

DIFERENTES MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO DE CAFEIEIRO VISANDO A TRANSFORMAÇÃO GÊNICA

V.S Ribeiro¹; V.H.R.A Paiva¹; C. Frois¹; A.C. Junior¹ Universidade Federal de Lavras, Dep. de Biologia/Setor de Fisiologia Vegetal, Lavras, Brasil.

Vários modelos de circulação global preveem alterações nas condições atmosféricas atuais, sugerindo o aumento de temperatura e alterações no regime hídrico como na distribuição de chuvas e incremento de episódios de seca (IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007).

Tais eventos acarretarão problemas em diversas regiões do globo e afetarão fortemente aquelas onde a principal fonte de renda é a agricultura. Tais mudanças ocorrem rapidamente e afetam a produtividade e mesmo a sobrevivência de várias espécies. Reduções de produtividade têm sido relatadas em várias culturas, tais como café no sul de Minas Gerais, tendo por possíveis causas eventos de seca (White et al., 2004). O melhoramento de plantas visando tolerância à seca tem sido realizado utilizando-se de diversas técnicas. Uma delas é a transformação genética de plantas, que é um método a curto prazo para se obter plantas geneticamente melhoradas, uma vez que através do melhoramento convencional de espécies arbóreas como o café é longo e pode demorar cerca de 30 anos para liberar uma nova cultivar de café. Atualmente, existem diversas técnicas de transformação de plantas, sendo uma das mais utilizadas a transformação indireta, em que se utiliza de estirpes de *Agrobacterium* para a inserção do gene de interesse no DNA alvo. Apesar das vantagens oferecidas pelo método, para se estabelecer um sistema de transformação genética, são necessários explantes competentes, e um sistema de cultivo in vitro, que permite uma alta frequência de regeneração (Stein, 2009).

Para a transformação em cafeeiros é mais comumente utilizada a *Agrobacterium rhizogenes*, com inoculação via radícula. Já obtenção de explantes competentes é feita a partir da germinação de sementes in vitro. Porém sabe-se que no Brasil o período de colheita do café ocorre entre os meses de maio a setembro (Pimenta, 2005), não havendo a produção de sementes novas o ano todo. Por esse motivo armazenamento de sementes se faz necessário. Embora o armazenamento seja possível, estudos mostram que sementes armazenadas de café, por serem consideradas recalcitrantes, podem perder sua viabilidade de germinação, assim dificultando seu uso a longo prazo. Segundo Dias et al. (1993), sementes de café não conservam o poder germinativo em níveis satisfatórios em períodos de armazenagem superiores a seis meses. Entretanto, para Miranda et al. (1993), a semente de café perde rapidamente a sua viabilidade a partir do terceiro mês de armazenamento.

Robles (1983) ressalta a importância da propagação in vitro como uma ferramenta para a obtenção de exemplares de plantas. Dessa forma, com a perda da viabilidade das sementes de café, técnicas in vitro constituem uma alternativa para a germinação e obtenção de explantes para transformação.

Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar a viabilidade entre sementes de café (*Coffea arabica* L.) armazenadas e novas, sendo duas cultivares testadas (Catuaí IAC144 e Catiguá MG2), utilizando dois tipos diferentes de germinação (germinação por semente inteira e resgate de embrião), visando à obtenção de explantes para a transformação genética.

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Utilizou-se sementes de *Coffea arabica* L. das cultivares Catiguá – MG2 e Catuaí – IAC144. O armazenamento de sementes foi realizado no Setor de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, em câmara fria à 10±3°C e umidade relativa a 60%.

Foram utilizadas duas técnicas de propagação: germinação da semente inteira e resgate de embrião. Para a germinação com sementes inteiras foram utilizadas sementes recém colhidas e sementes armazenadas por 13 meses, da safra de 2012 (colheita em julho). O resgate de embrião foi realizado a partir de sementes recém colhidas e também de sementes armazenadas. Nestes experimentos utilizou-se sementes armazenadas durante 13 meses (lote de sementes colhidas em julho de 2012) e sementes recém colhidas da safra 2013.

