

BANCO DE SEMENTES DE CAFÉ EM CRIOPRESERVAÇÃO: EXPERIÊNCIA INÉDITA NO BRASIL

Circular Técnica

Brasília, DF
Setembro 2005

Autores

Miriam T.S. Eira
Embrapa Café

Raimunda B. Reis
Embrapa Recursos
Genéticos e
Biotecnologia

**Francisca Neide S.
Ribeiro**
Bolsista
PNP&D/Café
Embrapa Recursos
Genéticos e
Biotecnologia

Viviane S. Ribeiro
Bolsista
PNP&D/Café
Embrapa Recursos
Genéticos e
Biotecnologia



Resumo

A conservação de sementes de café por longos períodos é dificultada pelo comportamento intermediário no armazenamento. No entanto, estudos recentes relatam que a partir da combinação de um grau crítico de umidade das sementes para cada temperatura de armazenamento, pode-se prolongar o período de conservação. Com o objetivo de estabelecer um Banco de Germoplasma de *Coffea* spp, através de técnicas de criopreservação, estudos vêm sendo desenvolvidos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, DF. O protocolo de conservação consta da desidratação parcial das sementes, até cerca de 20% de água, embalagem em sacos trifoliados de papel-alumínio-polietileno, selados hermeticamente e imersão direta no nitrogênio líquido. Após a criopreservação as sementes são descongeladas rapidamente em banho de água a 40°C, sob agitação constante. Os resultados obtidos até o momento, com cerca de 30 acessos de diferentes cultivares de *Coffea arabica* são bastante promissores, indicando a sobrevivência das sementes mesmo após períodos de dois anos de congelamento no nitrogênio líquido. A partir desses resultados será implantada uma *core collection*, ou uma pequena coleção com os principais acessos da espécie, constituindo-se o Banco de Germoplasma de café em criopreservação, experiência inédita no Brasil.

Palavras-chave: armazenamento, germinação, viabilidade, banco de germoplasma, criopreservação, *Coffea*

CRYOPRESERVATION OF COFFEE SEEDS: NEW EXPERIENCE IN BRAZIL

Abstract:

Coffee seeds long term conservation is difficult because of the intermediate storage behavior. Despite of that, in recent studies it was demonstrated that the longevity can be increased with a perfect combination of seed water content and storage temperature. Aiming to establish a *Coffea* genebank in Brazil, studies to define the best protocol have been carried out at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, in Brasilia, DF. Seeds are partially dehydrated to reach 20% water, then are sealed in hermetic bags and immersed in liquid nitrogen. After

cryopreservation, seeds are thawed in a water bath at 40°C. The results show that seeds of 30 cultivars of *Coffea arabica* maintained the viability after two years of storage. A core collection of coffee germplasm is being initiated and will be the first experience of a genebank in cryopreservation in Brazil.

Key words: storage, germination, viability, genetic resources, genebank, cryopreservation, *Coffea*.

Introdução

O café é um dos principais produtos agrícolas no mundo, sendo cultivado por mais de 70 países. A cafeicultura sempre ocupou posição de destaque na balança comercial brasileira, sendo um dos mais importantes produtos exportação do país, que é o principal produtor de café no mundo desde os anos 1800.

Os programas de melhoramento são responsáveis pelo desenvolvimento e lançamento de cultivares para atender as necessidades dos cafeicultores brasileiros. Para o desenvolvimento destas novas cultivares é fundamental a existência de bancos de germoplasma que representem significativamente a variabilidade genética da espécie e cujos recursos genéticos possam ser facilmente obtidos. Tradicionalmente, as espécies de *Coffea* vêm sendo conservadas *ex situ*, como plantas vivas mantidas em coleções de germoplasma a campo, devido ao comportamento intermediário das sementes no armazenamento. A manutenção de germoplasma vegetal em coleções no campo apresenta uma série de problemas tais 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. O progresso recente na área de biotecnologia criou novas possibilidades para a conservação de recursos genéticos de espécies vegetais usando técnicas de conservação *in vitro* sob crescimento lento ou criopreservação. Dentre estas técnicas, a criopreservação, ou seja, a conservação das sementes em nitrogênio líquido (NL), em temperatura ultrabaixa (-150 a -196°C), interrompe o metabolismo celular reduzindo ou eliminando completamente a ocorrência de reações metabólicas que podem levar à degeneração celular, sendo considerada como uma promissora maneira de conservação a longo prazo de células, tecidos e órgãos vegetais, a partir dos quais plantas inteiras podem ser regenerados.

