

VARIABILIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE *COFFEA ARABICA* EM RESPOSTA À PRESENÇA DO AL NO SISTEMA RADICULAR

Ariane de Lima Eiras^{1*}, Paula Macedo Nobile³, Paulo Boller Gallo⁴, Julio C. Mistro^{2b}, Walter José Siqueira^{2c}, Carlos Augusto Colombo^{2a}

¹ Mestranda, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Campinas, SP, arianeeiras@hotmail.com

^{2a} Pesquisador, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Campinas, SP, ccolombo@iac.sp.gov.br

^{2b} Pesquisador, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Campinas, SP, walterjs@iac.sp.gov.br

^{2c} Pesquisador, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Campinas, SP, mistrojc@iac.sp.gov

³ Pesquisadora, Centre INRA D' Angers Génétique et Horticulture (GenHort), Angers, France, paulanobile@yahoo.com

⁴ Pesquisador, APTA - Pólo Regional Nordeste Paulista, paulogallo@aptaregional.sp.gov.br.

* autor para correspondência

RESUMO: As principais regiões produtoras de café no Brasil estão localizadas em solos ácidos, que possuem teores de alumínio trocável (Al^{+3}) em quantidades suficientes para alterar o crescimento de muitas espécies de plantas cultivadas. O alumínio atua primariamente no sistema radicular das plantas retardando o crescimento e o desenvolvimento deste, promovendo a diminuição do número de raízes laterais, as principais responsáveis pela absorção de água e nutrientes, e o comprometimento da produção vegetal. Embora exista um número razoável de pesquisas a respeito dos efeitos tóxicos do alumínio e dos mecanismos de tolerância a este íon em várias plantas de valor econômico, poucos são os trabalhos que relatam seus efeitos na planta e genética molecular do cafeeiro. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo a identificação de genótipos de café sensível e tolerante ao Al para que estas possam ser utilizadas em estudos posteriores de expressão diferencial e identificação de genes potencialmente relacionados à tolerância desta cultura a este íon. Para isto, cinco cultivares economicamente importantes de *Coffea arabica* foram crescidas em meios nutritivos com 0,000mM, 0,075mM e 0,370mM de $AlCl_3$. Dentre as variedades estudadas, Obatã IAC 1669-20 e Catuaí Amarelo IAC 62 mostraram maior tolerância, enquanto Icatu IAC 4045 mostrou maior sensibilidade ao Al. Os resultados obtidos reforçam a toxicidade do Al no sistema radicular do cafeeiro e a existência de uma variabilidade genética de *Coffea arabica* relacionada a tolerância ao íon em questão.

Palavras-chave: *café*, alumínio, tolerância, melhoramento de plantas

GENETIC VARIABILITY OF *COFFEA ARABICA* GENOTYPES IN RESPONSE TO THE PRESENCE OF AL IN THE ROOTS

ABSTRACT: The main coffee producing areas in Brazil are located in acid soils, which have exchangeable aluminium (Al^{+3}) tenors in sufficient quantities to alter the growth of many species of cultivated plants. The aluminium acts first in the root system delaying its growth and development, promoting the reduction of lateral roots number, the main responsible for water and nutrients absorption, and damages in vegetable production. Although there is a reasonable number of researches about aluminium toxic effects and mechanisms of tolerance to this ion in several agronomical plants, few works report its effects on coffee plant and molecular genetics. Therefore, the aim of this work is to identify Al sensitive and tolerant genotypes of coffee to be used in subsequent studies of differential expression and identification of Al tolerance related genes. In this context, five economically important *Coffea arabica* cultivars were grown in nutrient solutions containing 0,000mM, 0,075mM and 0,370mM of $AlCl_3$. Among the studied genotypes, Obatã IAC 1669-20 and Catuaí Amarelo IAC 62 showed to be the most tolerant, while Icatu IAC 4045 the most sensible variety to Al toxicity. The obtained results reinforce the Al toxicity in coffee root system and the existence of a genetic variability into *Coffea arabica* genotypes related to Al tolerance.

Key words: *coffee*, aluminium, tolerance, plant breeding

INTRODUÇÃO

O Café é uma importante fonte de renda para a economia brasileira por sua participação na receita cambial, pela transferência de renda aos outros setores da economia, contribuição à formação de capital no setor agrícola do país, além da expressiva capacidade de absorção de mão-de-obra. A produção do café e de outras culturas no país é consideravelmente afetada pelos solos ácidos, os quais abrangem cerca de 70% das áreas disponíveis para agricultura e possuem teores de alumínio trocável (Al) em quantidades suficientes para alterar o crescimento de muitas espécies de plantas cultivadas.

