

## INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS EM *Coffea arabica* L. CV. CATUAÍ AMARELO<sup>1</sup>

Ana Cristina de Souza<sup>2</sup>; Renato Paiva<sup>3</sup>; Michele Valquíria dos Reis<sup>4</sup>; Milene de Figueiredo Carvalho<sup>4</sup>; Luciano Coutinho Silva<sup>5</sup>; Diogo Pedrosa Corrêa da Silva<sup>7</sup>; Fernanda Carlota Nery<sup>8</sup>; Thais Silva Sales<sup>9</sup>; Stella Veiga Franco da Rosa<sup>10</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

<sup>2</sup> Doutoranda, MS, UFLA, Lavras, MG, acstina17@posgrad.ufla.br

<sup>3</sup> Professor, PhD, UFLA, Lavras, MG, renpaiva@dbi.ufla.br

<sup>4</sup> Pós-Doutoranda, DsC, UFLA, Lavras, MG, mvreis@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Pesquisadora, Embrapa Café, DsC, Lavras, MG, milene.carvalho@embrapa.br

<sup>6</sup> Professor DSc, UFPB, João Pessoa, PB, lucotsilva@yahoo.com.br

<sup>7</sup> Pós-Doutorando, DsC, UFLA, Lavras, MG, pedrosacorrea@yahoo.com.br

<sup>8</sup> Professora DSc, UFSJ, São João del Rei, fernandacarlota@ufs.edu.br

<sup>9</sup> Pesquisadora, MS, UFLA, Lavras, thaisinha-sales@hotmail.com

<sup>10</sup> Pesquisadora, Embrapa Café, DsC, Lavras, MG, sttela.rosa@embrapa.br;

**RESUMO:** O cafeeiro (*Coffea* sp.) é um arbusto pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*. O grande valor comercial do *Coffea arabica* é devido ao fato de seus grãos apresentarem sabor mais pronunciado e refinado. A embriogênese somática é um importante método de multiplicação em larga escala de plantas *in vitro* e pode maximizar a propagação do cafeeiro. Além disso, apresenta aplicações práticas para estudos de desenvolvimento embriológico e como técnica conjunta aos trabalhos de transformação genética de plantas. Várias pesquisas de cultivo *in vitro* já foram desenvolvidas com a espécie, entretanto, existe uma grande variedade de cultivares carentes deste tipo de estudo. O objetivo deste trabalho foi de indução de calos embriogênicos em *Coffea arabica* L. cv Catuaí Amarelo. Plântulas de cafeeiro Catuaí Amarelo cultivadas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes. As folhas foram excisadas (1 cm<sup>2</sup>), pequenos cortes foram feitos na nervura central para indução de calos e os explantes foram inoculados com o lado abaxial voltado para o meio de cultivo MS com metade da concentração dos sais, 10 µM de Cinetina e diferentes concentrações (0, 2,5, 5, 10 e 20µM) do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Os explantes foram mantidos em sala de crescimento, no escuro e com temperatura de 25 ± 2 °C. Após 45 dias de cultivo, a porcentagem de formação de calos e formação de raízes foram avaliados e os dados submetidos à ANOVA. A formação de calos e de rizogênese foi significativa ( $p < 0.001$ ). O uso de 2,5 µM e 10 µM de 2,4-D promoveram maiores porcentagens de formação de calos em 51% dos explantes. Ocorreu a formação de rizogênese quando utilizado 2,5 µM ou ausência de 2,4 D. O tratamento com 10 µM de 2,4-D é o mais indicado para a indução de calos em explantes foliares da cultivar Catuaí Amarelo.