No gênero *Coffea* as sementes apresentam comportamento intermediário entre ortodoxo e recalcitrante, e os estudos de armazenamento desenvolvidos até o momento não viabilizam a conservação das sementes por longo prazo. No entanto, Eira et al. (1999a) sugerem que o armazenamento é possível desde que as sementes estejam com grau de umidade apropriado para a conservação sob a temperatura desejada. Assim, o nível crítico de água para a conservação de sementes de *C. arabica* em criopreservação seria de 0,20 g de água /g de matéria seca. Dussert et al. (1997, 1998) também demonstraram que sementes de *Coffea* com graus semelhantes de umidade toleram a criopreservação.

O objetivo deste estudo é monitorar a viabilidade das sementes de *Coffea arabica* armazenadas em

nitrogênio líquido (-196°C) para o estabelecimento de protocolos que permitam a conservação a longo prazo em Bancos de Germoplasma.

Material e Métodos

Foram utilizadas sementes de cerca de 30 cultivares ou linhagens de *Coffea arabica*, procedentes do Instituto Agrônomo de Campinas e da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais.

O grau de umidade ideal para armazenamento das sementes (EIRA et al., 1999a) foi ajustado sobre soluções de cloreto de sódio (UR=75,5%) a 15°C, de acordo com protocolo sugerido por Vertucci e Roos (1993). A solução foi escolhida a partir das isotermas determinadas para a espécie por Eira et al. (1999b).

A seguir as sementes foram embaladas hermeticamente em sacos trifoliados de papel-alumínio-polietileno e armazenadas em câmaras a +5°C, -

20°C ou imersas em nitrogênio líquido (-196°C). Amostras foram retiradas após 1, 6, 12 e 24 meses de armazenamento para monitoração da viabilidade das sementes, através de teste de germinação a 25°C, em rolos de papel.

Resultados e Discussão

As sementes atingiram o grau de umidade desejado (0,20g de água /g de matéria seca), que foi mantido durante todo o período de conservação, demonstrando que a embalagem trifoliada é adequada para a conservação de sementes de café em nitrogênio líquido. As sementes apresentaram alta viabilidade inicial, cerca de 90 a 100% de germinação, que não foi alterada durante o período de ajuste do grau de umidade. A Figura 1 mostra a viabilidade das sementes de algumas cultivares durante todo o período de testes.

