

IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS PROVAVELMENTE HAPLÓIDES DE *Coffea arabica* L. OBTIDAS ATRAVÉS DE SEMEADURA EM AREIA¹

COLOMBO, L.A.²; MATA, J.S.²; SERA, T.³ e AZEVEDO, J.A.³

¹ Projeto parcialmente financiado pelo Consórcio Café / Núcleo de Genética e Melhoramento; ² Bolsista da FUNAPE/EMBRAPA Café; ³ Pesquisadores do IAPAR Londrina, PR <tsera@pr.gov.br>.

RESUMO: Por meio do uso de plantas haplóides e sua posterior duplicação cromossômica, há possibilidade de se reduzir o tempo gasto para o desenvolvimento de uma linhagem experimental de café, de 25 anos para cerca de 8 anos. Este trabalho objetivou a identificação visual das plantas provavelmente haplóides, para posterior contagem e duplicação cromossômica, permitindo a obtenção de diplóides homozigotos utilizáveis em programa de melhoramento para acelerar as etapas da obtenção de novas cultivares de café. Utilizaram-se aproximadamente 12.960 sementes de 288 progênies, pertencentes a 42 famílias de café arábica, e foram encontradas 110 plantas com embriões gêmeos, ou seja, uma frequência de 0,84% de sementes diembriônicas e 0,47% provavelmente haplóides. A avaliação foi feita visualmente, comparando-se o diâmetro do caule entre as duas plântulas de cada semente, quando estas estavam no estágio de “palito-de-fósforo” e “orelha-de-onça”, porém, por estas plantas estarem inoculadas por nematóides, foram feitas estacas. A taxa de pegamento por estaquia foi de aproximadamente 60%, sendo considerada muito satisfatória, conforme a situação em que se encontravam as mudas. Estas plantas provavelmente haplóides foram identificadas através de seleção visual preliminar, as quais serão avaliadas com mais rigor por meio de dimensões foliares e número de cloroplastos; posteriormente elas serão confirmadas por exame citogenético de contagem do número de cromossomos. Devido à maior frequência de embriões ocorrida em sete das 42 famílias, estas foram avaliadas separadamente e observou-se variação de 0,4 a 2,2% de embriões gêmeos haplóides, em contraste com o 0,01% encontrado em cultivares comerciais, vislumbrando a possibilidade de ter genótipo indutor de alta frequência de haplóides. Para uso rotineiro num programa de melhoramento, seria necessário obter 100 plantas haplóides por genótipo, sendo suficiente uma quantidade de 20.000 sementes para uma frequência de 0,5% em vez de se utilizar de 1.000.000 de sementes no caso de cultivar comercial como o “Catuaí”, com 0,01%.

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

IDENTIFICATION OF PUTATIVE HAPLOID PLANTS *Coffea arabica* L. OBTAINED SOWING IN SAND

ABSTRACT: Through the use of haploid plants and subsequent chromosome duplication, it is possible to reduce the spented time to develop an experimental lineage of coffee from 25 to about 8 years. This work aimed the visual identification of haploid plants for subsequent chromosome count and duplication. That will allow to obtain homozygous diploids, that will accelerate the stages until to obtain new coffee cultivar in breeding programs. Approximately 12960 seeds of 288 progenies were used belonging to 42 families of Arabic coffee, and it were found 110 plants with twin embryos, in other words, a frequency of 0,84% diembryonic seeds and 0,47% probably haploids. The evaluation criterion was made visually, being compared the stem diameter among the two plants of each seed, when these were at the stadium of “palito-de-fósforo” and “orelha-de-onça”. However, in spite of these plants be inoculated by nematodes, it were made stakes. The rate of succeeded stakes was approximately 60%, being considered very satisfactory, in spite of the situation of seedlings. These probably haploid plants were identified through preliminary visual selection, which will be appraised with more rigidity through foliate dimensions and chloroplast number. Later that will be confirmed by citogenetic exam of counting chromosome number. Larger embryo frequency happened in seven of the 42 families, and these were separately evaluated and a variation from 0,4 to 2,2% of twin haploid embryos was observed, in contrast with the 0,01% found in commercial cultivar. That may increase to have the possibility of inductor genotype of a high haploid frequency. For a routine use in an breeding program, it would be necessary to obtain 100 haploid plants for genotype, being enough an amount of 20.000 seeds for a frequency of 0,5%, instead of using 1.000.000 seeds in the case of commercial cultivars as “Catuaí” with 0,01%.

