

CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE CULTIVARES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) POR IMERSÃO DIRETA DAS SEMENTES EM NITROGÊNIO LÍQUIDO¹

Stefânia Vilas Boas Coelho², Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa³, Júlia Lima Baute⁴, Tatiana Botelho Fantazzini⁵, Cristiane Carvalho Pereira⁶, Nathália Aparecida Bragança Fávarris⁷

¹ Trabalho Financiado pelo Consórcio Pesquisa Café, Embrapa Café e INCT Café.

² Pesquisadora, Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, stefaniavbc@gmail.com

³ Pesquisadora, Embrapa Café, Brasília – DF, sttela.rosa@embrapa.br

⁴ Bolsista, Iniciação científica, Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, juliabaute@hotmail.com

⁵ Pesquisadora: Dra, Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, tatiana_botelho@hotmail.com

⁶ Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, cristianecpe@gmail.com

⁷ Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, nath-braganca@hotmail.com

RESUMO: Sementes de café são sensíveis à dessecação e ao armazenamento. A criopreservação é um método seguro para armazenar sementes com essas características por longos períodos de tempo, entretanto são necessários estudos preliminares para determinar as condições ideais para o armazenamento. Objetivou-se neste trabalho avaliar sementes de cultivares de *Coffea arabica* L. criopreservadas por imersão direta em nitrogênio líquido, após secagem rápida e lenta. Sementes de *Coffea arabica* L. das cultivares Arara, Catiguá, Catuaí amarelo e Mundo Novo foram submetidas à secagem rápida e lenta até teor de água de 20% (base seca), foram imersas em nitrogênio líquido durante 24 horas e, então, reaquecidas em banho maria a 40°C, durante 2 minutos. A qualidade fisiológica das sementes após criopreservação foi avaliada por meio dos testes de germinação, tetrazólio e testes de vigor. A secagem rápida é mais indicada para a criopreservação das sementes de *Coffea arabica* L. Embora com diferentes níveis de tolerância, as sementes das cultivares investigadas podem ser criopreservadas, sendo a Catuaí amarelo a mais tolerante e a Arara a mais sensível à criopreservação, independentemente da velocidade de secagem. Secagem rápida em sílica gel até 20%, seguida de imersão direta em nitrogênio líquido possibilita a criopreservação de sementes de café, de maneira rápida, simples e econômica.

PALAVRAS-CHAVE: Sílica gel, cristais de gelo, qualidade fisiológica

CRYOPRESERVATION OF COFFEE SEEDS CULTIVARS (*Coffea arabica* L.) BY DIRECT IMMERSION IN LIQUID NITROGEN

ABSTRACT: Coffee seeds are sensitive to desiccation and storage. Cryopreservation is a safe method for storing seeds with these characteristics for long periods of time, however preliminary studies are needed to determine the ideal conditions for storage. The objective of this work was to evaluate seeds of *Coffea arabica* L. cultivars cryopreserved by direct immersion in liquid nitrogen, after fast and slow drying. *Coffea arabica* L. seeds from the cultivars Arara, Catigua, Catuai Amarelo and Mundo Novo were subjected to fast and slow drying to 20% water content (dry basis), were immersed in liquid nitrogen for 24 hours and thawed in a water bath at 40°C for 2 minutes. The physiological quality of seeds after cryopreservation was evaluated by germination, tetrazolium and vigor tests. Fast drying is best indicated for cryopreservation of seeds of *Coffea arabica* L. Although with different tolerance levels, the seeds of the investigated cultivars can be cryopreserved, being Catuai Amarelo the most tolerant and Arara the most sensitive to cryopreservation, regardless of the drying rate. Fast drying on silica gel up to 20%, followed by direct immersion in liquid nitrogen enables quick, simple and economical coffee seed cryopreservation.

KEY WORDS: Silica gel, ice crystals, physiological quality

INTRODUÇÃO

A conservação dos recursos genéticos das espécies vegetais se destaca como prioridade estabelecida e reconhecida em nível mundial, uma vez que para o desenvolvimento de novas cultivares, é fundamental a existência de variabilidade genética das espécies. No Brasil, a conservação do germoplasma do cafeeiro é de grande importância socioeconômica, uma vez que o país se destaca como maior produtor e exportador mundial dessa *commodity* (Abic, 2019). Devido ao comportamento intermediário ou recalcitrante das sementes, a conservação do gênero *Coffea* é feita por meio de bancos de germoplasma *in situ*. Esta metodologia, porém, envolve um alto custo de manutenção, além do fato de que plantas conservadas no campo estão vulneráveis ao ataque de pragas, doenças e a desastres climáticos (Eira et al., 2005; Dussert et al., 2012). A conservação *ex situ* por meio da criopreservação é a técnica mais promissora para a preservação de recursos genéticos vegetais para as espécies que produzem sementes recalcitrantes e/ou intermediárias (Dussert et al., 2012; Berjak e Pammenter, 2014). É uma forma de conservação de material biológico em nitrogênio líquido à -196°C, ou em sua fase a vapor, a -150°C, após uma desidratação controlada (Berjak e Pammenter, 2014), a qual não permite a ocorrência de reações metabólicas, garantindo a viabilidade no armazenamento desse material sem que ocorram

