal, 1991) .

Nas células parenquimáticas do endosperma de sementes viáveis a coloração pelo XP demonstrou a natureza protéica dos glóbulos corados em vermelho, em contraste com outros glóbulos XP-negativos localizados próximos a parede celular. No centro do citoplasma encontramos um conteúdo difuso XP-positivo de natureza protéica.

Estes resultados foram confirmados pela análise do endosperma de sementes viáveis ao microscópio eletrônico de varredura e de transmissão.

As eletromicrografias do material analisado ao microscópio eletrônico de varredura mostraram a presença de corpos protéicos entre os glóbulos de lipídios e na região central do citoplasma. A microscopia eletrônica de transmissão revelou que os glóbulos XP-positivos são corpos protéicos envolvidos por uma membrana simples e apresentando a mesma distribuição observada ao microscópio eletrônico de varredura.

O microscópio eletrônico de transmissão também confirmou a presença de um material protéico não incluso em corpo protéico formando uma matriz citoplasmática. Nesta matriz encontramos dispersos os glóbulos de lipídios, vacúolos, plastos e depósitos osmiofílicos. Dentan (1977) encontrou o mesmo padrão de distribuição de proteínas no endosperma de *C. arabica*.

Com a perda de viabilidade observou-se uma aparente redução na intensidade de coloração do material XP-positivo e

redução no número de glóbulos corados quando comparado com o material viável. Resultados semelhantes foram encontrados em sementes de *P. vulgaris* submetidas ao envelhecimento acelerado por 16 dias (Begnami, 1991, Begnami & Cortelazzo, 1996) e envelhecidas naturalmente por 21 meses em condições de armazenamento com altas temperaturas e umidade relativa (Lopes, 1990). Walkowski (1981) detectou uma redução no conteúdo protéico de sementes de *C. arabica* durante a estocagem de grãos verdes. Segundo Clifford (1985) esta redução poderia estar associada com a atividade de algumas enzimas como por exemplo a polifenoloxidase, que poderia ser ativada durante o processamento e estocagem dos grãos, levando a mudanças tais como produção de aminoácidos livres e ácidos graxos livres.

Danos nas membranas plasmáticas têm sido descritos durante estocagem em condições dessecantes. De modo similar as membranas dos corpos protéicos podem sofrer estes mesmos danos (Villiers, 1983). Osborne (1983) apontou como um dos principais eventos do processo de envelhecimento em sementes o rompimento das membranas dos corpos protéicos com a liberação de enzimas proteolíticas. Estas enzimas poderiam então estar associadas ao processo de perda de viabilidade através da degradação de proteínas citoplasmáticas solúveis, nucleoproteínas, ribossomos e enzimas (Ching & Schoolcraft, 1968).

Muitas proteínas encontradas nos corpos protéicos de células parenquimáticas do endosperma representam enzimas importantes, como por exemplo a polifenoloxidase (Clifford,

1985). Portanto, o fenômeno de redução do conteúdo protéico em sementes de café durante sua estocagem e consequente perda de viabilidade poderia estar associado a uma menor integridade dos compartimentos intracelulares, como vacúolos e corpos protéicos.

Proteínas neutras ou básicas são pouco coradas pelo AT a pH 4,0. Portanto, a ortocromasia apresentada pelos corpos protéicos e pela proteína difusa no citoplasma das células parenquimáticas do endosperma revela a natureza acídica deste material, provavelmente devido à presença de ácido glutâmico e aspártico na estrutura da molécula. Isto faz com que o corante ligue-se à proteína de forma espaçada, resultando assim na cor esverdeada detectada (Vidal, 1977). Com a perda de viabilidade observou-se uma menor intensidade de coloração destas proteínas e uma redução no número de corpos protéicos. Estes resultados reforçam a idéia de que o armazenamento em condições dessecantes e consequente perda da viabilidade levam a uma redução do conteúdo das proteínas difusas no citoplasma devido ao rompimento das membranas que delimitam os corpos protéicos.

Células do embrião de sementes viáveis coradas pelo XP a pH 2,5 apresentaram glóbulos e um material citoplasmático finamente granular XP-positivo. A estocagem em condições dessecantes acarretou em uma aparente redução do conteúdo citoplasmático XP-positivo. A coloração pela HF confirmou este resultado.

As análises ao microscópio eletrônico de varredura também mostraram uma diminuição no número de corpos protéicos, que passaram a ocupar uma posição parietal.

As eletromicrografias de células cotiledonares de sementes viáveis quando comparadas com as obtidas a partir de sementes inviáveis mostraram como principal alteração a posição parietal dos corpos protéicos e das proteínas dispersas. Nas células do material inviável, foi observado o surgimento de um grande vacúolo central além de inúmeros pequenos vacúolos dispostos próximos à parede celular. Esta última alteração ultraestrutural ocorreu de modo mais drástico nas células do eixo embrionário de sementes inviáveis e pode explicar a posição parietal dos corpos protéicos nas mesmas.

Nas células do eixo, também foi possível detectar alterações no estado de agregação do material protéico não incluso em corpos protéicos. Além disto, nas sementes inviáveis esta reserva aparentemente sofre uma redução, o que não foi observado nas células cotiledonares. Portanto parece-nos que as células que constituem o eixo embrionário são mais sensíveis à dessecação que as células cotiledonares.

Assim como nas células parenquimáticas do endosperma, as células do embrião de sementes inviáveis de *C. arabica* sofreram rompimentos nas membranas dos corpos protéicos com a liberação de enzimas proteolíticas que poderiam ter agido sobre as proteínas difusas no citoplasma. Uma outra consequência deste

evento celular seria a redução no número de corpos protéicos nas células do embrião.

Lipídios

Lipídios são sintetizados em todos os tecidos das plantas, sendo que as sementes podem ser órgãos ricos desses compostos, armazenados na forma de reservas nos cotilédones ou no endosperma (Esau, 1986). A quantidade de lipídio nas diferentes espécies pode variar desde 1% até 60% do peso seco da semente. Em quase todas as espécies vegetais, os lipídios são estocados na forma de triacilgliceróis (Ohlrogge & Browse, 1995).

A maioria dos ácidos graxos encontrados em plantas têm cadeia com 16 ou 18 carbonos e contém uma ou três duplas ligações cis. Os ácidos graxos mais comumente encontrados são: palmítico (16:0), linoléico (18:3), oléico (18:1) e esteárico (18:0).

A síntese, principalmente de triacilgliceróis, é observada durante a maturação das sementes e a sua degradação durante a germinação das mesmas. Fisiologicamente, os lipídios podem ser utilizados como compostos de reserva, presentes nos glóbulos lipídicos, como componentes estruturais das membranas plasmáticas e como metabólitos intermediários nos processos de biossíntese (Slabas et al., 1988).

Nas sementes maduras, os triacilgliceróis são estocados como glóbulos lipídicos mais ou menos esféricos, com um diâmetro médio de 1 μm (Huang, 1992; Murphy, 1993; Herman,

1994). Estas organelas parecem ser envolvidas por uma membrana monolamelar. Estas membranas contém fosfolipídios e proteínas denominadas oleosinas. Nos glóbulos lipídicos os constituintes das membranas perfazem apenas 5% do seu peso, sendo que 90 a 95% dizem respeito aos triacilgliceróis (Ohlrogge & Browse, 1995).

Os glóbulos de lipídios apresentam-se osmiofílicos ao microscópio eletrônico devido a sua reatividade com o tetróxido de ósmio (Dentan, 1977). Nas sementes de café eles se distribuem de forma homogênea no endosperma, cotilédones e eixo embrionário.

Dentan (1985C) constatou, através de análises citoquímicas, que os glóbulos de lipídios encontrados nas células parenquimáticas do endosperma são constituídos por lipídios insaturados e neutros.

Existem poucos dados sobre a composição lipídica do embrião. A maioria dos trabalhos refere-se ao conteúdo total da semente ou do órgão de reserva e na influência do embrião na mobilização desta reserva (Marriot & Northcote, 1975; Bewley & Black, 1978; Paulilo, 1980). Silva (1995) mostrou que as reservas lipídicas do eixo de sementes de *Dalbergia miscolobium* desempenham um importante papel no início da germinação.

Hendry et al. (1992) verificaram que durante a perda de viabilidade de sementes recalcitrantes de *Quercus robur* L., submetidas a dessecação, havia um aumento na peroxidação de lipídios e acúmulo de radicais livres no eixo embrionário.

Nestas sementes, estes processos parecem estar confinados ao eixo, não sendo observados em igual intensidade nos cotilédones. Segundo estes autores, o eixo embrionário seria mais susceptível aos danos causados pela perda de água durante a estocagem do que os outros tecidos que constituem a semente.

Segundo o acima exposto, e considerando os resultados obtidos através das análises estruturais e ultraestruturais de sementes de café, verificamos no endosperma uma pequena redução no número de glóbulos de lipídios em algumas células observadas ao microscópio eletrônico de varredura. O embrião apresentou, no entanto, uma diminuição acentuada no número de glóbulos de lipídios e também a aparente fusão de glóbulos menores. Sendo assim, dosamos os ácidos graxos e determinamos o índice de peróxidos no embrião destas sementes.

A estocagem de sementes de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho em condições dessecantes acarretou uma degradação significativa de ácido linoléico e um aumento de ácido palmítico. Isso sugere que durante o processo, o ácido linoléico (18:2) poderia estar sendo dessaturado e convertido a ácido palmítico (16:0) através da perda de 2 carbonos, talvez através da β -oxidação. Estes resultados são reforçados pelo menor índice de peróxidos obtidos para as sementes inviáveis.

As alterações estruturais e ultraestruturais mais marcantes com relação as reservas lipídicas ocorreram no embrião, havendo uma aparente redução no número de glóbulos de lipídio com o aparecimento de estruturas maiores, indicando a

fusão dos pequenos glóbulos lipídicos pré-existentes. Em amostras de sementes ortodoxas com baixa viabilidade, embriões frequentemente contêm células nas quais os glóbulos de lipídios tornam-se confluentes, formando grandes massas de material homogeneamente coradas. Este resultado também foi observado em sementes com baixa viabilidade infectadas por fungos, durante a sua estocagem (Villiers, 1983).

Compostos fenólicos

De acordo com Dentan (1985a), ácido clorogênico é encontrado associado com a cutícula e no citoplasma das células parenquimáticas do endosperma, principalmente no espaço periplasmático. O ácido clorogênico pode encontrar-se associado a cafeína possivelmente na proporção molar de 1:1 ou 2:1 formando um complexo que foi estudado por Horman & Viani (1971). Estes complexos fenólicos são capazes de reagir com metais por quelação formando complexos elétron-densos com o tetróxido de ósmio (Dentan, 1985a, b).

Entretanto, essa proposição poderia ser questionada dada a alta solubilidade da cafeína e do ácido clorogênico. Nesse caso, a complexação do ósmio estaria ocorrendo com fenóis insolúveis formando depósitos osmiofílicos citoplasmáticos e no espaço perimembranoso tanto nas células parenquimáticas do endosperma como nas células do embrião de sementes viáveis

A perda de umidade e consequente redução na viabilidade acarretou em um aumento na deposição de grãos osmiofílicos

principalmente no espaço perimembranoso em células parenquimáticas do endosperma e cotiledonares.

Dentan (1985c) trabalhando com grãos maduros, imaturos e imaturos fermentados de *C. arabica* observou que grãos maduros apresentavam maior deposição de polifenóis na cutícula e no citoplasma das células parenquimáticas, principalmente no espaço periplasmático. Nos grãos imaturos e imaturos fermentados a cutícula não apresentava nenhuma coloração, ao contrário do citoplasma parenquimatoso, que mostrava coloração intensa, principalmente no espaço perimembranoso. Segundo a autora esta maior deposição de polifenóis nas células parenquimáticas nos grãos imaturos seria devido a maior atividade de proteases, lipases e polifenoloxidasas, levando à ruptura das membranas intracelulares.

Resultado semelhante pode ocorrer durante o processo de perda da viabilidade. Nas sementes inviáveis a alteração ultraestrutural mais marcantes ocorrem no embrião, com ruptura de membranas, havendo liberação, no citoplasma, de enzimas com atividades diferentes e muitas vezes antagônicas.

Vacúolos

O vacúolo está envolvido na manutenção do potencial osmótico da célula vegetal, no isolamento de enzimas hidrolíticas (fosfatase ácida, proteases, RNase e DNase) e de alguns metabólitos tóxicos do restante do citoplasma, sendo responsável ainda pelo isolamento temporário de produtos

intermediários da fotossíntese (Boller, ,1982; Canut et al., 1987; Matile, 1978; Perry et al., 1987; Raven, 1987; Van Der Walk & Van Loon, 1987). Assim sendo, torna-se evidente a importância da integridade da delimitação do compartimento vacuolar para a manutenção da viabilidade celular

Nas células parenquimáticas do endosperma de sementes viáveis não foi observada a presença de vacúolos, mas com a perda de umidade, e consequente perda de viabilidade, observou-se o aparecimento de vários pequenos vacúolos, principalmente entre os glóbulos de lipídios. Estes vacúolos apresentaram-se perfeitamente delimitados por membrana.

As células dos cotilédones e do eixo embrionário de sementes viáveis apresentaram vacúolos de diferentes tamanhos e com conteúdo heterogêneo. Os cotilédones de sementes inviáveis apresentaram aumento no número de pequenos vacúolos delimitados por membrana, com conteúdo mais ou menos granular e a presença de um grande vacúolo central. No eixo embrionário de semente inviável também foi observado um maior número de vacúolos menores sendo que alguns apresentavam ruptura nas membranas que os delimitam. Resultado semelhante aos encontrados para as células de eixo foi encontrado em células do mesofilo da espécie sensível a dessecação *Aylthonia gencianoides* (Rosseto, 1997). Este pode ser um fator importante que poderia estar participando do processo de perda de viabilidade destas sementes devido aos danos celulares e mesmo à morte celular provocada pelo conteúdo vacuolar liberado após a ruptura da

membrana e consequente perda da compartimentalização intracelular (Boller, 1982; Canut et al. , 1987; Crowe et al., 1984; Matile, 1975; Van Der Walk & Van Loon, 1987).

Um importante aspecto da degeneração das células do eixo de sementes estocadas é a substituição de pequenos vacúolos por compartimentos maiores, indicando a ocorrência de anormalidades intracelulares no início da deterioração das células do eixo embrionário de sementes recalcitrantes estocadas em condições dessecantes, independente da espécie (Berjak et al., 1984; Farrant et al., 1985; Farrant et al., 1989). Estes resultados contradizem os obtidos para as células do endosperma e cotiledonares de sementes de *C. arabica* durante estocagem em condições dessecantes.

Resultados semelhantes aos encontrados em células parenquimáticas do endosperma e células cotiledonares de sementes de café foram obtidos em células do mesofilo de espécies tolerantes à dessecação. Gaff et al. (1976) observaram que em *Borya nitida*, o vacúolo fragmenta-se em vacúolos menores e de tamanho variado, sem ocorrer ruptura de membranas, o mesmo ocorrendo para *Xerophyta plicata* (Rosseto, 1992) e *Nanuza plicata* (Rosseto, 1997). A formação de pequenos vacúolos íntegros, sem ruptura de membranas, nestas espécies resistente à dessecação, revela que os compartimentos intracelulares foram mantidos intactos durante o processo de dessecação, não ocorrendo liberação de enzimas e de substâncias incompatíveis que existam em cada compartimento (Bewley, 1995; Schwab & Gaff,

1986; Sun et al., 1994). Portanto, pode-se supor que as células parenquimáticas do endosperma e as células cotiledonares seriam mais resistentes ao processo de perda de água do que as células do eixo embrionário devido a manutenção dos compartimentos intracelulares, o que reforça a idéia de um comportamento não tipicamente recalcitrante em café.

Núcleos e nucléolos

Núcleos e nucléolos foram corados pelo AT a pH 4,0 devido à presença de grupos fosfato do DNA nuclear e RNA nucleolar. Esta coloração foi eficiente para demonstrar que o núcleo das células parenquimáticas do endosperma de semente viável apresentaram algumas regiões de cromatina mais condensada e nucléolo evidente. Sementes inviáveis apresentaram compactação crescente da cromatina além de alguns núcleos picnóticos. Estes resultados foram confirmados através da coloração pela Hematoxilina.

Núcleos de células cotiledonares e do eixo embrionário de sementes viáveis corados pelo AT a pH 4,0 apresentaram cromatina descompactada com algumas regiões cromatínicas mais condensadas, o que dificultou a identificação do nucléolo. Nas sementes inviáveis os núcleos apresentaram uma maior compactação cromatínica e alguns núcleos picnóticos foram observados.

A principal mudança nuclear observada em sementes ortodoxas durante a perda de viabilidade é a condensação da

cromatina. Nas células do embrião de sementes viáveis o nucleoplasma cora-se de forma homogênea, na forma de uma cromatina descompactada. Com a perda de viabilidade, durante estocagem em condições dessecantes, a cromatina passa a apresentar coloração intensa e homogênea, indicando aumento no seu grau de compactação (Villiers, 1983). Resultados semelhantes foram encontrados em embriões de arroz durante estocagem em condições dessecantes, em cotilédones de *C. ensiformes* e *C. gladiata*, quando da sua abscisão da planta jovem (Cortelazzo, 1989), em sementes de *P. vulgaris* durante envelhecimento natural por 40 meses (Lopes, 1990) e em sementes de *P. vulgaris* e *Senna reticulata* submetidas ao envelhecimento acelerado (Begnami, 1991; Begnami & Cortelazzo, 1996).

O aumento no grau de compactação cromatínica resulta em menor integridade do material genético e sugere perda de coordenação dos processos de síntese e aumento das aberrações cromossômicas encontradas em muitas espécies de sementes durante o envelhecimento (Villiers, 1983)

Nas células cotiledonares de sementes inviáveis a cromatina apresenta-se condensada e com algumas regiões vacuolizadas, algo semelhante ao que ocorre em células que passam por processo de degeneração e apoptose (Wyllie et al., 1980). Núcleos de células do eixo embrionário apresentaram cromatina compactada e neste caso foi difícil identificar o nucléolo.

Tecidos animais e vegetais submetidos a vários tipos de estresse, tais como, choque térmico, ação de metais pesados, radiação gama, estresse hídrico e jejum, apresentaram alterações no grau de compactação cromatinica, fenômeno de vacuolização e presença de núcleos picnóticos (Mello, 1989; Dantas, 1990, Rosseto, 1997).

A análise ultrestrutural dos núcleos de sementes viáveis do embrião revelou a presença de envoltório nuclear íntegro com cromatina frouxa e algumas regiões cromatínicas mais condensadas, com nucléolo único.

A ausência de trabalhos estruturais e ultraestruturais com sementes recalcitrantes impossibilita a comparação dos resultados aqui obtidos para sementes de café durante o processo de armazenamento em condições desseccantes. No entanto, em nível nuclear o que se observa são alterações estruturais e ultraestruturais que se aproximam daquelas encontradas em sementes ortodoxas durante a perda de viabilidade. Portanto, estes resultados sugerem que as células que constituem as semente de *C. arabica*, durante o processo de perda de viabilidade, sofrem alterações nucleares que se aproximam daquelas observadas em sementes ortodoxas na mesma situação.

No embrião as alterações ultraestruturais indicam que a perda de água provoca lesão generalizada nestas células, onde as reservas lipídicas e protéicas, núcleo, vacúolos e deposição de compostos fenólicos sofrem várias alterações estruturais e ultraestruturais que levam à morte celular.

Ainda, de acordo com Berjak et al. (1984) a sensibilidade à dessecação de sementes recalcitrantes pode ocorrer devido ao início de eventos celulares associados à germinação durante a estocagem. As mudanças celulares que foram observadas incluem organização mitocondrial aumentada, maior atividade de enzimas respiratórias, maior atividade do complexo de Golgi, síntese de proteínas aumentada, acúmulo de amido em plastídios, início da divisão celular aumento na vacuolização (Farrant et al., 1985). Estes eventos são comparáveis aos observados em sementes ortodoxas embebidas e germinando, quando se tornam sensíveis à dessecação.

As sementes viáveis de *C. arabica* com 45,30% de umidade relativa armazenadas em condições dessecantes não apresentaram nenhuma destas alterações celulares, indicativas do início de eventos germinativos, como já encontrado para outras espécies recalcitrantes tais como, *A. marina* (Farrant et al, 1992), *A. angustifolia*, *S. membranaceus* e *L. kirkii* (Farrant et al, 1989; Berjak et al., 1992).

Além disso, sementes de café inviáveis apresentaram algumas alterações celulares comparáveis àquelas detectadas durante o envelhecimento de sementes de *P. vulgaris* e *S. reticulata* (Lopes, 1990; Begnami & Cortelazzo, 1996), que são sementes ortodoxas. Este fato em conjunto com os dados obtidos para a porcentagem de germinação durante o período de estocagem são indícios de que sementes de *C. arabica* apresentam um

comportamento intermediário, não podendo ser classificadas como ortodoxas ou recalcitrantes.

5. CONCLUSÕES

1. As sementes de *C. arabica* perdem rapidamente sua viabilidade quando seu conteúdo de umidade cai abaixo de 10%.

Assim, estas sementes possuem comportamento intermediário entre sementes ortodoxas e recalcitrantes, não satisfazendo completamente nenhuma das definições.

2. Células parenquimáticas do endosperma de sementes viáveis de *C. arabica* apresentam paredes celulares metacromáticas devido às substâncias pécticas. Com a perda de viabilidade ocorre uma diminuição da metacromasia e, como consequência, da carga negativa das paredes. Nas células do embrião não se observa uma alteração na metacromasia das paredes celulares.

3. As paredes celulares das células parenquimáticas do endosperma apresentam-se birrefringentes. A birrefringência diminui com a perda de viabilidade, indicando uma diminuição na ordem molecular dos biopolímeros das paredes, reforçando a idéia de que estejam ocorrendo alterações estruturais e/ou bioquímicas nesta estrutura.

4. As paredes celulares das células parenquimáticas do endosperma e do embrião de sementes viáveis apresentam-se intensamente coradas pelo PAS, indicando a presença de polissacarídeos. A perda de viabilidade acarretou uma diminuição na intensidade de coloração. A dosagem bioquímica dos polissacarídeos não revelou uma diminuição significativa no endosperma com a perda de viabilidade. Portanto, as alterações citoquímicas reveladas pelo método do PAS devem estar refletindo uma alteração no estado de agregação dos componentes da parede celular.

5. As paredes celulares das células parenquimáticas do endosperma de sementes viáveis de café ao microscópio eletrônico de varredura são espessas, maciças, com nodosidades características e sem espaços intercelulares. A perda de viabilidade leva ao surgimento de alterações estruturais, como separação de paredes adjacentes e ruptura parcial ou total das fibrilas que as compõem. As paredes celulares de embriões viáveis são finas e distendidas. Nas sementes inviáveis elas apresentaram-se retraídas.

6. Paredes celulares das células parenquimáticas do endosperma e do embrião sofreram alterações ultraestruturais com a perda de viabilidade. No endosperma de sementes inviáveis, elas eram mais finas e a região próxima à membrana plasmática apresentou-se levemente dissociada e com aspecto

fibrilar. As paredes celulares dos cotilédones inviáveis mostraram-se retraídas e no eixo elas apresentaram aspecto vacuolizado, indicando alteração no estado de agregação dos seus componentes estruturais.

7. No embrião de sementes inviáveis ocorreu uma degeneração do citoplasma, onde os lipídios tornaram-se confluentes, e as células do eixo apresentaram total dissolução da sua estrutura interna.

8. Nas células parenquimáticas do endosperma e do embrião de sementes inviáveis foi detectada uma alteração no estado de agregação do material protéico e no seu padrão de distribuição, com aparente redução desta reserva.

9. Observamos uma maior deposição de fenóis, principalmente no espaço perimembranoso, tanto no endosperma quanto no embrião de sementes inviáveis.

10. Houve um aumento no número de vacúolos nas células parenquimáticas do endosperma como do embrião decorrente da perda de umidade e consequente perda de viabilidade.

11. Nas células do eixo embrionário de sementes inviáveis as membranas apresentaram rompimentos, prejudicando a integridade dos compartimentos intracelulares.

12. Sementes de *C. arabica* inviáveis apresentam núcleos com compactação crescente da cromatina. Núcleos picnóticos também foram observados tanto nas células do endosperma como nas células do embrião. Células cotiledonares apresentaram núcleos com cromatina condensada e vacuolizada. No eixo embrionário, além da condensação cromatínica não foram encontrados nucléolos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-BAKI, A. & ANDERSON, J.D., 1970. Viability and leaching of sugars from germination barley. **Crop Sci.** 10: 31-33.
- AMABLE, R.A. & OBENDORF, R.L., 1986. Soybean seed respiration during simulated preharvest deterioration. **J. Exp. Bot.** 37: 1364-1375.
- ATKINS, E.D.T.; FARNELL, S.; BURDEN, C.; MACKIE, W. & SHELDRIK, B., 1988. Crystalline Structure and Packing of Mannan I. **Biopolymers** 27: 1097-1105.
- BACCHI, O. , 1955. Seca da semente de café ao sol. **Bragantia** 14(22): 225-236.
- BACCHI, O. , 1956. Novos ensaios sobre a seca da semente de café ao sol. **Bragantia** 15(8): 84-91.
- BACCHI, O. , 1958. Estudos sobre a conservação de sementes. IV. Café. **Bragantia** 17(20): 261-270.
- BEGNAMI, C.N., 1991. Alterações celulares durante o envelhecimento em sementes de *Phaseolus vulgaris* L. e *Senna reticulata* (Willdenow) Irwin & barneby. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, **tese de Mestrado**.
- BEGNAMI, C.N. & CORTELAZZO, A.L., 1996. Cellular alterations during accelerated aging of French bean seeds. **Seed Sci. Technol.** 24: 295-303.

- BENDANA, F.E., 1962. The physiology of coffee seeds. I. Problems related to storage. *Coffee* 4: 73-75.
- BERJAK, P.; DINI, M. & PAMMENTER, N.W., 1984. Possible mechanisms underlying the differing dehydration responses in recalcitrant and orthodox seeds: desiccation-associated subcellular changes in propagules of *Avicennia marina*. *Seed Sci. & Technol.* 12: 365-384.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; VERTUCCI, C., 1992. Homoiohydrous (recalcitrant) seeds: Developmental status, desiccation sensitivity and the state of water in axes of *Landolphia kirkii* Dyer. *Planta* 186: 249-261.
- BEWLEY, J.D., 1995. Physiological aspects of desiccation tolerance - A retrospect. *Int. J. Plant Sci.* 156: 393-403.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M., 1978. *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination*. Springer-Verlag, Berlin
- BEWLEY, J.D.; LEUNG, D.W.M.; MACISAC, S.; GRANT, J.S.R. & XU, N., 1993. Transient starch accumulation in the cotyledons of fenugreek seeds during galactomannan from the endosperm. *Plant Physiol. Biochem.* 31: 483-490.
- BLOWERS, L.E.; STORMONTH, D.A. & BRAY, C.M., 1980. Nuclei acid and protein synthesis and loss of vigour in germinating wheat embryos. *Planta* 150: 19-25.
- BOLLER, T., 1982. Enzymatic equipment of the plant vacuoles. *Physiol. Veg.* 20: 247-257.

- BRADBURY, AG.W. & HALLIDAY, D.J., 1990. Chemical structures of green coffee bean polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.*, **38**: 389-392.
- CANUT, H.; ALIBERT, G.; CARRASCO, A. & BOUDET, A.M., 1987. Protein degradation in vacuoles. IN: *Plant Vacuoles* (Marin ed), Plenum Press, New York, pp.369-380.
- CARVALHO, A., 1946. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie *arabica*. *Bol. Sup. Serv. Café (Secr. Fazenda)* **21(229)**: 127-130.
- CHABOT, J.F. & LEOPOLD, A.C., 1985. Ultrastructural aspects of chilling injury in the soybean radicle. *Am. J. Bot.* **72**: 1120-1126.
- CHANZY, H.D.; GROSRENAUD, A. ; VUONG, R. & MACKIE, W., 1984. The crystalline polymorphism of mannan in plant cell wall and after recrystallisation. *Planta* **161**: 320-329.
- CHEAH, K.S.E. & OSBORNE, D.J., 1978. DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. *Nature* **272**: 593-599.
- CHIN, T.M. & SHOOLCRAFT, I., 1968. Physiological and chemical differences in aged seeds. *Crop Sci.* **8**: 407-409.
- CIAMPOROVA, M., 1976. Ultrastructure of meristematic epidermal cells of maize root under water deficit conditions. *Protoplasma* **87**: 1-15.

