

OBTENÇÃO DE CAFEIROS HAPLÓIDES (*C. arabica* L) A PARTIR DE EMBRIÕES GÊMEOS¹

Larissa Abgariani COLOMBO² & Tumoru SERA³. IAPAR. LONDRINA. Pr. (E-mail: tsera@pr.gov.br)

RESUMO: A maior vantagem dos haplóides é o fato deles serem usados para produzir com rapidez linhas homozigóticas. O objetivo deste trabalho foi o de identificar plantas haplóides para obter linhagem para cultivo após a duplicação cromossômica ou como parentais de cultivares do tipo híbrido propagado vegetativamente, para redução do tempo gasto no desenvolvimento de cultivares de café de 24 para 8-12 anos, mais simples e econômica, alternativo à obtenção de cultivares de haplóides por biotecnologia. Utilizaram-se 87.500 sementes, sendo as avaliações realizadas em 8 cultivares e genótipos de café arábica. Os embriões gêmeos identificados nas sementes sem a casca de pergaminho foram extraídos em câmara de fluxo laminar e colocados em ambiente asséptico num tubo de ensaio com meio de cultura Murashige Skoog. Foram encontrados 9 embriões gêmeos, o que significa uma frequência de 0,01%, indicando a necessidade de uma amostra de 100.000-200.000 sementes para encontrar em torno de 10-20 sementes com embriões gêmeos. Esta alternativa é de baixo custo e sem necessidade de laboratório muito sofisticado e mão-de-obra muito especializada.

Palavras-chave: embriões gêmeos, haplóides em café, café arábica, melhoramento do café.

ABSTRACT: The main advantage of the haploids is to produce homozygous lines quickly. The objective of this work was to obtain pure line cultivars after doubling chromosome number of the haploids and to produce hybrids vegetatively propagated aiming at reduction of the time spent in the development of breeding lines, from 24 years to about 8-12 years. A total of 87,500 seeds were used with 8 genotypes of arabic coffee. The grains selected with twin embryos were placed in solution of 1,5% of sodium hypochloride for 15 to 20 minutes and later rinsed with sterile distilled water, where the embryos were extracted in a laminar flow chamber and placed in pairs in aseptic tubes containing MS culture medium. Nine twin embryos were found (frequency= 0,01%), indicating the need of a sample of 100,000-200,000 seeds to find 10-20 seeds with twin embryos. This is an alternative of low cost and without the need of very sophisticated laboratory and specialized labor.

Key-words: twin embryos, haploids in coffee, arabic coffee, coffee breeding, coffee crop,.

INTRODUÇÃO

A maior vantagem dos haplóides é o fato deles serem usados para produzirem com rapidez linhagens homozigóticas. Os haplóides tem apenas um número básico de cromossomas, a duplicação de cromossomas desses indivíduos ressalta numa fixação instantânea da linhagem. Este fato minimiza o tempo para obtenção de homozigotidade. Para a espécie *C. arabica*, especialmente em cruzamentos visando característica simples onde as diferenças entre os parentais não é muita e entre parentais já produtivos e de qualidade, a obtenção de 10-20 plantas haplóides que, duplicado o número de cromossomos ficaria completamente homozigota, poderá proporcionar oportunidade para a obtenção de recombinantes homozigotos úteis para um programa de melhoramento genético, especialmente na transferência de genes maiores. A obtenção de uma grande quantidade de plantas haplóides por meio de cultivo de tecidos, especialmente por cultura de micrósoros (CARNEIRO, 2000), tem encontrado dificuldades.

OBJETIVO

Obter cultivar do tipo linhagem para uso direto ou como parentais para cultivares do tipo híbrido propagado vegetativamente para redução do tempo gasto no desenvolvimento de cultivares de 24 para 8-12 anos, mais simples e econômica, alternativo à obtenção por biotecnologia.

¹ Projeto parcialmente financiado pelo **Consórcio Bras. de Pesq. e Desenv. do Café**

² Bolsista da FUNAPE / EMBRAPA-Café;

³ Pesquisador do IAPAR

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 87.500 sementes de café com 15% de umidade sem o pergaminho, removidos mecanicamente. Utilizaram-se 35.500 sementes de sete genótipos de *C. arabica* a saber, 5.000 de IAPARLF77038 (“Catuaí Sh3”), 5.000 de IAPARLG 89111 (*C. arabica* x *C. racemosa*), 5.000 de IAPARLG89099 (“*C. arabica* x *C. racemosa*”), 5.000 de IAPARLF77055 (“Catuaí x Icatu”), 600 de “Arabusta” (*C. arabica* x *C. canephora*), 5.000 de *C. dewevrei* x *C. arabica*, 4.500 de (*C. arabica* Catimor x *C. racemosa*) x *C. arabica* cv. Mundo Novo e 5.000 de *C. arabica* cv. Catuaí. Procurou-se validar os resultados obtidos numa amostra maior de 52.000 sementes da variedade Catuaí.