O sintoma mais evidente da toxidez do Al disponível nos solos ácidos é a inibição do crescimento do ápice radicular e das raízes secundárias resultando em um sistema radicular com desenvolvimento superficial e ramificação inadequada. Este sistema é capaz de explorar um volume limitado de solo, tornando-se ineficaz na absorção de água e nutrientes, o que causa uma significativa redução no crescimento da planta como um todo (Rao et al., 1993; Taylor, 1988). Assim

como os mecanismos de toxidez, os mecanismos de resistência ao Al ainda não estão claramente compreendidos. Porém, várias hipóteses baseadas em diferentes evidências foram desenvolvidas e podem ser divididas em dois grupos: mecanismos de resistência ou exclusão, os quais ocorrem no exterior da célula e impedem a entrada do Al, protegendo os sítios intracelulares sensíveis ao ataque deste íon; e mecanismos de tolerância, os quais ocorrem no interior da célula e são baseados na imobilização, compartimentalização ou detoxificação do Al (Kochian et al., 2004).

Embora exista um número razoável de pesquisas a respeito dos efeitos tóxicos do alumínio e dos mecanismos de tolerância a este íon em várias plantas de valor econômico, poucos são os trabalhos que relatam seus efeitos na planta e que facilitem a identificação do perfil de transcrição de genes envolvidos em resposta a este tipo de estresse no cafeeiro, quando há interesse nessa abordagem de estudo. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo a identificação de genótipos de café sensível e tolerante ao Al para que estas possam ser utilizadas em estudos posteriores de expressão diferencial e identificação de genes potencialmente relacionados à tolerância desta cultura a este íon.

MATERIAL E MÉTODOS

Germinação e aclimação

Trezentas sementes de cada genótipo de *Coffea arabica* analisado (Obatã IAC 1669-20, Tupi IAC 4993, Mundo Novo MP 38817-1, Catuaí Amarelo IAC 62, Icatu vermelho IAC 4045), procedentes do Pólo Regional do Nordeste Paulista (Mococa) do IAC, foram embebidas em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 5% durante 6 horas para remoção do pergaminho (Meireles et al., 2007). Depois de descascadas, as sementes foram tratadas com fungicida Tyran 70% PS (0,2% do peso das sementes), colocadas em papel de germinação - autoclavados e umedecidos com água destilada autoclavada - e mantidas em B.O.D. a 30°C na ausência de luz. Quando suas raízes apresentaram aproximadamente 3cm de comprimento, 100 plântulas de cada cultivar foram transferidas para solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) sem Al e modificada de acordo com Braccini et al., 1998; onde ficaram durante 24 horas para aclimação a 24°C e fotoperíodo de 16 horas.

Teste de hidroponia com Al

Após aclimação, foram adicionados 0,000mM, 0,075mM e 0,370mM de $AlCl_3$ às soluções nutritivas. As plântulas foram mantidas a 24°C sob fotoperíodo de 16hs por um período de 8 dias. O pH da solução nutritiva foi ajustado diariamente com HCl 0,1 mol.L⁻¹ ou NaOH 0,1 mol.L⁻¹ para 4,2. Os genótipos que apresentaram maior e menor crescimento radicular foram escolhidos para os ensaios futuros de expressão subseqüentes na condição de variedades tolerante e sensível, respectivamente.

Crescimento do sistema radicular

O crescimento do sistema radicular foi avaliado pelos seguintes parâmetros:

- Crescimento total da raiz principal: $CT = C_{8\text{dias}} - C_{\text{inicial}}$
- Número de raízes secundárias
- Crescimento relativo da raiz (CRR), o qual será calculado de acordo com Mao et al., 2004:

$$CRR = (T_{Al} - T_{\text{inicial}}) / (C_{\text{controle}} - C_{\text{inicial}})$$
 onde T e C se referem à medida do comprimento da raiz sob estresse por Al e sem adição de Al, respectivamente.
- Número relativo de raízes secundárias = $(N_{Al} - N_{\text{inicial}}) / (D_{\text{controle}} - D_{\text{inicial}})$, onde N e D se referem à medida do número de raízes laterais sob estresse por Al e sem adição de Al, respectivamente.

