

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VITRO* DE HÍBRIDOS DE *COFFEA*
CANEPHORA POR MEIO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

***IN VITRO* VEGETATIVE PROPAGATION OF *COFFEA* *CANEPHORA* HYBRIDS
BY SOMATIC EMBRYOGENESIS**

Maurício Reginaldo Alves dos Santos¹; Ana Carla Soares da Silva¹

¹Laboratório de Biotecnologia Vegetal/Embrapa Rondônia/Porto Velho-RO, Brasil

Autor correspondente: mauricio.santos@embrapa.br

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi otimizar condições para a propagação vegetativa *in vitro* de 15 híbridos das variedades botânicas Conilon e Robusta de *Coffea canephora*. Fragmentos de folhas de 15 híbridos foram submetidos a diferentes reguladores de crescimento – 2iP, BAP e AIB. Explantes foliares foram inoculados em meio de cultura suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2iP, 1,1 mg L⁻¹ de BAP ou 1,0 mg L⁻¹ de 2iP + 5,0 mg L⁻¹ de AIB. Todos os 15 híbridos responderam a uma ou mais das três suplementações hormonais testadas. 2iP e a combinação 2iP + AIB foram significativamente superiores ao BAP quanto à porcentagem de explantes embriogênicos. Em relação ao número de embriões cotiledonares, 2iP + AIB foi mais eficaz do que BAP ou 2iP isoladamente, chegando a produzir 46 embriões por explante. 56 dias após inoculação dos explantes foram identificados embriões globulares; embriões cordiformes aos 69 dias; embriões torpedo aos 76 dias; e embriões cotiledonares aos 82 dias de cultivo.

Palavras-chave: Cultura de tecidos vegetais. Embriões somáticos. Híbridos. Conilon. Robusta.

ABSTRACT

The objective of this research was to optimize conditions for *in vitro* vegetative propagation of 15 hybrids of Conilon and Robusta botanical varieties of *Coffea canephora*. Fragments of leaves of 15 hybrids were submitted to different growth regulators – 2iP, BAP and IBA. Leaf explants were inoculated in culture medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ 2iP, 1.1 mg L⁻¹ BA or 1.0 mg L⁻¹ 2iP + 5.0 mg L⁻¹ IBA. All 15 hybrids responded to one or more of the three hormonal supplementations tested. 2iP and the combination 2iP + AIB were significantly higher than BAP in the percentage of embryogenic explants. Regarding the number of cotyledonary embryos 2iP + AIB was more effective than BAP or 2iP alone, producing 46 embryos per explant. 56 days after explant inoculation, globular embryos were identified; heart-shaped embryos at 69 days; torpedo embryos at 76 days; and cotyledonary embryos at 82 days of cultivation.

Keywords: Plant tissue culture. Somatic embryos. Hybrids. Conilon. Robusta.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner possui duas variedades botânicas distintas que são cultivadas comercialmente – Robusta e Conilon. Robusta se caracteriza pelo crescimento ereto, folhas maiores, maturação tardia, menor tolerância à seca e alta resistência a pragas e doenças. Conilon tem crescimento arbustivo, maturação precoce, maior tolerância à seca e grande susceptibilidade a pragas e doenças [1].

A partir do cruzamento entre estas variedades, amplia-se a variabilidade genética, o que possibilita a obtenção de híbridos que reúnem características desejáveis de ambas e que apresentam alto desempenho agrônomico devido à ocorrência de heterose [2].

Híbridos de *C. canephora* vêm sendo propagados vegetativamente *in vitro* por meio da embriogênese somática, técnica que permite a multiplicação rápida e em larga escala [3, 4]. De acordo com Hervé et al. [4], células vegetais não diferenciadas ou totalmente diferenciadas podem ser facilmente cultivadas *in vitro* para gerar células embriogênicas não diferenciadas, as quais podem regenerar plantas inteiras, o que é a mais espetacular expressão da totipotência. Assim, células embriogênicas representam um material chave na biotecnologia vegetal, pois podem ser utilizadas visando à reprodução assexuada por embriogênese somática. No entanto, a utilização dessa técnica depende da determinação das concentrações de reguladores de crescimento mais adequada para cada material genético [5].

Visando subsidiar a manipulação desse recurso genético, o objetivo deste trabalho foi otimizar condições para a propagação vegetativa *in vitro* de 15 híbridos interespecíficos provenientes da hibridação entre as variedades Conilon e Robusta.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram conduzidos experimentos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia, em Porto Velho-RO, para avaliação da embriogênese somática em relação à suplementação do meio de cultivo com os reguladores de crescimento isopenteniladenina (2iP), benzilaminopurina (BAP) e ácido indolbutírico (AIB) para 15 híbridos das variedades botânicas Conilon e Robusta. Estes reguladores foram escolhidos devido ao fato de já terem sido testados com sucesso para a indução de embriões somáticos em outros genótipos da espécie [6, 7, 8].