- CLIFFORD, M.N., 1985. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. IN: **Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage** (M.N. Clifford and K.C. Willson, eds), 1st Edition, American Edition, Westport, Connecticut, pp. 305-374.
- CORTELAZZO, A.L., 1989. Caracterização topoquímica e bioquímica de sementes de *Canavalia ensiformes* DC e *Canavalia gladiata* DC. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, **tese de Doutorado**.
- CORTELAZZO, A.L., 1992. Detecção e quantificação do amido em cotilédones de *Canavalia ensiformes* e *C. gladiata* durante o desenvolvimento inicial da planta. **Revta Brasil. Bot.** 15: 157-162.
- CORTELAZZO, A.L. & VIDAL, B.C., 1991. Soybean seed proteins: detection in situ and mobilization during germination. **Revta Brasil. Bot.** 14: 27-33
- CORTELAZZO, A.L.; VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S., 1983. Basic fuchsins and the Schiff-aldehyde reaction. I. Spectral absorption characteristics in solution. **Acta Histochem.** 73: 121-133.
- CROWE, L.M.; MOURADIAN, R.; CROWE, J.H.; JACKSON, S.A. & WOMERSLEY, C., 1984. Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. **Biochimica et Biophysica Acta** 769: 141-150.

- DANTAS, M.M., 1990. Efeitos de choque de temperaturas sobre fenótipos nucleares de *Triatoma infestans* Klug, em condições de insetário da SUCEN de Mogi-Guaçu. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, **tese de Mestrado**.
- DEA, I.C.M. & MORISON, A., 1975. Chemistry and interations of seed galactomannans. **Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.** 31: 241-312.
- DEDECA, D.M., 1959. Anatomy. IN: **Advances in coffee production technology** (B. Sachs and P.G. Sylvain, eds), 1nd Edition, Coffee & Tea Industries, New York, pp. 25-30.
- DELOUCHE, J.C., 1968. Physiology of seed storage. **Corn and Sorghum Res.** 23: 83-90.
- DENTAN, E., 1977. Structure fine du grain de café vert. 8^e **Colloque Scientifique sur le café**, ASIC, Paris, pp. 341-368.
- DENTAN, E., 1985a. The microscopic structure of coffee bean. IN: **Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage** (M.N. Clifford and K.C. Willson, eds), 1nd Edition, American Edition, Westport, Connecticut, pp. 285-304.
- DENTAN, E., 1985b. Étude microscopique du développement et de la maturation du grain de café. 11^e **Colloque Scientifique sur le café**, ASIC, Lomé, pp. 341-368.
- DENTAN, E., 1985c. Étude microscopique de grains de café matures, immatures et immatures fermentés arabica santos. 11^e **Colloque Scientifique sur le café**, ASIC, Lomé. pp. 341-368.

- ELLIS, R.H.; HONG, T.D. & ROBERTS, E.H., 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. *J. Exp. Bot.* **41**(230): 1167-1174.
- ELLIS, R.H.; SIMON, G. & COVELL, S., 1987. The influence of temperature on seed germination rate in grain legumese *J. Exp. Bot.* **38**: 1033-1043.
- ESAU, K., 1986. *Anatomia das plantas com sementes*. Ed. Edgard Blucher, São Paulo.
- ESKIN, N.A.M., 1979. Plant Pigments, Flavors and Textures: The Chemistry and Biochemistry of Selected Compounds. Academic Press, New York, pp. 176-183 apud CLIFFORD, M.N., 1985. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. IN: *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage* (M.N. Clifford and K.C. Willson, eds), 1st Edition, American Edition, Westport, Connecticut, pp. 305-374.
- FAHN, A., 1974. *Plant Anatomy*. 2nd Edition, Pergamon Press, Oxford, p. 91.
- FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W. & BERJAK, P., 1985. The effects of drying rate on viability retention of recalcitrant *Avicennia marina*. *S. Afr. J. Bot.* **51**: 432-438.
- FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W. & BERJAK, P., 1988. Recalcitrance - a current assessment. *Seed Sci. & Technol.* **16**: 155-166.

- FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W. & BERJAK, P., 1989. Germination-associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds - a study on three unrelated species. **Planta** 178: 189-198.
- FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W. & BERJAK, P., 1992. Development of the recalcitrant (homoiohydrous) seeds of *Avicennia marina*: Anatomical, ultrastructural and biochemical events associated with development from histodifferentiation to maturation. **Ann. Bot.** 70: 75-86.
- FELLOWS, R.D. & BOYER, J.S., 1978. Altered ultrastructure of cells of sunflowers leaves having low water potentials. **Protoplasma** 93: 381-395.
- FERGUSON, J.M.; TEKRONY, D.M. & EGLI, D.B., 1990. Changes during early soybean seed and axes deterioration: I. Seed quality and mitochondrial respiration. **Crop Sci.** 30: 175-179.
- FOLCH, J.; LEES, M. & STANLEY, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.** 226: 497-509.
- FREY-WISSLING, A., 1959. *Die pflanzliche zellwand*. Springer-Verlag, Berlin, p. 91 apud DENTAN, E., 1985. The microscopic structure of coffee bean. IN: **Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage** (M.N. Clifford and K.C. Willson, eds), 1nd Edition, American Edition, Westport, Connecticut, pp. 285-304.

- FREY-WISSLING, A. & MUHLERTHALER, J., 1965. Cell Wall. IN: **Ultrastructural plant cytology with an introduction to molecular biology**. Elsevier, Amsterdam, pp. 275-328.
- FRY, S.C., 1988. The structure and function of xyloglycan. **J. Exp. Bot.** 40: 1-11.
- GAFF, D.F.; ZEE, S-Y.; O'BRIEN, T.P. 1976. The fine structure of dehydrated and reviving leaves of *Boria nitida* Labill. - A desiccation tolerant plant. **Aust. J. Bot.** 24: 225-236.
- GIDROL, X.; NOUBHANI, A.; MOCQUOT, B.; FOURNIER, A. & PRADET, A., 1988. Effect of accelerated aging on protein sythesis in two legume seeds. **Plant Physiol. Biochem.** 26: 281-288.
- GILES, K.B.; COHEN, K. & BEARDSSELL, M.F., 1976. Effects of water stress on the ultrastructure of leaf cells of *Sorghum bicolor*. **Plant Physiol.** 57: 11-14.
- GONZALEZ, J.A., 1973. Ensayo preliminar de almacenamiento de café. Instituto Salvadoreno de Investigaciones del Café, Santa Tecla, El Salvador
- GRANGE, A., 1980. Vieillissement des graines de *Phaseolus vulgaris* (L.) var. contender: I. Effects sur la germination, la vigueur, la teneur en eau et la variation des formes d'azote. **Physiol. Veg.** 18: 579-586.
- GROSRENAUD, A., 1980. Mannanes et Glucomannanes: Cristallisation et Polymorphisme. Université Scientifique et Médicale de Grenoble, **Thèse Ing. Doct.**
- HARTMAN, G. & MATTICK, L.R., 1976. Association of lipid oxidation with seed ageing and death. **Nature** 260: 323-324.

- HARRINGTON, J.F., 1972. Seed Storage and longevity. IN: **Physiological Ecology, 5: Seed Biology** (T.T. Kozlowski, ed), Vol 3, 1nd Edition, Academic Press, New York, pp. 145-243.
- HENDRY, G.A.; FINCH-SAVAGE, W.E.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; BUCKLAND, S.M.; NILSSON, N.M. & SEEL, W.E., 1992. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytol.** 122: 273-279.
- HERMAN, J.L., 1994. Cell and molecular biology of seed oil bodies. IN: **Seed development and germination** (H. Kigel & G. Galili, eds), Marcel Dekker, New York, pp. 195-214.
- HORMAN, I. & VIANI, R., 1971. The caffeine-chlorogenate complex of coffee. Na NMR study. **5th International Colloquium on the Chemistry of Coffee**, ASIC, Paris, pp. 101-111.
- HUANG, A.H.C., 1992. Oil bodies and oleosins in seeds. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 43: 177-200
- HUXLEY, P.A., 1964. Some factors which can regulate germination and influence viability of coffee seeds. **Proceedings of International Seed Testing Association** 29: 423-444.
- IBRAHIM, A.E.; ROBERTS, E.H. & MURDOCH, A.J., 1983. Viability of lettuce seeds. I. Survival and oxygen uptake in osmotically controlled storage. **J. Exp. Bot.** 34: 620-630.

- JOSELEAU, J.P.; CARTIER, N.; CHAMBAT, G.; FAIK, A. & RUEL, K., 1992. Strutral features and biological activity of xyloglucans from suspension-cultured plant cells. **Biochimie** **74**: 81-88.
- KING, M.W. & ROBERTS, E.H., 1979. The storage of recalcitrant seeds - achievements and possible approaches. IBPRG Secretariat.
- KOSTER, K.L. & LEOPOLD, A C., 1988. Suger and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiol.** **88**: 829-832.
- LARKINS, B.A., 1981. Seed Storage Proteins: Characterization and Biosynthesis. IN: **the Biochemistry of Plants**, Academic Press, New York, pp. 449-489.
- LEOPOLD, A.C. & MUSGRAVE, M.E., 1980. Respiratory pathways in aged soybean seeds. **Physiol. Plant.** **49**: 49-54.
- LILLIE, R.D., 1954. **Histopathologie Technic and Pratical Histochemistry**. New York, Blakiston.
- LILLIE, R.D., 1969. **Biological Stains**. The Willians & Wilkins Company, Baltimore.
- LISON, L., 1963. **Histochemie et citochemie animales**. Gauthier-Villars, Paris, p. 396.
- LOPES, J.C., 1990. Germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris*. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, **tese de Doutorado**.

- MARRIOT, K.M. & NORTHCOTE, D.H., 1975. The breakdown of lipide reserves in the endosperm of germinating castor bean. **Biochem. J.** 148: 139-144.
- MATILE, Ph., 1975. **The latic compartment in plant cells.** Springer-Verlag Cell Biology Monographs, Vienna, New York.
- MATILE, Ph., 1978. Biochemistry and function of vacuoles. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 29: 193.
- MAZZAFERA, P., 1990. Estudo sobre o papel da cafeína em plântulas de café (*Coffea arabica*). **Revta Brasil. Bot.** 13: 97-102.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYER, A., 1989. **The germination of seeds.** 4rd Edition, Pergamon Press, New York.
- MEIER, H., 1958. On the structure of cell wall mannans from ivory nut and from dates. **Biochim. Biophys. Acta** 28: 229-240.
- MEIER, H. & REID, J.S.G., 1982. Reserve polysaccarides other than starch in higher plants. In: **Plant carbohydrates I. Intracellular carbohydrates** (F.A. Loewus and W. Tanner., eds), Springer Verlag, Berlin, pp. 418-471.
- MELLO, M.L.S., 1989. Nuclear fuction and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. **Rev. Brasil. Genet.** 12: 485-498.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C., 1978. A reação de Feulgen. **Ciênc. Cult.** 30: 665-676.

- MURPHY, D.J., 1993. Structure, function, and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plant. **Prog. Lipid Res.** 32: 247-280.
- MURRAY, D.R., 1984. Accumulation of Seed Reserves of Nitrogen. IN: **Seed Physiology** (D.R. Murray, ed), Vol 1, Academic Press, Sydney, pp. 83-127.
- OLHROGGE, J. & BROWSE, J., 1995. Lipid Biosynthesis. **The Plant Cell**, 7: 957-970.
- OSBORNE, D.J., 1983. Senescence in Seeds. IN: **CRC Series in Aging: Senescence in Plants** (K.V. Thimann ed), CRC Press, Boca Raton, pp. 13-38.
- OUGUERRAM, A., 1989. Formation et digestion des parois cellulaires de réserves à mannanes du café (*Coffea arabica* L.) (*). **Ann. Sci. Nat. Bot.** 10: 111-133.
- PANDEY, D.K., 1989a. Ageing of french bean seeds at ambient temperature in relation to vigour and viability. **Seed Sci. Technol.** 17: 41-47.
- PANDEY, D.K., 1989b. Short duration accelerated ageing of french bean in hot water. **Seed Sci. Technol.** 17: 107-114.
- PARRISH, D.J. & LEOPOLD, A.C., 1978. On the mechanism of aging in soybean seeds. **Plant Physiol.** 61: 365-368.

- PAULILO, M.T.S., 1980. Efeito do ácido giberélico e 6-benziladenina na utilização das reservas da semente de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Carioca. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, **tese de Mestrado**.
- PEARSE, A.G.E., 1961. **Histochemistry: theoretical and applied**. 2nd Edition, J. & A Churchill Ltd, London, 998p.
- PERNOLLET, J.C., 1978. Proteins bodies of seeds: ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. **Phytochemistry** 17: 1473-1480.
- PERNOLLET, J.C., 1982. Les corpuscules proteiques des graines, stade transitoire de vacuoles specialisees. **Physiol. Veg.** 20: 259-276.
- PERRY, C.A.; LEIGH, R.A.; TOMOS, A.D. & HALL, J.L., 1987. Osmotic factors affecting the mobilization of sucrose from vacuoles of red beet storage root tissue. IN: **Plant Vacuoles** (Marin ed), Plenum Press, New York, pp. 89-94.
- PETRUZZELLI, L. & TARANTO, G., 1989. Wheat aging: the contribution of embryonic and non-embryonic lesions to loss of seed viability. **Physiol. Plant.** 76: 289-294.
- PFRUNDER, R.; WANNER, H.; FRISEHKNNHT, P.M. & BAUMANN, T.W., 1980. Na attempt to localise caffeine in the cell, by its washout kinetics. **9th International Colloquium on the Chemistry of Coffee**, ASIC, Paris, pp. 169-176.
- PLATT-ALOIA, K.A. & THOMSON, W.W., 1985. Frezze-fracture evidence of gel-phase lipid in membranes of senescing cowpea cotyledons. **Planta** 163: 360-369.

- POISSON, J., 1979. Aspects chimiques et biologiques de la composition du café vert. 8^e Colloque Scientifique sur le café, ASIC, Paris, pp. 33-57.
- POWELL, A.A. & MATTHEWS, S., 1981. Association of phospholipid changes with early stages of seed ageing. *Ann. Bot.* 47: 709-712.
- PRIESTLEY, D.A., 1986. Morphological structural and biochemical changes associated with seed ageing. IN: *Seed Ageing - Implication for Seed Storage and Persistence in the Soil* (D.A. Priestley ed), Cornell Univ. Press, Ithaca, pp. 125-195.
- PRIESTLEY, D.A. & LEOPOLD, A.C., 1979. Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seed. *Plant Physiol.* 63: 726-729.
- PRIESTLEY, D.A.; McBRIDE, M.B. & LEOPOLD, A.C., 1980. Tocopherol and organic free radical levels in soybean seeds during natural and accelerated aging. *Plant Physiol.* 66: 715- 719.
- PRITCHARD, H.W., 1991. Water potencial and axis viability in recalcitrant seeds of *Quercus rubra*. *Ann. Bot.* 67: 43-49.
- PRITCHARD, H.W.; TOMPSETT, P.B.; MANGER, K. & SMIDT, W.J., 1995. The effect of moisture content on the low temperature responses of *Araucaria hunsteinii* seed and embryos. *Ann. Bot.* 76: 79-88.

- PUNTARULO, S. & BOVERIS, A., 1990. Effect of natural and accelerated aging on the hydroperoxide metabolism of soybean embryonic axes. **Plant Sci.** 68: 27-32.
- RAO, N.K.; ROBERTS, E.H. & ELLIS, R.H., 1988. A comparison of quantitative effects of seed moisture content and temperature on the accumulation of chromosome damage and loss of seed viability in lettuce. **Ann. Bot.** 62: 5-18.
- RAVEN, J.A., 1987. Benefits and costs of vacuolation. IN: **Plant Vacuoles** (Marin ed), Plenum Press, New York, pp. 63-65.
- REID, J.S.G. & BEWLEY, J.D. 1979. A dual role for the endosperm and it's galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), and endospermic legume seed. **Planta** 147: 145-150.
- ROBERTS, E.H., 1972. Storage environment and the control of viability. IN: **Viability of Seeds** (E.H. Roberts, ed), Chapman and Hall Limited, London, pp. 14-58.
- ROBERTS, E.H., 1973. Predicting the storage life of seeds. **Seed Sci. Technol.** 1: 499-514.
- ROBERTS, E.H. & KING, M.W., 1980. The characteristics of recalcitrant seeds. IN: **Recalcitrant Crop Seeds** (H.F. Chin and E.H. Roberts, eds), 1nd Edition, Tropical Press SDN. BHD., Kuala Lumpur, Malaysia, pp. 1-5.
- ROBERTS, E.H. & OSBORNE, D.J., 1973. Protein synthesis and loss of viability in rye embryos - The lability of transferase enzymes during senescence. **Biochem. J.** 135: 405-410.

- ROBERTS, E.H.; KING, M.W. & ELLIS, R.H., 1984. Recalcitrant seeds: their recognition and storage. **IN: Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation** (J.H.W. Holden and J.T. Williams, eds), George Allen & Unwin, London, pp. 38-52.
- ROLAND, J.C.; VIAN, B. & REIS, D. 1975. Observation with cytochemistry and ultramicrotomy on fine structure of the expanding walls in actively elongating plant cells. **J. Cell Sci.** **19**: 239-259.
- ROSSETO, E.S., 1992. Aspectos celulares de folhas de *Xerophyta plicata* Spreng. (Velloziaceae), durante os processos de dessecação e revivescência. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, **tese de Mestrado**.
- ROSSETO, E.S., 1997. Comparação ultraestrutural entre folhas hidratadas e dessecadas de três espécies de Velloziaceae: duas revivescentes e uma sensível à dessecação. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, **tese de Doutorado**.
- SENO, M.S. 1993. Composição e morfologia de feijão Guandu, Lab-Lab e Mucuna. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, **tese de Mestrado**.
- SCHWAB, K.B. & GAFF, D.F., 1986. Sugar and ion content in leaf tissues of several drought tolerant plants under water stress. **J. Plant Physiol.** **125**: 257-265.
- SILVA, T.R.G., 1995. Compostos de reserva em sementes de *Dalbergia miscolobium* Benth.: Caracterização histo e bioquímica e variação durante a germinação. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, **tese de Doutorado**.

- SILVA, W.R. & DIAS, M.C.L.L., 1985. Interferência do teor de umidade das sementes de café na manutenção de sua qualidade fisiológica. **Pesq. Agropec. Bras.** 20(5): 551-560.
- SIMON, E.W., 1974. Phospholipids and plant membrane permeability. **New Phytol.** 73: 377-420
- SLABAS, A.R.; DAVIES, C.; HELLYER, A.; MACKINTOSH, R.W.; SHELDEN, P.; HARDIE, D.G.; KEKWIICK, R.G.O. & SAFFORD, R.C., 1988. Molecular structure of fatty acid synthetizing enzymes from developing seeds of oil seed rape. IN: **Plant lipids: targets for manipulation** (N.J. Pinfield & A.K. Stobart, eds), British Plant Growth Regulator Group, London, pp 1-9.
- SPURR, A.R., 1969. A low-viscosity epoxy resin embeedding medium for eletron microscopy. **J. Ultrastructure Res.** 26: 31-43.
- STANWOOD, P.C. & BASS, I.N., 1978. Ultracold preservation of seed germplasm. IN: **Plant Cold Hardiness and Freezing Stress** (P.H. Li and A Sakai, eds), Academic Press, New York, pp. 361-371.
- STEWART, R.R.C. & BEWLEY, J.D., 1980. Lipid peroxidation associated with accellerated aging of soybean axes. **Plant Physiol.** 65: 245-248.
- SUN, W.Q.; IRVING, T.C. & LEOPOLD, AC., 1994. The roloe of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. **Physiol. Plant.** 90: 621-628.

- THALER, H., 1975. Makromolekulare strukturen in kaffee. 7^e International Colloquium on the Chemistry of coffee, ASIC, Paris, pp. 175-188.
- THOMSON, W.W. & PLATT-ALOIA, K., 1982. Ultrastructure and membrane permeability in cowpea seeds. *Plant Cell Environ.* 5: 367-373.
- VALIO, I.F.M., 1976. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo). *J. Exp. Bot.* 27(100): 983-991.
- VAN DER WALK, H. & VAN LOON, L., 1987. Protease activity in oat leave vacuoles. IN: *Plant Vacuoles* (Marin ed), Plenum Press, New York, pp. 381-382.
- VENABLE, J.H. & COGGESHALL, R., 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25: 407-408.
- VIDAL, B.C., 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microespectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Mol. Biol.* 22: 45-64.
- VIDAL, B.C., 1987. Métodos em Biologia Celular. IN: *Biologia Celular* (B.C. Vidal & M.L.S. Mello eds), 1nd Edição, Atheneu, Rio de Janeiro, pp. 5-39.
- VIERA DA SILVA, J.; NAYLOR, AW. & KRAMER, P.J., 1974. Some ultrastructural and enzymatic effects of water stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 3243-3247.

- VILLIERS, T.A., 1983. Ultrastructural changes in seed dormency and senescence. IN: **CRC Series in Aging: Senescence in Plants** (K.V. Thimann ed), CRC Press, Boca Raton, pp. 38-66.
- VILLIERS, T.A. & EDGCUMBE, D.J., 1975. On the cause of seed deterioration in dry storage. **Seed Sci. Technol.** 3: 761-764.
- VAN DER VOSSEN, H.A.M., 1979. Methods of preserving the viability of coffee seed in storage. **Seed Sci. Technol.** 7: 65-74.
- WALKOWSKI, A., 1981. Changes in factors determining coffee bean quality during storage. **Lebensmittelindustrie**, 28: 75-76.
- WILSON, D.O. & McDONALD, M.B., 1986. The lipid peroxidation model of seed aging. **Seed Sci. Technol.** 14: 269-300.
- WOLFROM, M.L.; LAVER, M.L. & PATIN, D.L., 1961. Carbohydrates of the coffee bean. II. Isolation and characterisation of a mannan. **J. Org. Chem.**, 26: 4533-4535.
- WOLFROM, M.L. & PATIN, D.L., 1965. Carbohydrates of the coffee bean. IV. An arabinogalactan. **J. Org. Chem.**, 30: 4060-4063.
- WOLFROM, M.L.; PLUNKETT, R.A. & LAVER, M.L., 1960. Carbohydrates of the Coffee bean. **J. Agric. Food Chem.**, 8: 58-65.
- WOODSTOCK, L.W.; FURMAN, K. & SOLOMOS, T., 1984. Changes in respiratory metabolism during aging in seeds and isolated axes of soybean. **Plant Cell Physiol.** 25: 15-26.

WURZIGER, J.; DREWS, R. & BANDESEN, G., 1977. Uber Arabusta-Roh- und Rostkaffee. **8^e International Colloquium on the Chemistry of Coffee**, ASIC, Paris, pp. 101-108.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.R. & CURRIE, A.R., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev. Cytol.** **68**: 251-306.

ZULUAGA-VASCO, J. & TABACCHI, R., 1975. Contribución al estudio y utilización de la pulpa de café. **7th International Colloquium on the Chemistry of Coffee**, ASIC, Paris, pp. 233-242.

CRISTIANA DE NORONHA BEGNAMI

ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS, ULTRAESTRUTURAIS E
BIOQUÍMICAS DURANTE A PERDA DE
VIABILIDADE EM SEMENTES DE
Coffea arabica cv. CATUAÍ VERMELHO

VOLUME 2

este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
<i>Cristiana de Noronha Begnami</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora.

02/12/98 M. Dolder

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Campinas - SP

1998

B394a
V.2
36551/BC



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	IN Am
V.	02 Ea
TOMBO BC/	36.551
PROC.	229/99
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	13/02/99
N.º CPD	400220932-4

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Begnami, Cristiana de Noronha

B394a Alterações estruturais, ultraestruturais e bioquímicas durante a perda de viabilidade em sementes de *Coffea arabica* cv. catuaí vermelho/Cristiana de Noronha Begnami.-- Campinas, SP: [s.n.], 1998.
2v.:ilus.

Orientadora: Mary Anne Heidi Dolder

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Café. 2. Sementes-viabilidade. 3. Ultraestrutura. I. Dolder, Mary Anne Heidi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 02 de dezembro de 1998

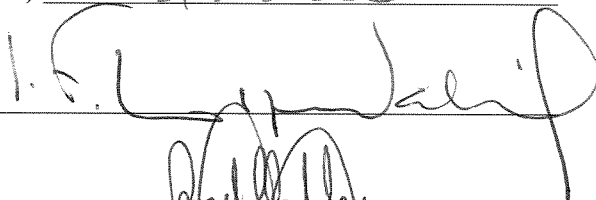
BANCA EXAMINADORA

Titulares

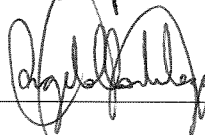
Profa Dra. Mary Anne Heidi Dolder (Orientadora)



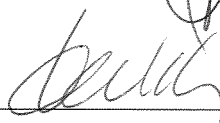
Prof. Dr. Ivany Ferraz Marques Válio



Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo



Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima



Profa. Dra. Márcia Regina Braga



Suplentes

Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato

Profa. Dra. Telma Regina Gabriel da Silva





FIGURAS

Figura 1: Cortes transversais de endosperma de sementes viável e inviável submetidos à coloração pela Hematoxilina (He) e Floxina (F) para caracterização geral.

1a: Semente viável. São observadas paredes celulares (P) e a lamela média pouco coradas pela He. No citoplasma são vistos glóbulos F positivo (→) e outros glóbulos não corados (►) localizados próximos à parede celular. No centro do citoplasma encontramos um conteúdo homogêneo F positivo. O núcleo apresenta-se corado pela He e deslocado para a periferia do citoplasma. São visualizadas algumas regiões de cromatina compactada enquanto os nucleólos apresentam-se intensamente corados pela He (→). 1050x.

1b: Semente inviável. Podem ser observadas paredes celulares (P) e a lamela média coradas pela He em roxo. No citoplasma são vistos poucos glóbulos (→) e um material homogêneo F positivo localizado próximo à parede celular (*), além de um conteúdo homogêneo intensamente corado pela F localizado no centro de citoplasma. O núcleo apresenta-se corado pela He e deslocado para a periferia. São visualizadas algumas regiões de cromatina compactada coradas pela He (→). 1050x.

