

¹CRIOPRESERVAÇÃO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

Izulm . I. SANTOS, M rian T. S. EIRA, Antonieta N. SALOM O, Rosângela C. MUNDIM
Embrapa Recursos Gen ticos e Biotecnologia, CP 02372, CEP 70849-970, Brasília-DF, Brasil. E-mail: izulme@cenargen.embrapa.br

ABSTRACT: The effect of water content on the survival of embryonic axes of *Coffea arabica* to freezing in liquid nitrogen was investigated as part of the effort to develop a cryopreservation protocol for this species. Axes were excised from seeds at different water contents, both frozen in liquid nitrogen or non-frozen controls. The viability of axes excised from control non-frozen seeds was 100%, regardless of their initial water content. Axes exhibited uniform dark red colour following TTZ test, suggesting the tissues were viable and intact. In contrast, the initial water content of cryopreserved seeds determined the viability of excised axes. Up to 86% of the axes excised from seeds containing 12.6% of water remained viable after cryopreservation. After the TTZ test these axes showed bright red coloration throughout. However, only 7% of the axes isolated from seeds containing 29.4% moisture content were viable after freezing in liquid nitrogen. Most of these axes showed large white areas, an indication that tissues were killed during the freezing/thawing procedure. The cryopreservation procedure described here is simple, does not require the use of chemical cryoprotectants or expensive programmable freezers, and most importantly yields high survival percentages. The results obtained suggest that cryopreservation of embryonic axes is a good alternative for germplasm conservation of coffee.

RESUMO : Eixos embrionários de *Coffea arabica* L. foram isolados de sementes contendo diferentes teores de umidade, congeladas ou não em nitrogênio líquido. A viabilidade de eixos isolados de sementes que não foram congelados em NL foi de 100%, independente do seu teor de umidade inicial. Estes eixos apresentaram colora o vermelha intensa e uniforme após o teste de tetrazólio, indicando que os tecidos estavam viáveis e intactos. A viabilidade de eixos isolados de sementes congeladas em NL foi determinada pelo seu teor de umidade inicial. Um total de 86% dos eixos isolados de sementes com 12.6% de umidade permaneceram viáveis após a criopreserv o, exibindo colora o vermelha intensa e uniforme após o teste de tetrazólio. Apenas 7% dos eixos isolados de sementes com 29.4% de umidade permaneceram viáveis depois de congelados em NL; a maioria apresentou extensas áreas de colora o branca-leitosa, indicativo de morte dos tecidos. Os resultados obtidos sugerem que a criopreserv o de eixos embrionários de café   uma alternativa viável para a conserva o do germoplasma desta valiosa cultura. O protocolo descrito no presente trabalho   simples, não requer uso de crioprotetores químicos ou congeladores programáveis e propicia alta porcentagem de sobrevivência.

PALAVRAS CHAVE: *Coffea* spp., café, conserva o de germoplasma, criopreserv o, nitrogênio líquido.

INTRODU O

O café   uma das espécies agron micas mais importantes no Brasil, o maior produtor mundial desta cultura. A cafeicultura   a principal fonte de divisas para muitos outros países, nos quais representa uma importante fonte de renda para milhões de pessoas. O centro de diversidade de *C. arabica* L. e de outras espécies do g nero   a Etiópia, de onde elas foram introduzidas no continente americano no início do século XVIII (Carneiro, 1997). Dentre as mais de 100 espécies de *Coffea* conhecidas, apenas *C. arabica* L (café Arabica) e *Coffea canephora* Pierre (café Robusta) são cultivadas comercialmente. A bebida obtida das sementes de *C. arabica*   considerada de qualidade superior e por isto esta   a espécie mais cultivada representando 70% da produ o mundial de café (Carneiro, 1997).