Key words: Arabic coffee, twin embryos, coffee haploids , coffee improvement.

INTRODUÇÃO

Através do uso de plantas haplóides e sua posterior duplicação cromossômica, há possibilidade de se reduzir o tempo gasto para o desenvolvimento de uma linhagem experimental de café, de 25 anos para cerca de 8 anos.

A maior vantagem dos haplóides é o fato de eles serem usados para produzir com rapidez linhagens homozigóticas (Carvalho, 1952; Carneiro, 2000). Nos cereais, plantas haplóides são usualmente frágeis na sua estrutura, com colmos e folhas finas, porte baixo e panículas ou espigas pequenas e estéreis

(Niizeki & Oono, 1971). Em café, as plântulas haplóides são perfeitamente distintas das normais. Quando adultas, apresentam folhas de limbo mais delgado e mais estreito, porte menor e flores, embora abundantes, também menores (Mendes & Bacchi, 1940). Todos os haplóides apresentam porte menor e folhas mais estreitas e mais finas do que as variedades que lhes deram origem. Apesar de as flores serem completas, nota-se esterilidade muito acentuada. Raramente se formam alguns frutos, e estes são providos de uma única semente, motivo pelo qual as plantas haplóides são denominadas “monosperma”. As plantas monospermas podem ser encontradas em qualquer variedade de café, motivo pelo qual não devem ser consideradas como variedades, mas, apenas, como haplóides das variedades da qual se originaram (Carvalho, 1952).

A determinação da ploidia é, normalmente, realizada por meio da contagem do número cromossômico em meristemas apicais de raízes. No entanto, essa técnica é muito trabalhosa, sendo, em alguns casos, também possível determinar a ploidia das plantas por meio de contagem do número de cloroplastos das células epidérmicas das folhas (Franco, 1939; Mochizuki & Sueoka, 1955; Carneiro, 2000).

Por meio deste trabalho pode ser viável a elaboração de um procedimento para obter número suficiente de cafeeiros haplóides para um programa de melhoramento, consistindo de pré-seleção de sementes recém-germinadas, avaliação visual de mudas de quatro pares de folhas e confirmação por contagem cromossômica. A duplicação do número de cromossomos pode ser feita pelo uso de colchicina (Mendes, 1947; Monaco et al., 1975), para obter plantas homozigotas na geração F_2 em vez de F_5 .

Este trabalho objetivou a identificação visual das plantas provavelmente haplóides germinadas em areia e seu resgate através de estacas, para posterior contagem e duplicação cromossômica, permitindo a obtenção de diplóides homozigotos utilizáveis em programa de melhoramento para acelerar as etapas da obtenção de novas cultivares de café.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas aproximadamente 12.960 sementes de 288 progênies, pertencentes a 42 famílias de café arábica (*Coffea arabica* L.). Estas sementes foram tratadas com fungicida Thiabendazole e semeadas diretamente em caixas de cimento-amianto de 500 litros, contendo areia lavada. O experimento foi instalado em casa de vegetação em conjunto com outro experimento, que tem por objetivo avaliar progênies homozigotas e heterozigotas resistentes ao nematóide *Meloidogyne paranaensis*.