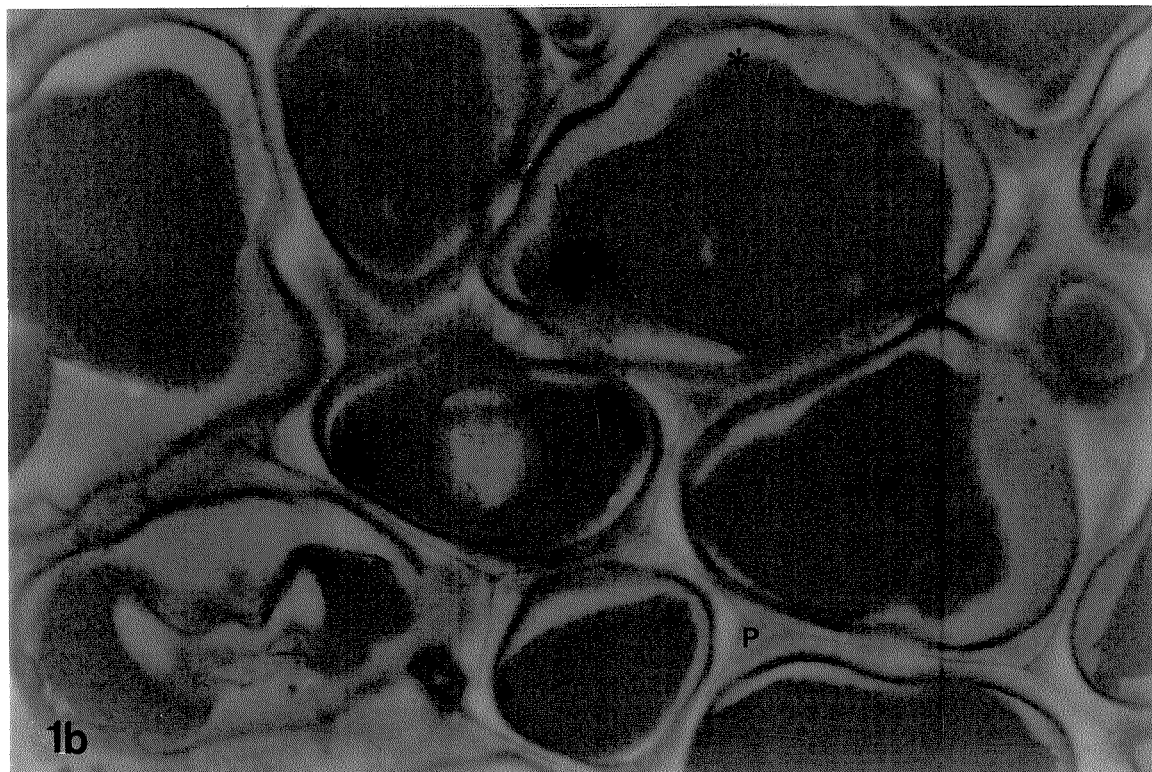
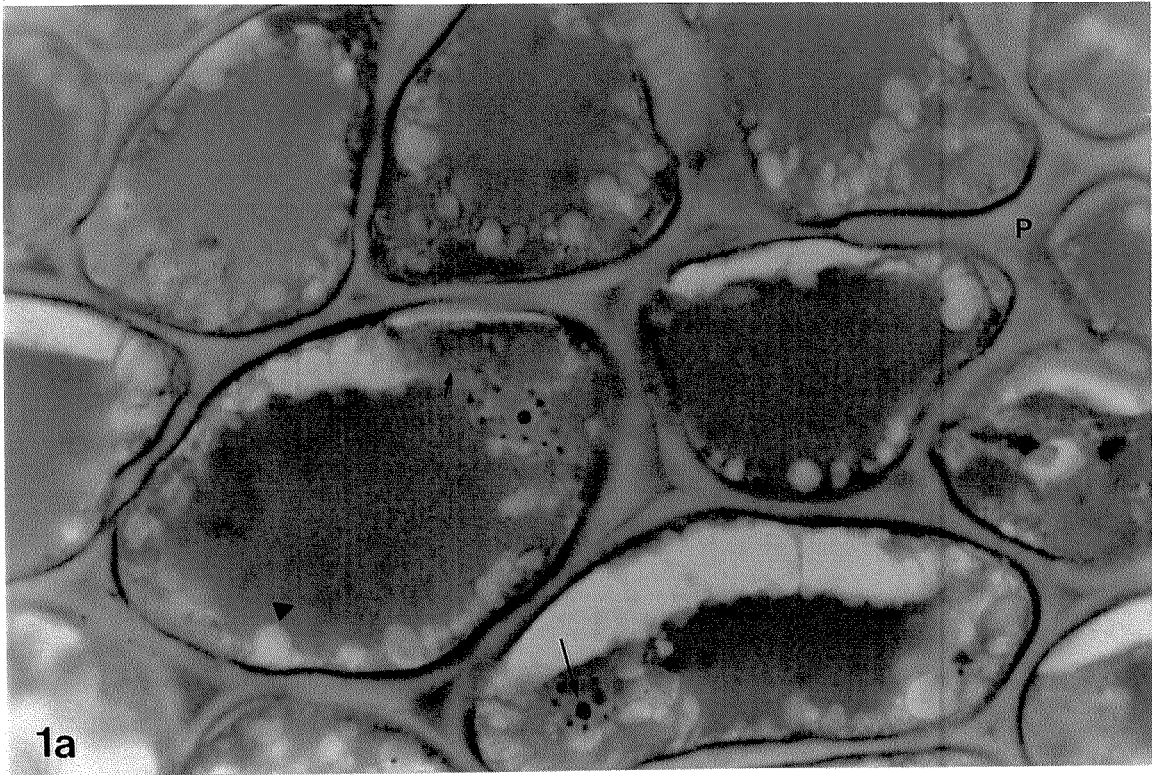


Figura 2: Cortes transversais de endosperma de sementes viável e inviável corados pelo Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0 para detecção de radicais aniônicos e metacromasia.

2a: Semente viável. Note as paredes celulares (P) e a lamela média coradas em tom arroxeadado (metacromáticos). No citoplasma são vistos glóbulos corados em azul-esverdeado (ortocromáticos) (→) e inúmeros glóbulos não corados localizados (►) próximos a parede celular. No centro do citoplasma encontramos um conteúdo homogêneo levemente corado em azul-esverdeado. O núcleo está corado em azul e está deslocado para a periferia do citoplasma, sendo aí visualizadas algumas regiões de cromatina mais compactada e o nucléolo (►) apresenta-se corado em roxo. 1050x.

2b: Semente inviável. Note a diminuição na intensidade de coloração das paredes celulares (P). No citoplasma são vistos poucos glóbulos corados em azul-esverdeado (→). O núcleo está corado em azul e deslocado para a periferia, sendo aí visualizadas inúmeras regiões de cromatina compactada (►). 1050x.

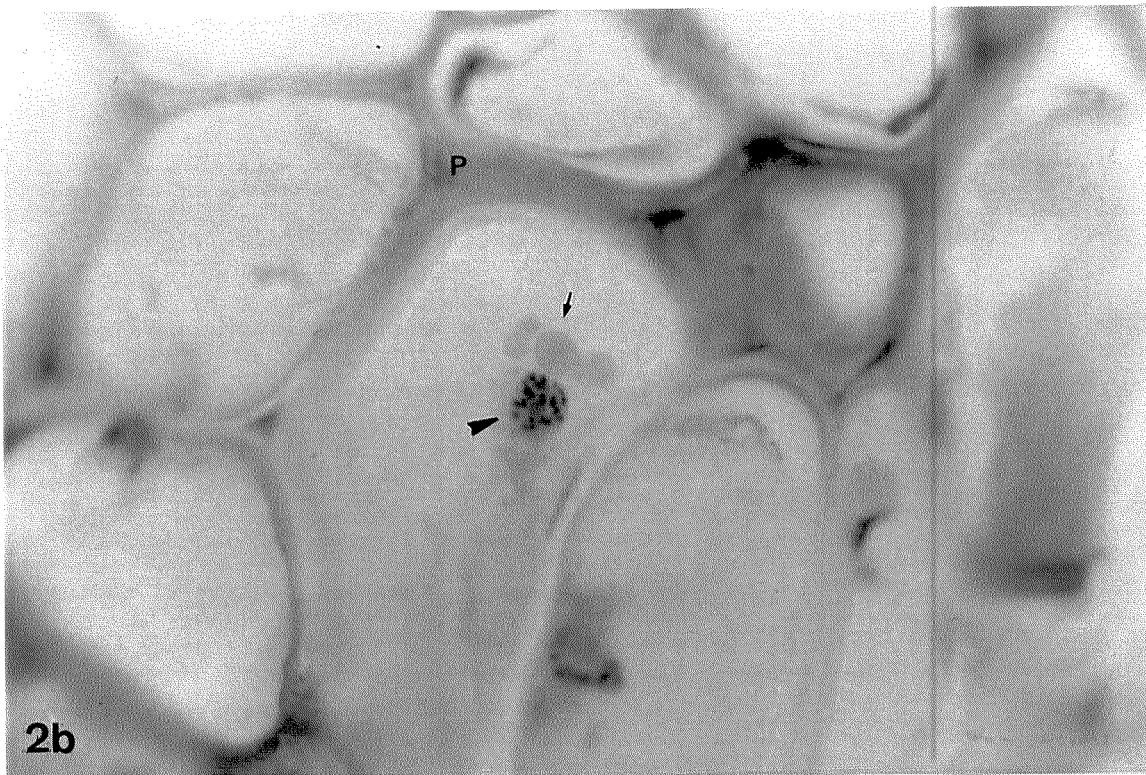
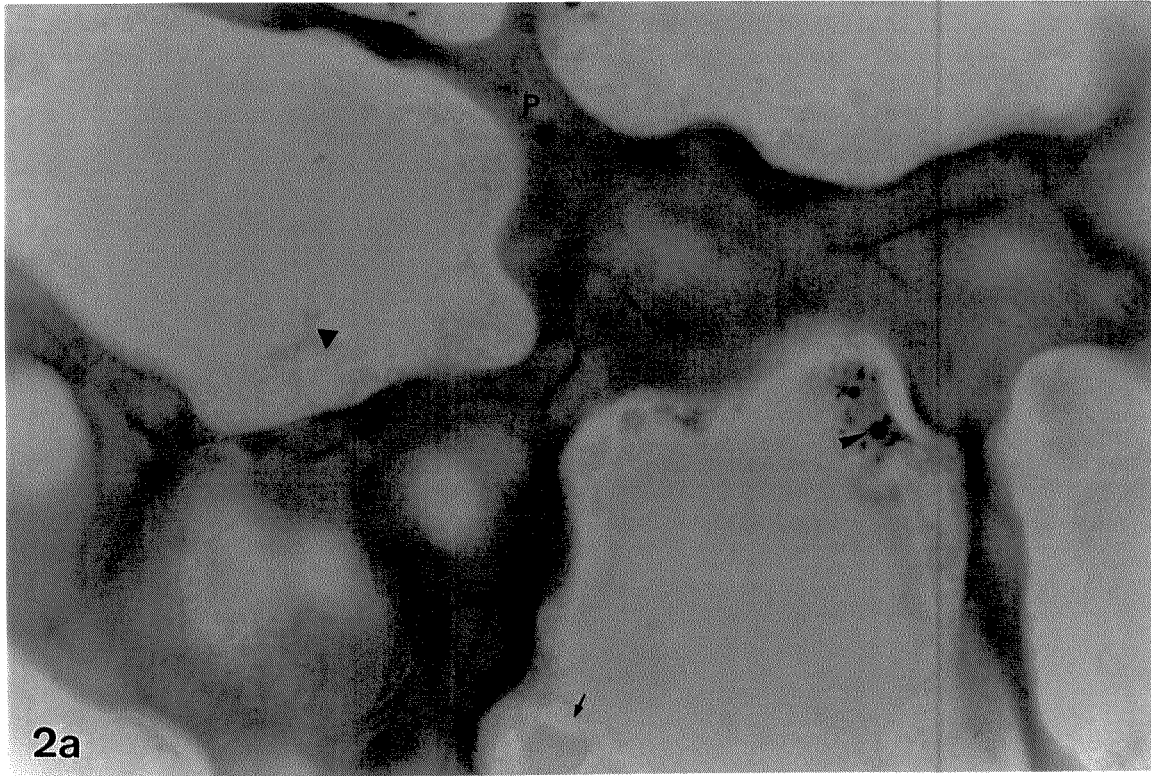


Figura 3: Cortes transversais de endosperma de sementes viável e inviável submetidos a coloração pelo Xylidine Ponceau (XP) a pH 2,5 para detecção de radicais catiônicos.

3a: Semente viável. As paredes celulares (P) encontram-se pouco coradas. No citoplasma são vistos glóbulos de natureza proteica corados em vermelho (→) em contraste com outros glóbulos XP-negativos (►) localizados próximos à parede celular. No centro do citoplasma e entre os glóbulos XP-positivos encontramos um conteúdo homogêneo intensamente corado (*). 420x.

3b: Semente inviável. Observa-se uma redução na intensidade de coloração de todo o conteúdo XP-positivo quando comparado com o mesmo na figura 3a, além da presença dos glóbulos XP-negativos (►) localizados próximos à parede celular. 420x.

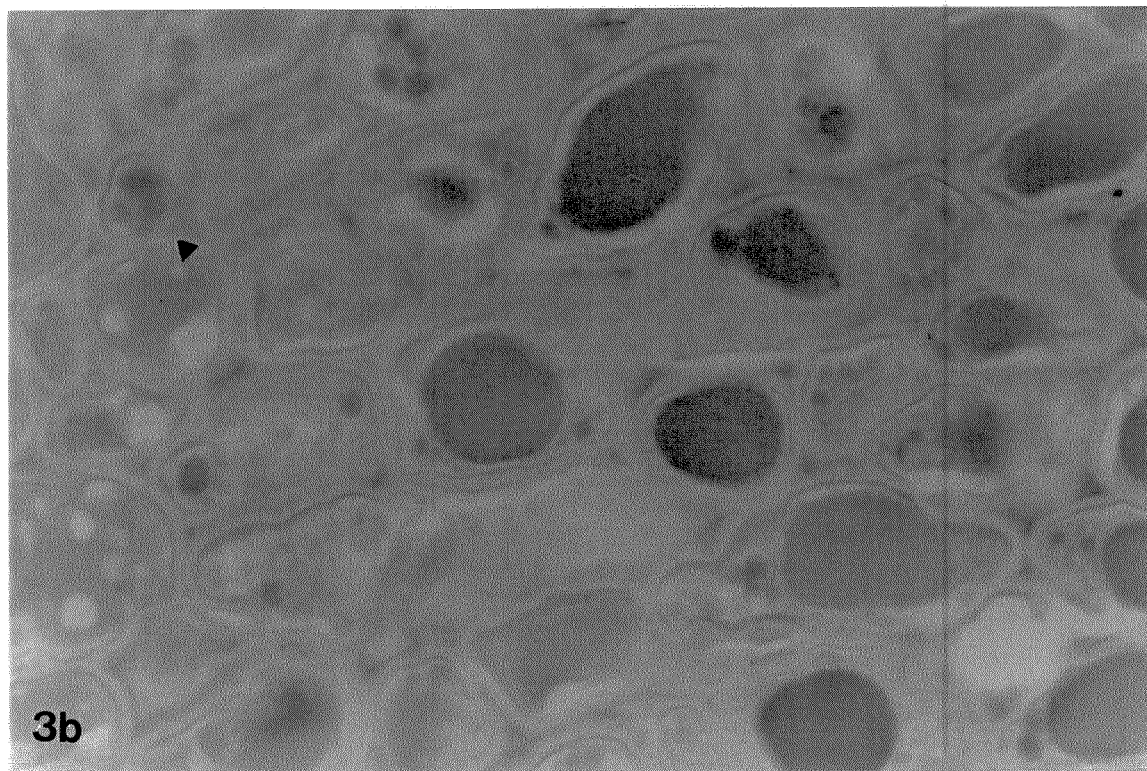
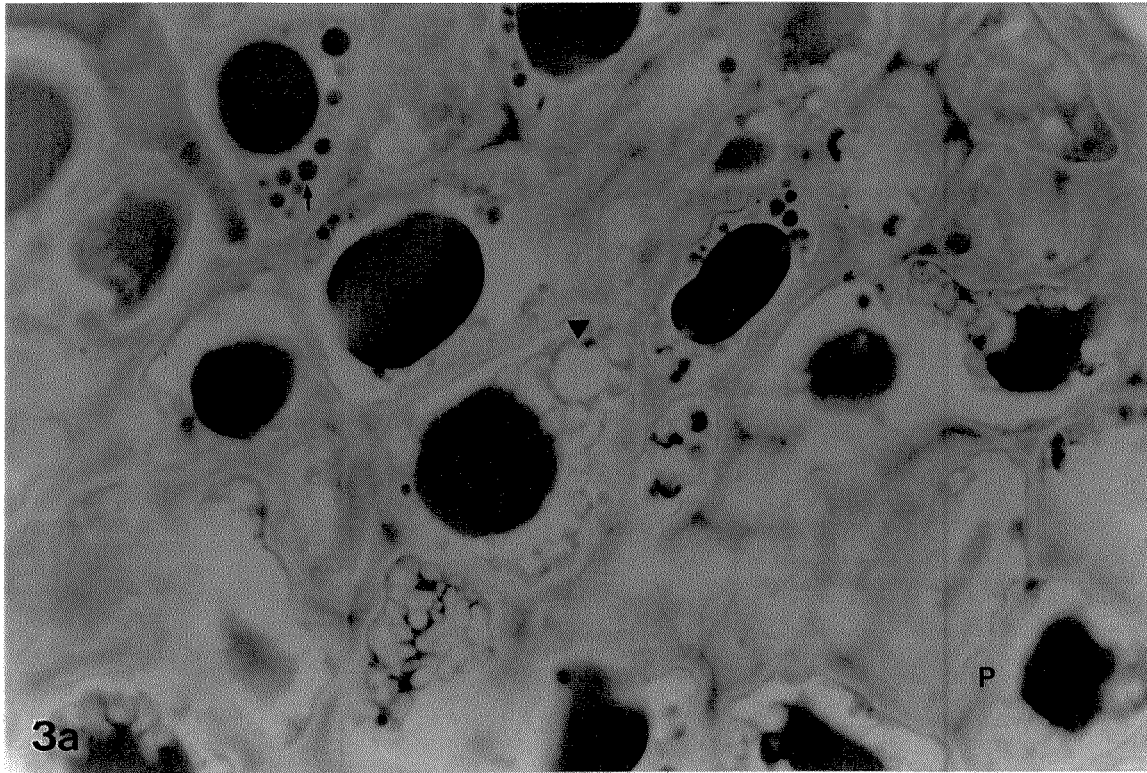


Figura 4: Cortes transversais de endosperma de sementes viável e inviável submetidos a reação do PAS para detecção de polissacarídeos e glicoproteínas.

4a: Semente viável. Note as paredes celulares (P) intensamente coradas, um conteúdo citoplasmático heterogêneo PAS-positivo e glóbulos de diferentes tamanhos PAS-negativos (→). 420X.

4b: Semente inviável. Observe as paredes celulares coradas (P) e a presença das nodosidades (N). Um conteúdo PAS-positivo homogêneo pode ser observado no centro do citoplasma (►) e um conteúdo PAS-negativo homogêneo ocupa posição parietal (→). 420x.

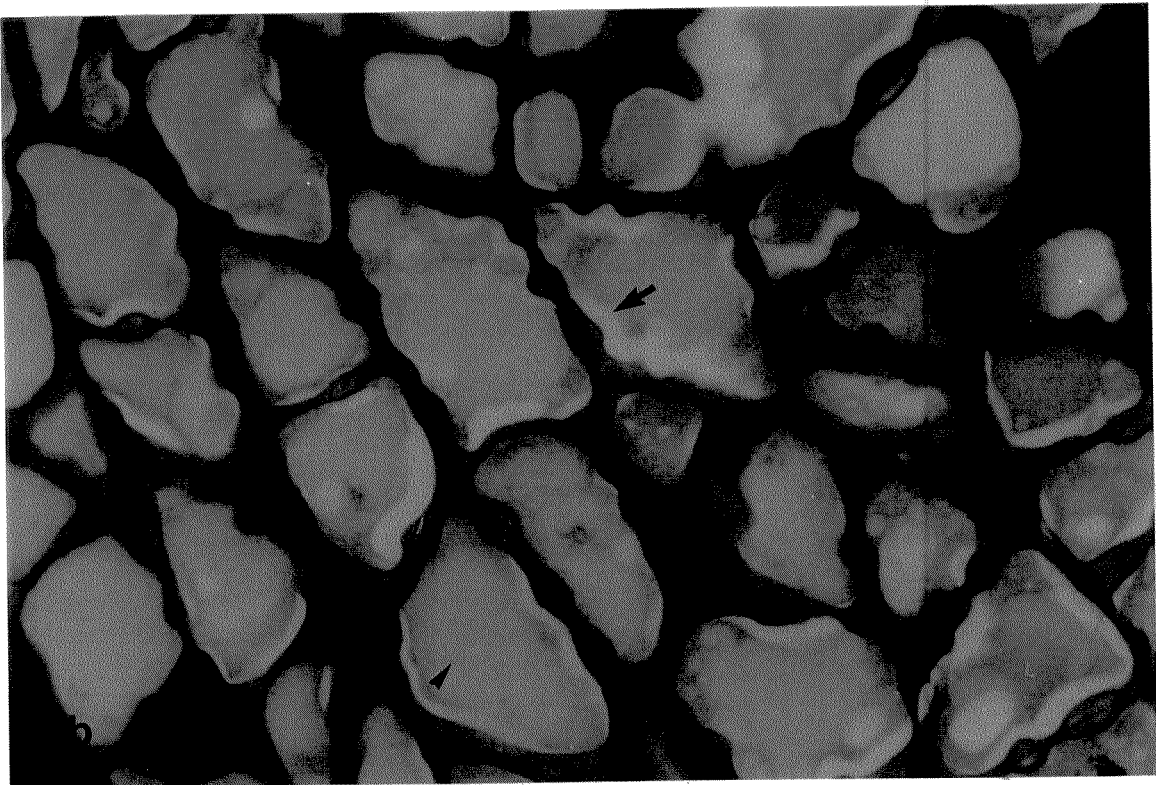
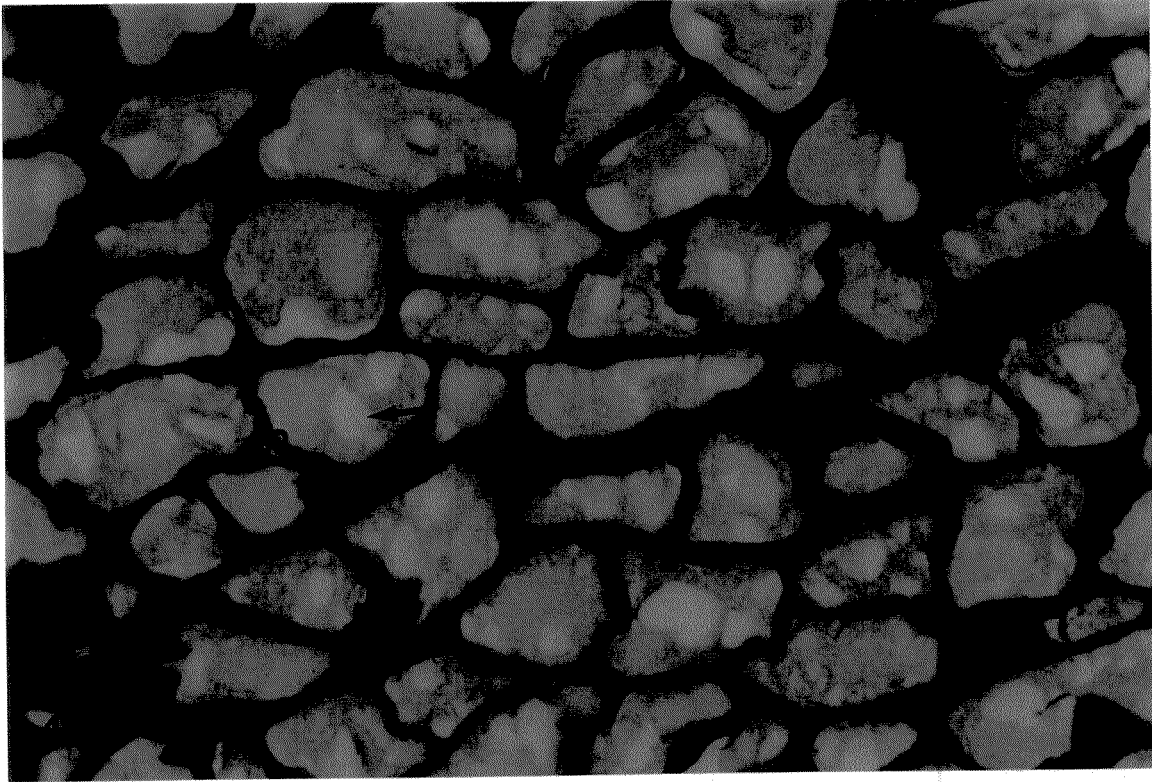


Figura 5: Cortes transversais de endosperma de sementes viável e inviável observados ao microscópio de polarização, com o polarizador e o analisador cruzados.

5a: Semente viável. Note a birrefringência das paredes celulares e de suas nodosidades (→). 420x

5b: Semente inviável. A birrefringência diminui significativamente em relação às sementes viáveis acima. 420x.

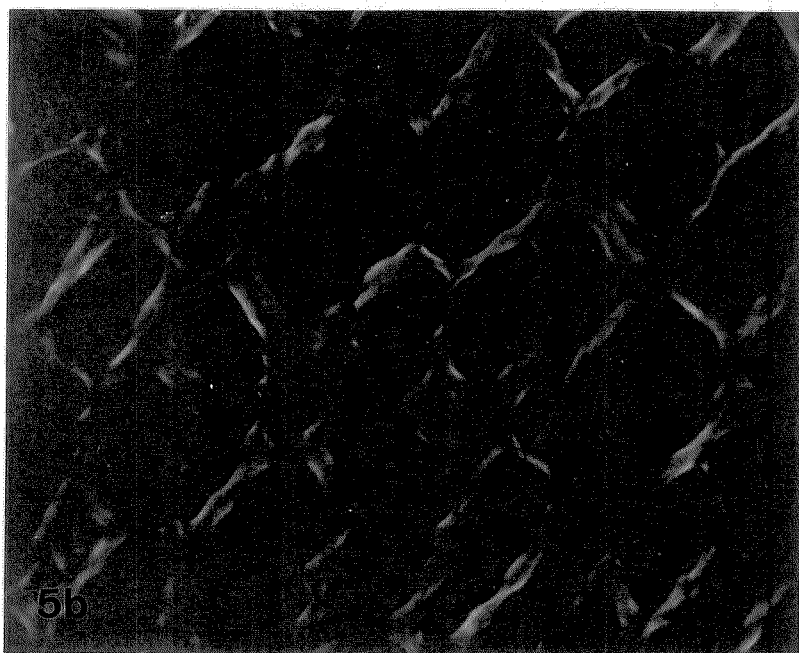
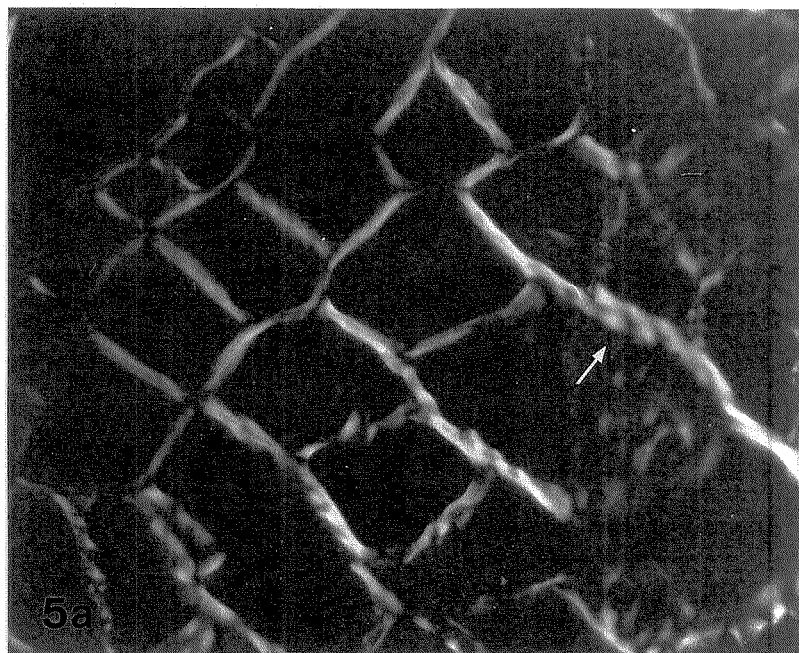


Figura 6: Cortes transversais de endosperma de sementes viável e inviável observados ao Microscópio Eletrônico de Varredura.

