

5.01.99

INDUÇÃO *IN VIVO* DE POLIPLOIDIA EM *Coffea canephora* RESISTENTE A NEMATOIDESAna Karolina dos Santos Gasparini¹, Leonardo Adabo Cintra², Fernando Cesar Carducci³, Luciana Harumi Shigueoka⁴, Gustavo Hiroshi Sera⁵, Tumoru Sera⁶, Paula Cristina da Silva Angelo⁷¹ Graduanda em Ciências Biológicas no IFPR/ Bolsista do Programa PIBIC do IDR-Paraná Unidade Londrina.² Doutorando em Genética e Biologia Molecular da UEL/ Bolsista da Embrapa Café no IDR-Paraná Unidade Londrina³ Doutorando em Genética e Melhoramento da UEL, Auxiliar técnico de pesquisa do IDR-Paraná Unidade Londrina⁴ D.Sc., Pesquisadora Colaboradora no IDR-PR Unidade Londrina/Consórcio Pesquisa Café⁵ D.Sc., Pesquisador do IDR-Paraná Unidade Londrina⁶ Pesquisador do IDR-Paraná Unidade Londrina, Bolsista Senior da Embrapa Café⁷ D.Sc., Pesquisadora A da Embrapa Café no IDR-Paraná Unidade Londrina**Resumo**

O melhoramento genético do cafeeiro tem grande importância econômica para o Brasil. O cruzamento entre espécies pode gerar cultivares mais produtivos e resistentes. A diferença na ploidia de *Coffea arabica* ($2n = 44$) e *C. canephora* ($2n = 22$) dificulta o cruzamento interespecífico. Com a intenção de induzir o aumento da ploidia de *C. canephora* resistente aos nematoides *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita*, meristemas apicais de estacas enraizadas foram tratados com colchicina a 0,2 ou a 0,35% em ágar. O número de estômatos nas folhas produzidas pelos meristemas tratados foi contado para avaliar o efeito da colchicina. Para plantas com número de estômatos reduzido, foram contados cromossomos nos meristemas de nós caulinares produzidos após os tratamentos com colchicina. Enquanto foram observados cerca de 30 estômatos por campo em folhas controle, uma planta tratada que produziu folha com 15 estômatos por campo e tem 44 cromossomos em um meristema vegetativo foi identificada.

Palavras-chave: Tetraploide; Café; Resistência a pragas**Apoio financeiro:** Consórcio de Pesquisa em Café/Embrapa Café - Projeto no. 10.18.20.035.00.05**Introdução**

O gênero *Coffea* compreende mais de 130 espécies, sendo *Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner as duas de maior importância econômica. Há algum tempo cultivares de *C. canephora* resistentes aos nematoides *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* são utilizadas como porta-enxertos para plantas de *C. arabica* suscetíveis (Sera et al., 2006). Cruzamentos controlados entre *C. arabica* e *C. canephora* podem gerar novas cultivares com a qualidade de bebida, alta rusticidade e vigor vegetativo, produtividade e resistência às doenças e nematoides das duas espécies, ainda mais interessantes que IPR106 (Sera et al., 2020).

No entanto, *C. arabica* é uma espécie alotetraploide, com $2n = 4x = 44$ cromossomos, originada a partir do cruzamento espontâneo entre *C. canephora* e *C. eugenioides*, estas últimas diplóides com $2n = 2x = 22$ (Lashermes et al., 1999). A diferença entre o número de cromossomos de *C. arabica* e *C. canephora* dificulta o cruzamento interespecífico, que tem sido útil para a introgressão de resistência a outras pragas no germoplasma de *C. arabica* (Medina Filho et al. 1977; Carvalho et al., 1983). A compatibilidade reprodutiva entre as duas espécies pode ser melhorada elevando-se a ploidia de *C. canephora*. Para isso podem ser utilizados agentes anti-mitóticos, como a colchicina, que interferem na formação do fuso e na ocorrência normal da anáfase mitótica (Latado et al., 2007), induzindo o surgimento de células com número duplicado de cromossomas.

