

CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE *COFFEA* SPP. EM COLEÇÕES DE GERMOPLASMA *EX SITU*

Mirian T. S. EIRA (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. E-mail: meira@cenargen.embrapa.br), Christina WALTERS (NSSL/USDA, Fort Collins, CO, USA), Linda S. CALDAS (UnB, Brasília, DF), Raimunda B. REIS (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF)

O café é considerado um dos mais importantes produtos agrícolas no mercado internacional e muitos países estão envolvidos na sua produção, consumo e comercialização. O Brasil é o principal produtor de café a nível mundial desde os anos 1800 (Medina Filho et al., 1984; Fazuoli, 1986). Tradicionalmente, as espécies de café vem sendo conservadas *ex situ* como plantas vivas mantidas em coleções de germoplasma a campo, já que as sementes de *Coffea* não sobrevivem por longos períodos sob as condições convencionais recomendadas para Bancos de Germoplasma (grau de umidade de $5 \pm 2\%$ e -18°C) (Ellis et al., 1990, 1991; Hong & Ellis, 1992, 1995; Dussert et al., 1997, 1998; Eira et al., 1999). Tais coleções apresentam problemas como erosão genética das espécies e variedades devido a pouca adaptação às condições ambientais desses locais, pragas e doenças, além de envolverem um grande custo financeiro e de mão de obra. Assim, o desenvolvimento de técnicas alternativas de conservação a longo prazo dos recursos genéticos de *Coffea* spp. vem a ser uma importante prioridade.

Estudos recentes mostraram que as sementes de diversas espécies de *Coffea* apresentam diferenças de tolerância à desidratação e a baixa temperatura (Dussert et al., 1998; Eira et al., 1999) e devem ser estudadas separadamente para o estabelecimento do protocolo de conservação. Fatores como a procedência das espécies, grau de maturidade e fatores genéticos podem ainda estar relacionados com tal comportamento e devem ser melhor estudados.

O efeito do grau de umidade e da temperatura na sobrevivência de sementes de *Coffea* spp. foi estudado visando caracterizar o comportamento das sementes no armazenamento. Não foram observadas diferenças de tolerância à desidratação e à baixa temperatura entre as cultivares de *C. arabica*. No entanto, o grau de tolerância à desidratação variou muito entre as espécies de *Coffea*. *C. racemosa* foi a espécie mais tolerante, contrastando com *C. liberica*, a mais sensível. As diferenças dentro do gênero *Coffea* podem ser atribuídas tanto a relações filogenéticas quanto ao habitat de origem da espécie e/ou duração do período de maturação. Observou-se, por exemplo, que espécies agrupadas em uma mesma subseção dentro do gênero *Coffea* apresentavam grau semelhante de tolerância à desidratação, embora a classificação das espécies não tenha sido baseada em características fisiológicas das sementes. Espécies provenientes de regiões mais secas, como *C. racemosa*, *C. arabica*, *C. canephora* e *C. congensis* apresentaram grau de tolerância à desidratação mais elevado que sementes de *C. liberica* ou *C. dewevrei*, naturais de regiões mais úmidas. Quanto ao período de maturação das sementes, em *C. racemosa*, a espécie mais tolerante à desidratação, é de apenas 90 dias, enquanto em *C. liberica*, a espécie menos tolerante, a maturidade só é atingida depois de 360 dias.

O nível crítico de água para a manutenção da viabilidade das sementes a 15°C foi 0,08 g H_2O /g massa da matéria seca (*C. racemosa*), 0,10 g/g (*C. arabica*, *C. canephora*) e 0,16 g/g (*C. liberica*). O nível crítico de água variou em função da temperatura, sendo mais elevado em temperaturas mais baixas. Sementes de *C. arabica* apresentaram maior sobrevivência a -20°C com grau de umidade de 0,12 g/g, *C. canephora* em 0,13 g/g, e *C. racemosa* em 0,15 g/g. A -20°C sementes de *C. liberica* não sobreviveram quando expostas a quaisquer dos níveis de água testados. Tais níveis críticos de água substanciam a sugestão de que as sementes de *Coffea* spp. apresentam comportamento intermediário entre ortodoxo e recalcitrante. Esses resultados, confirmados com sementes coletadas em três safras induziram a conclusão de que existe uma base genética para as diferenças no grau de tolerância à desidratação entre as espécies estudadas. Essas diferenças necessitam ser entendidas para que os protocolos de conservação do germoplasma de café possam ser desenvolvidos.

A influência do conteúdo de água e da temperatura sobre o grau de deterioração e a longevidade das sementes *Coffea* spp. foi monitorado durante armazenamento por um ano sob temperaturas de 25, 15, 5 e -20°C . O grau de deterioração foi reduzido quando as sementes foram armazenadas nas condições ótimas de grau de umidade e temperatura identificadas na primeira parte deste trabalho. Dentre as temperaturas testadas, o armazenamento a 5°C proporcionou a manutenção da viabilidade das sementes por maior período de tempo. Mesmo sementes armazenadas nas melhores condições de grau de umidade e temperatura perderam viabilidade após um ano de armazenamento, comprovando mais uma vez o comportamento intermediário. O grau de deterioração no entanto, diferiu entre as espécies, sendo que as sementes de *C. liberica* perderam viabilidade mais rapidamente que sementes das outras espécies sob qualquer combinação de grau de umidade e temperatura testada.