Obtenção de explantes

Semente inteira

270 sementes recém colhidas foram germinadas sendo 136 sementes da cultivar Catuaí IAC144 e 134 sementes da cultivar Catiguá MG2. Para a desinfestação das sementes foram retirados os pergaminhos manualmente e lavadas com água destilada com uma gota de detergente. Em seguida foram colocadas no álcool 70% por 10 min, uma hora em hipoclorito de sódio a 2% e finalmente lavadas (3x) com água destilada autoclavada. As sementes foram distribuídas em 68 placas de petri esterilizadas (4 sementes por placa) contendo meio ½ MS (Murashige & Skoog, 1962) sem sacarose. A germinação e o crescimento foram realizados em B.O.D, temperatura entre 27 a 30°C no escuro durante 30 dias após a semeadura (DAS). O meio ½ MS foi feito a partir da diluição de MS (2.2g) e de phytigel (2.5g) em 1L de água destilada. Após a diluição o pH foi ajustado para 5,8 e autoclavado por 20 min e então vertido nas placas dentro do fluxo laminar.

Resgate de embrião

159 embriões de sementes armazenadas por 13 meses foram resgatados, sendo 72 da cultivar Catuaí IAC144 e 87 da cultivar Catiguá MG2. Também foram resgatados 120 embriões de sementes após 1 mês da colheita, sendo 60 de cada cultivar.

Para a desinfestação das sementes foram retirados os pergaminhos manualmente e deixadas em erlenmeyer com 150 ml de formol 1,6% durante 30 minutos e lavadas (3x) com água destilada autoclavada. Procedimento realizado dentro do fluxo laminar. Em seguida as sementes foram colocadas em 150 ml de solução de ácido bórico a 0,5% e deixadas no agitador a 120 rpm durante 72 horas.

Ao término da desinfestação foram retirados os embriões das sementes com o auxílio de pinças e espátula estéril e colocados em tubos de ensaio contendo 10ml de meio MS feito a partir da diluição de MS (4.4g), sacarose (30g) e de phytigel (2.5g) em 1L de água destilada. Após a diluição o pH foi ajustado para 5,8 e autoclavado por 20 min.

O crescimento foi feito em B.O.D nas mesmas condições descritas anteriormente. As sementes armazenadas foram crescidas por 120 dias após o resgate (DAR), enquanto as sementes recém colhidas durante 42 dias. Obteve-se dias diferentes de crescimento pois ocorreu oxidação das sementes recém colhidas, sendo necessário a espera por um novo lote.

Avaliação anatômica da plântula

O tamanho das plântulas (parte aérea e raiz) foi determinado com o auxílio de uma régua convencional. Subgrupos de plântulas foram formados segundo ao eixo do crescimento radicular em relação ao meio de cultura, havendo raízes que se alongaram na horizontal ou vertical

Resultados e discussão

Sementes da cultivar Catuai IAC144 recém colhidas tiveram eficiência média de germinação de 63.97%, enquanto da cultivar Catiguá MG2 foram obtidas 52.9%. Este foi o único tratamento de sementes inteiras que resultou na obtenção de plântulas, pois não houve germinação a partir de sementes armazenadas (armazenamento de 13 meses), provavelmente devido a contaminação por fungos que se desenvolveram durante o armazenamento, feito em geladeira convencional (dados não demonstrados).

O resgate de embrião de sementes recém colhidas aumentou a eficiência de germinação/obtenção de plântulas. Das 60 sementes recém colhidas de cada cultivar, 75% e 78.3% dos embriões das cultivares Catuai IAC144 e Catiguá MG2, foram respectivamente obtidos. Aproximadamente 30 dias após o resgate de embrião, plântulas das duas cultivares estavam aptas para a transformação genética (Fig. 3), pois apresentavam parte aérea e radículas bem definidas, podendo ser estabelecido o local de corte e inoculação.

Quando as sementes foram armazenadas em câmara fria por aproximadamente 13 meses, obteve-se uma eficiência de resgate de embriões de 72,2% dos 72 resgatados com a cultivar Catuai IAC144. No entanto, sementes de Catiguá MG2 armazenadas pelo mesmo período, apresentaram eficiência do resgate de embriões de 41,37% dos 87 resgatados. Esta redução de obtenção de plântulas pode estar ligada à contaminação de meio de cultura durante o crescimento. Assim como para plântulas obtidas de sementes recém colhidas, o resgate de embriões de sementes armazenadas também proporcionou plântulas aptas à transformação cerca de 30 dias após o resgate dos embriões (Fig. 4), demonstrando que a técnica é válida para ambos os tratamentos.

O tamanho médio das plântulas obtidas por resgate de embrião foi superior no tratamento de sementes armazenadas (Fig. 1). Este resultado advém provavelmente da diferença de tempo de crescimento em meio de cultura de cada tratamento, pois as plantas oriundas de sementes armazenadas cresceram durante 120 dias enquanto as novas por 46 dias.