A relação entre o número de cromossomos somáticos e o número de estômatos nas folhas dos cafeeiros foi registrada por Mishra (1997) e Kufa e Burkhardt (2011) estudaram a interferência do ambiente na frequência de estômatos em folhas de *C. arabica*.

O objetivo deste trabalho foi testar duas concentrações de colchicina para induzir a duplicação no número de cromossomos em células meristemáticas de *C. canephora* resistente aos nematoides *M. paranaensis* e *M. incognita*, *in vivo*, em viveiro telado. Para avaliar o efeito dos tratamentos com a colchicina foram utilizadas contagens do número de estômatos na superfície abaxial das folhas e contagens do número de cromossomos nos meristemas.

Metodologia

Estacas de *C. canephora* resistentes aos nematoides *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* (Sera et al., 2006) foram enraizadas e estão mantidas em tubetes no viveiro telado para

mudas do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IAPAR - EMATER (IDR - Paraná) - Unidade Londrina. As gemas apicais das estacas foram tratadas com colchicina nas concentrações 0% (20 plantas, ágar sem colchicina), 0,2% (40 plantas) e 0,35% (40 plantas), em aplicação interna (por injeção da solução de colchicina no interior das brácteas de proteção das gemas) e/ou externa (por inclusão das soluções de colchicina em ágar), método adaptado de Schulze e Contreras (2017). Os meristemas foram mantidos em contato com o ágar/colchicina durante 18 horas ou 3 dias. A recuperação do crescimento vegetativo das estacas foi avaliada 30, 60 e 90 dias após o tratamento.

Todas as estacas/plantas avaliadas foram produzidas com segmentos de ramos ortotrópicos das mesmas plantas-mãe, que por sua vez também foram clonadas vegetativamente. Folhas de tamanho padronizado foram coletadas para todos os tratamentos, incluindo o controle. A padronização foi útil para possibilitar a avaliação dos resultados em folhas imaturas no mesmo estágio de desenvolvimento e mantidas no mesmo viveiro telado onde foi realizado o enraizamento das estacas e os tratamentos com a colchicina. Impressões da região central (terço médio longitudinal) da superfície abaxial das folhas, produzidas com esmalte para unhas transparente (van Duren et al., 1996) foram observadas em aumento de 100X e as imagens foram registradas utilizando câmera digital acoplada ao microscópio Nikon Eclipse 200 e o aplicativo IC Measure.

Cinco campos de observação em cada folha produzida por meristema tratado foram avaliados. As contagens têm sido paulatinas e obedecem o ritmo de desenvolvimento das plantas. Para folhas produzidas por meristemas não tratados (CONTROL) foram contados cinco campos por folha até perfazer 125 campos de observação, de forma a reunir amostra representativa da variabilidade natural desta característica. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância *on ranks* (Kruskal Wallis) e ao teste de medianas de Dunn (aplicativo Sigma Plot v. 11.2), para averiguar se houve diferença significativa quanto ao número de estômatos em folhas produzidas por meristemas tratados com colchicina e folhas controle.

Para contagem de cromossomos, foram coletados meristemas apicais de caule das estacas, digeridos em solução enzimática (celulase 2%, hemicelulase 2% e macerozima 20%) por pouco mais de 3 horas à 38,5°C e o material foi macerado com ajuda da micropipeta para preparo de lâminas de citogenética, utilizando o método de isolamento de protoplastos e gotejamento, adaptado de Anamthawat-Jónsson (2004). As lâminas foram secas ao ar, coradas com Giemsa 0,2% e observadas e fotografadas em microscópio óptico com câmera acoplada utilizando aumento de 400x.