Para melhor visualização dos embriões, foram deixadas uma noite imersas em água num recipiente. Posteriormente, os prováveis grãos com embriões gêmeos foram separados visualmente e, usando-se lupa de mesa, examinando-se a parte dorsal do grão.

Os grãos identificados com possíveis embriões gêmeos foram colocados em solução de 1,5% de hipoclorito de sódio, durante 15 a 20 minutos enxaguando-os depois por 5 a 6 vezes com água destilada estéril em câmara de fluxo laminar. Depois de flambar todos os instrumentos após imersão em álcool 100% (92,8° GL), colocaram-se as sementes em placas de Petri contendo papel filtro para eliminar o excesso de água.

Extraíram-se os embriões cortando-se transversalmente o endosperma dos grãos com bisturi, abrindo-os usando pinça e bisturi. Pressionaram-se as paredes do endosperma próximo ao embrião para expeli-los e retirá-los com outra pinça para evitar a contaminação. Colocaram-se então, os embriões gêmeos confirmados aos pares em tubos de ensaio, contendo meio de cultura MS e estes foram levados para uma câmara de crescimento.

Após a formação das primeiras folhas e raízes, foram levados para câmara úmida num tubete contendo substrato de viveiro, em casa de vegetação, para posterior aclimatação em viveiro comercial para confirmação posterior da condição haplóide por avaliações morfológicas e cromossômicas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliações realizadas em oito cultivares e genótipos de café possibilitou-nos, determinar a frequência de sementes com embriões gêmeos, indicando a possibilidade de se usar este procedimento para identificar plantas haplóides de um genótipo heterozigoto, desde que encontre correlação com plantas haplóides.

Genótipos	Quantidade de sementes avaliadas	Nº. de sementes com embriões gêmeos	%
IaparLF77038 (“Catuaí Sh3”)	5.000	4	0,08
IaparLG89111 (<i>C. arabica</i> x <i>C. racemosa</i>) 4n	5.000	1	0,02
IaparLG89099 (<i>C. arabica</i> x <i>C. racemosa</i>) 4n	5.000	2	0,04
IaparLF77055 (Catuaí x Icatu)	5.000	1	0,02
Arabusta (<i>C. canephora</i> x <i>C. arabica</i>)	600	0	0,0
“Piatã” (<i>C. arabica</i> x <i>C. dewevrei</i>) 4n	5.000	0	0,0
(<i>C. arabica</i> “Catimor” x <i>C. racemosa</i>) x <i>C. arabica</i>	4.900	0	0,0
<i>C. arabica</i> “Catuaí Vermelho IAC-81	5.000	5	0,1
TOTAL	35.500	13	0,037%

Tabela 1. Frequência de sementes com embriões gêmeos encontrados em diferentes genótipos de café.

Num total de 35.500 sementes, foram encontrados 13 embriões gêmeos (**Tabela 1**), o que significa uma frequência de 0,037%. Houve 75% de sucesso no resgate destes embriões extraídos da semente e, 50% dos embriões gêmeos apresentavam-se com características fenotípicas aparentemente de haplóide, isto é, um dos embriões bem menor que o outro. Isto está de acordo com as características de plantas haplóides que, apresentam folhas de limbo mais delgado e mais estreito e plantas de tamanho menor (MENDES & BACCHI, 1940b). Disto resultou em 4 plantas aparentemente haplóides (0,0113%).

Ao examinar os dados da **Tabela 1** verifica-se que a quantidade de 5.000 sementes por cultivar mostrou claramente que é insuficiente para encontrar pelo menos uma planta haplóide, muito menos uma quantidade razoável da ordem de 10 a 100 plantas haplóides. Pela frequência média obtida pela soma de todos os genótipos (0,01%), seria necessário pelo menos 10.000 sementes por cultivar para encontrar em média apenas uma planta haplóide, indicando a necessidade de pelo menos 20.000 sementes.

Para confirmar isto, procurou-se validar estes resultados com uma amostra maior de sementes de uma variedade conhecida, Catuaí Vermelho IAC-81. A partir de 52.000 sementes encontraram-se 15 sementes aparentemente com embriões gêmeos e confirmaram-se 5 aparentemente haplóides (0,0096%).

Conseguiu-se examinar aproximadamente 10.000 sementes por dia na procura por sementes com embriões gêmeos.

A frequência média de 0,01% indica a necessidade de uma amostra de 100.000 sementes para encontrar em torno de 10 sementes com embriões gêmeos resultando em 10 plantas haplóides.

