

## Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica* L.)

Izulmé R. I. Santos<sup>1</sup>  
Antonietta N. Salomão<sup>2</sup>  
Rosângela C. Mundim<sup>3</sup>  
Francisca Neide Santos Ribeiro<sup>4</sup>

### Resumo

Eixos embrionários de *Coffea arabica* L. foram isolados de sementes contendo diferentes teores de umidade e congeladas em nitrogênio líquido. A viabilidade de eixos isolados de sementes que não foram congeladas em nitrogênio líquido foi de 100%, independente do seu teor de umidade inicial. Estes eixos germinaram formando plântulas normais, indicando que os tecidos estavam viáveis e intactos. Em contraste, a viabilidade de eixos isolados de sementes congeladas em nitrogênio líquido foi determinada pelo seu teor de umidade inicial. Todos os eixos isolados de sementes com 12,6% de umidade permaneceram viáveis após a criopreservação. No entanto, apenas 23% dos eixos isolados de sementes com 29,4% de umidade permaneceram viáveis depois de congelados em nitrogênio líquido. Os resultados obtidos sugerem que a criopreservação de eixos embrionários de café é uma alternativa viável para a conservação do germoplasma desta cultura. O protocolo descrito no presente trabalho é simples, não requer uso de crioprotetores químicos ou congeladores programáveis e propicia alta porcentagem de sobrevivência.

### Introdução

O café é uma das espécies agrônômicas mais importantes no Brasil, o maior produtor mundial dessa cultura. A cafeicultura é uma das principais fontes de divisas para nosso país, e representa uma importante fonte de renda para milhões de pessoas. O centro de diversidade de *Coffea arabica* L. e de outras espécies do gênero *Coffea* é 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* é considerada de qualidade superior e por isto esta é a espécie mais cultivada, representando 70% da produção mundial de café (Carneiro, 1997).

A despeito de sua importância sócio-econômica, ainda não existe uma metodologia apropriada para a conservação a longo prazo do germoplasma de café. A metodologia tradicional de conservação de sementes (5-7% teor de umidade/-18°C) não é adequada para a preservação do

<sup>1</sup> Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. E-mail: izulme@cenargen.embrapa.br

<sup>2</sup> Eng<sup>o</sup>. Florestal, MSc, Pesquisadora. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. E-mail: antoniet@cenargen.embrapa.br

<sup>3</sup> Assistente de Operações, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Estagiária, Embrapa Café, estudante de segundo grau.

germoplasma de *C. arabica* porque suas sementes são intermediárias (Ellis et al., 1990). Isto é, as sementes toleram desidratação a teores de umidade relativamente baixos (0.05-0.08 g H<sub>2</sub>O.g<sup>-1</sup> de peso seco), mas são danificadas pelo congelamento e além disto, a desidratação não estende a sua longevidade (Ellis et al., 1990).

A viabilidade das sementes pode ser preservada por um período máximo de aproximadamente 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. Porém, 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 de eixos embrionários pode ser a metodologia mais apropriada para a conservação a longo prazo da diversidade genética desta espécie. 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. 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 obtidos sobre o efeito do congelamento em nitrogênio líquido na sobrevivência de embriões zigóticos de *C. arabica* com diferentes teores de umidade.

## Material e métodos

### Material

Sementes maduras de *Coffea arabica* L. var. IAC 99, provenientes do Instituto Agronômico de Campinas, Campinas-SP, recebidas no laboratório com teor de umidade de 12,6%, com base em peso seco (BPS).

### Isolamento dos eixos embrionários

As sementes foram hidratadas sobre H<sub>2</sub>O destilada por 0,2,4, e 6 horas, a 25 ± 2°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 nitrogênio líquido. Após a embebição, o excesso de água foi removido da superfície das sementes com papel filtro seco. Uma parte das sementes foi transferida para envelopes de alumínio para congelamento em nitrogênio líquido. O outro lote de sementes foi desinfestado superficialmente com

solução contendo hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo) e detergente comum (4 – 5 gotas) por 15 minutos, sob agitação, e em seguida transferido para H<sub>2</sub>O destilada por 48 horas para amolecimento da semente. O amolecimento é necessário para possibilitar o isolamento de eixos embrionários intactos. Passadas 48 horas, eixos embrionários foram isolados das sementes com auxílio de um microscópio estereoscópico e transferidos para tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1981).