**PALAVRAS CHAVES:** Calogênese, cultivo *in vitro*, Auxina, café.

## INDUCTION EMBRYOGENIC CALLI IN *Coffea arabica* L. CV. CATUAÍ AMARELO

**ABSTRACT:** The coffee (*Coffea* sp.) is a shrub belonging to the Rubiaceae family and the genus *Coffea*. The great commercial value of *Coffea arabica* is due to the fact that their grain showing more pronounced and refined taste. Somatic embryogenesis is an important method of multiplying large-scale plants *in vitro* and can maximize the spread of coffee. It also presents practical applications for embryonic development studies and as joint technical work to genetic transformation of plants. Several *in vitro* culture of research has been developed with the species; however, there is a wide variety of cultivars lacking this type of study. The objective of this study was induction of somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. cv Catuaí Yellow. Coffee plantlets Catuaí Yellow cultured *in vitro* were used as a source of explants. Leaves were excised (1 cm<sup>2</sup>), small cuts were made in the central rib for callus induction and the explants were inoculated with the abaxial side to MS medium with half the concentration of the salts, 10 mM of various concentrations of kinetin and (0, 2.5, 5, 10 and 20µM) of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The explants were maintained in growth room, in the dark and at a temperature of 25 ± 2 °C. After 45 days of culture, the percentage of formation of embryogenic callus and rizogenesis were evaluated and the data submitted to ANOVA. Callus formation and root formation was significant ( $p < 0.001$ ). The use of 2.5 µM and 10 µM of 2, 4-D promoted greater percentage callus formation in 51% of explants. There was rooting formation when used 2.5 µM or absence of 2.4 D. The treatment with 10 µM of 2,4-D is the most appropriate for the induction of callus of leaf explants of Catuaí Amarelo.

**KEYWORDS:** Calogenesis, *in vitro* culture, Auxin.

## INTRODUÇÃO

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea* L. A espécie *Coffea arabica* L. tem grande valor comercial no mercado devido ao fato de seus grãos apresentarem propriedades organolépticas mais pronunciadas e refinadas (EL-ABASSY; DONFACK; MATERNY, 2011). O café é largamente cultivado em países tropicais, tanto para consumo próprio como para exportação. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, seguido pelo Vietnã e a Colômbia (OLIVEIRA, 2012). Pesquisas sobre o cafeeiro nas diversas áreas são importantes para o país. Com relação ao cultivo *in vitro*, vários estudos já foram desenvolvidos com a espécie, porém devido à grande variedade de cultivares existentes ainda há muito a ser estudado. A embriogênese somática pode ser definida como o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estágios embriogênicos originando uma nova planta sem que ocorra a fusão de gametas (PINHAL et al., 2011), possui várias aplicações práticas, como utilização como modelo em estudos de desenvolvimento embrionário, formação de bancos de germoplasma através da criopreservação, propagação clonal em larga escala, além de ser utilizada para transformação genética (VON ARNOLD et al., 2002). Dois tipos de embriogênese somática podem ocorrer, a direta e a indireta. O termo embriogênese somática direta é aplicado a explantes que passam por uma mínima proliferação antes da formação dos embriões, já a embriogênese indireta acontece quando antes da formação do embrião ocorre uma proliferação intensiva do explante formando uma massa celular não diferenciada, denominada de calo (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). A embriogênese somática em cafeeiro foi descrita pela primeira vez na espécie *Coffea canephora* por Staritsky (1970) e na espécie *Coffea arabica* L. por Söndahl e Sharp (1977), e desde então tem sido estudada por diversos pesquisadores (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002; GEORGE; HALL; KLERK, 2008). Protocolos já foram desenvolvidos para a cultivar Arábica, desde estudos com apenas uma etapa antes da obtenção dos embriões até protocolos mais complexos envolvendo etapas sequenciais e diferentes meios de cultura (SANTANA-BUZZY et al., 2007).

## MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *Coffea arabica* c.v. Catuaí Amarelo utilizadas nos experimentos foram adquiridas na fazenda experimental Procafé em Varginha. Após a retirada do pergaminho, as sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar utilizando-se álcool 70% por um minuto e hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 minutos, em seguida foi feita a tríplice lavagem das sementes em água destilada e autoclavada. Para a germinação *in vitro*, foi utilizado o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 0,09 M de sacarose e solidificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH do meio ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C, com irradiância de fótons de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Para a indução dos calos embriogênicos foram utilizadas folhas cotiledonares de plântulas germinadas *in vitro*. Após a excisão da planta mãe, as folhas foram divididas em fragmentos de 1 cm<sup>2</sup>, sendo que em cada fragmento foram feitos pequenos cortes para aumentar o contato da folha com o regulador de crescimento. Em seguida, os fragmentos da folha foram inoculados com a face abaxial em contato com o meio de cultura MS/2 suplementado com 10 μM de cinetina e diferentes concentrações de 2,4D (0, 2,5; 5, 10 e 20 μM). Foram feitas avaliações para formação de calos e raízes após 45 dias de cultivo na ausência de luz. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 30 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de um tubo de ensaio com um explante. Com o *software* Sisvar (Ferreira, 2011), os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas diferenças significativas para a formação de calos ( $p < 0,05$ ) com uma média geral de 40%. Maior porcentagem de formação de calos 51%, foi observada quando da utilização de 2,5 e 10 μM de 2,4-D. Na ausência do regulador de crescimento 2,4-D foi observada uma pequena formação de calos apenas de 10%. (Figura 1).

As auxinas são capazes de iniciar a divisão celular e controlar os processos de crescimento e alongação celular, sendo o 2,4-D a auxina mais frequentemente utilizada na indução de calogênese respondendo positivamente em explantes foliares (NOGUEIRA et al., 2007). Como a indução de calo é dependente de um balanço hormonal de auxinas e citocininas, no caso deste estudo, provavelmente, o fornecimento da auxina 2,4 D foi suficiente para uma porcentagem superior de indução de calos, já que somente o fornecimento da citocinina cinetina (controle) ocasionou uma pequena porcentagem de formação de calos indicando que provavelmente o nível endógeno de auxina foram suficientes para ocasionar esta resposta. Neste experimento, pôde-se observar o surgimento de raízes em alguns dos tratamentos testados. Com média geral de 28% dos explantes apresentando raízes. O uso de baixas concentrações ou ausência de auxinas proporcionaram o surgimento de raízes em explantes foliares de Catuaí Amarelo (Figura 2).

Auxinas têm reconhecidamente, efeito positivo no início da formação de raízes por estimular a diferenciação celular e o acúmulo de auxinas endógenas ou exógenas induz à formação de raízes (Soares et al., 2007; Laskowski et al., 2008). Provavelmente para a espécie em estudo o balanço hormonal endógeno seja suficiente para ocasionar essa resposta, sendo que concentração de 2,5 μM e ausência de auxina propiciaram a formação de raízes. Acima da concentração de 2,5 μM não há o efeito da auxina exógena para a rizogênese.

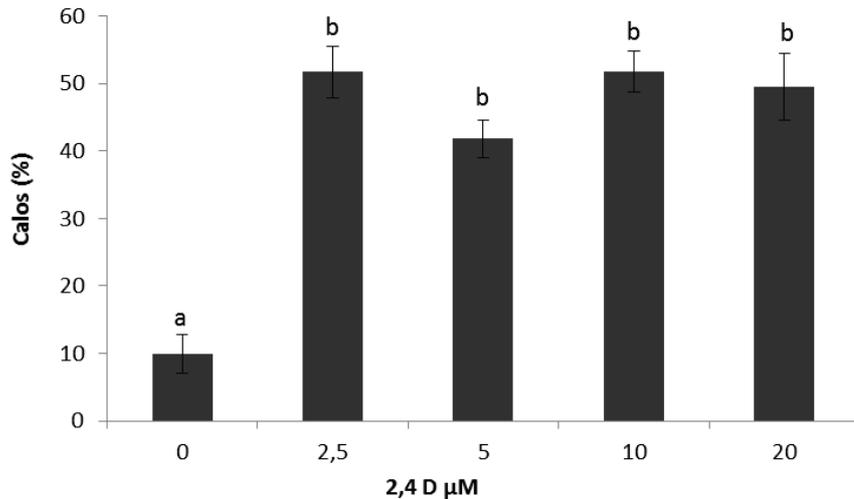


Figura 1. Porcentagem da formação de calos em explantes foliares de Catuaí Amarelo em diferentes concentrações de 2,4 D. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