modificações ou alterações fisiológicas, bioquímicas e genéticas por um período indeterminado de tempo (Engelmann, 2011). A secagem das sementes até um nível ideal de umidade é fundamental para o sucesso da criopreservação, pois evita a formação de cristais de gelo no meio intracelular (Kaviani, 2011). Porém, em espécies intermediárias como *Coffea arabica* L., a velocidade com que a água é retirada pode comprometer a viabilidade das sementes por ocasionar danos irreversíveis às células (Kohoma et al., 2006). Diante da importância de se preservar os recursos genéticos do café e da ausência de estudos do efeito da velocidade de secagem na criopreservação das sementes, o objetivo neste trabalho foi avaliar sementes de diferentes cultivares de *C. arabica* L. após criopreservação por imersão direta em nitrogênio líquido após secagem rápida e lenta.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes da espécie *C. arabica* L., de quatro cultivares comerciais no Brasil, Arara, Catiguá, Catuaí amarelo e Mundo Novo foram secadas até o teor de água de 20% (base seca), sendo essa umidade a indicada para criopreservação de sementes de café, de acordo com resultados de estudos anteriores (Dussert et al., 2012; Eira et al., 2005; Dussert and Engelmann, 2006). Foram utilizados dois tipos de secagem, rápida e lenta, ambas em ambientes com temperatura controlada.

Para a secagem rápida, as sementes foram acondicionadas em camada única sobre telas metálicas das caixas de gerbox contendo sílica gel ativada em seu interior e abaixo da tela. Para a secagem lenta, as sementes foram acondicionadas da mesma forma, em caixas contendo solução salina saturada de NaCl (75% de umidade relativa), sendo essa solução capaz de manter a umidade relativa interna estável. Os recipientes foram lacrados e mantidos em câmaras do tipo B.O.D, em temperatura constante de 25°C. A perda de água durante a secagem foi monitorada por pesagens contínuas em balança de precisão de 0,001 g, até que as sementes atingissem o teor de água de interesse.

As sementes submetidas à secagem, com umidade de 20% (bs), foram, então, acondicionadas em embalagens trifoliadas de alumínio e diretamente imersas em tanque contendo nitrogênio líquido, o que proporciona um congelamento ultrarrápido. Após 24 horas de criopreservação, as embalagens contendo as sementes foram retiradas e as sementes descongeladas em banho-maria a 40°C, por 2 minutos (Dussert et al., 1998). Posteriormente, foram secadas em papel toalha e tiveram seus pergaminhos retirados manualmente para serem submetidas à avaliação fisiológica.

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105°C, durante 24 horas (Brasil, 2009). A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada pela porcentagem de plântulas normais, de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, de viabilidade de embriões no teste de tetrazólio e matéria seca de plântulas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x4, sendo dois tipos de secagem, rápida e lenta e quatro cultivares de *C. arabica* L., Arara, Catiguá, Catuaí amarelo e Mundo Novo, com quatro repetições. Os resultados dos testes foram submetidos à análise de variância por meio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011). As médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de variância dos dados, constatou-se interação significativa dos fatores estudados, velocidade de secagem e cultivares, para todas as variáveis respostas analisadas. Na figura 3 encontram-se os resultados dos testes fisiológicos após a criopreservação das sementes das cultivares comerciais de *C. arabica* L.

Observou-se por meio da avaliação fisiológica que a secagem rápida, em sílica gel, é mais favorável do que a secagem lenta para a criopreservação, uma vez que as sementes de todas as cultivares apresentaram qualidade superior, exceto da cultivar Catuaí amarelo, em que não houve diferença entre os tipos de secagem (Figura 1, A, B, C e D). As sementes da cultivar Catuaí amarelo secadas em sílica gel apresentaram a maior tolerância à criopreservação, independentemente da forma de secagem, juntamente com as sementes da cultivar Catiguá. Das quatro cultivares estudadas, as sementes da cultivar Arara foi a mais sensível aos efeitos da criopreservação, com base nos resultados do teste de germinação (Figura 1, A).