- 6a:** Semente viável. Paredes celulares (P) espessas com saliências que deixam cavidades penetradas por projeções citoplasmáticas (►). Adjacente à parede celular observa-se uma camada homogênea de glóbulos de lipídios (L). 3300x.
- 6b:** Semente viável. Paredes celulares (P) espessas e distendidas. 2000x.
- 6c:** Semente viável. Paredes celulares (P) espessas e íntegras. Note a presença de glóbulos de lipídio (L) citoplasmáticos. Adjacente ao endosperma observamos o presença de células do eixo embrionário (E). 1250x.
- 6d:** Semente inviável: Note a presença das nodosidades (N) das paredes celulares distendidas. Essas nodosidades estendem-se ao longo da parede. Observe ainda a presença de regiões da parede celular rompidas (→). L: glóbulos citoplasmáticos de lipídios (L). 3750x.
- 6e:** Semente inviável. Nodosidade da parede celular apresentando componentes da parede celular com aspecto fibrilar (N). Observe os corpos proteicos (CP) e glóbulos semelhantes a lipídio (L) citoplasmáticos. 5000x.
- 6f:** Semente inviável. Detalhe de paredes celulares rompidas, com aspecto fibrilar (►). Glóbulos de lipídios (L) em menor quantidade estão localizados próximos às paredes celulares. 2500x

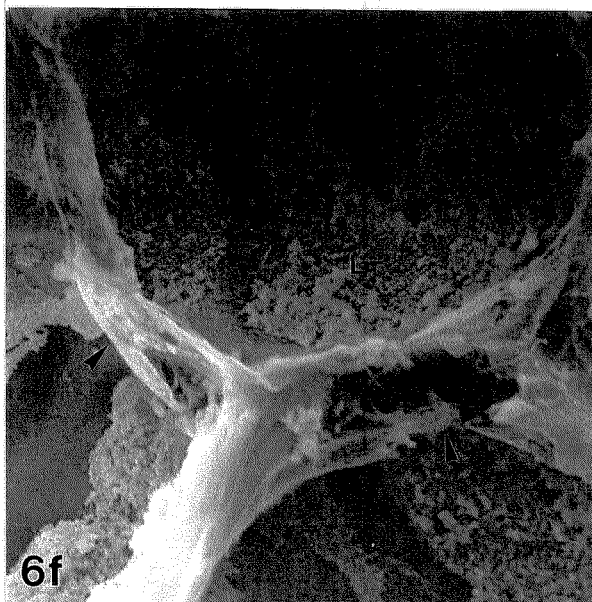
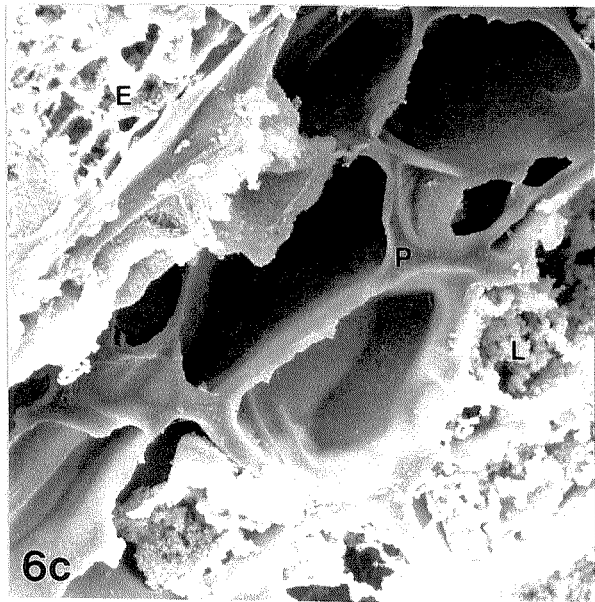
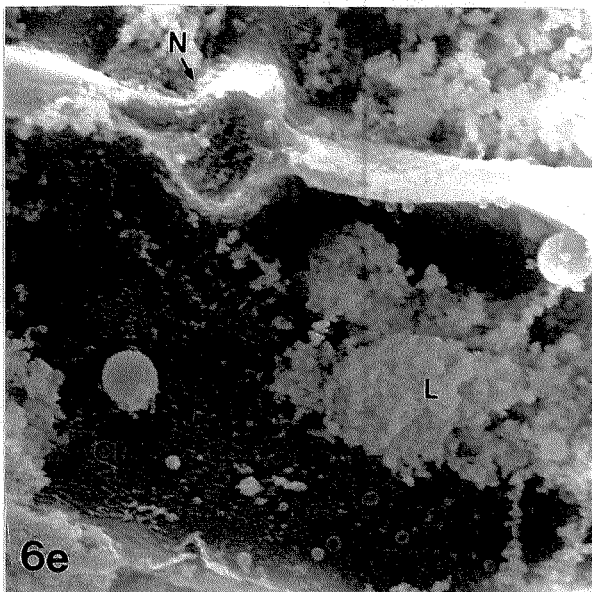
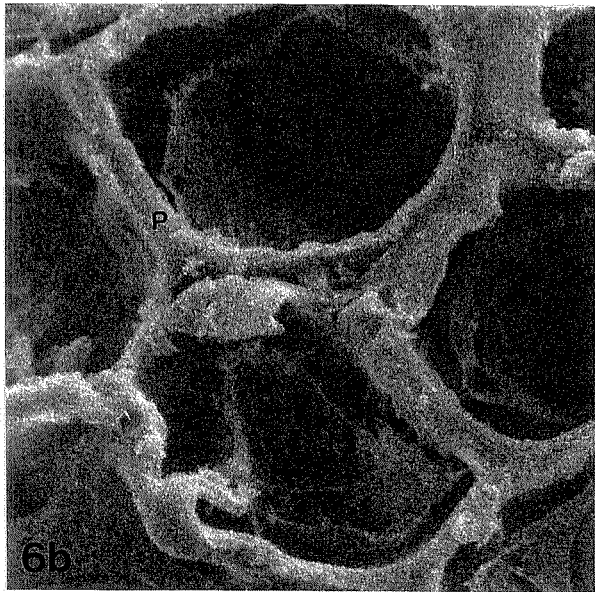
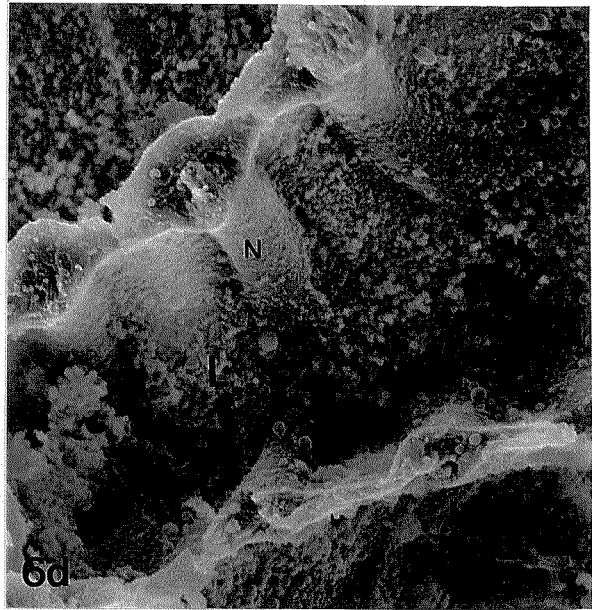
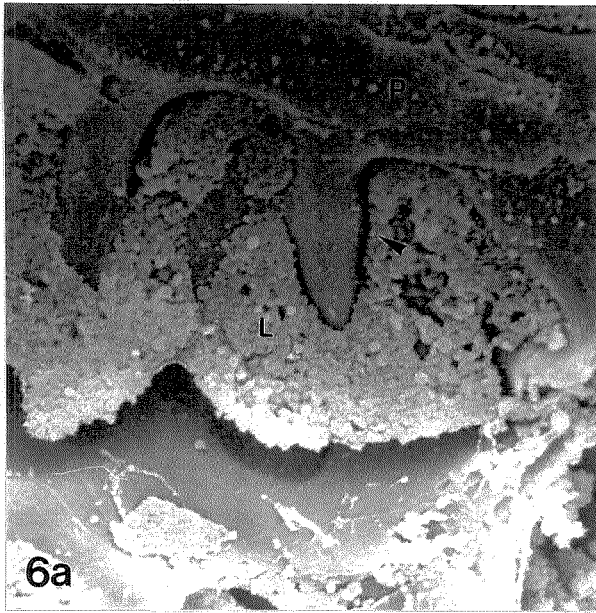




Figura 7: Cortes transversais de Endosperma de sementes viável e inviável observados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão.

7a: Semente viável. Observam-se as espessas paredes celulares distendidas (P) e no centro a lamela média (LM). Note a ausência de espaços intercelulares. Adjacente à membrana plasmática encontra-se uma camada homogênea de glóbulos de lipídios (L). 9000x.

7b: Semente inviável. Paredes celulares distendidas (P). Note o aspecto mais fibrilar dos componentes da parede secundária (►). Observe a presença de uma camada homogênea de glóbulos de lipídios (L) adjacente à membrana plasmática (me) e inseridos em uma matriz proteica (*). 12760x.

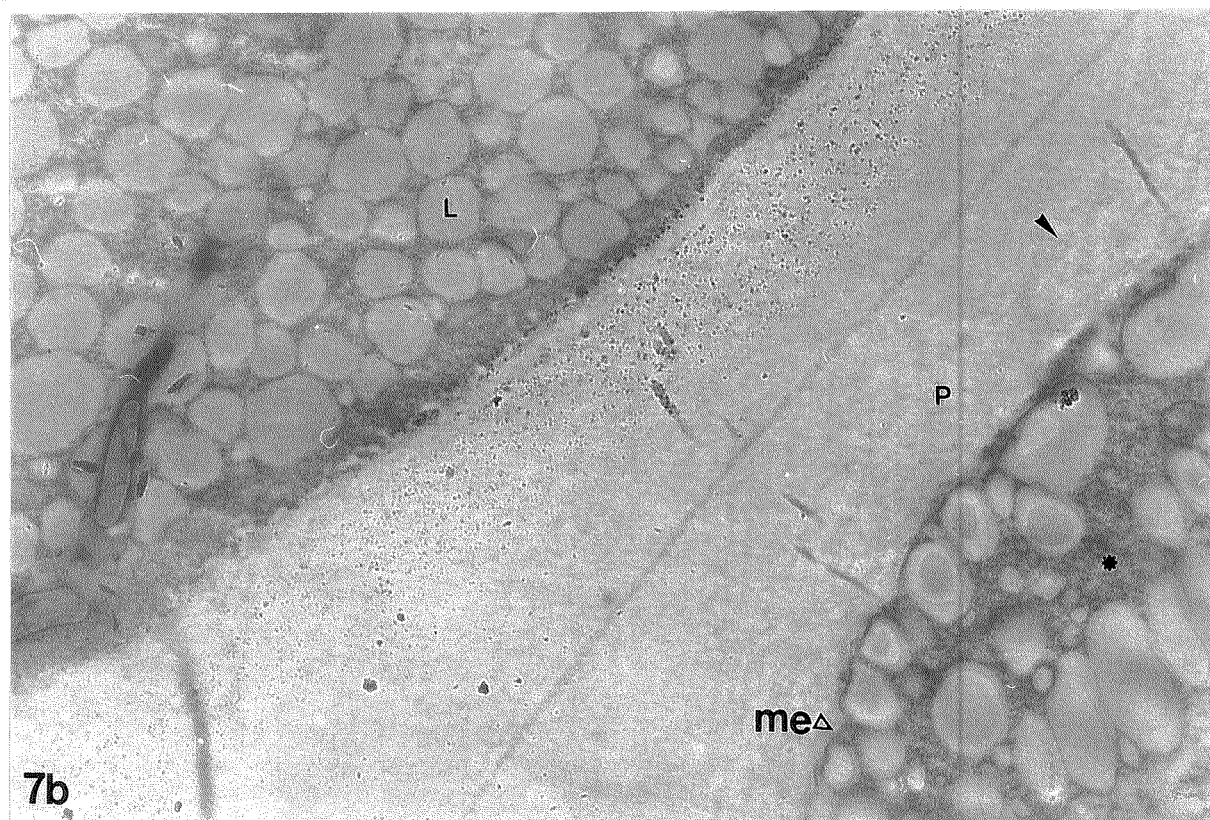
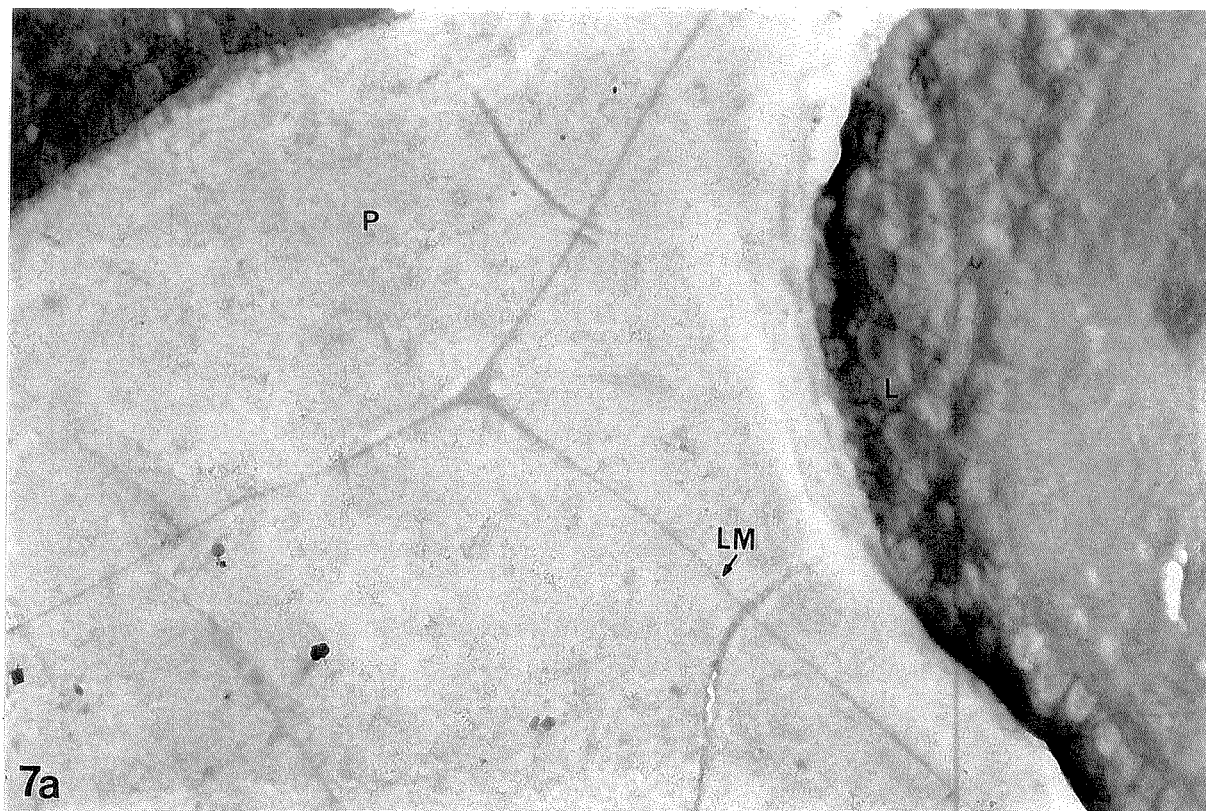


Figura 8: Cortes transversais de endosperma de sementes viável e inviável observados ao Microscópio Eletrônico de Varredura.

8a: Semente viável. Detalhe da rede de filamentos de carboidratos citoplasmáticos (ca) e a presença de glóbulos de lipídios (L). 8050x..

8b: Semente inviável. Paredes celulares finas (P) apresentam projeções dirigidas ao citoplasma (►). O citoplasma contém pequenos glóbulos de lipídios (L) e filamentos de carboidratos (ca). 2300x

8c: Semente viável. Paredes celulares espessas (P) distendidas. O citoplasma apresenta uma camada homogênea de glóbulos de lipídios (L) adjacentes à parede celular e filamentos de carboidratos que se estendem de uma parede a outra (ca). 1725x

8d: Semente inviável. Paredes celulares finas e distendidas, note a presença de uma fenda (►) na parede celular. No citoplasma pode-se observar a presença de pequenos glóbulos de lipídios (L) e de filamentos de carboidratos (ca) que se estendem de uma parede celular a outra. 2200x.

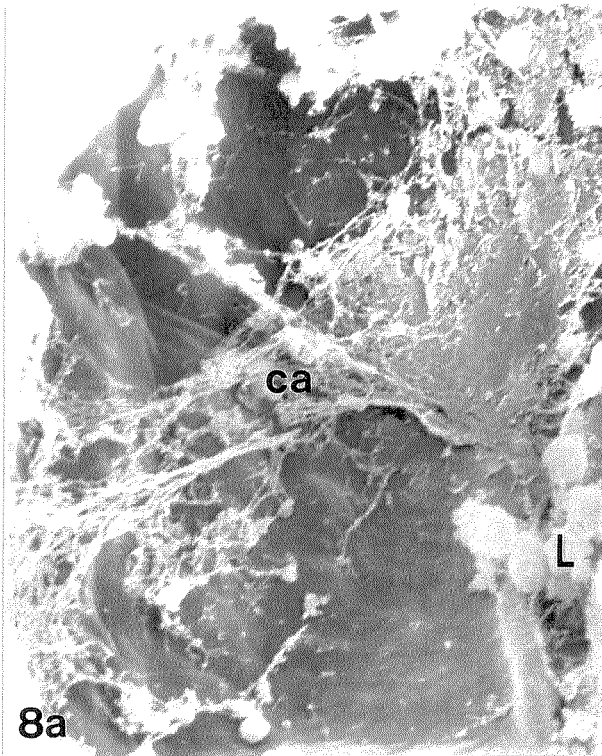


Figura 9: Cortes transversais de endosperma de sementes viável e inviável observados ao Microscópio Eletrônico de Varredura.

9a: Semente viável. Glóbulos de lipídios formando uma camada homogênea (L), corpo protéico recoberto (CP) por aparentes glóbulos de lipídios e filamentos de carboidratos (►). 5200x.

9b: Semente inviável. Detalhe da reduzida quantidade de glóbulos de lipídios (L) e a presença de corpos protéicos lisos (CP) localizados próximos a fina parede celular (P). 7000x.

9c: Semente viável. Corpo protéico fraturado (CP). Note a natureza compacta do seu conteúdo além da presença de glóbulos de lipídios (L). 6000x.

9d: Semente inviável. Paredes celulares delgadas (P). Note a presença no citoplasma de corpos protéicos de aspecto homogêneo e liso (CP) e a pequena quantidade de glóbulos de lipídios (L). 2300x.

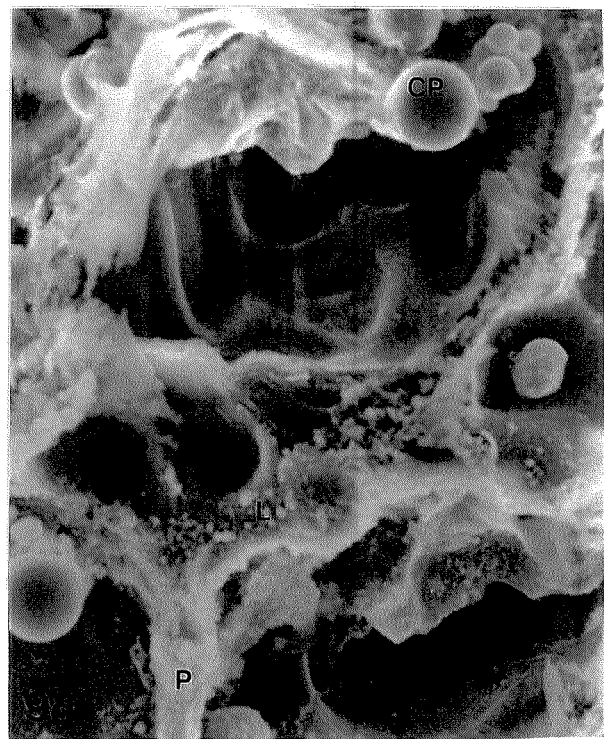
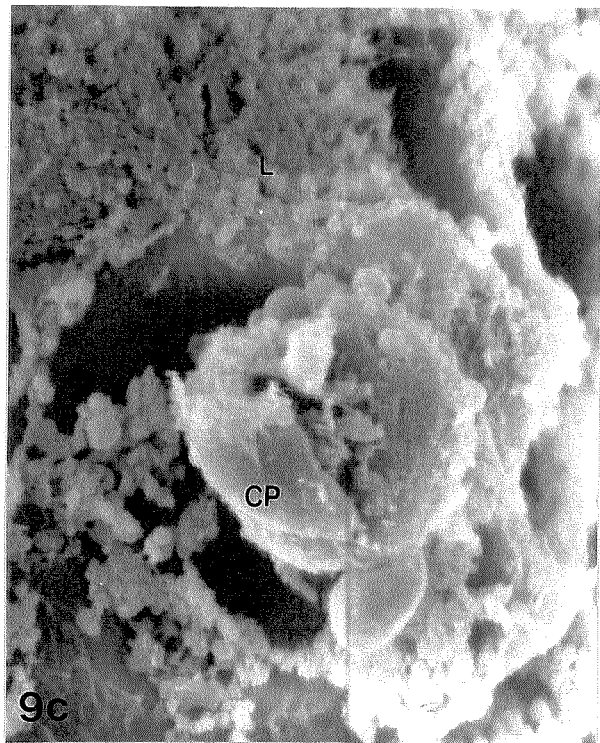
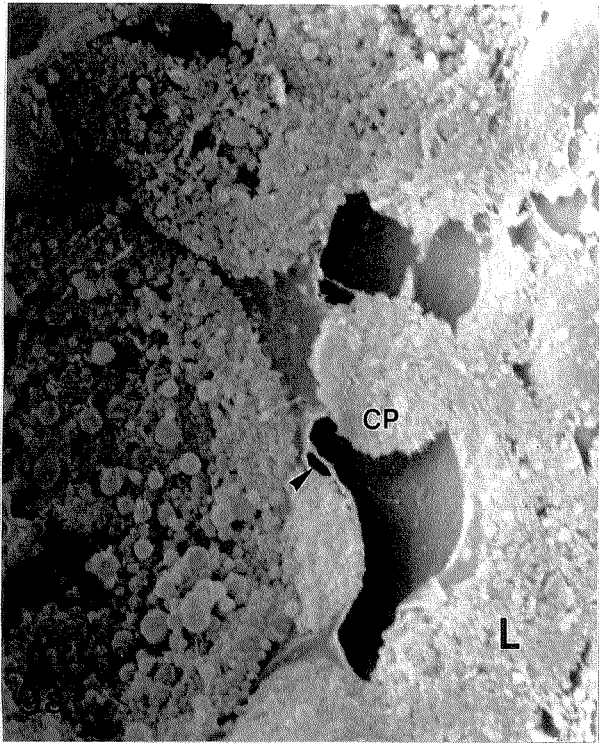


Figura 10: Cortes transversais de endosperma de semente inviável observados ao Microscópio Eletrônico de Varredura.

10a: Paredes celulares finas e distendidas (P), glóbulos lipídicos (L) citoplasmáticos ocupando posição parietal, corpo protéico central e íntegro (CP). Note a presença dos filamentos de carboidratos (►). 3750x.

10b: Paredes celulares com aspecto fibrilar (P). Note a presença de pequena quantidade de glóbulos de lipídios (L) e corpo protéico (CP) íntegro. 3000x

10c: Paredes celulares finas e rompidas (►). Note a presença de uma separação entre paredes celulares adjacentes (→). No citoplasma observa-se pequena quantidade de glóbulos de lipídio (L) ocupando posição parietal e um corpo protéico central, partido (CP). Note a natureza compacta do seu conteúdo. 3450x.

10d: Paredes celulares distendidas (P) delimitam duas células adjacentes. Glóbulos de lipídios (L) formando uma camada parietal são observados. Pequenos filamentos (→) são encontrados entre os glóbulos de lipídios. 4800x.

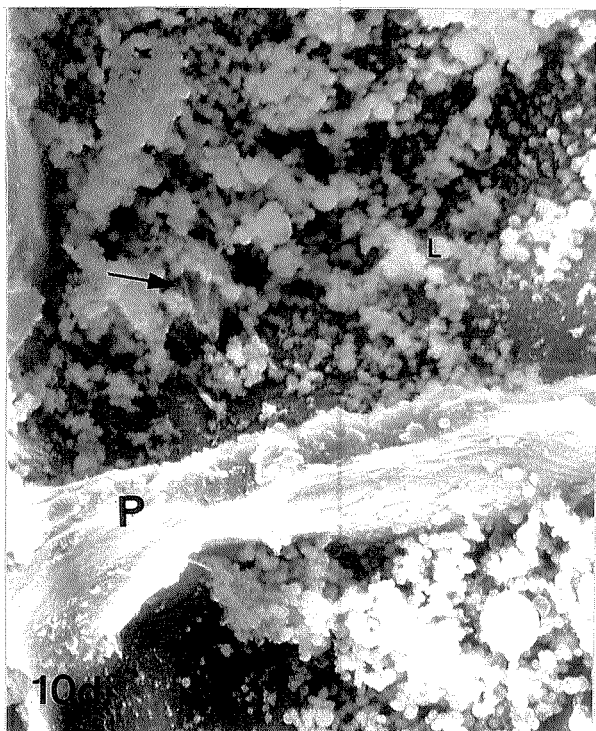
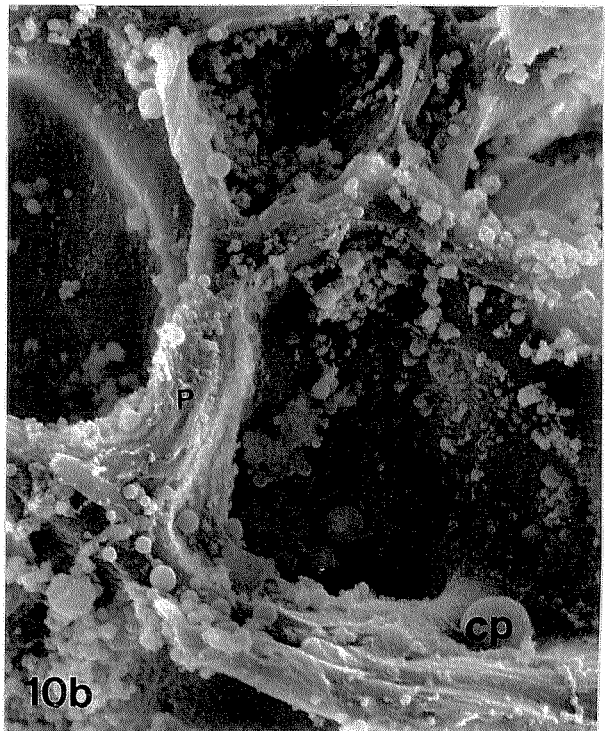


Figura 11: Cortes transversais de endosperma de semente viável observados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão.

11a: Citoplasma de célula parenquimática do endosperma mostrando camada homogênea de glóbulos de lipídios (L) ocupando posição parietal. No espaço periplasmático e próximo aos glóbulos lipídicos e entre estes encontram-se grânulos osmiofílicos (►). A região central do citoplasma é preenchida por uma matriz proteica (p) e corpos protéicos (cp). 11000x.

11b: Detalhe de um corpo protéico (CP) com conteúdo homogêneo localizado entre os glóbulos de lipídios (L). Os lipídios estão mergulhados em uma matriz de proteínas difusas (p). 13200x.

11c: Citoplasma delimitado pela parede celular distendida e membrana plasmática (me) evidente. No citoplasma encontramos entre os glóbulos de lipídios (L) vacúolos com conteúdo mais ou menos granular (v). Note a presença de um grande grânulo osmiofílico (→) entre os lipídios. Na região central do citoplasma encontramos proteínas difusas (p). 9240x.

11d: Detalhe do núcleo de uma célula parenquimática do endosperma apresentando cromatina frouxa, com algumas regiões mais compactadas (→). Observe a maior deposição de material protéico adjacente ao envoltório nuclear (en). Adjacente ao núcleo encontramos um glóbulo de lipídio (L). 21600x.