Resultados e Discussão

Pela primeira vez foi utilizado o tratamento com colchicina para induzir duplicação do número de cromossomos em estacas enraizadas de cafeeiros mantidos em tubete, em viveiro telado. Essa técnica de tratamento *in vivo* oferece a vantagem de obtenção direta de plantas que apresentem poliploidia estável, pelo simples transplante das estacas tratadas para recipientes maiores e em seguida para o campo. Neste estudo, foram tratadas estacas de *C. canephora* simultaneamente resistente aos nematoides *M. paranaensis* e *M. incognita*, que uma vez poliploidizadas serão utilizadas em cruzamentos interespecíficos com plantas de *C. arabica* produtivas, com resistências a outras pragas e doenças.

As doses de colchicina utilizadas para induzir a poliploidia causaram pouca perda de estacas ou oxidação dos tecidos tratados do ramo ortotrópico e das brácteas de proteção dos meristemas apicais, sendo que, menos de 6% das estacas tratadas apresentaram oxidação no ponto tratado, 91,6% das estacas recuperaram o crescimento do ramo ortotrópico e 92,8% apresentam também crescimento normal de ramos plagiotrópicos. O contato com o ágar sem colchicina não danificou meristemas.

Foram contados 460 campos de observação ao microscópio, incluindo campos em folhas controle. Das 100 plantas/estacas enraizadas que fizeram parte do experimento, foram avaliadas 55. Utilizando análise de variância *on ranks*, identificou-se três plantas que, nos 7,5 mm² (tamanho do campo de observação do microscópio utilizado) da superfície abaxial de folhas produzidas por meristemas tratados, tiveram número de estômatos menor ($p < 0,001$) e próximo da metade do número encontrado em folhas controle. Essas foram as plantas 43, 53 e 61 (Fig. 1), que apresentaram mediana em torno de 15 estômatos por campo contra os 30 estômatos por campo das folhas controle. A redução pela metade do número de estômatos dessas folhas foi interpretada como uma possível consequência da duplicação da ploidia das células meristemáticas, devido aos tratamentos com a colchicina, a exemplo do reportado por Mishra (1997).