O progresso recente nas áreas de biotecnologia possibilitou o uso de técnicas de conservação *in vitro*, crescimento lento e criopreservação do germoplasma de várias espécies, e devem ser estudadas para as do gênero *Coffea*. O estabelecimento de protocolos de conservação de sementes inteiras, eixos embrionários, gemas laterais, ápices

caulinares ou embriões somáticos, através de técnicas *in vitro* ou em criopreservação podem representar a solução para a conservação a longo prazo da variabilidade genética desse importante gênero. Dentre as técnicas alternativas de conservação a longo prazo, a criopreservação parece ser uma técnica bastante promissora.

Vários autores reportam sucesso na criopreservação de embriões zigóticos extraídos de frutos maduros de *C. liberica* (Normah & Vengadasalam, 1992; Hor et al., 1993), *C. arabica* (Abdelnour-Esquivel et al., 1992), *C. canephora* e do híbrido interespecífico arabusta (Abdelnour-Esquivel et al., 1992). Para todas as espécies testadas, a desidratação parcial dos embriões até cerca de 0.20 g H₂O/g peso seco foi suficiente para obter altos níveis de sobrevivência após a posterior imersão em nitrogênio líquido.

A criopreservação das sementes inteiras, por outro lado, seria mais fácil, envolvendo menos tempo e mão-de-obra. Diversos protocolos vêm sendo testados na criopreservação de sementes de café. Independente do grau de umidade, as sementes de café parecem não suportar a imersão direta em nitrogênio líquido (Becwar et al., 1983). No entanto, recentemente foi demonstrado que um pré-congelamento lento (2°C/min) até -50°C seguido da direta imersão em NL pode resultar em maior sobrevivência (Dussert et al., 1997, 1998), relacionando o grau de sobrevivência a técnicas de congelamento e protocolos de criopreservação. E Eira et al. (1999) relataram 30 a 40% de plântulas normais após a direta imersão de sementes de *C. arabica* e *C. racemosa* em NL. Esses autores discutem que fatores tais como procedência das espécies, grau de maturidade e fatores genéticos podem estar relacionados com tal comportamento e devem ser melhor estudados. Fatores tais como o grau de umidade, velocidade de congelamento e descongelamento, etc, podem ser determinantes na sobrevivência das sementes de várias espécies do gênero *Coffea* em nitrogênio líquido e precisam ser melhor estudados.

REFERÊNCIAS

- Abdelnour-Esquivel, A.; Villalobos, V.; Engelmann, F. (1992) Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. *Cryo-Letters* 13:297-302.
- Becwar, M.R.; Stanwood, P.C.; Leonhardt, K.W. (1983) Dehydration effects on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 108:613-618.
- Dussert, S.; Chabrilange, N.; Engelmann, F.; Anthony, F.; Hamon, S. (1997) Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of precooling temperature. *Cryo-Letters* 18:269-276.
- Dussert, S.; Chabrilange, N.; Engelmann, F.; Anthony, F.; Louarn, J.; Hamon, S. (1998) Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. *Sed Sci. Res.* 8:9-15.
- Eira, M.T.S., Walters, C., Caldas, L.S., Fazuoli, L.C., Sampaio, J.B. and Dias, M.C.L.L. (1999) Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature. *Rev. Brasil. Fis. Veg.* 11:97-105.
- Ellis, R.H.; Hong, T.D.; Roberts, E.H. (1990) An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. *J. Exp. Bot.* 41:1167-1174.
- Ellis, R.H.; Hong, T.D.; Roberts, E.H. (1991) An intermediate category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. *J. Exp. Bot.* 42:653-657.
- Fazuoli, L.C. (1986) Genética e melhoramento do cafeeiro. In: Rena, A.B.; Malavolta, E.; Rocha, M.; Yamada, T. (eds). *Cultura do cafeeiro – fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da potassa e do fosfato. pp. 87-113.
- Hong, T.D.; Ellis, R.H. (1992a) Optimum air-dry seed storage environments for arabica coffee. *Seed Sci. & Technol.* 20: 547-560.
- Hong, T.D.; Ellis, R.H. (1995) Interspecific variation in seed storage behaviour within two genera – *Coffea* and *Citrus*. *Seed Sci. & Technol.* 23:165-181.
- Hor, Y.L.; Stanwood, P.C. & Chin, H.F. (1993) Cryopreservation of *Coffea liberica* seeds and embryos following desiccation and freezing treatments. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, 16(2):75-80.
- Medina Filho, H.P.; Carvalho, A.; Sondahl, M.R.; Fazuoli, L.C.; Costa, W.M. (1984) Coffee breeding and related evolutionary aspects. *Pl. Breed. Rev.* 2:157-193.
- Normah, M.N.; Vengadasalam, M. (1992) Effects of moisture content on cryopreservation of *Coffea* and *Vigna* seeds and embryos. *Cryo-Letters* 13:199-208.