A despeito de sua importa o sócio-econ mica ainda não existe uma metodologia apropriada para a conserva o a longo prazo do germoplasma de café. A metodologia tradicional de conserva o de sementes (5-7% teor de umidade/-18 C) não pode ser aplicada para a preserv o do germoplasma de *C. arabica* porque suas sementes não são ortodoxas, mas intermediárias (Ellis *et al.*, 1990). Isto  , as sementes toleram

¹ CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ

desidratação a teores de umidade relativamente baixos ($0.05\text{-}0.08\text{ g H}_2\text{O.g}^{-1}$ de peso seco), mas não toleram congelamento e além disto a desidratação não extende a sua longevidade (Ellis *et al.*, 1990). A viabilidade das sementes pode ser preservada por um período máximo de 24 meses quando elas são parcialmente desidratadas e armazenadas a 20°C em ambiente com alta umidade (Naidu e Sreenath, 1999). Devido a este comportamento problemático de suas sementes a conservação do germoplasma das espécies de *Coffea* é feita em bancos no campo. Esta não é a melhor opção para a conservação de recursos genéticos porque plantas mantidas no campo estão permanentemente expostas a desastres climáticos e biológicos, os quais podem levar à perda total da coleção de germoplasma. Na atualidade, a criopreservação pode ser a metodologia mais apropriada para a conservação a longo prazo da diversidade genética de espécies problemáticas como o café. Criopreservação é a conservação de material biológico a temperaturas extremamente baixas, geralmente em nitrogênio líquido (-196°C). A esta temperatura reações metabólicas e deterioração biológica ocorrem muito lentamente ou são completamente suspensas. Em decorrência disto a criopreservação assegura alta estabilidade genética e integridade biológica do material conservado (Kartha, 1985).

O objetivo deste projeto é definir os parâmetros básicos (teor de umidade, velocidade de congelamento, descongelamento e regeneração) para a criopreservação do germoplasma de café. O presente trabalho apresenta resultados preliminares sobre o efeito do congelamento em nitrogênio líquido na sobrevivência de embriões zigóticos de *C. arabica* a diferentes teores de umidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram utilizadas neste experimento sementes maduras de *Coffea arabica* var. IAC 99 provenientes do Instituto Agronômico de Campinas, Campinas-SP. As sementes foram recebidas no laboratório processadas, secas e acondicionadas em sacos de papel. O teor de umidade das sementes na ocasião de sua chegada era de 12.6%, com base em peso seco (BPS).

Criopreservação e avaliação da viabilidade

Antes do congelamento em nitrogênio líquido (NL) as sementes foram hidratadas com H_2O destilada por diferentes períodos de tempo em câmara de crescimento a $25\pm2^\circ\text{C}$. O objetivo da hidratação foi obter sementes com diferentes teores de umidade, condição necessária para se determinar o teor de umidade mais apropriado para o congelamento em NL. Uma parte das sementes embebidas foram transferidas para envelopes de alumínio para congelamento em NL. O outro lote de sementes foi esterilizado superficialmente com solução contendo hipoclorito de sódio comercial (2.5% de cloro ativo) e detergente comum (45- gotas) por 15 minutos, sob agitação, e em seguida transferidas para H_2O destilada por 48 horas para amolecimento da semente. O amolecimento é necessário para possibilitar o isolamento dos eixos embrionários intactos. O congelamento utilizado foi o ultra-rápido obtido com mergulho do material diretamente em NL. Depois de permanecer por toda a noite (aproximadamente 16 horas) em NL as sementes foram descongeladas rapidamente em banho a $40\pm2^\circ\text{C}$, sob agitação. As sementes descongeladas foram esterilizadas e hidratadas da mesma forma descrita anteriormente. Eixos embrionários foram isolados das sementes com auxílio de um microscópio estereoscópico e sua viabilidade foi avaliada usando o teste de tetrazólio (solução 1%) conduzido à temperatura ambiente ($25\pm2^\circ\text{C}$). Foram usados 15 eixos por teor de umidade avaliada. Eixos embrionários isolados de sementes não congeladas em NL foram utilizados como controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de *C. arabica* não podem ser conservadas a longo prazo usando a metodologia tradicional de conservação de sementes (Dussert *et al.*, 2000). A criopreservação de eixos embrionários é uma alternativa para a conservação deste tipo de semente, uma vez que os eixos podem tolerar condições que seriam letais para a semente inteira Berjak *et al.*, 2000). As sementes atingiram 19.7%, 22.0% e 29.4% de umidade (BPS) após 2, 4 e 6 horas de embebição, respectivamente. Não foi possível determinar o teor de umidade nos eixos embrionários propriamente ditos (o que seria ideal) porque o eixo somente pode ser removido da semente após esta ter sido hidratada por um período mínimo de 48 horas. A viabilidade de eixos embrionários isolados de sementes que não foram congelados em NL foi de 100%, independente do teor de umidade por elas apresentado. Estes eixos exibiram coloração vermelha intensa e uniforme quando submetidos ao teste de tetrazólio, indicando que os tecidos estavam viáveis e intactos. Após o congelamento em NL os eixos embrionários apresentaram viabilidade inversamente proporcional ao teor de umidade das sementes das