A avaliação das plantas foi feita comparando-se o diâmetro do caule entre as duas plântulas de cada semente. Assim, plântulas com diâmetro do caule maior tem correlação com o vigor vegetativo, com o volume radicular e com o tamanho da planta. Determinou-se então, através dessa avaliação, a porcentagem de plantas diembriônicas semelhantes, onde emergem plântulas com caule de mês mo diâmetro, as quais se desenvolvem igualmente, e a porcentagem de plantas diembriônicas não-semelhantes (a menor delas, provavelmente haplóide), em que se notam, no diâmetro do caule e no desenvolvimento, diferenças que podem ser muito acentuadas a ponto de uma das plântulas permanecer bem menor que a outra e ser puxada para fora da areia pela planta maior. Essa avaliação foi feita visualmente, quando as plantas estavam no estágio de “palito-de-fósforo” e “orelha-de-onça”, e, devido à inoculação por nematóides, destas plantas foram feitas estacas cortando-se a raiz e parte das folhas, que logo após foram tratadas com fungicida (Benomil) durante dois minutos por imersão e, posteriormente, com o regulador de crescimento para enraizamento (IBA1500 ppm) durante cinco minutos. Em seguida, foram colocadas em tubetes contendo substrato próprio para café em casa de vegetação com nebulização, onde permaneceram por aproximadamente 90 dias. Foram transplantadas para sacos com terra e transferidas para o viveiro, a fim de realizar avaliações citogenéticas posteriores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Encontraram-se 110 plantas com embriões gêmeos, ou seja, uma frequência de 0,84% de sementes diembriônicas e de 0,47% provavelmente haplóides. Esta frequência é maior do que a de 0,03% encontrada em cultivares comerciais (Colombo & Sera, 2000). É também maior do que a frequência de plantas haplóides espontâneas relatadas em algumas literaturas, como 0,015% de plantas haplóides, encontrada por Dublin & Parvais (1975); 0,015%, 0,02% e 0,06%, relatada por Couturon (1982); e uma variação de 0,01% a 0,14% de plantas haplóides, observada por Lashermes et al. (1993).

Em razão da maior frequência de embriões ocorrida em sete das 42 famílias, estas foram avaliadas separadamente, observando-se variação de 0,4 a 2,2% de embriões gêmeos haplóides (Tabela 1). Para determinar a porcentagem mais precisa, característica de cada progênie, é necessário obter sementes das plantas que deram origem a estas progênies e avaliá-las novamente com amostra de pelo menos 1.000 plantas/progênie. Serão utilizadas as plantas-mães das progênies com mais frequência, destas 34 progênies pertencentes a sete famílias, para cruzar com plantas normais e avaliar a porcentagem de haplóides nas gerações F_1 e F_2 . Em cereais tem sido sugerido o uso de genótipos indutores de maior frequência de plantas haplóides (Chen, 1986; Ouyang, 1986; Hou et al, 1993). Num trabalho anterior (Colombo & Sera,

2000), para uma frequência média de 0,01% seriam necessárias 100.000 sementes para obter 10 plantas haplóides. Assim, para o uso rotineiro num programa de melhoramento, seria necessário obter 100 plantas haplóides por genótipo, sendo suficiente uma quantia de 20.000 plantas, em vez de se utilizar de 1.000.000 de plantas no caso de uma frequência normal de 0,01% no “Catuaí”.

Das 110 estacas feitas, restaram 65, o que significa aproximadamente 60% de pegamento. Essa taxa de pegamento por estaquia é considerada muito satisfatória devido à situação em que se encontravam as plantas, ou seja, já haviam sido inoculadas com nematóide e apresentavam deficiência nutricional severa, pois foram semeadas em areia com adubação insuficiente por causa do objetivo principal do ensaio, que era de avaliar a resistência do nematóide. Outra explicação possível seria a natureza haplóide das plantas, que são mais frágeis quando comparadas às plantas normais. As plantas provavelmente haplóides foram identificadas através de seleção visual preliminar, as quais serão avaliadas com mais rigor por meio de dimensões foliares e número de cloroplastos e que, posteriormente, serão confirmadas por exame citogenético de contagem do número de cromossomos.