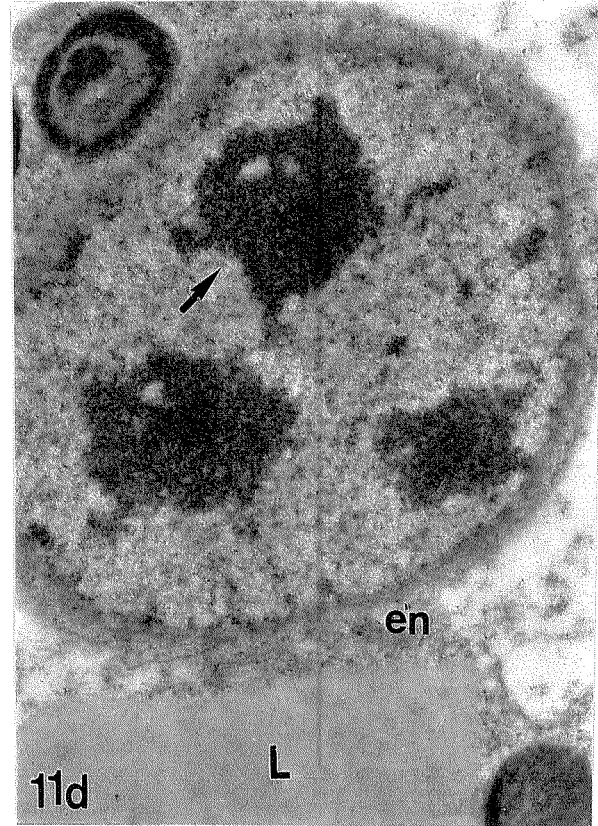
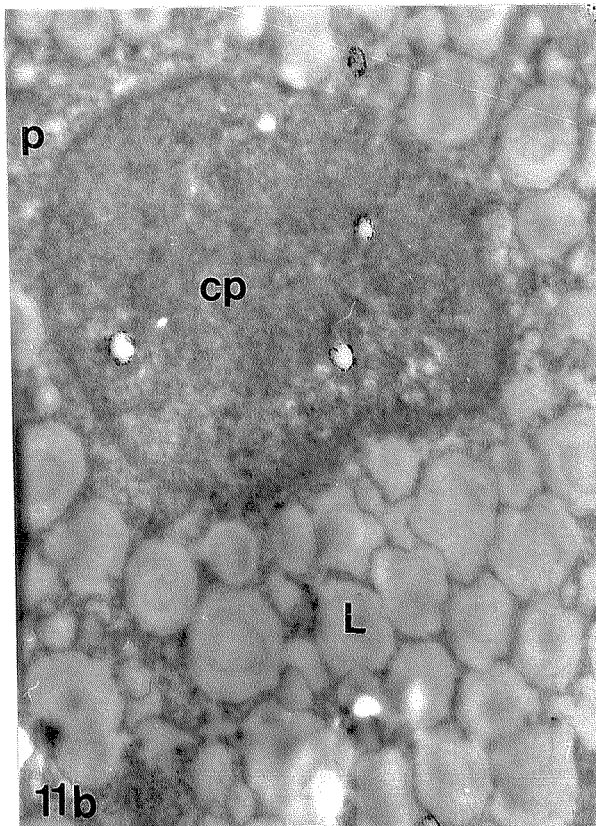
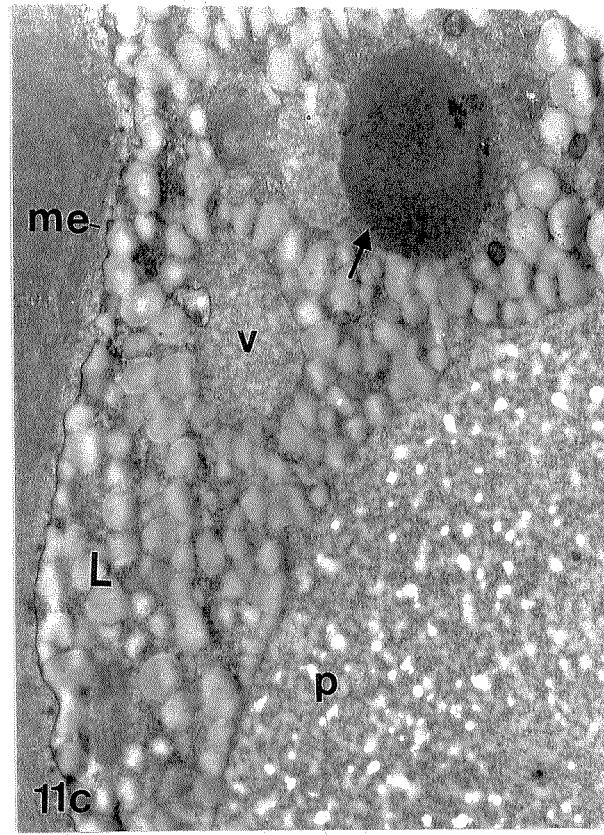
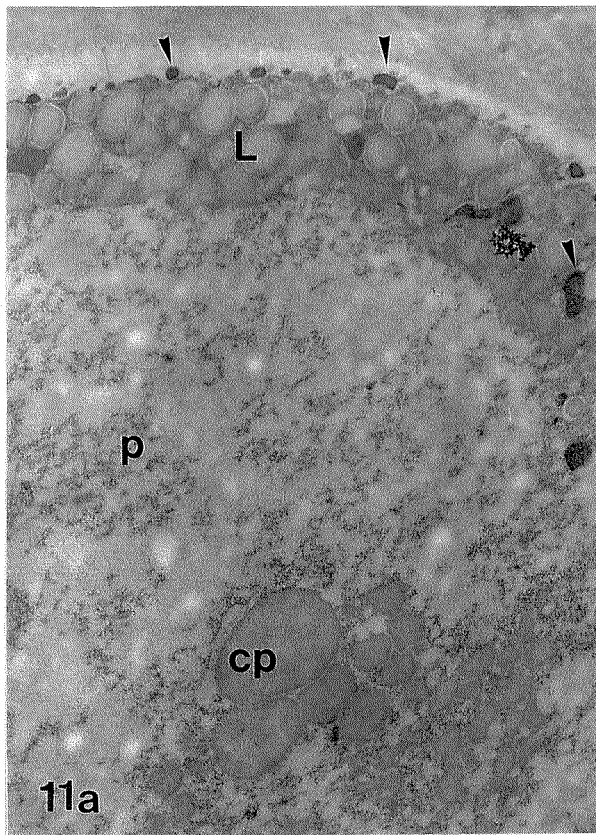


Figura 12: Cortes transversais de endosperma de semente inviável observados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão.

12a: No citoplasma da célula parenquimática do endosperma observa-se uma camada de glóbulos de lipídios (L) imersos em uma matriz proteica (p), localizada próximo à parede celular (P). Entre os glóbulos de lipídios encontram-se vários vacúolos (v) de diferentes tamanhos. O citoplasma encontra-se retraído em relação à parede celular. A membrana plasmática apresenta-se retraída e pode-se observar na região periplasmática o brotamento de vesículas e a presença de grânulos osmiofílicos (►). A camada mais interna da parede celular apresenta um aspecto mais fibrilar. 16100x.

12b: Parede celular (P) distendida apresentando nodosidades (N) delimitando duas células adjacentes. Note o aspecto fibrilar dos componentes da parede secundária (*). Glóbulos de lipídio (L) são encontrados próximos à membrana plasmática e inseridos em uma matriz proteica. 7800x

12c: Paredes celulares adjacentes (P) delimitando duas células parenquimáticas do endosperma. Observe o aspecto fibrilar dos componentes da parede secundária (*). Note a distribuição uniforme dos glóbulos de lipídios (L) imersos em uma matriz proteica. Grânulos osmiofílicos (►) aparecem entre os glóbulos lipídicos, além de um material granular fortemente osmiofílico (→) depositado no espaço periplasmático. 6000x.

12d: Parede celular distendida (P) delimitando citoplasma onde observam-se glóbulos de lipídios (L) imersos em matriz proteica e grânulos osmeofílicos (►) e um material granular fortemente osmiofílico (→) depositado no espaço periplasmático. Note a presença de corpo protéico (CP) apresentando membrana retraída entre os glóbulos de lipídios. 8700x.

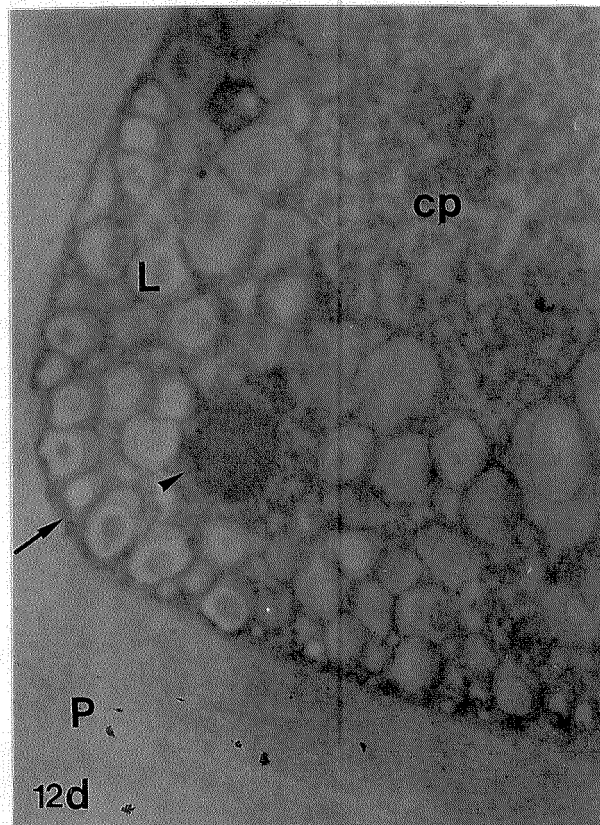
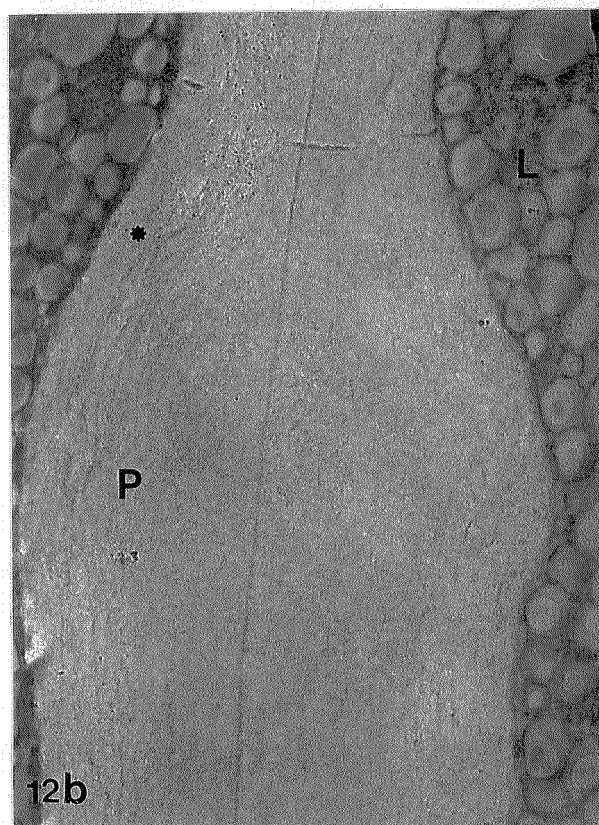
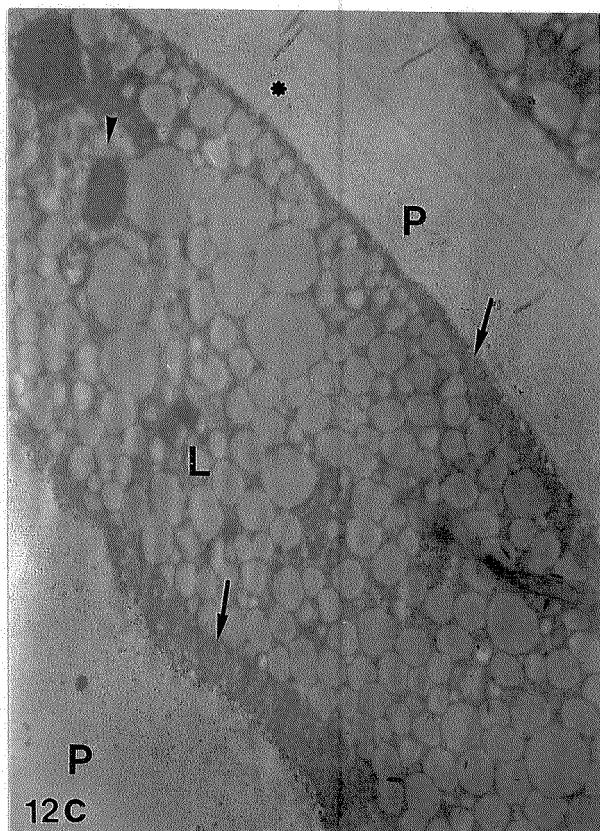
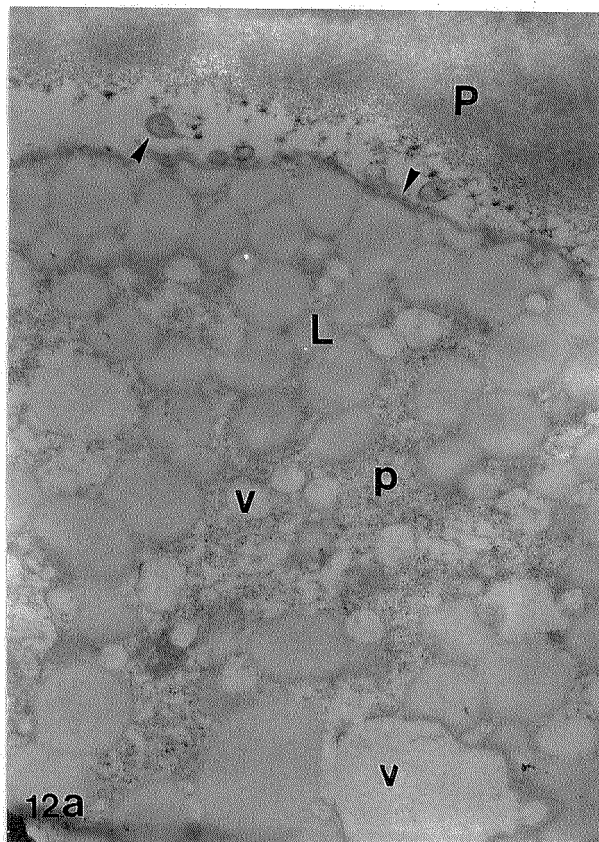


Figura 13: Cortes transversais de cotilédones de sementes viável e inviável submetidos à coloração pela Hematoxilina (He) e Floxina (F) para caracterização geral.

13a: Semente viável. Note as paredes celulares coradas pela He em roxo. No citoplasma observa-se um material F-positivo. Os núcleos apresentam cromatina com algumas regiões compactadas sendo corados pela He (►). Observe ainda a presença de uma matriz de mucilagem (M) He-positiva entre as folhas cotiledonares. 420x.

13b: Semente inviável. As paredes celulares apresentam-se coradas pela He em roxo. No citoplasma observa-se a presença de um material homogêneo F-positivo localizado próximo à parede celular, além de glóbulos corados com menor intensidade pela F encontrados na região mais central do citoplasma. Os núcleos apresentam-se picnóticos (►), corados pela He, ocupando posição parietal. Entre o endosperma (EN) e o cotilédone (C) observa-se a presença de uma mucilagem (M) He-positiva. 420x.

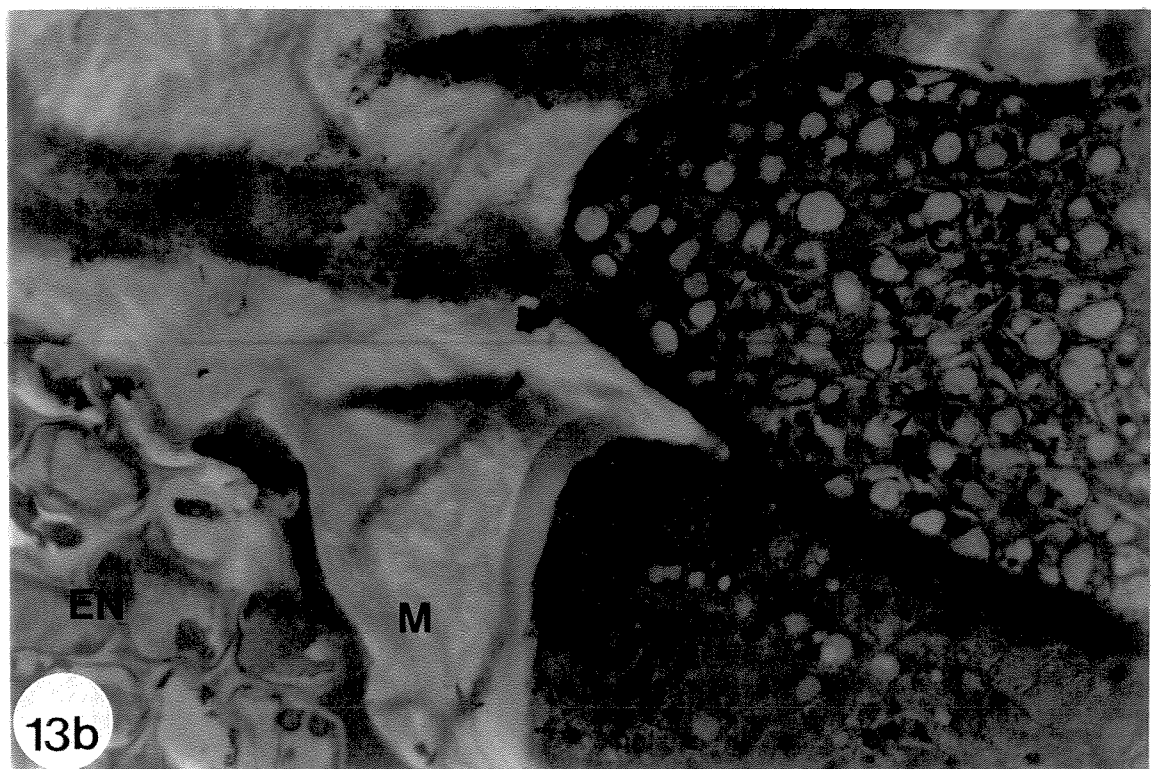
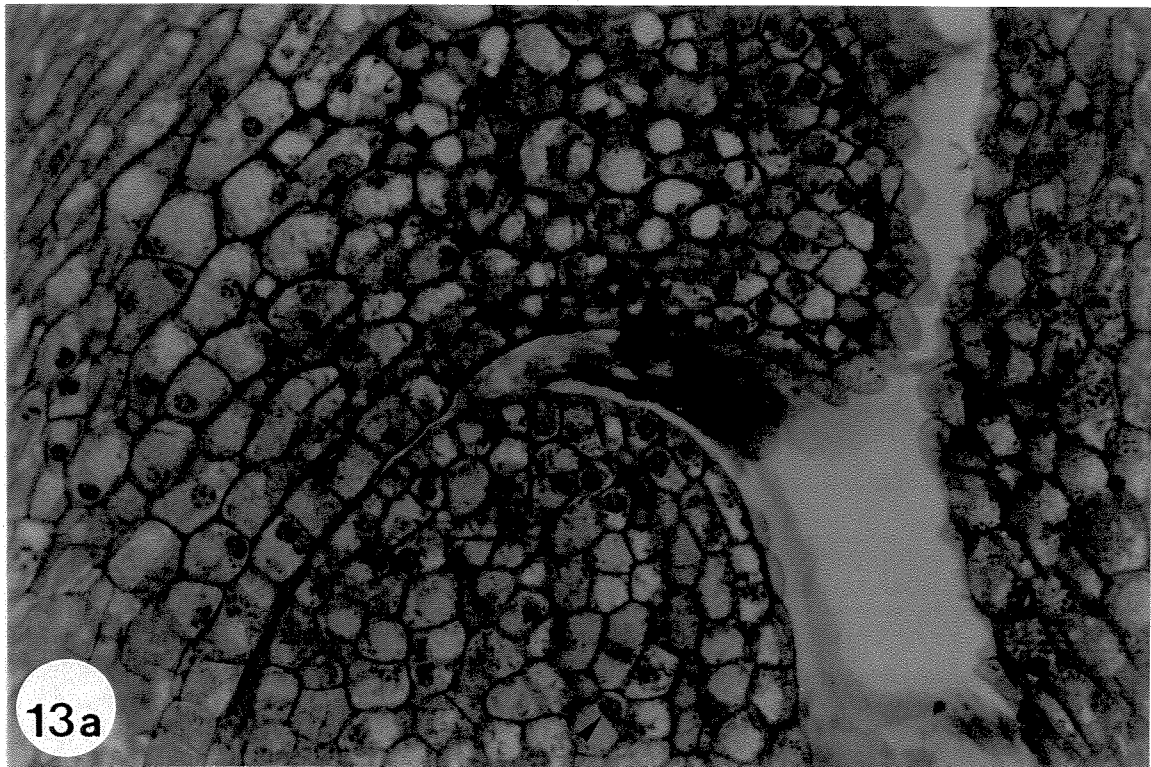


Figura 14: Cortes transversais de eixo embrionário de sementes viável e inviável submetidos à coloração pela Hematoxilina (He) e Floxina (F) para caracterização geral.

14a: Semente viável. Note as paredes celulares coradas pela He em magenta. No citoplasma observa-se um material granular F-positivo além de regiões F-negativa. O núcleo corado pela He mostra algumas regiões de cromatina condensada (►). 420x.

14b: Semente inviável. Note as paredes celulares coradas pela He em magenta. No citoplasma observa-se um material homogêneo F-positivo além de vários grânulos intensamente corados. Os núcleos são corados pela He, sendo que alguns deles apresentam cromatina mais compactada (►). Alguns núcleos picnóticos podem ser observados (→). 420x.

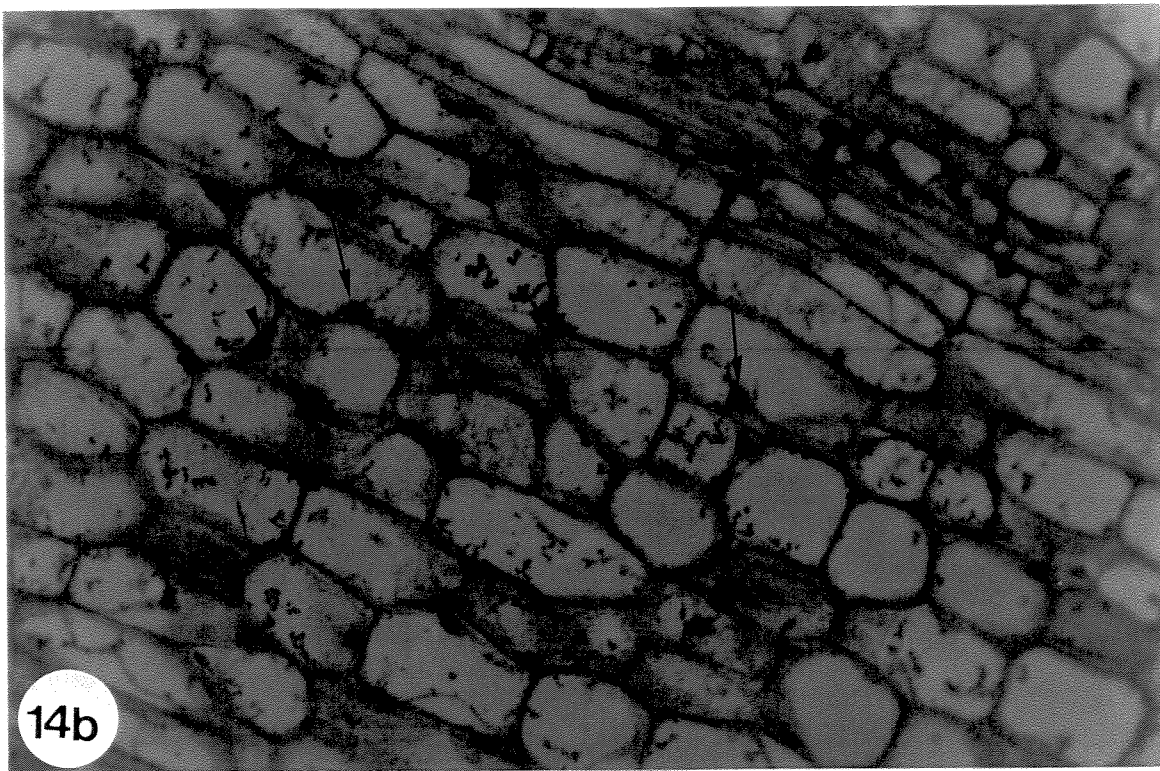
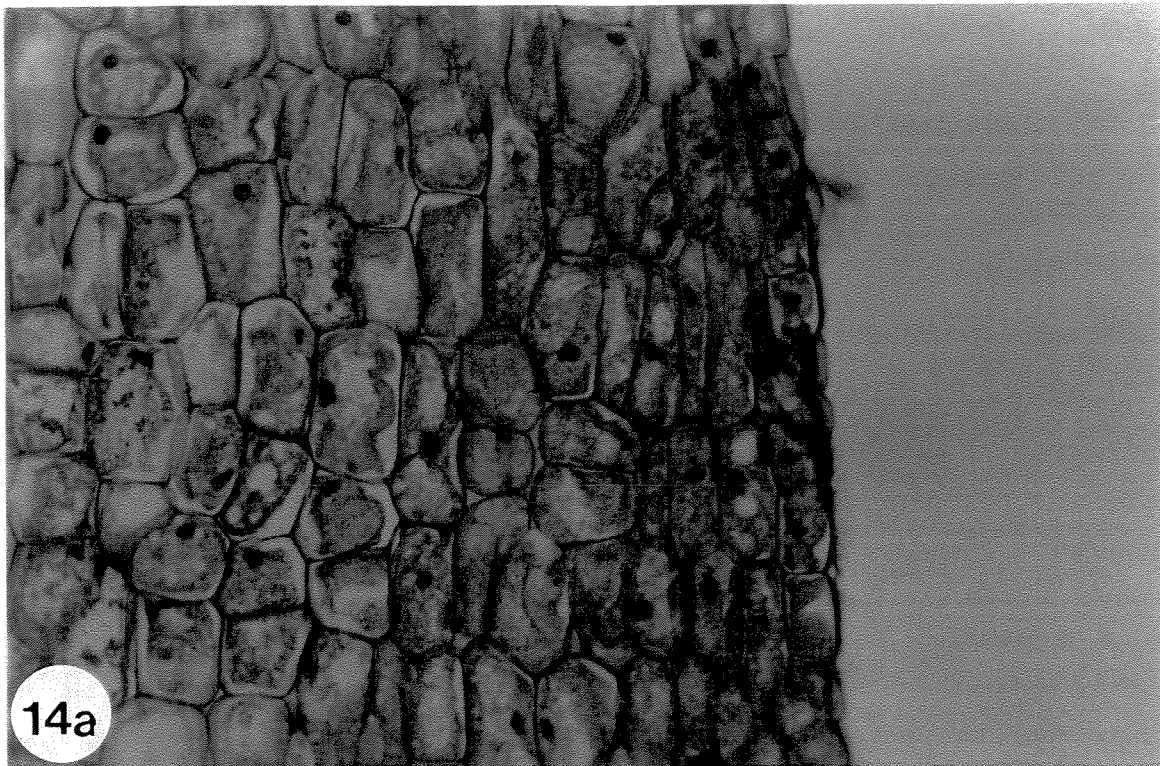


Figura 15: Cortes transversais de cotilédones de sementes viável e inviável corados pelo Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0 para detecção de radicais aniônicos e metacromasia.

15a: Semente viável. Note as paredes celulares finas e distendidas coradas em roxo. O núcleo das células coram-se em azul, apresentando algumas regiões de cromatina compactada (►). Observe a presença da mucilagem (M) entre as duas folhas cotiledonares. 420x.

15b: Semente inviável. Paredes celulares finas e coradas em roxo. Os núcleos ocupam posição parietal e apresentam várias regiões cromatínicas compactada fortemente coradas. Observe a presença de núcleos picnóticos (→). Entre as folhas cotiledonares observamos a presença da mucilagem (M). 420x.