quais eles foram isolados. Assim, 86% dos eixos isolados de sementes com 12.63% umidade permaneceram viáveis após o congelamento, exibindo coloração vermelha intensa e uniforme após o teste de tetrazólio. Em contraste, apenas 7% dos eixos isolados de sementes com 29.4% de umidade estavam viáveis depois de congelados no NL, apresentando extensas áreas de coloração branco-leitosa no eixo, indicativo de morte dos tecidos. O teste de tetrazólio é um método rápido e confiável para determinar a viabilidade de sementes ou de outras estruturas vegetais. Entretanto evidência irrefutável da viabilidade (no caso de sementes e eixos embrionários) somente pode ser obtida com a germinação e produção de uma plântula normal. Por esta razão os experimentos aqui descritos serão repetidos e a regeneração após o congelamento será feita usando a cultura *in vitro* dos eixos embrionários. Vários meios de cultura foram testados e um deles foi selecionado para o cultivo *in vitro* de eixos embrionários de *C. arabica* congelados em NL. Nossa hipótese é que o resgate em meio de cultura proporcionará um aumento significativo na porcentagem de sobrevivência dos eixos submetidos ao congelamento. Os resultados obtidos com a regeneração usando a cultura de tecidos *in vitro* serão divulgados futuramente.

A criopreservação de eixos embrionários representa uma alternativa para a conservação a longo prazo do germoplasma de *C. arabica*. O procedimento descrito neste trabalho é bastante simples e não requer o uso de crioprotetores químicos ou congeladores programáveis. O material é manipulado sob condições de assepsia apenas em sua etapa final, após o descongelamento, o que simplifica ainda mais o protocolo, tornando-o mais prático para uso rotineiro em bancos de germoplasma.

CONCLUSÕES

Os eixos embrionários de *C. arabica* podem ser congelados em NL mantendo alta viabilidade (86%) quando o teor de umidade inicial das sementes é da ordem de 12.63% (BPS).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Berjak p, Walker M, Mycock DJ, Wesley-Smith J, Watt P, Pammeter NW** (2000) Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In F Engelmann e H Takagi, eds, Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application, Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, pp140-155.
- Carneiro MF** (1997) Coffee biotechnology and its application in genetic transformation. *Euphytica* **96**: 167-172.
- Dussert S, Chabrilange N, Engelmann F, Anthony F, Hamon S** (2000) Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: toward a simplified protocol for routine use in coffee genebanks. In F Engelmann e H Takagi, eds, Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application, Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, pp161-166.
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH** (1990) An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. *J Exp Bot* **41(230)**: 1167-1174.
- Kartha KK** (1985) Meristem culture and germplasm preservation. In KK Kartha, ed, Cryopreservation of plant cells and organs, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 115-134.
- Naidu MM, Sreenath HL** (1999) *In vitro* culture of coffee zygotic embryos for germplasm conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **55**: 227-230