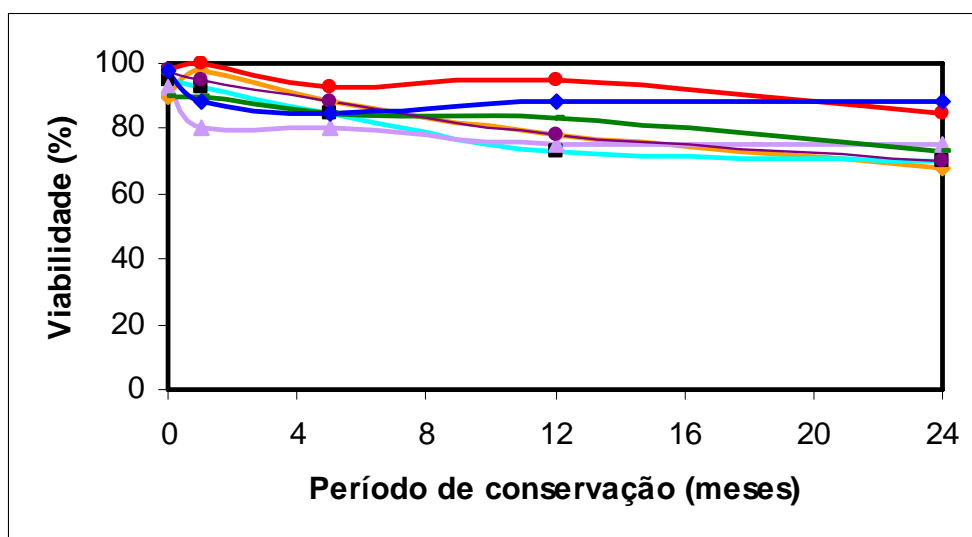


Figura 1 – Viabilidade de sementes de *Coffea arabica* em criopreservação (-196°C) por 24 meses.

No gênero *Coffea* as sementes apresentam comportamento intermediário entre ortodoxo e recalcitrante (ELLIS et al., 1990, 1991; EIRA et al., 1999a). As sementes de café de todos os materiais estudados retiveram 70% da viabilidade inicial mesmo após dois anos de conservação em nitrogênio líquido. A redução da viabilidade ocorreu para algumas cultivares logo no início do período de armazenamento, enquanto para outras ocorreu ao longo do período. O componente genético é um dos fatores que interferem no processo de deterioração, de modo que sementes de diferentes cultivares de uma mesma espécie podem apresentar diferenças de longevidade.

Os resultados obtidos são promissores para a definição do protocolo de conservação das sementes de café em Bancos de Germoplasma. A manutenção da viabilidade das sementes em nitrogênio líquido pode ser considerada um grande avanço no estudo de criopreservação, uma vez que nos resultados anteriormente relatados na literatura sempre foi verificada redução do poder germinativo após alguns dias de armazenamento (DUSSERT et al., 1997, 1998; EIRA et al., 1999a).

A partir desses resultados será implantada uma *core collection*, ou uma pequena coleção com os principais acessos da espécie, constituindo-se o Banco de Germoplasma de café em criopreservação, experiência inédita no Brasil. O trabalho também está sendo conduzido para outras espécies do gênero *Coffea*. Experiência semelhante está sendo realizada no Institut de Recherche pour le Développement – IRD, em Montpellier, França.

Referências bibliográficas

DUSSERT, S.; CHABRILLANGE, N.; ENGELMANN, F.; ANTHONY, F.; HAMON, S. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of precooling temperature. **Cryo-Letters**, Cambridge, GB, v. 18, p. 269-276, 1997.

DUSSERT, S.; CHABRILLANGE, N.; ENGELMANN, F.; ANTHONY, F.; LOUARN, J.; HAMON, S. Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, Wallingford, GB, v. 8, p. 9-15, 1998.

EIRA, M. T. S.; WALTERS, C.; CALDAS, L. S.; FAZUOLI, L. C.; SAMPAIO, J. B.; DIAS, M. C. L. L. Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, p. 97-105, 1999a.

EIRA, M. T. S.; WALTERS, C.; CALDAS, L. S. Water sorption isotherms in *Coffea* spp. seeds and embryos. **Seed Science Research**, Wallingford, GB, v. 9, p. 321-330, 1999b.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. **Handbook of seed technology for genebanks**. Rome: IBPGR, 1985. v. 2.

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

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate

category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, GB, v. 42, p. 653-657, 1991.

VERTUCCI, C. W.; ROOS, E. E. Theoretical basis of protocols for seed storage. II. The influence of temperature on optimal moisture levels. **Seed Science Research**, Wallingford, GB, v. 3, p. 201-213, 1993.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos pesquisadores Luiz Carlos Fazuoli, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e Gabriel Ferreira Bartholo, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) e às suas equipes pelo material genético e apoio recebidos durante toda a condução dos experimentos.

Circular Técnica, 42

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 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3448-4600 Fax: (61) 3340-3624

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2005)

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante
Maria Alice Bianchi
Graça S. P. Negrão
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro*

Expediente

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara
Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da
Graça Simões Pires
Negrão*