Análises estatísticas

O delineamento adotado foi inteiramente casualizado com disposição fatorial de cultivares e doses de Al^{+3} como causas de variação. As parcelas foram constituídas de 9 potes com 10 plantas cada para cada cultivar analisado e os caracteres avaliados foram crescimento total e relativo da raiz e número de raízes laterais entre os genótipos. O contraste entre as médias foi realizado utilizando-se Tukey a 5%. A presença ou não de interação foi determinada pelo teste F da análise de variância. As análises estatísticas foram realizadas no programa SANEST (Machado e Zonta, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variável crescimento relativo de raiz (CRR), com CV% de 17,9, foi a que melhor respondeu ao tratamento das plântulas submetidas aos diferentes níveis de Al^{+3} no sistema radicular. Ou seja, a variável número de raízes (NR) (CV%=13,3) não sofreu variações que puderam ser detectadas pelo teste de médias realizado (Tukey) ao nível de 5% de probabilidade de erro. Portanto, para as análises de diferenciação dos genótipos em relação à toxidez por Al^{+3} , apenas a primeira variável foi considerada. Dentre os genótipos estudados, a Obatã IAC 1669-20 apresentou o maior crescimento relativo da raiz (CRR) nas duas concentrações de Al analisadas (Figura 1, B), não diferindo significativamente uma da outra. A cultivar Catuaí Amarelo IAC 62, na concentração de maior toxidez de Al^{+3} (0,370mM), exibiu o segundo maior CRR (Figura 1, B). Da mesma forma que Obatã, esse genótipo não apresentou diferenças de crescimento relativo de raízes nas doses de 0,074 e 0,370mM de Al, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Além disso, Catuaí Amarelo IAC 62 apresentou aumento significativo do número de ramificações laterais (Figura 1, C e D). Por outro lado, a cultivar Icatu IAC 4045 obteve uma redução significativa do crescimento total e relativo sob tratamento com 0,370mM

de Al^{+3} (Figura 1, A e B), ocorrendo diferenças significativas (5% de probabilidade de erro) de redução do crescimento de raiz quando a concentração do íon Al^{+3} passou de 0,074 para 0,37mM.

Os resultados obtidos demonstram que os genótipos Obatã IAC 1669-20 e Catuaí Amarelo IAC 62 foram os menos afetados pelo Al^{+3} , portanto mais tolerantes a este íon; enquanto que Icatu IAC 4045 foi a mais afetada e, portanto, a mais sensível dentre os genótipos analisados.

Diante do acima exposto, os genótipos Catuaí Amarelo IAC 62 e Icatu IAC 4045 foram escolhidos como os mais tolerante e sensível, respectivamente, para serem utilizadas em estudos posteriores de expressão diferencial e identificação de genes potencialmente relacionados à tolerância desta cultura ao estresse abiótico causado por Al^{+3} .

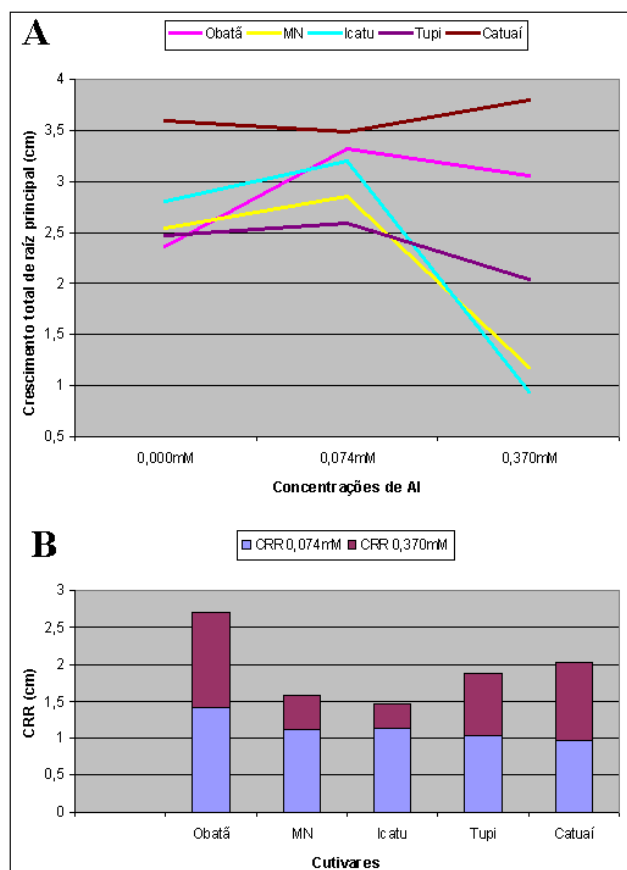


Figura 1. (A) Crescimento total de raiz das cultivares sob tratamento com Al. (B) Crescimento relativo das cultivares sob tratamento com Al.