Tabela 1 - Frequência de embriões gêmeos em diferentes genótipos de café

Germoplasma possível	Número de progênies	Genótipos	Total de plantas	Nº de sementes com embriões gêmeos idênticos	% de embriões gêmeos idênticos	Nº de sementes com embriões gêmeos diferentes	% de embriões provavelmente haplóides
Icatu X Catuaí	7	95243	360	3	0,83	5	1,39
Icatu X Catuaí	4	95295	180	1	0,55	4	2,22
Icatu X Catuaí	4	95217	225	4	1,77	1	0,44
Icatu X Catuaí	8	95273	225	1	0,44	2	0,89
Icatu X Catuaí	2	10-14-1	450	2	0,44	9	2,0
“Piatã” x <i>C. arabica</i>	3	E95001	225	7	3,11	1	0,44
“Iapar 59” X “Icatu Catuaí”	4	51	450	2	0,44	4	0,89
-	-	testemunha Catuaí	50.000	-	-	5	0,01

CONCLUSÕES

- Existem genótipos com frequência alta, como 2,0%, de plantas haplóides em *Coffea arabica*, em contraste com o 0,01% em cultivares comerciais, vislumbrando a possibilidade de ter genótipo indutor de alta frequência de haplóides.

- Para obter 100 plantas haplóides e para ter utilidade prática num programa de melhoramento, seriam suficientes 10.000 sementes para uma frequência de 0,5% em vez de se utilizar de 1.000.000 de sementes no caso de cultivar comercial como o Catuaí, com 0,01%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARNEIRO, M.F. Avanços na obtenção de di-haplóides em cultivares de *C. arabica* L. In. : SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3, 1999, Londrina, Brasil. **Anais...** Londrina: IAPAR/IRAD, 2000. p.55-58.
- CARVALHO, A. Taxonomia de *Coffea arabica* L. Caracteres morfológicos dos haplóides. **Bragantia** 12 : 201-211, 1952.
- CHEN, Y. Anther and pollen culture in rice. In. : HU, H.; YANG, H., ed. **Haploids of higher plants in vitro**. Berlin: Springer –Verlag, p.3-25, 1986.
- COLOMBO, L. A. & SERA, T. Obtenção de cafeeiros haplóides (*C. arabica* L.) a partir de embriões gêmeos. In. : SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1, Poços de Caldas, 2000. **Anais...** Brasília: EMBRAPA/CNP&DCAFÉ, 2000.
- COUTURON, E. Obtention d'haploïdes spontanés de *Coffea canephora* Pierre par l'utilisation du greffage d'embryons. **Café Caçã Thé** (Paris), vol. XXVI, n.3, p.155-160, 1982.
- DUBLIN, P.; PARVAIS, J.P. Sur les premiers haploïdes spontanés découverts chez le *Coffea canephora* var. *robusta*. **Café Caçã Thé** (Paris), vol. XIX, n.3, p.191-196, 1975.
- FRANCO, C.M. Relação entre o número de estomas e números de cromossômios em *Coffea*. **Boletim Téc. Inst. Agron. Campinas** 66 : 1-16, 1939.
- HOU, L.; ULLRICH, S.E.; KLEINHOFS, A.; STIFF, C.M. Improvement of anther culture methods for doubled haploid production in barley breeding. **Plant Cell Reports**, v.12, p.334-338, 1993.
- LASHERMES, P.; COUTURON, E.; CHARRIER, A. Doubled haploids of *Coffea canephora*: development, fertility and agronomic characteristics. **Euphytica** 74 : 149-157, 1994.
- MENDES, A.J.T. Observações citológicas em *Coffea*: XI – Métodos de tratamento pela colchicina. **Bragantia** 7 : 221-230, 1947.
- 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.
- MOCHIZUKI, A.; SUEOKA, M. Genetic studies on the number of plastids in stomata. I. Effects of autopolyploidy in sugar beets. **Cytologia**, v.20, p.358-366, 1955.

MONACO, L.C.; SÖNDAHL, M.R.; CARVALHO, A. New technique for colchicine treatment of coffee seedlings. **Turrialba** 25 : 323-324, 1975.

NIIZEKI, H.; OONO, K. Rice plants obtained by anther culture. In.: COLLOQUES INTERNATIONAUX DU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, 193; 1970, Strasbourg. **Les cultures de tissus de plantes**. Paris: CNRS, p.251-257, 1971.

OUYANG, J. Induction of pollen plants in *Triticum aestivum*. In.: HU, H.; YANG, H., ed. **Haploids of higher plants in vitro**. Berlin: Springer - Verlag , p.26-41, 1986.