### Condições de cultivo *in vitro*

Os tubos de ensaio contendo um eixo embrionário cada foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com intensidade luminosa de 39 μM.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Foram usadas três replicatas de 15 eixos por teor de umidade testada. Eixos embrionários isolados de sementes não congeladas em nitrogênio líquido foram utilizados como controle.

### Criopreservação e descongelamento

O congelamento utilizado foi o ultra-rápido (263°C/min), obtido pelo mergulho direto em nitrogênio líquido. Depois de permanecer por toda a noite (aproximadamente 17 horas) em nitrogênio líquido as sementes foram descongeladas rapidamente em água morna (40 ± 2°C), sob agitação, por três minutos. As sementes descongeladas foram desinfestadas superficialmente e embebidas em água por 48 horas para amolecimento e os eixos embrionários foram isolados e cultivados *in vitro* nas mesmas condições descritas acima.

### Avaliação da viabilidade

Os eixos embrionários cultivados *in vitro* foram avaliados diariamente para detectar a presença de contaminantes e evidências de crescimento. Foram considerados como sobreviventes apenas os eixos que se desenvolveram e produziram plântulas normais, ou seja, com região apical e radicular normais.

## 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). O teor de umidade das sementes foi 12,6, 19,7%, 22,0% e 29,4% (BPS) após 0, 2, 4 e 6 horas de embebição, respectivamente (Fig. 1).

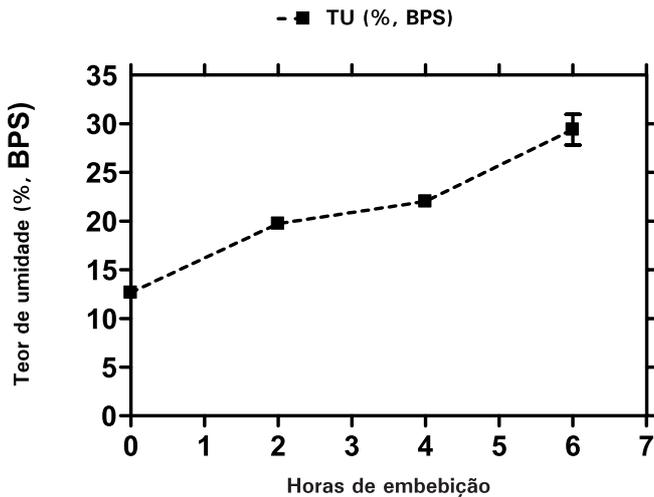


Fig. 1. Curva de embebição de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar IAC 99 em água destilada por diferentes períodos de tempo. Pontos representam a média de três medidas; barras não aparentes estão dentro do limite do símbolo ( $P < 0,001$ ).

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 embebida por um período mínimo de 48 horas para amolecimento do endosperma. A viabilidade de eixos embrionários isolados de sementes que não foram congelados em Nitrogênio Líquido foi de 100%, independente do teor de umidade por elas apresentado (Fig. 2).

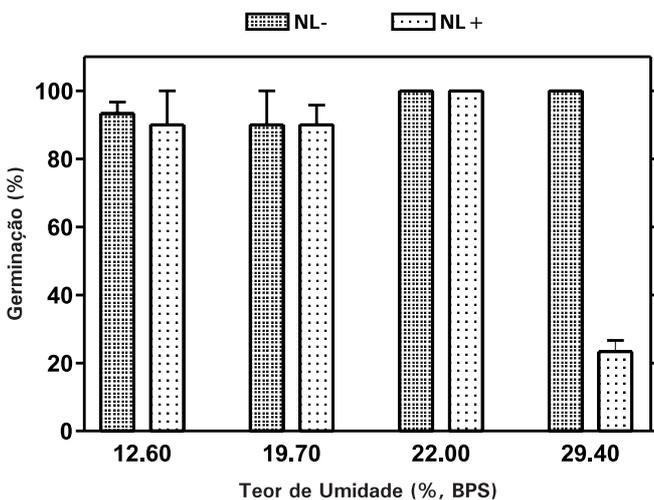


Fig. 2. Efeito do teor de umidade das sementes sobre a germinação (%) de eixos embrionários de *C. arabica* cv. IAC 99 após o congelamento em nitrogênio líquido. As sementes foram hidratadas para diferentes teores de umidade congeladas por mergulho direto em nitrogênio líquido e descongeladas rapidamente em banho a  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ . Barras representam a média de três replicatas; as barras que não aparecem estão dentro do limite da coluna ( $P < 0,0001$ ).