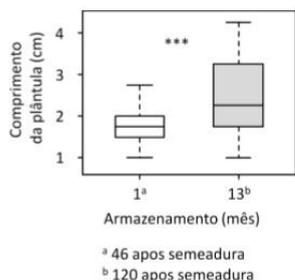


Figura 1 -Boxplot representando o comprimento total (parte aérea e raiz) de todas plântulas obtidas reagrupando plantas com raízes crescidas no eixo vertical e horizontal com relação ao meio de cultura. Houve diferença entre os tamanhos das plântulas entre sementes armazenadas e novas devido a diferença entre os dias de crescimento (a, b).

Não foram observadas diferenças entre as médias de tamanho das plântulas das duas cultivares testadas (Fig. 2). Embora a diferença de eficiência de germinação, o crescimento das plântulas foi similar para ambas as cultivares, o que indica possivelmente um vigor semelhante entre as mesmas. O mesmo acontece com germinação de aveia como demonstra SCHUCH et. al., 1999, em que se utiliza o comprimento da raiz para determinar diferenças de vigor.

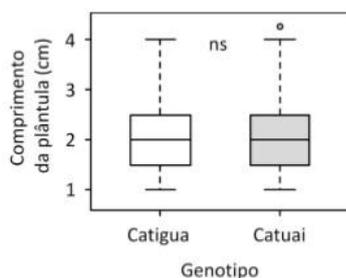


Figura 2-Boxplot representando o comprimento total (parte aérea e raiz) de todas plântulas obtidas, reagrupando plantas com raízes crescidas no eixo vertical e horizontal com relação ao meio de cultura. Não foram observadas diferenças significativas (ns) entre as cultivares testadas (Catuai IAC144 e Catiguá MG2).

Plântulas com o eixo de crescimento na vertical em relação ao meio cresceram mais do que aquelas com orientação horizontal (Fig.3). Isso possivelmente está ligado ao efeito de gravitropismo positivo ocorrido em

plântulas com crescimento voltado horizontalmente, pois a auxina se distribui na parte inferior da raiz deixando seu crescimento mais lento (Taiz e Zeiger, 2004).

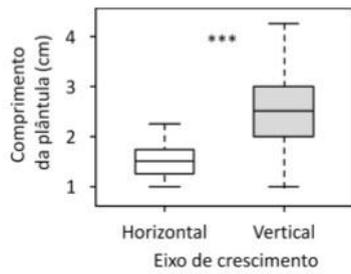


Figura 3 -Boxplot representando o comprimento total (parte aérea e raiz) de todas plântulas obtidas. Foram observadas diferenças entre os tamanhos de plântulas crescidas horizontalmente e verticalmente devido ao efeito de gravitropismo positivo.

A análise do eixo de crescimento da radícula entre as sementes armazenadas e novas demonstram uma semelhança em relação ao crescimento horizontal, indicando uma redução de crescimento (Fig.4 e 5). Tal fato é observado nas duas cultivares possibilitando uma análise fisiológica de crescimento causada por geotropismo. No caso das crescidas verticalmente, observa-se diferenças entre os tratamentos, pois os dias de crescimento foram diferentes. Assim demonstrando que as plântulas com dias a mais de crescimento tiveram um maior tamanho.

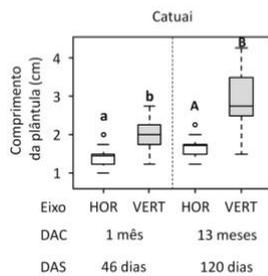


Figura 4 - Boxplot representando o comprimento total (parte aérea e raiz) de plântulas obtidas. Foram observadas diferenças entre os tamanhos de plântulas crescidas verticalmente entre sementes armazenadas e novas. Observa-se semelhança entre as crescidas horizontalmente em relação ao meio devido ao efeito do gravitropismo positivo - DAC Dias Após a Colheita. DAS dias após sementeira.

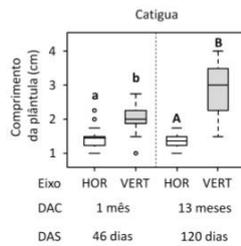


Figura 5 -Boxplot representando o comprimento total (parte aérea e raiz) de plântulas obtidas. Foram observadas diferenças entre os tamanhos de plântulas crescidas verticalmente entre sementes armazenadas e novas. Observa-se semelhança entre as crescidas horizontalmente em relação ao meio devido ao efeito do gravitropismo positivo - DAC Dias Após a Colheita. DAS dias após sementeira.