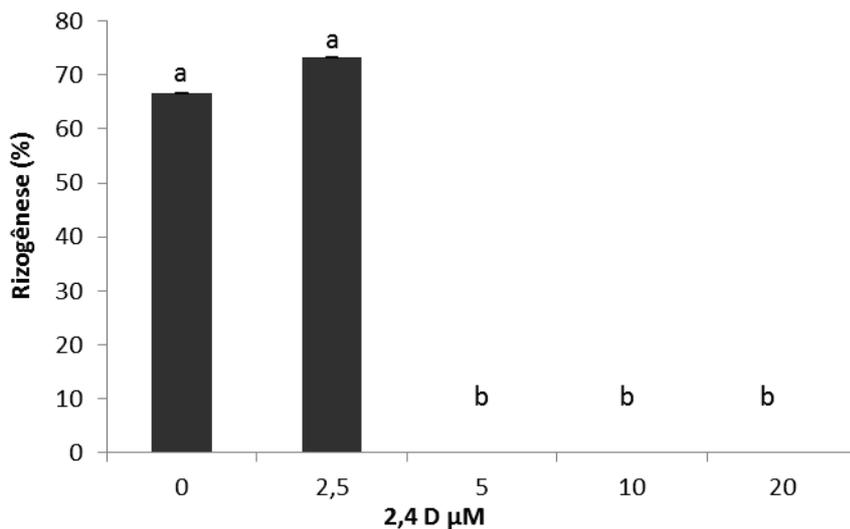


Figura 2. Porcentagem de rizogênese em explantes foliares de Catuaí Amarelo em diferentes concentrações de 2,4 D. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

## CONCLUSÕES

1. Maiores porcentagens de formação de calos foram obtidos na presença da auxina 2,4 D.
2. Concentrações de 2,5  $\mu\text{M}$  2,4 D ou ausência de auxina ocasionou a formação de rizogênese.
3. Para indução de calos embriogênicos de Catuaí Amarelo, recomenda-se o uso de 10  $\mu\text{M}$  de 2,4 D. Uma vez que esta concentração apresentou maiores porcentagens de formação de calos sem a presença de rizogênese.

## AGRADECIMENTOS

EMBRAPA pelo financiamento do projeto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EL-ABASSY, R. M.; DONFACK, P.; MATERNY, A. Discrimination between Arabica and Robusta green coffee using visible micro Raman spectroscopy and chemometric analysis. *Food Chemistry* 126:1443-1448 (2011).
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35:1039-1042 (2011).
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. (2008). *Plant propagation by tissue culture* 3th. ed.

- LASKOWSKI, M. et al. Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *Plos Biol* 6:2721-2735(2008).
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology. Plant.* 15:473-497.
- OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L. C.; MOURA, C. S. F. T. Cultura do Café: histórico, classificação e fases de crescimento. *Revista Faculdade Montes Belos*, 5:17-32. (2012).
- PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos em fruteiras do Cerrado. *Ciência Rural* 41: 1136-1142. (2011).
- QUIROZ-FIGUEROA, F. R. et al. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports* 20:1141-1149. (2002).
- SANTANA-BUZZY, N. et al. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 43:507-520. (2007).
- SHARP, W. R. et al. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Horticultural Reviews* 2:268-310. (1980).
- SOARES, F. P. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Ciência e Agrotecnologia* 31:1048-1053. (2007).
- VON ARNOLD, S. et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 233-249. (2002).