Estes eixos germinaram produzindo plântulas normais após sete dias de cultivo *in vitro* (Fig. 3). Após o congelamento em nitrogênio líquido, 100% dos eixos isolados de sementes com 12,6% umidade permaneceram viáveis e deram origem a plântulas normais depois de uma semana de cultivo *in vitro* (Fig. 2 e 3A). Em contraste, apenas 23% dos eixos isolados de sementes com 29,4% de umidade germinaram depois de congelados em nitrogênio líquido (Fig. 2). As plântulas produzidas por estes eixos apresentaram crescimento mais lento (Fig. 3D). A cultura de tecidos *in vitro* proporciona evidência irrefutável da sobrevivência ao nitrogênio líquido: a germinação e produção de uma plântula normal. Dentre os vários meios de cultura testados o meio WPM foi selecionado para o cultivo *in vitro* de eixos embrionários de *C. arabica* congelados em nitrogênio líquido, porque apresentou melhores resultados de crescimento, induzindo a regeneração de uma plântula normal sem fase intermediária de calo.



Fig. 3. Plântulas obtidas após duas semanas em cultura, a partir de eixos embrionários isolados de sementes criopreservadas em nitrogênio líquido. O teor de umidade das sementes, estimado com base em peso seco, no momento do congelamento era de: (A) 12,6%; (B) 19,7%; (C) 22,0% e (D) 29,4%.

Os resultados obtidos indicam que a criopreservação de eixos embrionários é uma alternativa viável para a conservação a longo prazo do germoplasma de *C. arabica*. O procedimento descrito neste trabalho é simples e não requer o uso de crioprotetores químicos ou congeladores programáveis. O material requer manipulação em condições de assépticas apenas em sua etapa final, após o descongelamento, o que simplifica muito o protocolo, tornando-o mais prático para uso rotineiro em bancos de germoplasma. Este protocolo será utilizado como modelo para a criopreservação de outras variedades de *C. arabica* e outras espécies de *Coffea*. O efeito do armazenamento a longo prazo em nitrogênio líquido será avaliado na próxima etapa desta pesquisa.

## Conclusões

Nas condições experimentais utilizadas neste trabalho 100% dos eixos embrionários de *C. arabica* isolados de sementes contendo 12.6-22% de umidade sobrevivem ao congelamento em nitrogênio líquido.

## Referências Bibliográficas

BERJAK P, WALKER M, MYCOCK, D. J, WESLEY-SMITH J, WATT P, PAMMENTER, N. W Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p. 140-155.

CARNEIRO M. F. Coffee biotechnology and its application in genetic transformation. **Euphytica**, Dordrecht, v. 96, p. 167-172, 1997.

DUSSERT S, CHABRILLANGE N, ENGELMANN F, ANTONHY F, HAMON S Cryopreservation of coffee

(*Coffea arabica* L.) seeds: toward a simplified protocol for routine use in coffee genebanks. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p. 161-166.

ELLIS, R.H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E.H An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.

LLOYD, G.; MCCOWN, B Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of Annual Meetings of International Plant Propagators' Society**, Seattle, WA, v. 30, p. 421-427, 1981.

NAIDU, M. M.; SREENATH, H. L. *In vitro* culture of coffee zygotic embryos for germplasm conservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 55, p 227-230, 1999.

### Comunicado Técnico, 69

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**  
 Serviço de Atendimento ao Cidadão  
 Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) -  
 Brasília, DF. CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372  
 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
 e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição  
 1ª impressão (2002): 150 unidades

### Comitê de publicações

**Presidente:** José Manuel Cabral de Sousa Dias  
**Secretário-Executivo:** Miraci de Arruda Camâra Pontual  
**Membros:** Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria  
 Marta Aguiar Sabo Mendes  
 Sueli Correa Marques de Mello  
 Vera Tavares Campos Carneiro

### Expediente

**Supervisor editorial:** Miraci de Arruda Camâra Pontual  
**Normalização Bibliográfica:** Maria Alice Bianchi  
 Priscila Rocha Silveira  
**Editoreção eletrônica:** Alysson Messias da Silva