No teste de tetrazólio, em que se avalia a viabilidade dos embriões de café (Figura 1, E), não foram encontradas diferenças significativas entre os tipos de secagem e entre as diferentes cultivares, exceto para as sementes da cultivar Catiguá, secadas lentamente, em que apresentaram embriões com viabilidade inferior aos das demais cultivares. Observa-se também com os resultados de viabilidade no teste de tetrazólio, uma maior qualidade fisiológica dos embriões de café quando comparado à qualidade fisiológica das sementes, para todas as cultivares estudadas, independentemente do tipo de secagem, indicando que os endospermas são mais sensíveis do que embriões, aos danos ocorridos durante a secagem e a imersão em nitrogênio líquido. Os embriões isolados de lotes de sementes que apresentaram baixos percentuais de plântulas normais devidos aos danos de secagem e decorrentes da imersão em nitrogênio líquido, apresentaram altos percentuais de viabilidade no teste de tetrazólio.

Zhang et al. (2014) investigando os efeitos da criopreservação sobre a qualidade fisiológica de sementes de *Citrus paradisi* Macfad., outra espécie de comportamento intermediário, também constataram que sementes secadas em sílica gel apresentam maior viabilidade após a exposição em nitrogênio líquido em comparação às secadas em soluções salinas saturadas. Este resultado é semelhante ao encontrado no presente trabalho, em que a secagem mais rápida, em

sílica gel é melhor que a secagem mais lenta em solução salina saturada (75% de unidade relativa) para a criopreservação das sementes de café.