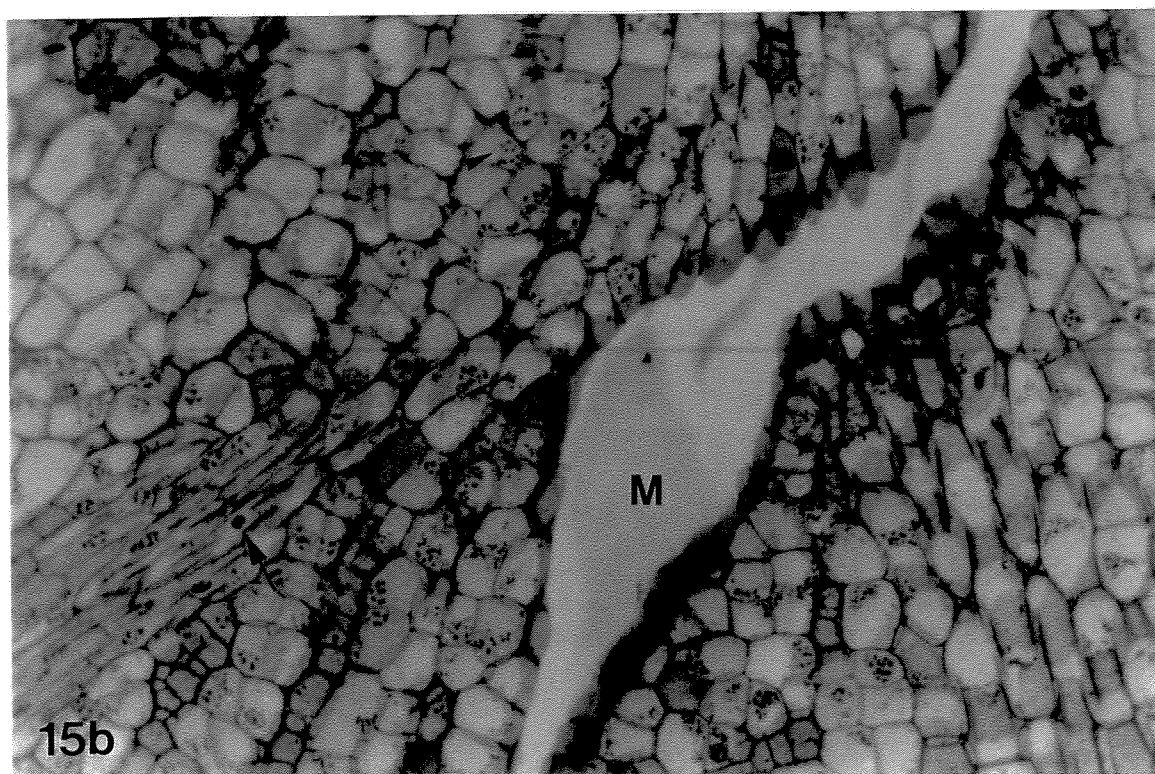
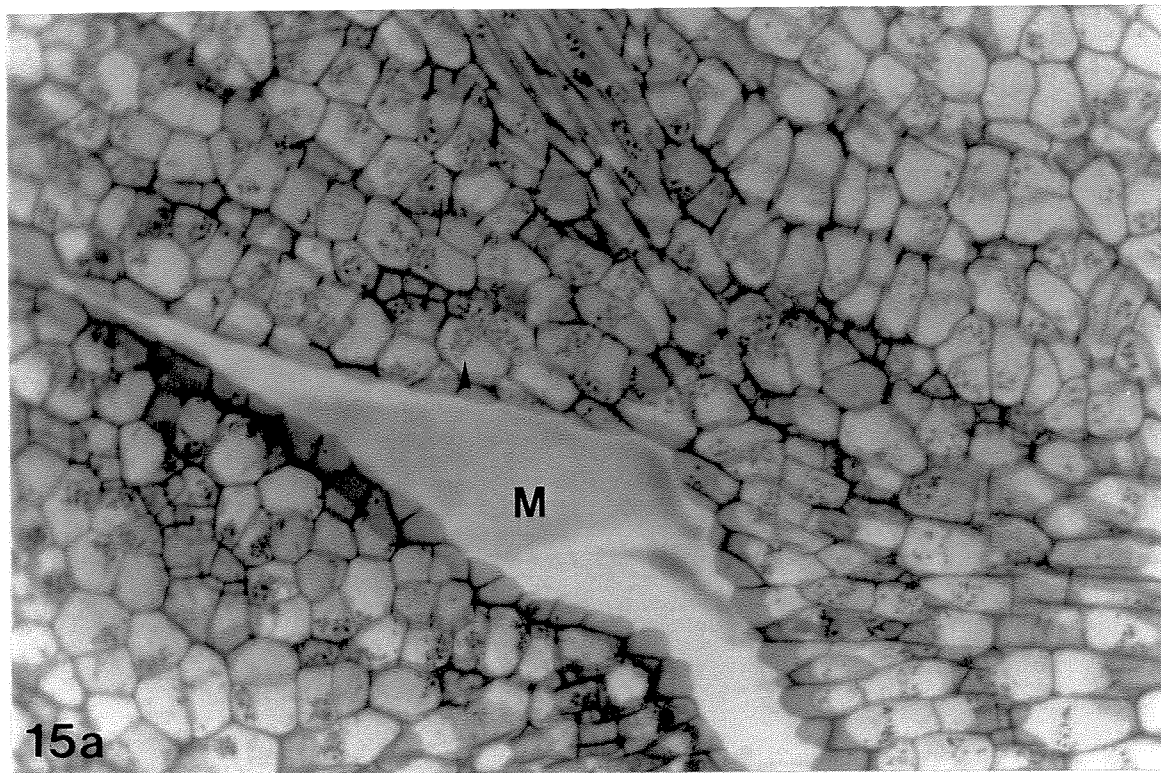


Figura 16: Cortes transversais de eixo embrionário de sementes viável e inviável corados pelo Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0 para detecção de radicais aniônicos e metacromasia.

16a: Semente viável. Note as paredes celulares coradas em roxo e a presença de plasmodesmas (►). No citoplasma observa-se a presença de um material granular corado em verde. O núcleo das células do eixo embrionário coram-se em azul, apresentando algumas regiões de cromatina condensada (→). 420x.

16b: Semente inviável. Note as paredes celulares coradas em roxo e com plasmodesmas (►). No citoplasma observa-se a presença de uma quantidade reduzida de material granular corado em verde. O núcleo cora-se em azul, sendo observados alguns núcleos apresentando cromatina mais compactada (→). 420x.

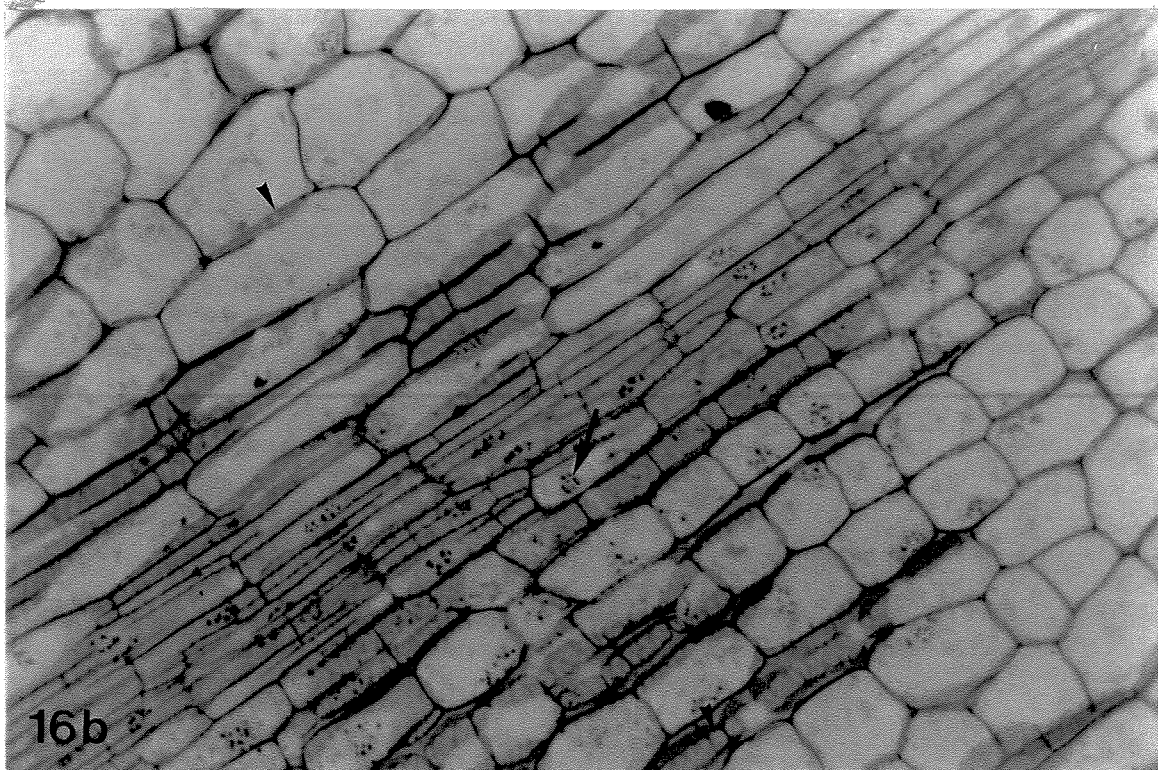
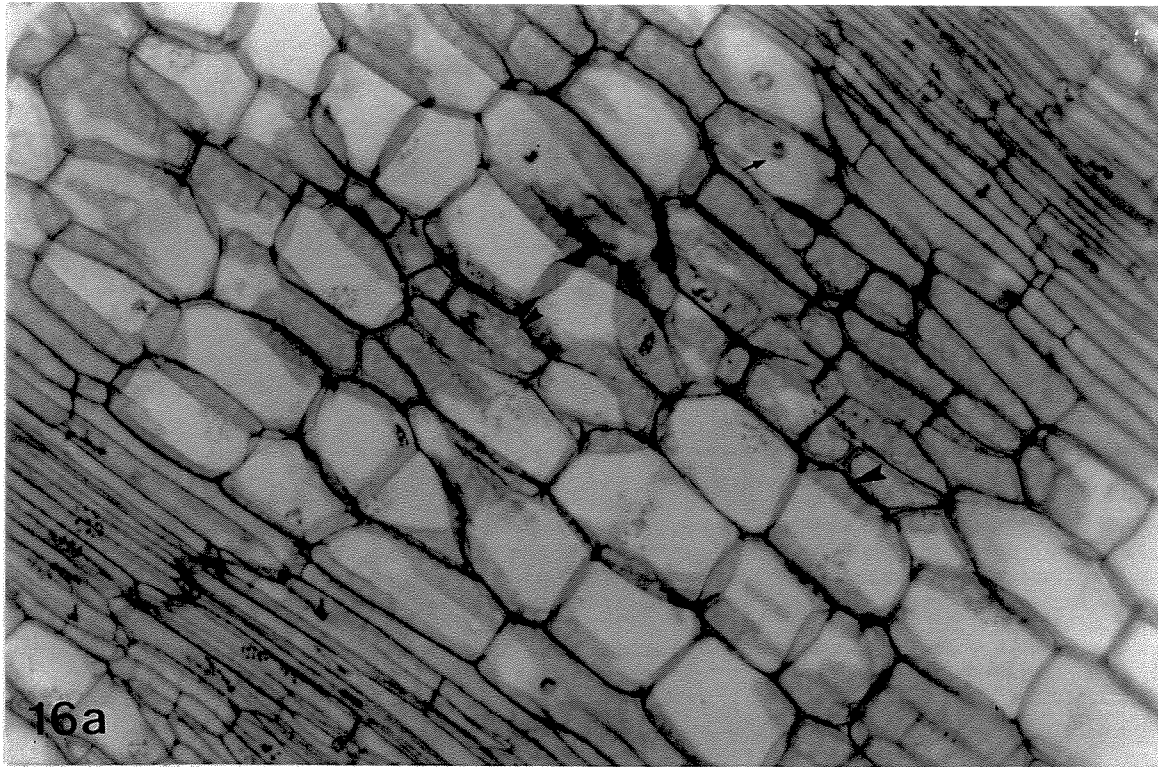


Figura 17: Cortes transversais de cotilédone de sementes viável e inviável submetidos a coloração pelo Xylidine Ponceau (XP) a pH 2,5 para detecção de radicais catiônicos.

17a: Semente viável. As paredes celulares encontram-se pouco coradas (*). No citoplasma são vistos glóbulos de natureza proteica corados em vermelho (►). 1050x.

17b: Semente inviável. Paredes celulares pouco coradas (*). No citoplasma observa-se a presença de material globular corado e um grânulo XP-positivo de natureza proteica localizado próximo à parede celular (►). No centro do citoplasma encontra-se uma região de coloração XP-negativa. 1050x.

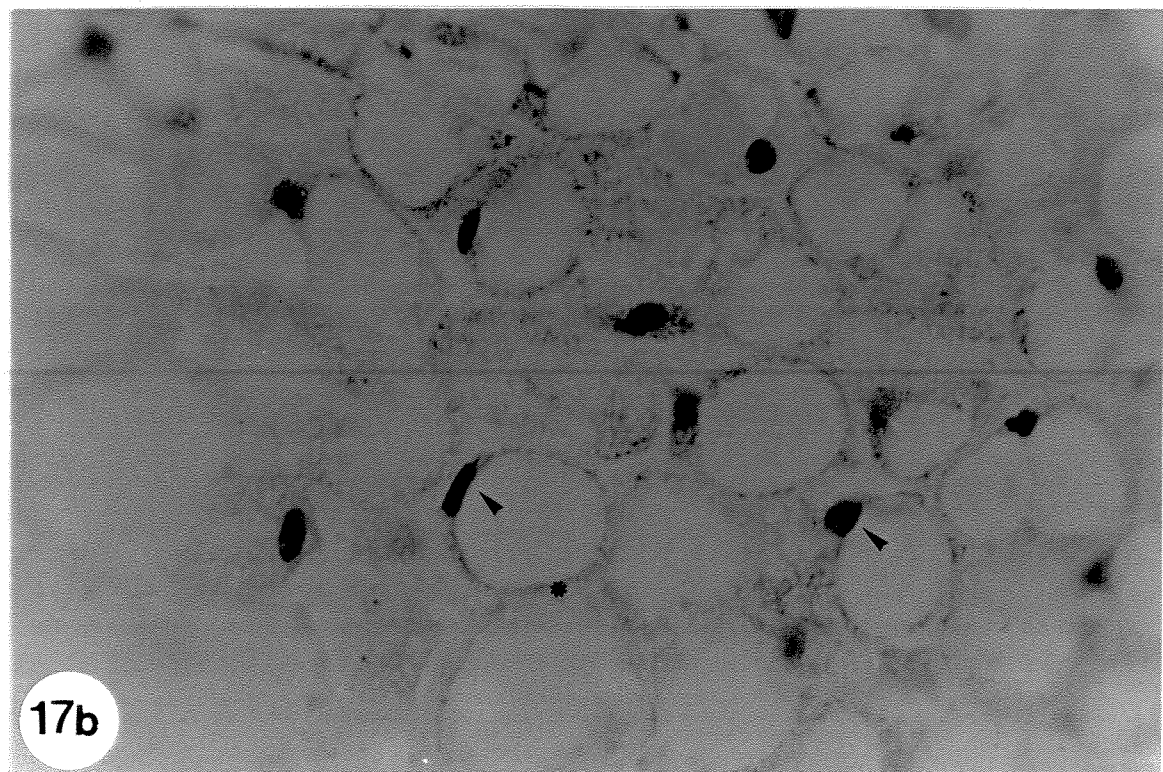
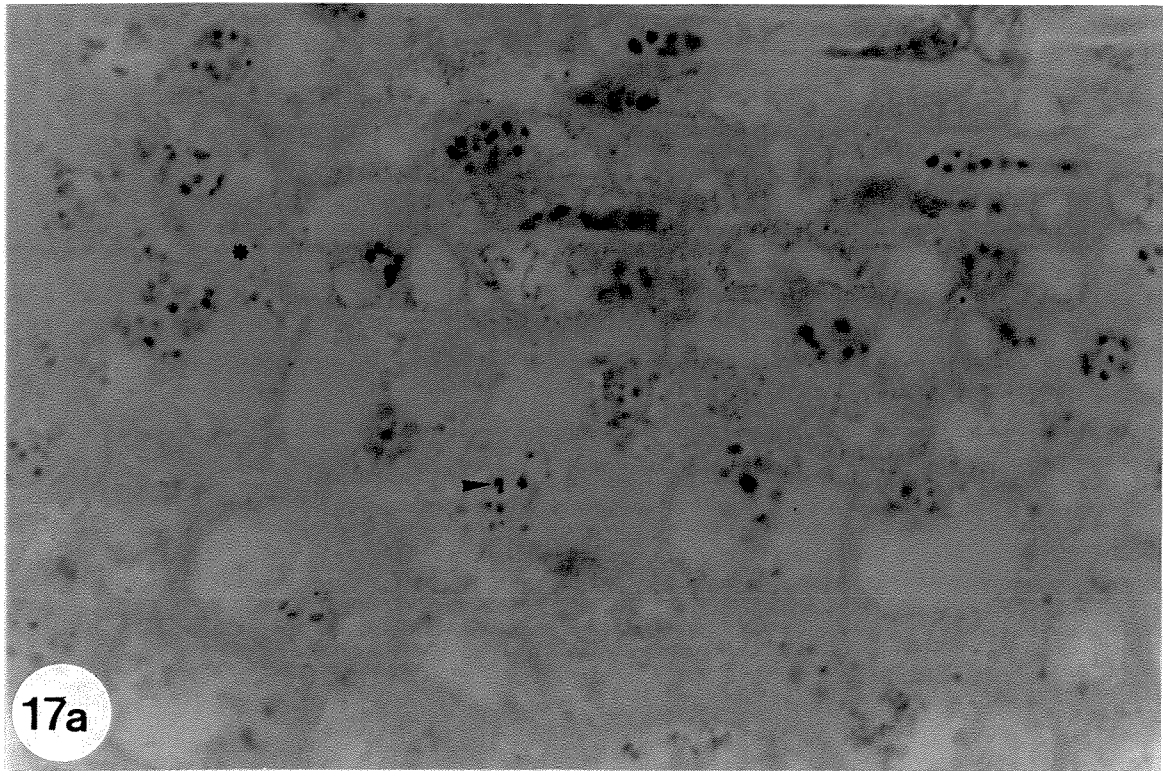


Figura 18: Cortes transversais do eixo embrionário de sementes viável e inviável submetidos a coloração pelo Xylidine Ponceau (XP) a pH 2,5 para detecção de radicais catiônicos.

18a: Semente viável. As paredes celulares encontram-se pouco coradas (*). No citoplasma observa-se um material granular de natureza proteica corado em vermelho (►).1050x.

18b: Semente inviável. Paredes celulares pouco coradas (*). No citoplasma observa-se a presença de material grânular (*) e um glóbulo XP-positivo (►) de natureza proteica localizado próximo à parede celular. No centro do citoplasma encontra-se uma região de coloração XP-negativa. 1050x.

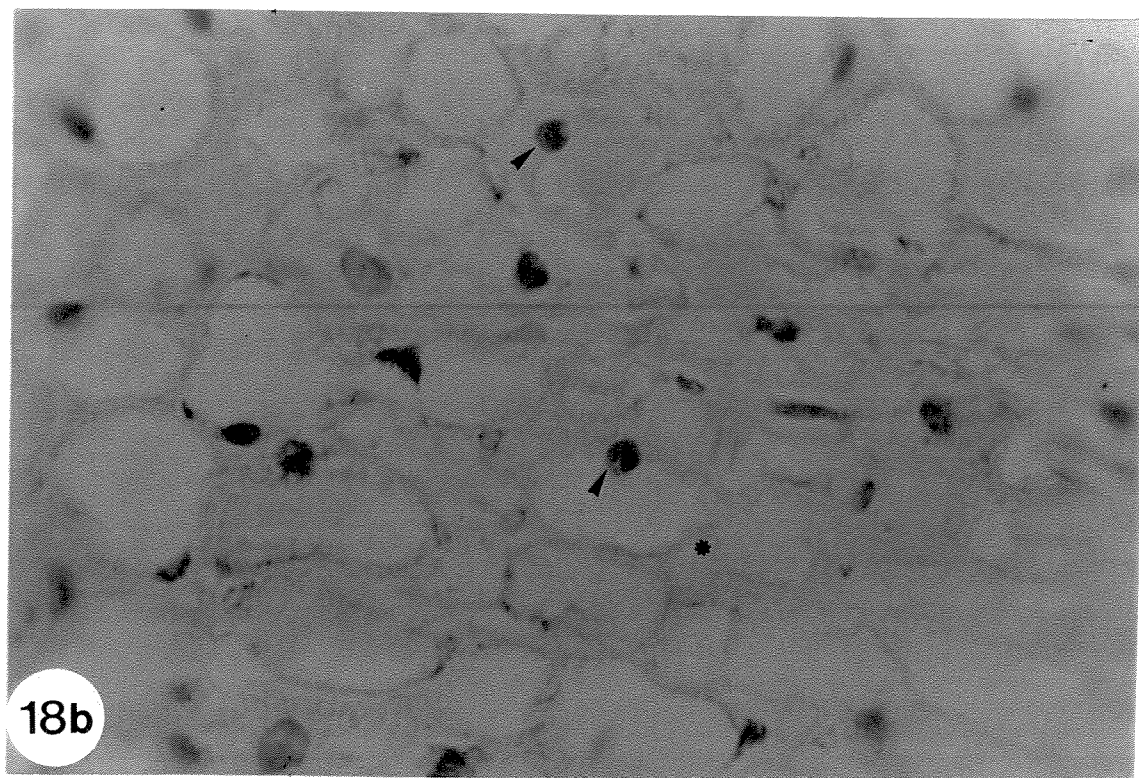
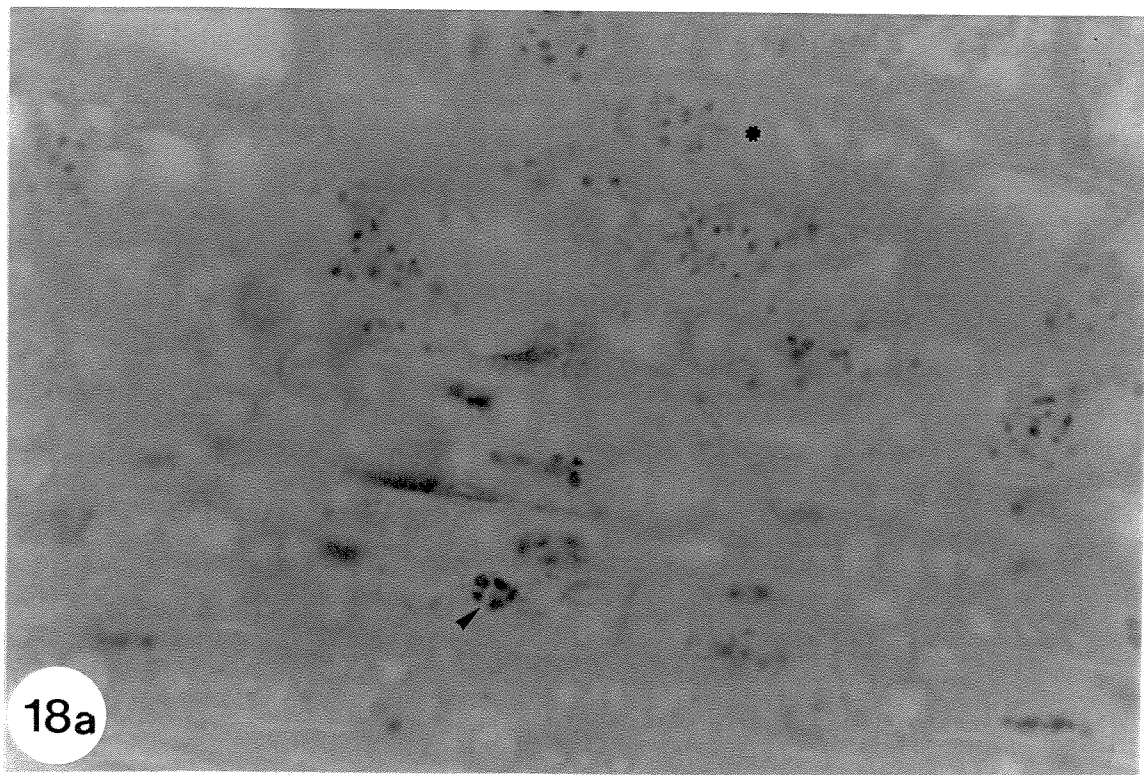


Figura 19: Cortes transversais de cotilédones de sementes viáveis e inviáveis submetidos à reação do PAS para detecção de polissacarídeos e glicoproteínas.

19a: Semente viável. Note as paredes celulares intensamente coradas e a presença de pequenos grânulos citoplasmáticos PAS-positivos. 420x.

19b: Semente inviável. Observe a alteração na coloração das paredes celulares e do conteúdo citoplasmático PAS-positivo quando comparados com as sementes viáveis acima. 420x.

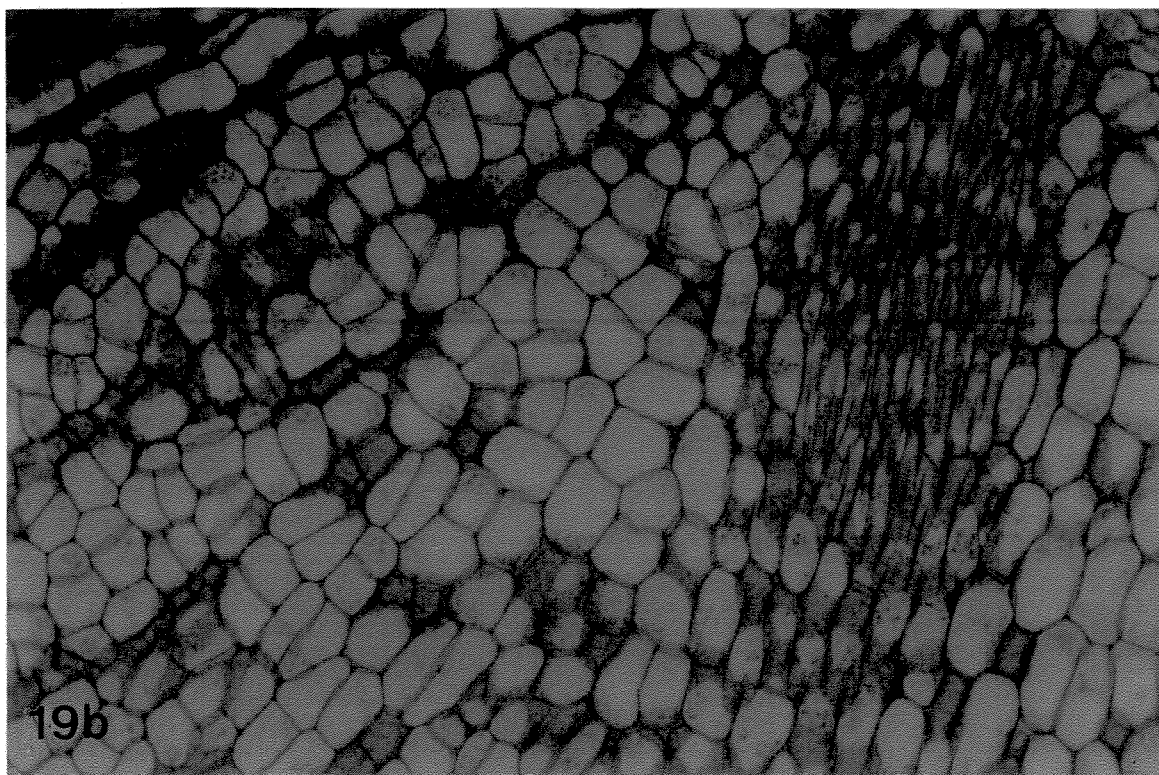
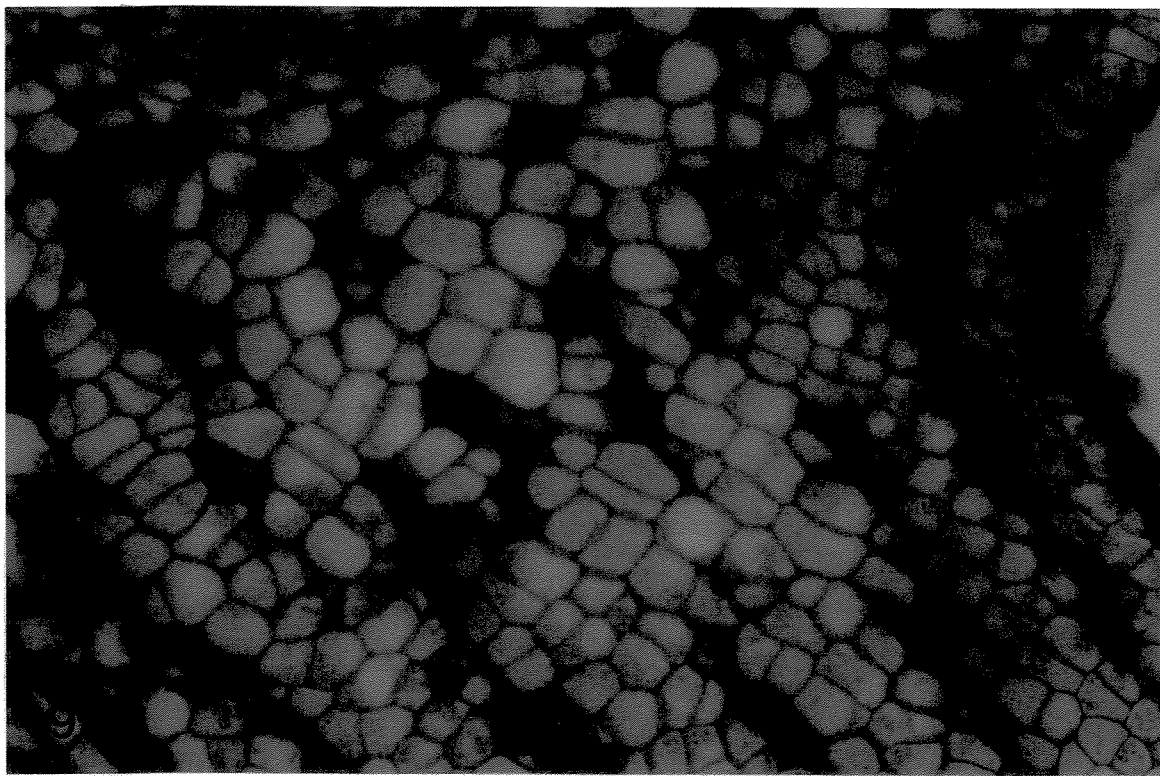


Figura 20: Cortes transversais do eixo embrionário de sementes viável e inviável submetidos a reação do PAS para a detecção de polissacarídeos e glicoproteínas.