Devido a grande quantidade de sementes necessárias, torna-se inviável a retirada manual de pergaminho das mesmas. Para contornar este problema, estas foram retiradas usando máquina de benefício de amostras. Apesar do maior dano mecânico às sementes e conseqüentemente maior risco de contaminação e oxidação, foi possível a identificação e o resgate de embriões desde que realizado dentro de 10 horas após a retirada de imersão em água.

Para a identificação de grãos com embriões gêmeos é inviável que todas as sementes sejam abertas individualmente em ambiente asséptico, devendo ser feita a separação visual e com uso de lupa dos prováveis grãos com embriões gêmeos e a partir daí, extrair em câmara de fluxo laminar os embriões de poucas sementes que serão cultivados em meio asséptico. Esta extração deverá ser feita como descrito anteriormente, para se evitar qualquer risco de contaminação, sendo também uma técnica mais aperfeiçoada do que a descrita por COLONNA (1972). Estes por fim, poderão ou não ser haplóides.

Apesar de ter conseguido examinar 10.000 sementes por dia, o refinamento da técnica, como por exemplo, com menor umidade para visualizar os embriões sem o uso da lupa, eliminando rapidamente as sementes facilmente identificadas visualmente como embriões simples, torna possível alcançar rendimento de 25.000 sementes por dia/pessoa possibilitando o exame de muitas sementes num prazo curto, especialmente ao ser executada por quatro pessoas de nível médio por dez dias. Em dez dias de trabalho poderia identificar 100 plantas haplóides. Quarenta diárias de US\$25 dariam apenas US\$1000 em mão de obra que é o item mais oneroso.

O alcance deste resultado é grande ao se identificar 10 a 30 plantas haplóides num tempo relativamente curto, de 5-10 dias para algumas características controladas por poucos genes, especialmente em um programa para combinar num genótipo os genes de resistência simples a parasitos diferentes presentes em cultivares que já apresentam produtividade e qualidade. Neste caso, por exemplo, a transferência de um gene de resistência teria 6,2% de probabilidade de ser homozigoto, isto é, 1-2 plantas recombinadas homozigotas em 30 plantas haplóides. Se for um gene simples de resistência a um parasito em um dos parentais, por exemplo, seriam necessários 100.000 sementes para identificar 10 plantas haplóides para obter duas plantas recombinantes homozigotas.

A produção de 100.000 sementes por genótipo, difícil de obter apenas numa planta heterozigota num mesmo ano, pode ser obtida programando os cruzamentos para ter 25 plantas F1. Considerando-se 4.000 sementes por planta obteria 100.000 sementes num genótipo F1 com os gametas haplóides em segregação F2 recombinada.

Este trabalho deverá ter continuidade usando-se mais de 100.000 sementes F2 para cada um dos dois híbridos com resistência à ferrugem e, as plantas identificadas como haplóides serão confirmadas por avaliações morfológicas, cloroplasticas e cromossomais.

CONCLUSÕES

- A frequência média observada para todos os genótipos de embriões gêmeos foi de 0,01% não sendo possível a comparação de frequência entre os genótipos devido a tamanho insuficiente da amostra.
- Para identificar uma quantidade razoável de 10 embriões gêmeos por genótipo híbrido para possível aplicação na identificação de plantas haplóides recombinantes para um gene em transferência, seria necessário uma amostra de 100.000 sementes obtidas de 25 plantas F1 para ser uma alternativa viável imediata até que se viabilize a obtenção de haplóides por biotecnologia.
- Esta alternativa é de baixo custo e sem necessidade de laboratório muito sofisticado e mão-de-obra muito especializada podendo chegar a US\$1000 para identificar 100 haplóides no item mais oneroso que é a mão de obra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARNEIRO, M. F. Avanços na obtenção de di-haplóides em cultivares de *Coffea arabica* L. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3, 1999, Londrina, Brasil. **Anais**. Londrina: IAPAR/IRAD, 2000. p.55-58.
- MENDES, A. J. T. & BACCHI, O. Observações citológicas em *Coffea* : V. Uma variedade haplóide ("di-haplóide") de *C. arabica* L. **Jornal de Agronomia**, Piracicaba, 3 (3) : 183-206, 1940.
- COLONNA, J. P. Contribution à l'étude de la culture in vitro d'embryons de caféiers. *Action de la caféine*. **Café Cacao Thé** (Paris), 16 (3) : 193-203, 1972.

AVISO

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS
SEGUINTE ENDEREÇOS:

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV
Viçosa - MG
Cep: 36571-000
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485
Fax : (31) 3891-3911

EMBRAPA CAFÉ

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)
Edifício Sede da Embrapa - sala 321
Brasília - DF
Cep: 70770-901
Tel: (61) 448-4378
Fax: (61) 448-4425