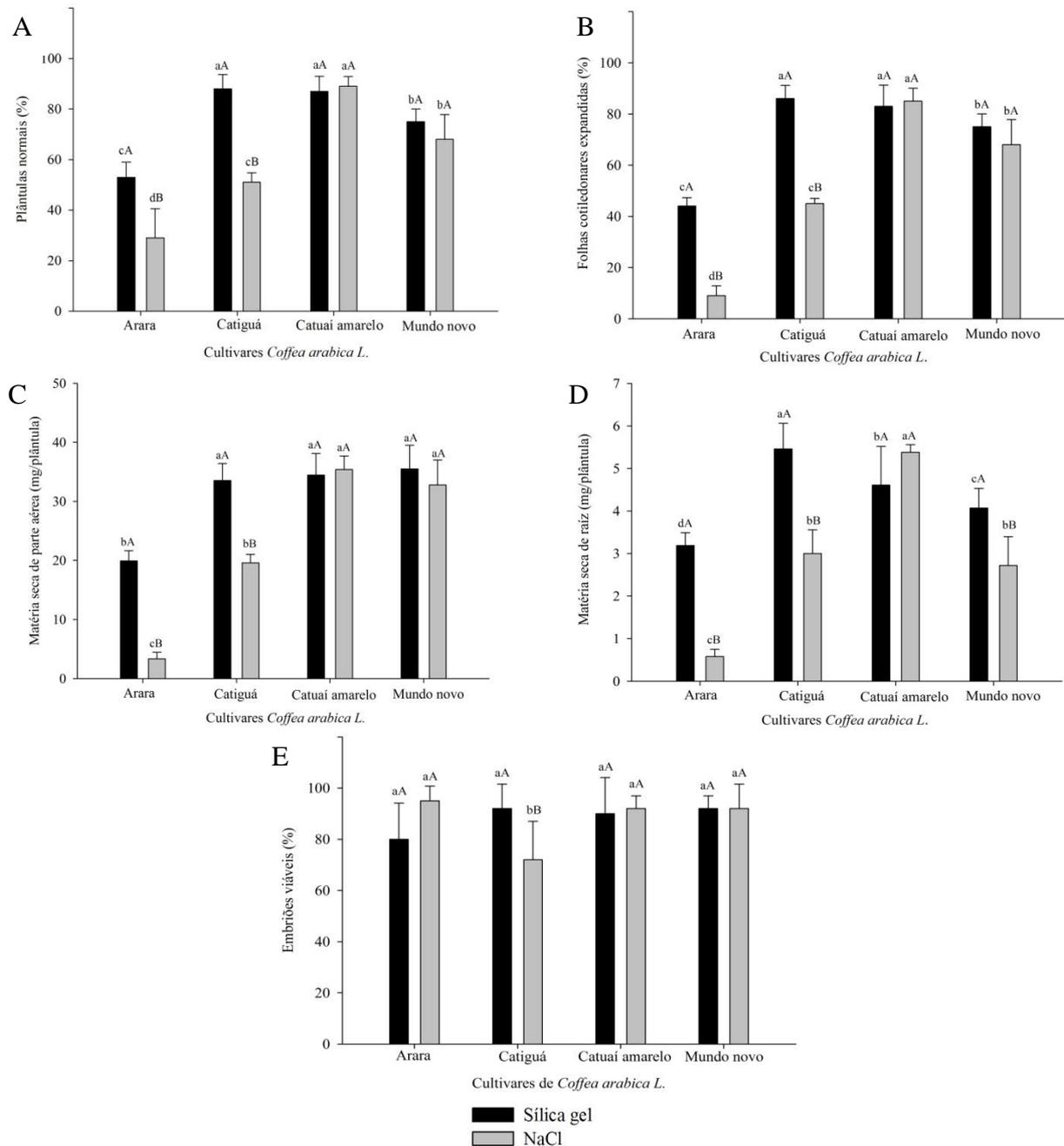


Figura 1. Porcentagem média de plântulas normais (A), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (B) e peso médio de matéria seca de parte aérea (C) e raiz (D), no teste de germinação e viabilidade de embriões no teste de tetrazólio (E), de sementes de quatro cultivares comerciais de *Coffea arabica* L., após criopreservação. (Letras maiúsculas comparam o tipo de secagem dentro de uma mesma cultivar e letras minúsculas, as cultivares dentro de um mesmo tipo de secagem).

Com base nos resultados do presente trabalho com diferentes cultivares, as sementes podem ser criopreservadas, mas apresentam diferentes níveis de tolerância à imersão em nitrogênio líquido, sendo a Catuai amarelo a mais tolerante e a Arara a mais sensível à imersão em nitrogênio líquido, independentemente da velocidade em que as sementes são secadas. Devido à estreita base genética da espécie, as cultivares de *Coffea arabica* apresentam muita semelhança entre os parentais e em muitos casos, de difícil discriminação genotípica e fenotípica. Entretanto, as sementes das cultivares investigadas neste trabalho apresentaram comportamentos diferentes com relação ao processo de criopreservação.

CONCLUSÕES

1 - A secagem rápida é mais indicada para a criopreservação das sementes de *Coffea arabica* L. Embora com diferentes níveis de tolerância, as sementes das cultivares investigadas podem ser criopreservadas, sendo a Catuaí amarelo a mais tolerante e a Arara a mais sensível à criopreservação, independentemente da velocidade de secagem.

2 - Secagem rápida em sílica gel até 20%, seguida de imersão direta em nitrogênio líquido possibilita a criopreservação de sementes de café, de maneira rápida, simples e econômica.

AGRADECIMENTOS

À UFPA, CAPES, FAPEMIG, CNPQ e Fundação Procafé.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Associação Brasileira da indústria de café. *Produção Mundial de Café - Principais países Produtores*. Safra 2019. Disponível em:
<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#5103>. Acesso em: 19 JUN. 2019.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. (2014). Cryostorage of germplasm of tropical recalcitrant-seeded species: Approaches and problems. *International Journal Plant Science*, 175, 29-39.
- BRASIL (2009). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária. *Regras para análise de sementes*. Brasília: MAPA/ACS, 399 p.
- DUSSERT, S.; CHABRILLANGE, N.; ENGELMANN, F.; ANTHONY, F.; LOUARN, J.; HAMON, S. (1998). Cryopreservation of seed of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. *Seed Science Research*, 8, 9-15.
- DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. (2006). New determinants for tolerance of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. *Cryo Letters*, 27, 169-78.
- DUSSERT, S.; COUTURON, E.; ENGELMANN, F.; JOËT, T. (2012). Biologie de la conservation des semences de caféiers : aspects fondamentaux et conséquences pratiques. Une revue. [Coffee seed conservation biology: Fundamental aspects and practical implications. A review]. *Cahiers Agricultures*, 21 106-114.
- EIRA, M.T.S.; REIS, R. B.; RIBEIRO, F. N. S.; RIBEIRO, V. S. (2005). *Banco de sementes de café em criopreservação: experiência inédita do Brasil*. Circular Técnica 42.
- ENGELMANN, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 47, 5-16.
- FERREIRA, D. F. (2011). SISVAR: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 1039-1042.
- KAVIANI, B. (2011). Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal of Crop Science*, 5, 778-800.
- KOHOMA, S., MALUF, A.M., BILIA, D.A.C., BARBEDO, C.J. (2006). Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* LAM. (Grumixameira). *Revista Brasileira de Sementes*, 28, 72-78.
- ZHANG, N.; WEN, B.; J. I. M.; YAN, Q. (2014). Low-temperature storage and cryopreservation of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad.) seeds. *CryoLetters*, 35, 418-426.