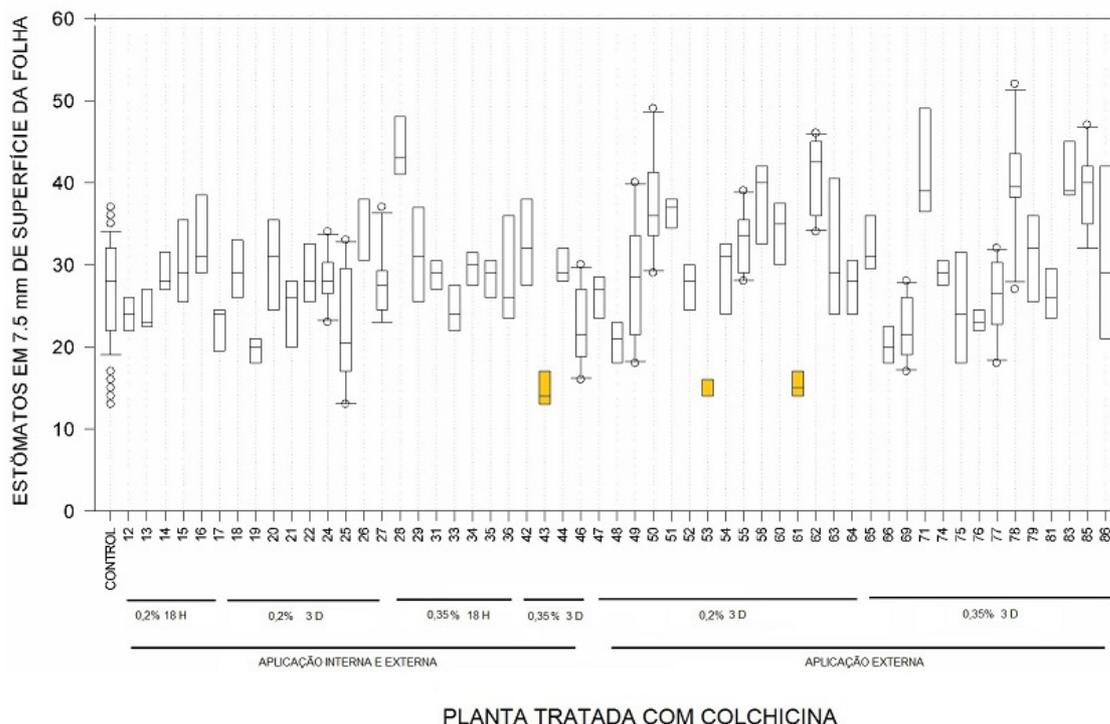


Figura 1. Gráfico resultante da análise estatística do número de estômatos em folhas tratadas e controle de *C. canephora* resistente a nematoides *M. paranaensis* e *M. incognita*. Barras verticais indicam intervalo de confiança, pontos indicam ocorrências fora do intervalo de confiança de 95% e barras horizontais dentro das caixas indicam as medianas. Folhas significativamente diferentes ($p < 0,001$) do controle, segundo o teste de Dunn, estão coloridas em laranja, e apresentaram cerca de 15 estômatos/campo contra os aproximadamente 30 contados para plantas controle (CONTROL).

Campos de observação ao microscópio em folha controle e folha da planta no. 53, produzida por meristema tratado com 0,2% de colchicina, em aplicação externa, por três dias, podem ser visualizados na Fig. 2. Esse foi o tratamento que produziu duas das plantas (53 e 61) com números de estômatos reduzido com relação às folhas controle.

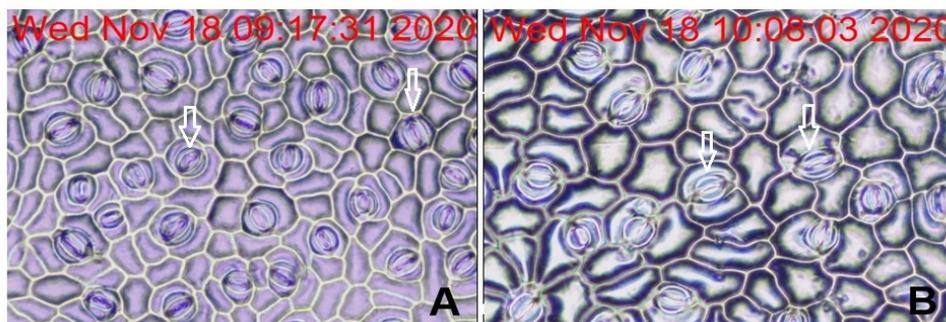


Figura 2. Impressão em esmalte transparente da epiderme abaxial de folhas de *C. canephora*, resistente aos nematoides *M. paranaensis* e *M. incognita*. (A) Estômatos (setas) em folha controle. (B) Estômatos em folha da planta 53, produzida por meristema vegetativo tratado com 0,2% de colchicina em ágar, por três dias, cerca de quatro meses antes do registro das imagens. As imagens foram tomadas em aumento 100X e os campos de observação do microscópio têm área de 7,5 mm².

As análises citogenéticas foram aplicadas a meristemas vegetativos das três plantas (números 43, 53 e 61) cujas folhas avaliadas diferiram significativamente de folhas controle quanto ao número de estômatos. Foram observadas metáfases com 22 cromossomos em meristemas vegetativos de nós produzidos após o tratamento nas plantas 43 e 61, assim como nas estacas tratadas com ágar sem colchicina (Figura 3A). Para a planta de número 53, foram encontradas metáfases com 44 cromossomos nos meristemas vegetativos produzidos após o tratamento (Figura 3B), indicação da efetividade do tratamento aplicado aos meristemas vegetativos de *C. canephora* para induzir o aumento da ploidia dos tecidos diferenciados a partir do término dos tratamentos. Resultados semelhantes foram relatados por Mendes (1947), que utilizou metodologias diferentes e outras espécies do gênero *Coffea*.