20a: Semente viável. Note as paredes celulares intensamente coradas e a presença de pequenos grânulos citoplasmáticos PAS-positivos. 420x.

20b: Semente inviável. Observe a alteração na coloração das paredes celulares e do conteúdo citoplasmático PAS-positivo quando comparados com as sementes viáveis acima. 420x.

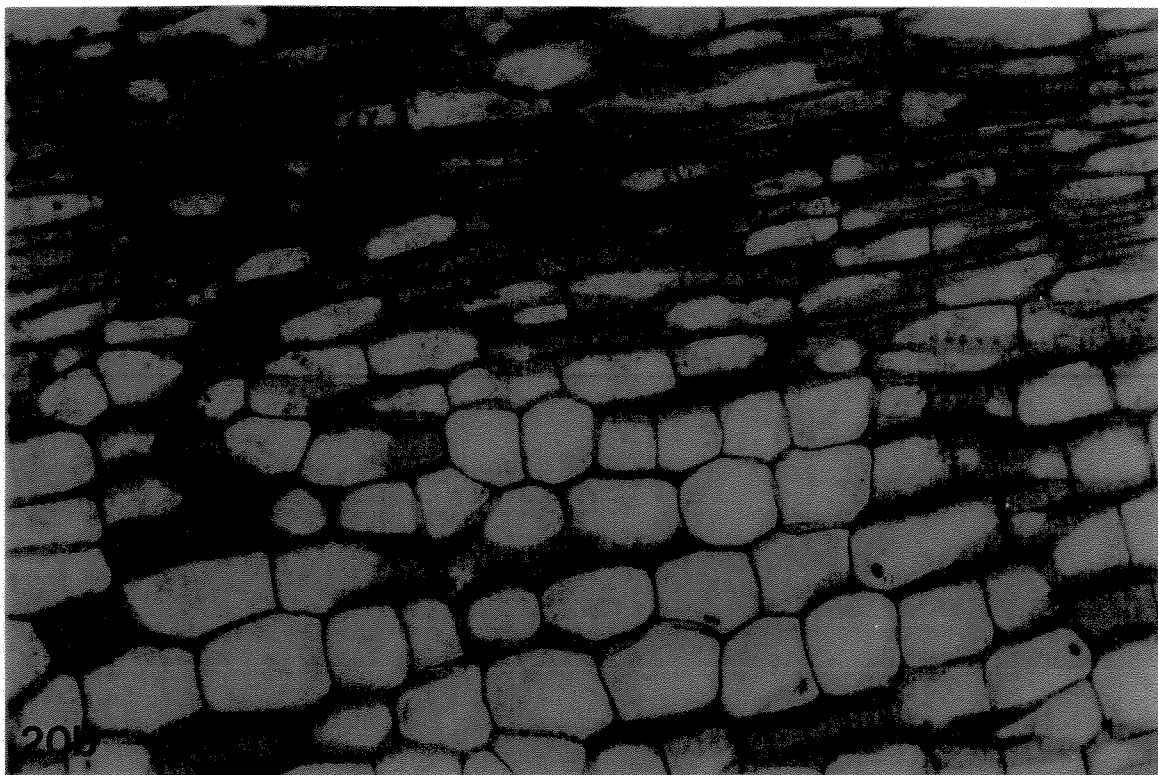
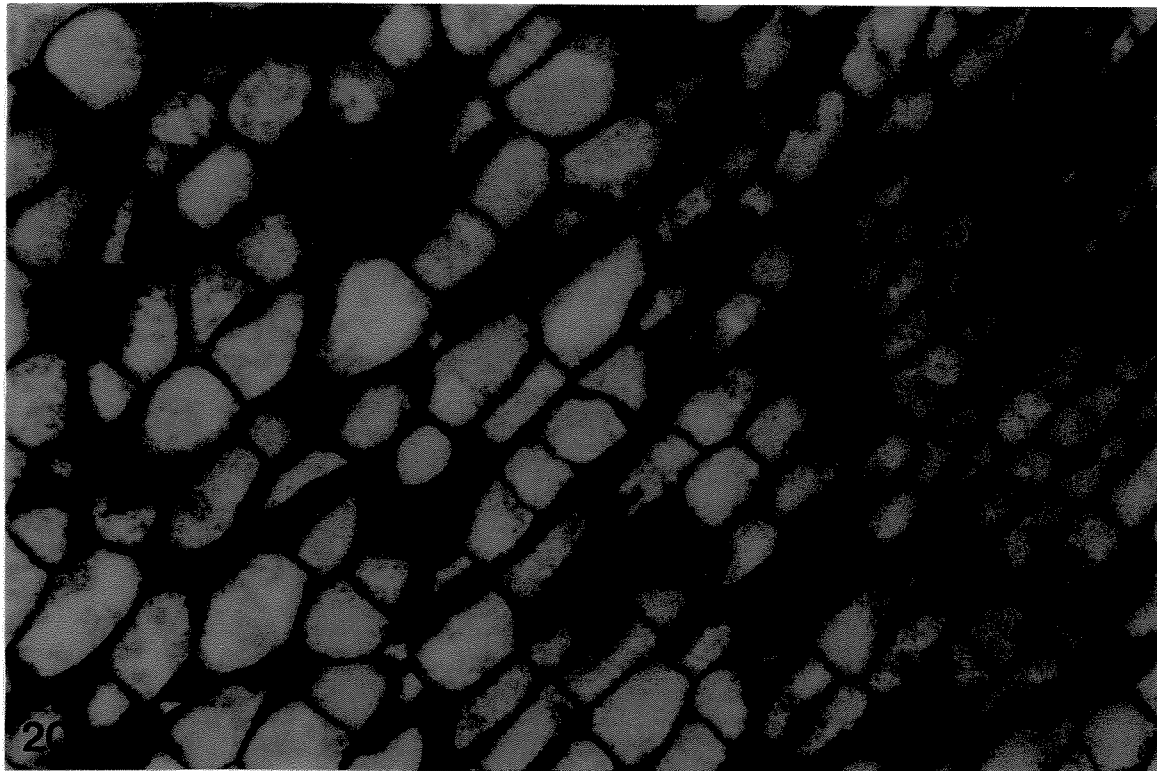


Figura 21: Eixo Embrionário de semente viável observado ao Microscópio Eletrônico de Varredura.

21a: Cotilédone (C) e Eixo Embrionário (E). 66,5x.

21b: Corte transversal de semente de *C. arabica* mostrando Endosperma (EN) e Cotilédone (C). 770x.

21c: Corte longitudinal de semente de *C. arabica* mostrando Endosperma (EN), Cotilédone (C) e Eixo Embrionário (E). 110x.

21d: Corte transversal de semente de *C. arabica* mostrando Endosperma (EN) e Eixo Embrionário (E). 230x.

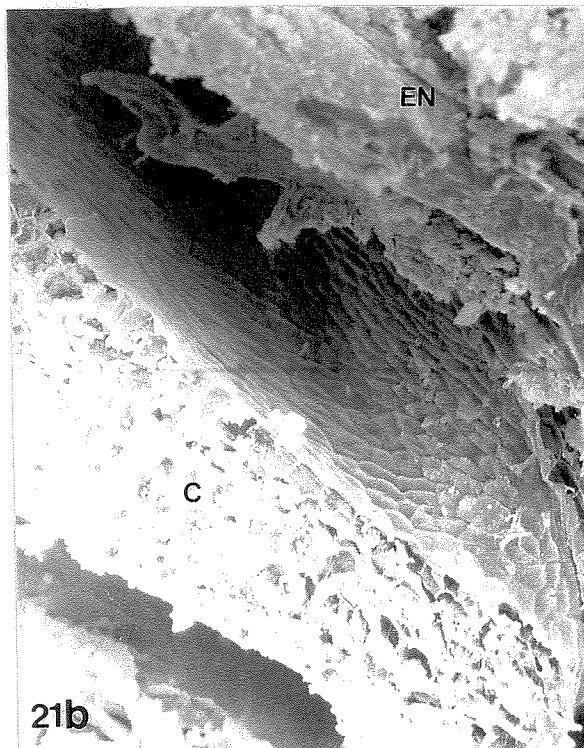
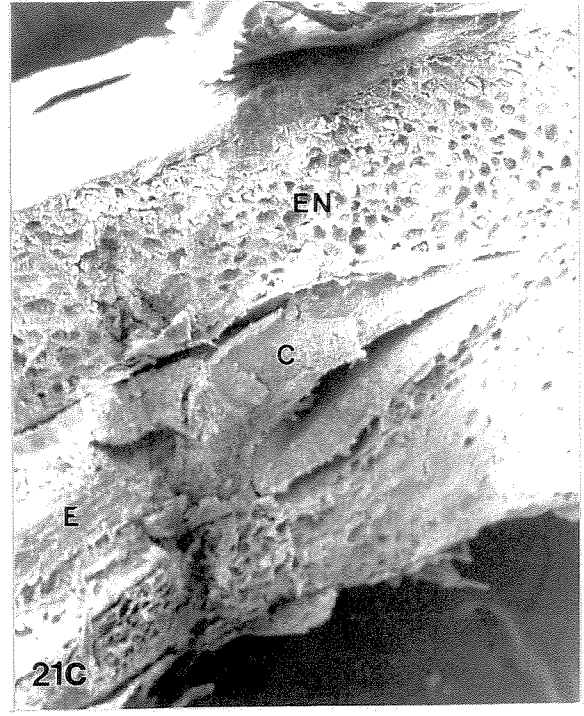
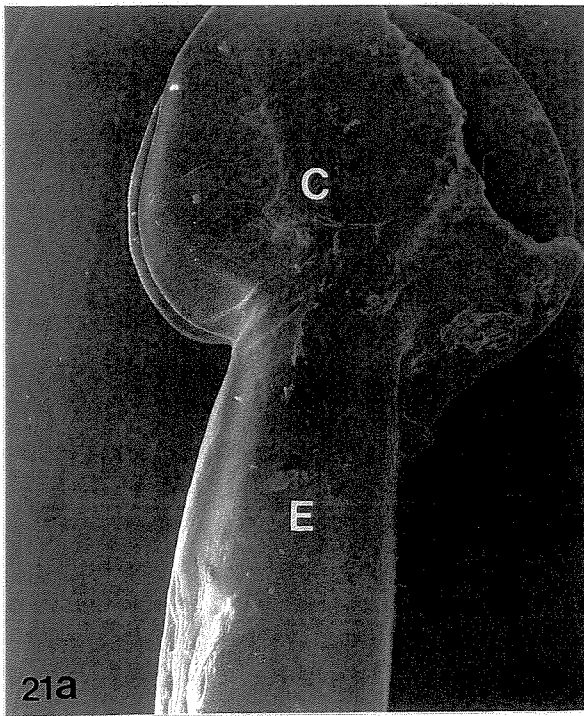


Figura 22: Cotilédone de sementes viável e inviável observados ao Microscópio Eletrônico de Varredura.

22a: Semente viável. Vista frontal da superfície de cotilédone de semente viável. Note a uniformidade das paredes celulares das células epidérmicas (→). 2850x.

22b: Semente inviável. Vista frontal da superfície de cotilédone de semente inviável. Note o aspecto retraído das paredes celulares das células epidérmicas (→). 2850x.

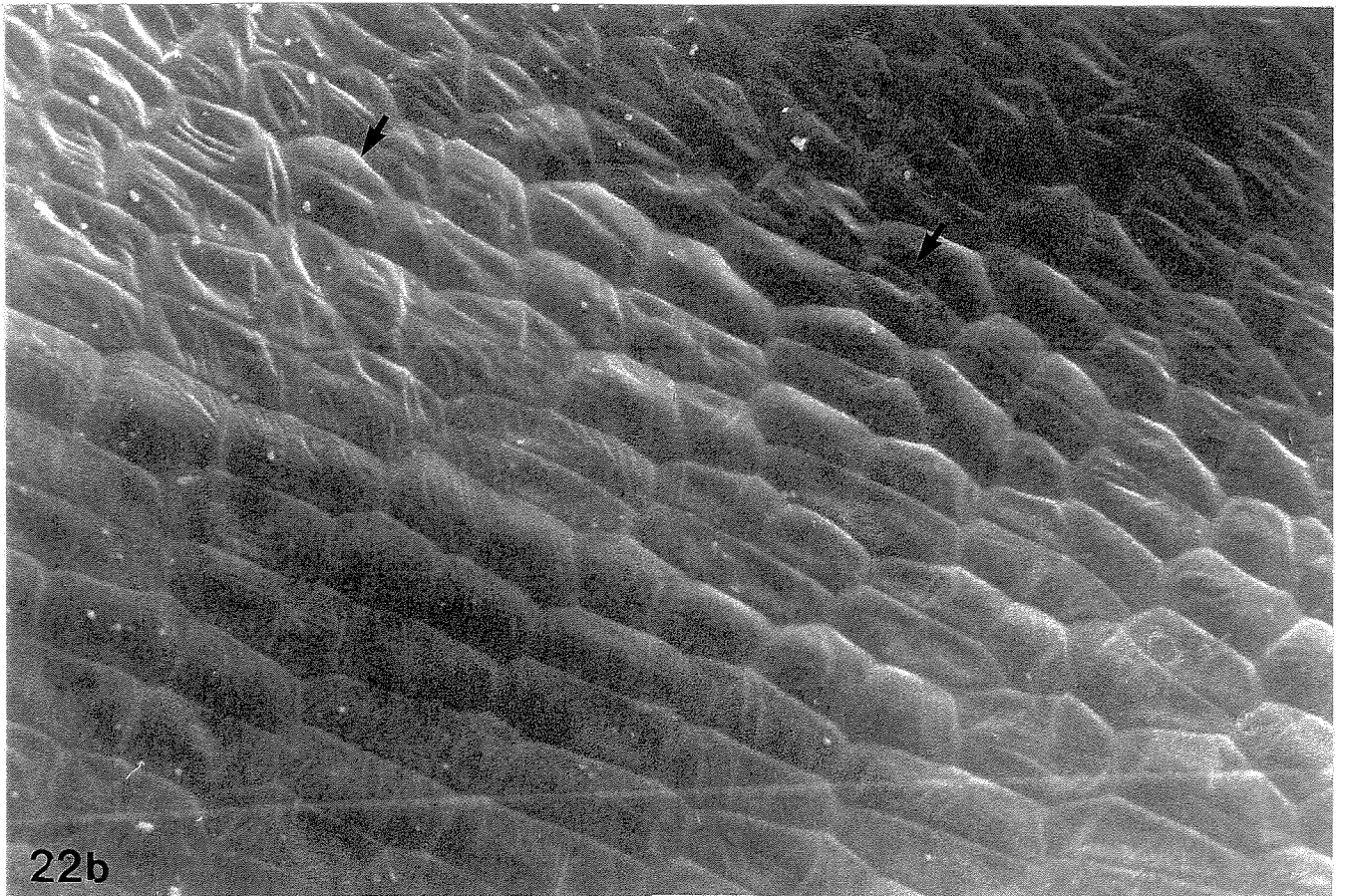
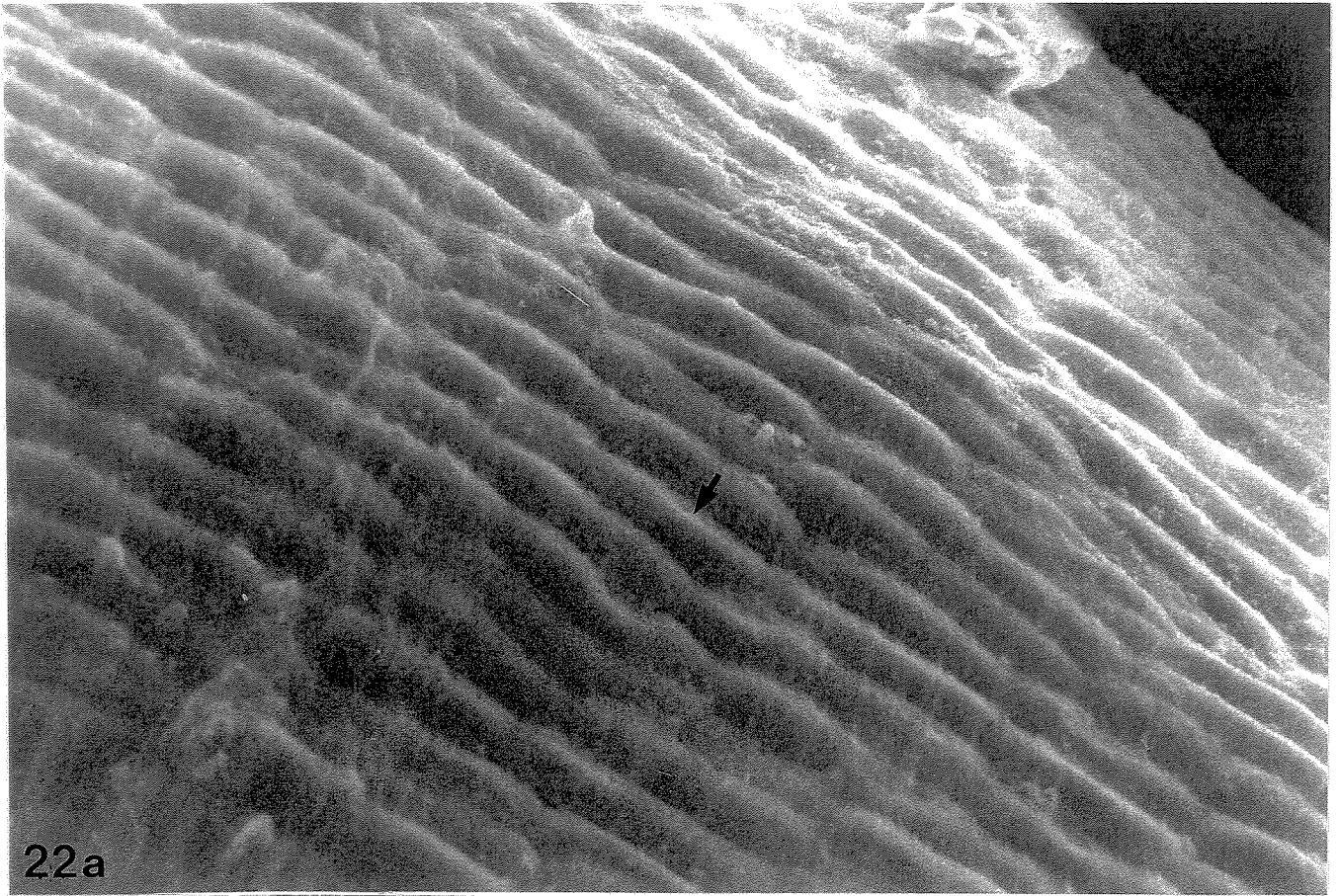


Figura 23: Cortes transversais de cotilédone de sementes viável e inviável observados ao Microscópio Eletrônico de Varredura.

23a: Semente viável. Paredes celulares finas (P). Note a disposição parietal dos glóbulos de lipídio (L) formando uma camada homogênea. Entre os glóbulos de lipídio são observados corpos protéicos (CP). Os filamentos de carboidratos formam uma malha citoplasmática (→). 3750x.

23b: Semente inviável. Detalhe de células cotiledonares onde pode-se observar paredes celulares finas e distendidas (P), o reduzido número de glóbulos lipídicos (L), corpos protéicos (CP) e os filamentos de carboidratos (→). 6400x.

23c: Semente viável. Células cotiledonares com glóbulos de lipídios (L) localizados próximos à parede celular (P). Note os filamentos de carboidratos (→) e corpos protéicos (CP) dispersos entre os glóbulos lipídicos. 3850x.

23d: Semente inviável. Note o reduzido número de glóbulos de lipídios (L) localizados próximos à parede celular (P). Entre os glóbulos lipídicos observam-se filamentos de carboidratos (→). 5400x.

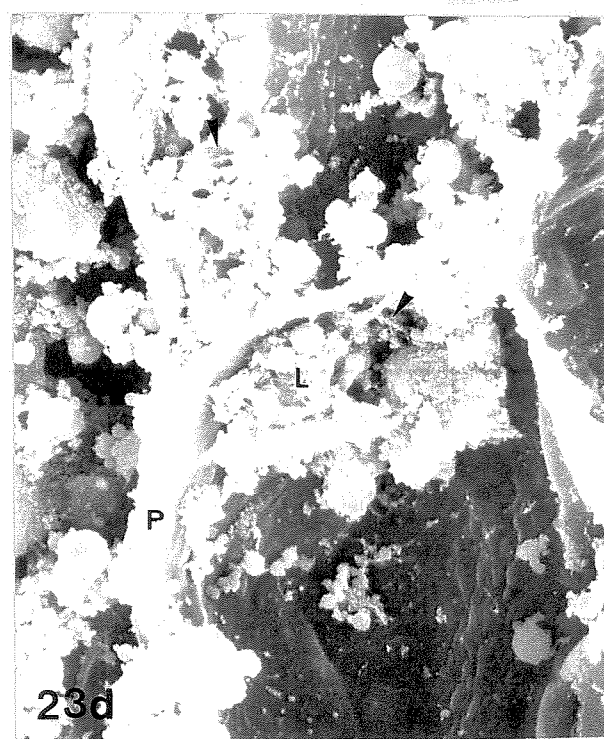
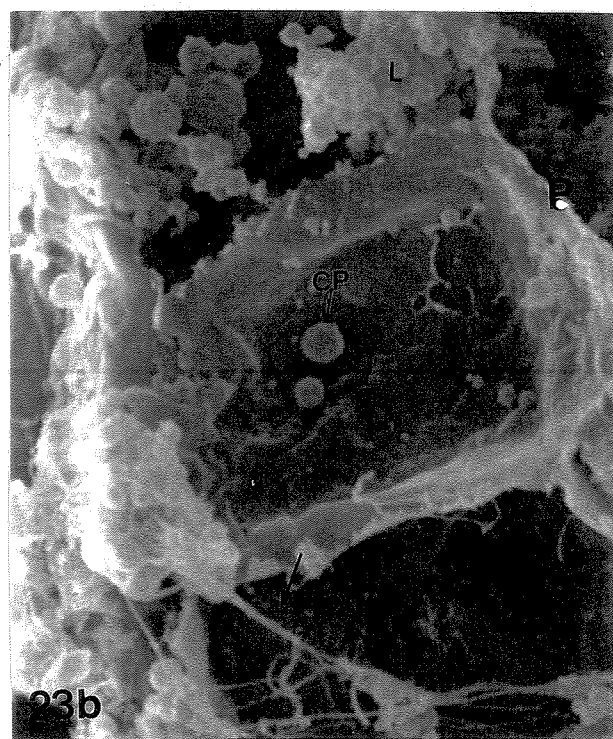
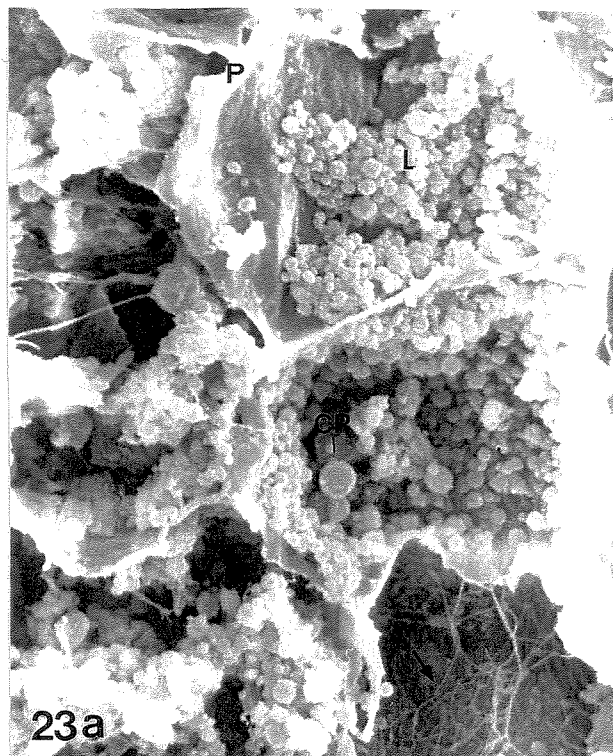


Figura 24: Cortes transversais de cotilédone de semente viável e inviável observados ao Microscópio Eletrônico de Varredura.

24a: Semente viável. Note a disposição parietal dos glóbulos de lipídio (L). Filamentos de carboidratos (►) são encontrados entre os glóbulos de lipídio e corpos protéicos (CP). 7700x.

24b: Semente inviável. Detalhe de células onde pode-se observar paredes celulares finas e retraídas (P). Note a presença do reduzido número de glóbulos lipídicos (L) e corpos protéicos (CP). 2880x.

24c: Semente viável. Células do eixo embrionário com glóbulos de lipídios (L) localizados próximos à parede celular (P) fina e distendida. 8050x.

24d: Semente inviável. Note o reduzido número de glóbulos de lipídios (L) ocupando posição parietal. Paredes celulares delgadas e levemente retraídas. 2400x.