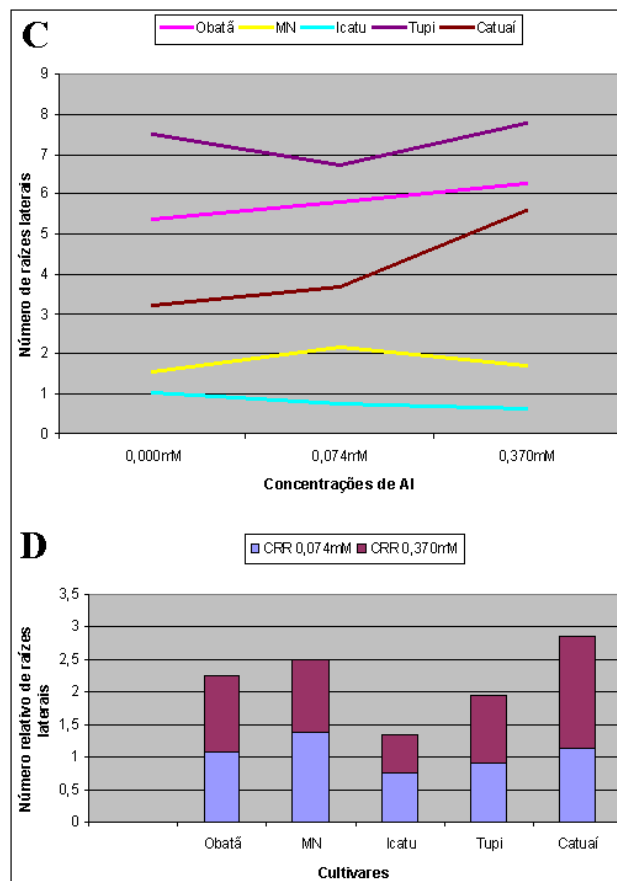


Figura 2. (A) Número total de raízes laterais sob tratamento com Al. (B) Número relativo de raízes laterais sob tratamento com Al.

CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho são preliminares e fundamentais para os trabalhos subsequentes de expressão gênica visando a descoberta de genes potencialmente relacionados à tolerância do cafeeiro ao Al. A descoberta de tais genes ampliará o conhecimento sobre os mecanismos de tolerância da cultura em questão ao Al, como também abrirá perspectivas para a utilização dos genes relacionados à tolerância em projetos de seleção assistida e/ou ensaios de plantas transgênicas visando à produção de plantas mais tolerantes a solos ácidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hoagland, DR & Arnon, DI. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley. Cal. Agric. Exp. Station, 1950.347p.
- Kochian LV, Hoekenga OA, Piñeros MA. 2004. How do crop plants tolerate acid soils Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. Annual Review of Plant Biology. Vol. 55: 459-493.
- Machado AA, Zonta EP. 1995. Manual do SANESP: Sistema para análise estatística para microcomputadores. Pelotas, UFPel, 102 p.
- Mao CZ, Yi KK, Yang L, Zheng BS, Wu YR, Liu FY, Wu P. 2004. Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes form the metabolism of cell wall components. Journal of Experimental Botany. Volume 55, nº. 394, p. 137-143.

- Meirelles RC, Araujo EF, Reis MS, Sedyama CS, Sakiyama NS, Reis LS. 2007. *Revista Brasileira de Sementes*. Vol. 29, n° 3, p. 90-96.
- Rao KS, Rao BS, Vishnuvardhan D, Prasad KV. 1993. Alteration of superhelical state of DNA by aluminium (Al). *Biochim Biophys Acta*;1172 (1-2): 17-20.
- Taylor, G.J. 1988. The physiology of aluminum phytotoxicity. In *Metal Ions in Biological System. Aluminum and Its Role in Biology*, Vol. 24. Edited by Sigel, H. and Sigel, A. pp. 123–163. Marcel Dekker, New York, EUA.