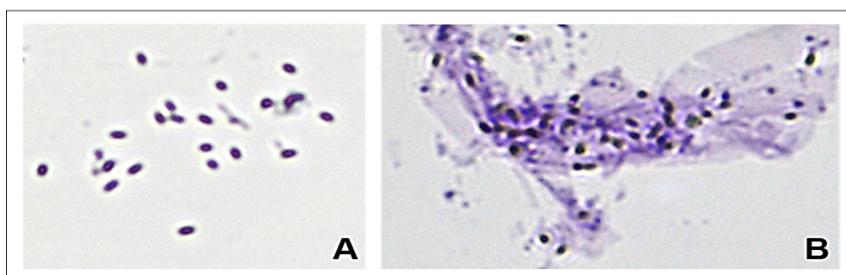


Figura 3. Imagens de metáfases de tecido meristemático do caule (ramo ortotrópico) de *C. canephora* resistentes a nematoides *M. paranaensis* e *M. incognita*. (A) metáfases de planta controle (22 cromossomos). (B) metáfases da planta de no. 53 (44 cromossomos) autoploidizada artificialmente pelo tratamento com colchicina a 0,2% por três dias.

Conclusões

Conclui-se que o tratamento com colchicina em concentração de 0,2% aplicada externamente em ágar, mantido em contato com o meristema apical por três dias foi eficiente para induzir o aumento do número de cromossomos nas células meristemáticas e tecidos por elas produzidos em estacas enraizadas de *Coffea canephora* resistente a nematoides *M. paranaensis* e *M. incognita*.

Referências bibliográficas

- ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K. Preparation of chromosomes from plant leaf meristems for karyotype analysis and in situ hybridization. **Methods in Cell Science** 25, 91-95. 2004.
- CARVALHO, A.; COSTA, W.M.; FAZUOLI, L.C. Auto-incompatibilidade, produtividade, ocorrência de sementes do tipo moca e mudas anormais no café Icatu. **Bragantia** 42, 157-169. 1983.
- KUFA, T.; BURKHARDT, J. Stomatal Characteristics in Arabica Coffee Germplasm Accessions under Contrasting Environments at Jimma, Southwestern Ethiopia. **International Journal of Botany** 7, 63-72. 2011.
- LASHERMES, P.; et al. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics** 261, 259-266. 1999.
- LATADO, R.R. et al. Plantas autotetraplóides de citros sob tratamento *in vitro* com colchicina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 42, 1429-1435. 2007.
- MEDINA FILHO, H.P. et al. Germoplasma de *Coffea racemosa* e seu potencial no melhoramento do cafeeiro. **Bragantia** 36, XLIII-XLVI. 1977.
- MENDES, A.J.T. Observações citológicas em *Coffea*: XI-Métodos de tratamento pela colchicina. **Bragantia** 7, 221-230. 1947.
- MISHRA, M.K. Stomatal characteristics at different ploidy levels in *Coffea L.* **Annals of Botany** 80, 689-692. 1997.
- SCHULZE, J.A.; CONTRERAS, R.N. *In vivo* chromosome doubling of *Prunus lusitanica* and preliminary morphological observations. **HortScience** 52, 332-337. 2017.
- SERA, G.H. et al. Porta-enxertos de café robusta resistentes aos nematóides *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* raças 1 e 2. **Semina: Ciências Agrárias** 27, 171-184. 2006.
- SERA, G.H. et al. IPR 106: new Arabica Coffee cultivar, resistant to some *Meloidogyne paranaensis* and *M. incognita* nematode populations of Paraná. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 20: e305520317. 2020.
- van DUREN, M. et al. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. **Euphytica** 88, 25-34. 1996.