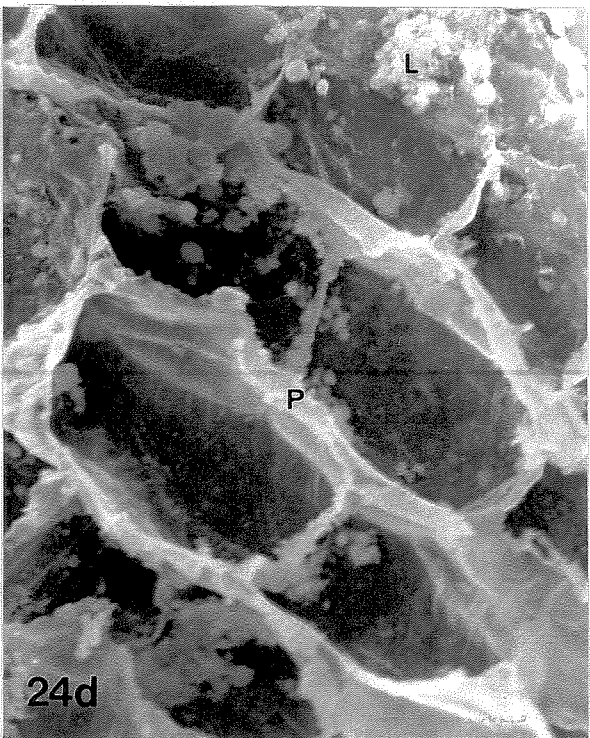
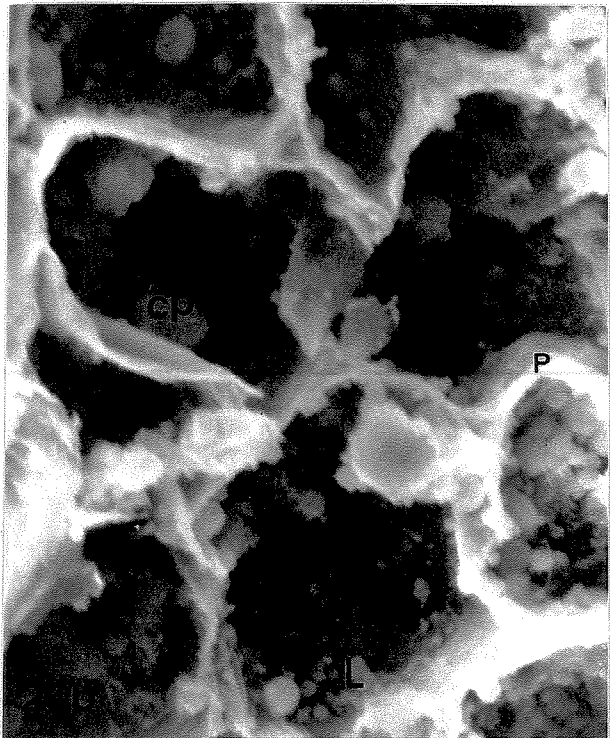
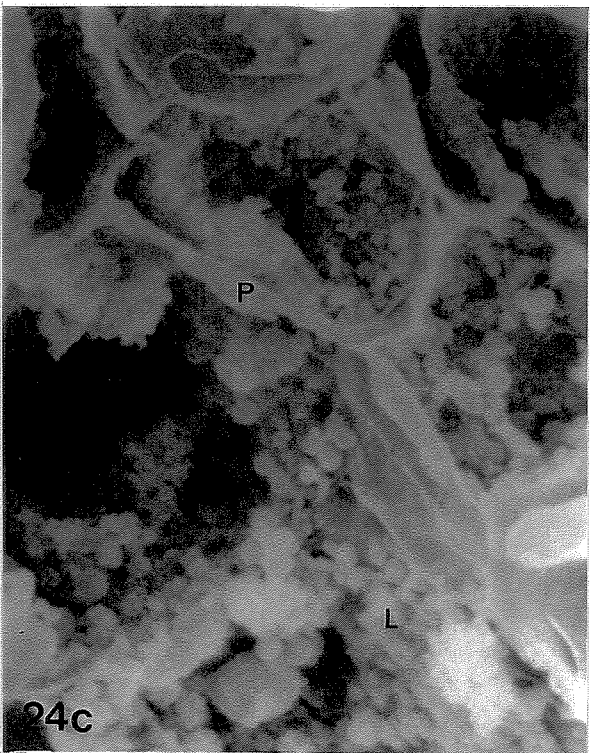
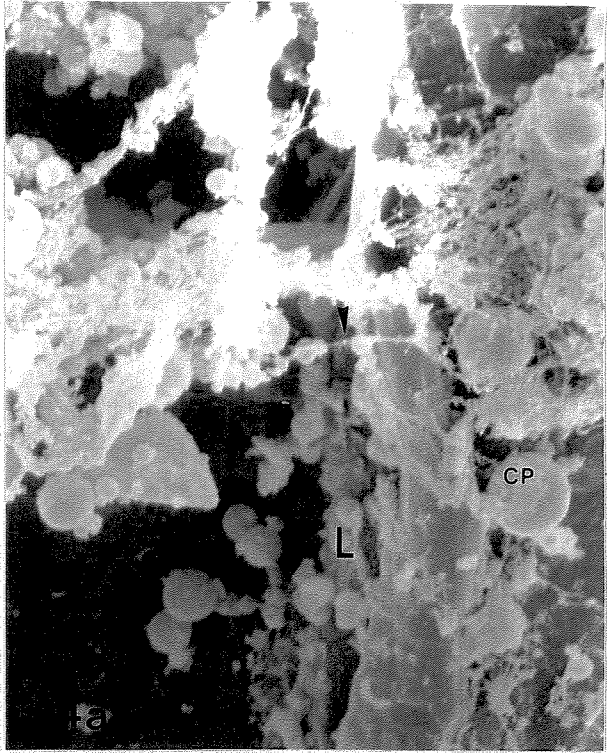


Figura 25: Cortes transversais de cotilédone de semente viável observados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão.

25a: Paredes celulares (P) finas e delgadas. No citoplasma são observados glóbulos de lipídio (L) próximos à parede celular imersos em uma matriz proteica (p). Mitocôndrias (M) são observadas entre os glóbulos lipídicos ou logo abaixo destes. Pequenos vacúolos (v) são detectados nesta mesma região. No grande vacúolo (V) central encontram-se várias endomembranas. 13200x.

25b: Paredes celulares (P) distendidas delimitam espaço intercelular (e). Note a presença de plasmodesma (►). Os glóbulos lipídicos (L) ocupam posição parietal. Mitocôndrias (M) podem ser observadas próximas aos lipídios, assim como vacúolos (v) de tamanho variados com conteúdo mais ou menos granular imersos em uma matriz proteica (p). 13200x.

25c: As paredes celulares (P) delimitam espaços intercelulares (e). Note a camada de glóbulos de lipídios (L) ocupando posição parietal. Próximo aos lipídios são observados plastoglóbulos (►). 13300x.

25d: Detalhe do núcleo (N), com regiões de cromatina mais condensada e nucléolo (NU) evidente. O núcleo é delimitado por envoltório nuclear, onde complexos de poro podem ser observados (►). No citoplasma, adjacente ao núcleo, são detectados dois plastoglóbulos (→). 17500x.

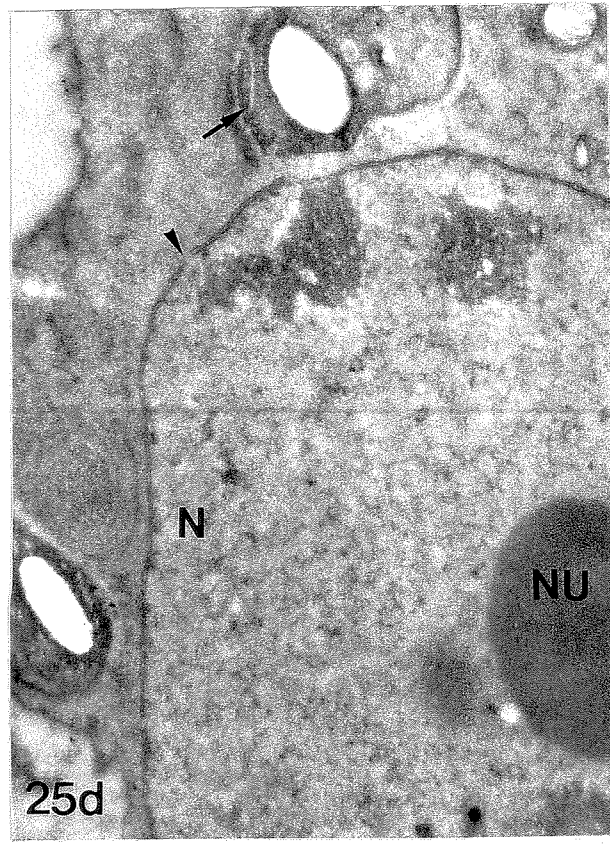
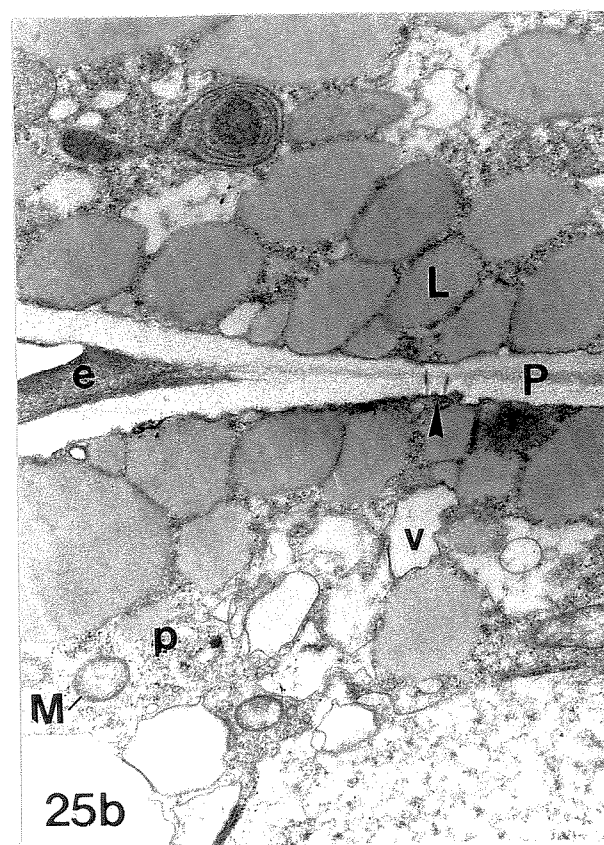
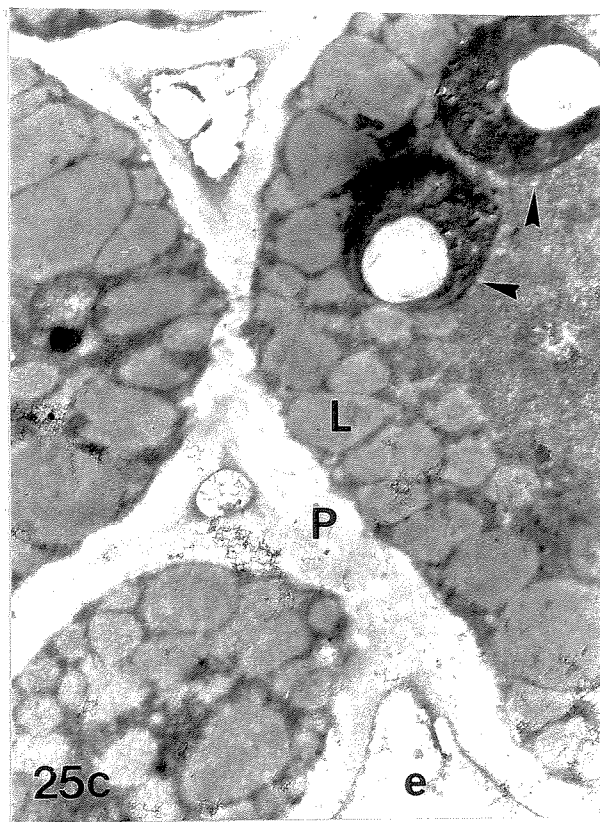
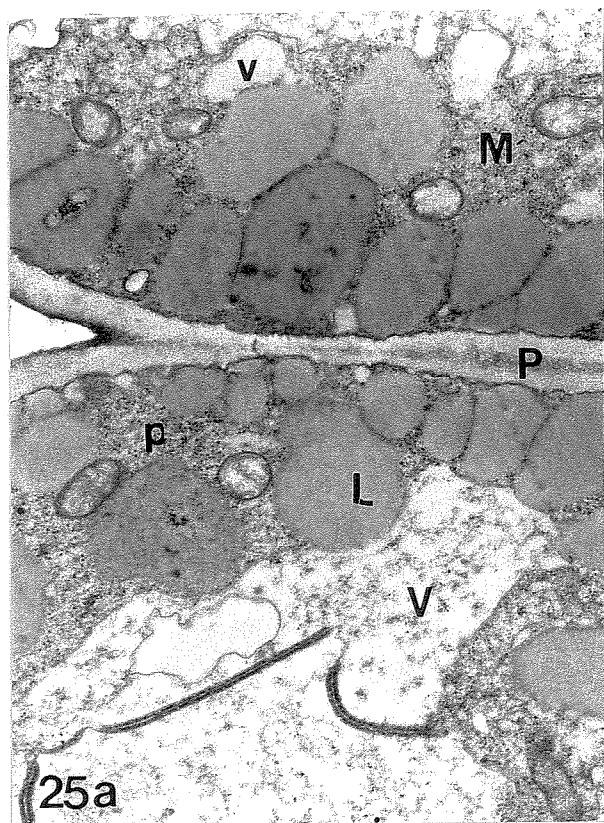


Figura 26: Cortes transversais e longitudinais de cotilédone de semente inviável observados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão.

26a: Paredes celulares (P) de células adjacentes retraídas, delimitando espaços intercelulares (e). Os glóbulos de lipídio (L) ocupam posição parietal. Observe a presença de um grande glóbulo lipídico (L*). Vacúolos (V) com conteúdo mais ou menos granular são observados ocupando posição central no citoplasma. Próximo aos glóbulos de lipídios encontramos pequenos vacúolos (►) e alguns glóbulos com conteúdo com conteúdo osmiofílico, além da presença de corpos protéicos (CP). Observa-se a deposição de pequenos grânulos osmiofílicos (→) abaixo da membrana celular. 13300x.

26b: Detalhe do citoplasma de duas células cotiledonares mostrando os pequenos vacúolos (v) e um grande vacúolo central (V). Eles podem apresentar conteúdo com maior ou menor granulação. Os glóbulos de lipídio ocupam posição parietal. O núcleo (N) apresenta cromatina condensada e nucléolo (NU) evidente. 8800x.

26c: Células cotiledonares mostrando glóbulos lipídicos (►) localizados próximos à parede celular, pequenos vacúolos (v) com conteúdo mais ou menos granular dispersos pelo citoplasma, presença de vacúolo central grande (V) e com conteúdo heterogêneo. Note o acúmulo de grânulos osmiofílicos no espaço perimembranoso (►). 8800x.

26d: Detalhe do citoplasma mostrando glóbulos lipídicos (L) localizados próximos à parede celular, vacúolos (v) com conteúdo mais ou menos granular e o núcleo (N) ocupando posição parietal. O núcleo apresenta cromatina condensada e vacuolizada (►) com nucléolo (NU) granular e evidente. Observe a presença de granulações osmiofílicas no espaço perimembranoso. 14080x.

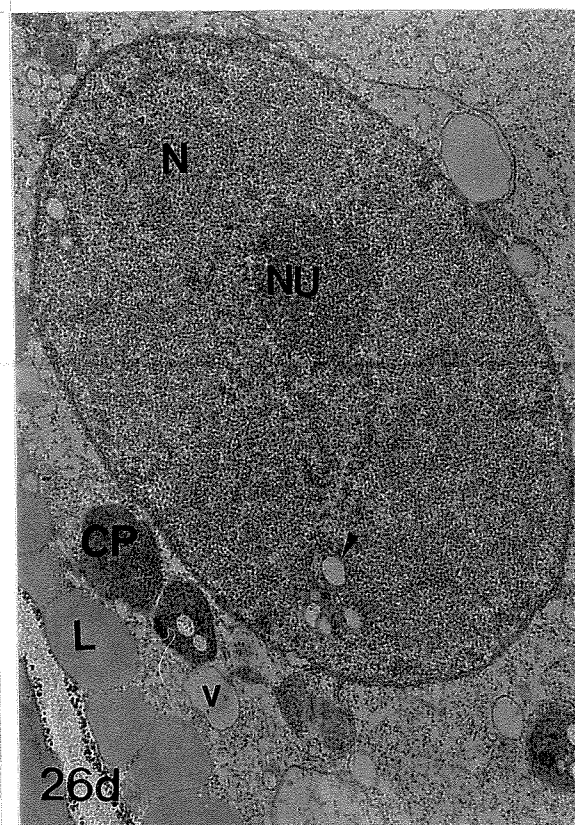
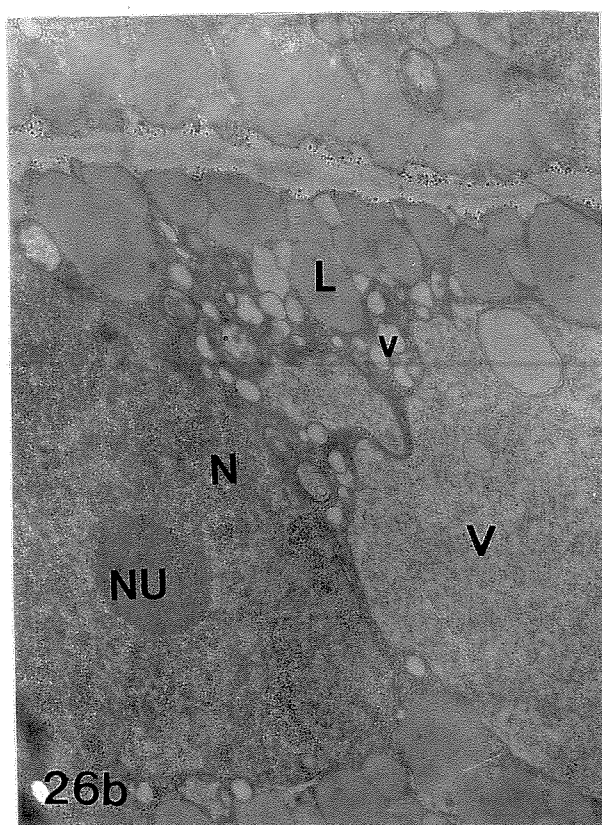
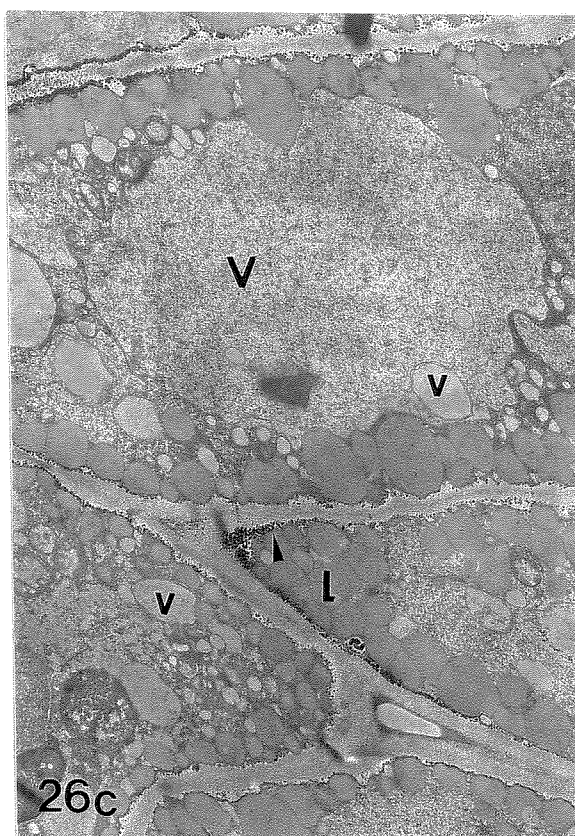
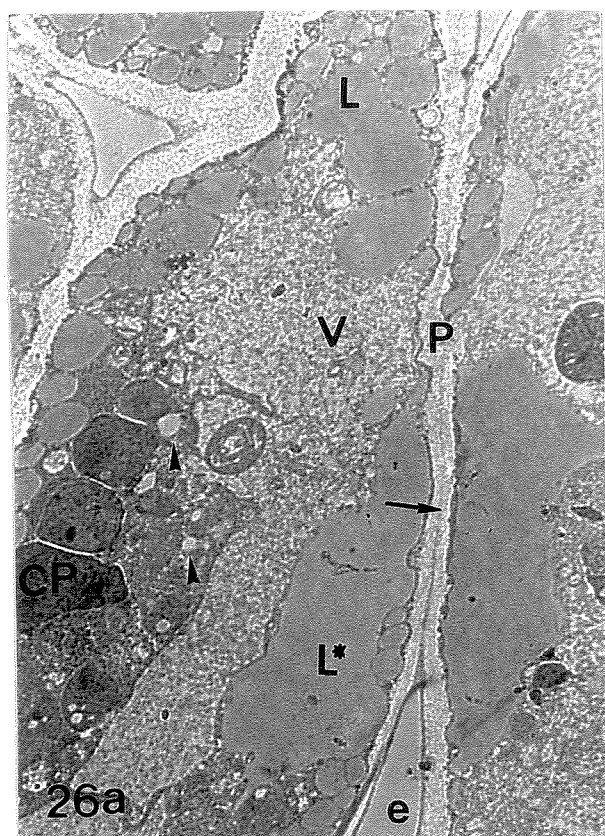


Figura 27: Cortes transversais de eixo embrionário de semente viável observados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão.

27a: As paredes adjacentes são finas e distendidas e delimitam células com conteúdo citoplasmático denso. Note os glóbulos de lipídio (L) próximos à parede celular. Vacúolos (v) de diferentes tamanhos e conteúdo heterôgeneo localizam-se na região central do citoplasma. Note a presença de vacúolos com conteúdo granular (V*). 7200x

27b: Detalhe de corpos protéicos (cp) localizados entre os glóbulos de lipídios (L) imersos em uma densa matriz proteica (p). 14960x.

27c: Paredes celulares (P) delgadas. No citoplasma encontramos mitocôndrias (M), vacúolos (v) com conteúdo heterogêneo e glóbulos de lipídios (L) localizados próximos à parede celular. 12100x.

27d: Detalhe de um núcleo (N) com envoltório nuclear com complexos de poros (►). A cromatina apresenta algumas regiões mais compactadas (→) e nucléolo (NU) evidente. 17500x

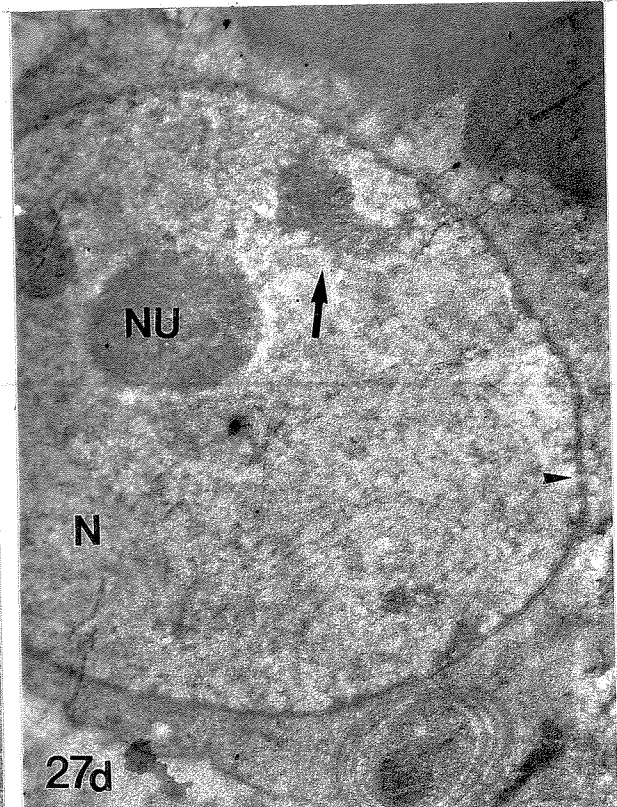
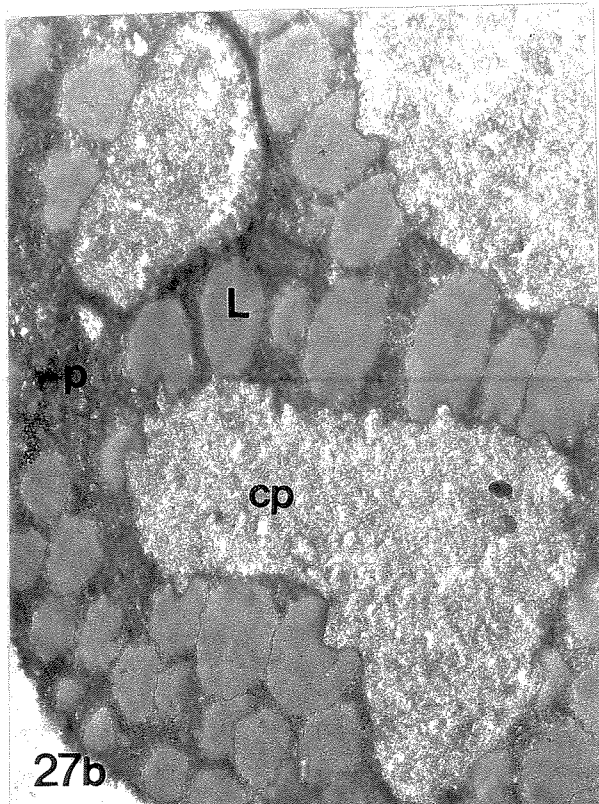
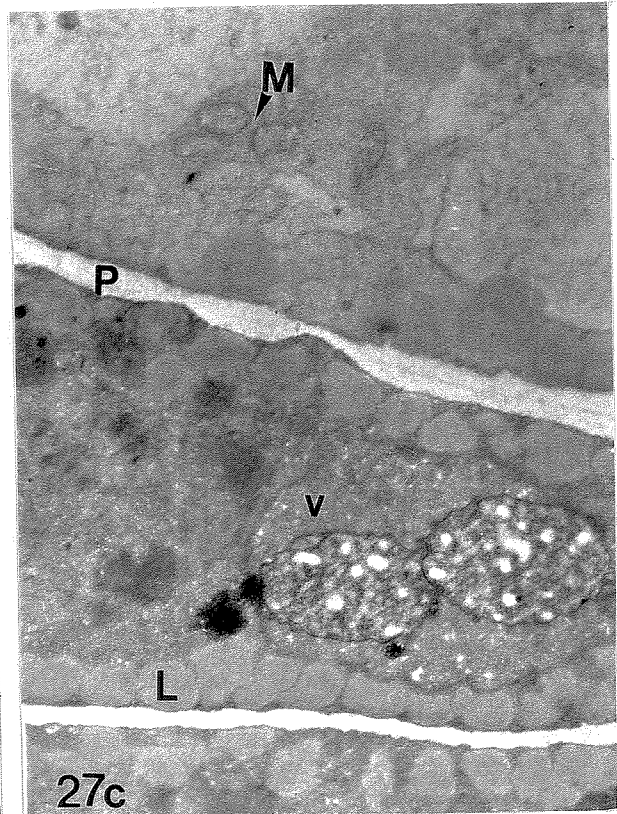


Figura 28: Cortes transversais de eixo embrionário de semente inviável observados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão.

28a: Células do eixo embrionário com citoplasma denso. Paredes celulares (P) finas e distendidas apresentando um aspecto vacuolizado. Note a presença de glóbulos lipídicos com aspecto disforme (L) e tamanho variado. Observe a quantidade reduzida de proteína difusa (p) e a presença de inúmeros vacúolos (v) com conteúdo mais ou menos granular. Vacúolos periféricos sugerem a fragmentação da membrana plasmática (→) 11000x.

28b: Paredes celulares (P) vacuolizadas delimitando células adjacentes e um grande espaço intercelular (e). Os lipídios podem ser encontrados na forma de grandes glóbulos (L) e em número reduzido. Vacúolos (v) com conteúdo heterôgeneo são observados. Note o aspecto granular das proteínas difusas (p). 7500x.

28c: Note a presença de vários vacúolos (v) com conteúdo mais ou menos granular ocupando posição central no citoplasma, além da presença de vacúolos periféricos que sugerem a fragmentação da membrana plasmática (→). Parte de um grande glóbulo de lipídio (L*) pode ser observado. Note o aspecto granular da matriz proteica (p). 20400x.

28d: As paredes celulares são finas, distendidas e com conteúdo não homogêneo. Note o número reduzido de glóbulos de lipídio e vários vacúolos (v). Núcleo alongado (N) ocupando posição parietal com cromatina bastante homogênea e um provável nucléolo pouco visível. 11900x.