Explantes foliares foram coletados do segundo par de folhas de ramos ortotrópicos em plantas de cada material genético, lavados com esponja e detergente sob água corrente, desinfestados por imersão em hipoclorito de sódio (2,4% de cloro ativo, por cinco minutos) e enxaguados três vezes em água destilada autoclavada. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo meio de cultivo com vitaminas de Morel, metade dos sais Murashige & Skoog, 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e, alternativamente, suplementação hormonal com 1,0 mg L⁻¹ de 2iP; 1,1 mg L⁻¹ de BAP; ou a combinação de 1,0 mg L⁻¹ de 2iP + 5,0 mg L⁻¹ de AIB. O delineamento experimental foi

inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, cada uma composta por cinco explantes.

Foi avaliada a porcentagem de explantes que deram origem a embriões somáticos, bem como o número de embriões cotiledonares produzidos por explante. A porcentagem foi calculada para cada repetição multiplicando-se o número de explantes embriogênicos por 20. Estes dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey ($P < 0,05$), utilizando o programa Assistat 7.5.

Foram identificados também os estádios de desenvolvimento dos embriões e o tempo médio de cada fase.

Os embriões cotiledonares foram subcultivados em tubos de ensaio contendo meio de cultivo (conforme descrito) suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB para enraizamento e posterior conversão em plântulas.

Após enraizamento, as plântulas foram submetidas à aclimatização, que consiste na sua transferência para casa de vegetação – onde devem se adaptar a este novo ambiente, com maior luminosidade, menor umidade e maior amplitude diária de temperatura. As plântulas foram mantidas, durante 60 dias, em copos plásticos de 400 mL contendo substrato Plantmax®, com sombreamento de 50% e irrigação por aspersão (meia hora, quatro vezes ao dia).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todos os 15 híbridos responderam a uma ou mais das três suplementações hormonais testadas, pelo menos uma destas resultando em embriogênese somática em, no mínimo, 20% dos explantes, sendo que, dos 15 híbridos, sete apresentaram embriogênese somática em 100% dos explantes (Tabela 1). Fuentes et al. [8] obtiveram a mesma variação ao comparar cinco clones de *C. canephora* quanto à ocorrência de embriogênese somática, observando quatro clones com embriões em 100% dos explantes e um clone com embriões em 20% dos explantes. Conforme estes autores mencionam, as diferentes respostas encontradas para os diversos genótipos de *C. canephora* são determinadas por características genóticas intrínsecas, em combinação com as condições fisiológicas de cada planta doadora de explantes.

O regulador de crescimento 2iP, isoladamente, e a combinação de 2iP e AIB não diferiram significativamente entre si quanto à porcentagem de explantes responsivos à

embriogênese somática, e foram superiores ao tratamento com BAP. Porém, em apenas um híbrido, C837, não ocorreu formação de embriões quando exposto ao 2iP, enquanto que três híbridos não responderam à combinação 2iP e AIB, e sete não responderam ao BAP.

Tabela 1. Porcentagens de explantes de 15 híbridos ‘Conilon x Robusta’ que desenvolveram embriões somáticos, aos 82 dias de cultivo, em relação a três suplementações hormonais no meio de cultivo.

Híbridos	2iP (1,0 mg L ⁻¹)	BAP (1,1 mg L ⁻¹)	2iP (1,0 mg L ⁻¹) + AIB (5,0 mg L ⁻¹)
C125	7 b*	0 c	23 a
C160	25 b	0 c	100 a
C193	6 b	0 c	40 a
C194	75 b	8 c	100 a
C57	100 a	33 b	100 a
C836	8 b	0 c	100 a
C837	0 b	0 b	20 a
P09	100 a	36 b	33 b
P10	60 a	0 b	0 b
P12	33 b	67 a	33 b
P13	77 a	0 c	14 b
P14	86 b	100 a	0 c
P15	77 b	100 a	50 c
P16	73 a	73 a	75 a
P20	50 a	50 a	0 b
Médias	51,8 a	31,1 b	48,1 a

*Médias seguidas pela mesma letra dentro da mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05).

Houve grande variação no número de embriões cotiledonares produzidos por explante foliar em relação às suplementações hormonais (Tabela 2). Os maiores valores foram obtidos nos híbridos P13, que na suplementação com 2iP + AIB produziu 46,00 embriões cotiledonares por explante; C194, que produziu 34,00 embriões com a utilização de BAP e 20,33 em 2iP + AIB; e P15, que no meio com 2iP produziu 18,00 embriões por explante. A

combinação dos reguladores de crescimento 2iP e AIB foi mais eficaz do que BAP ou 2iP isoladamente, em relação ao número médio de embriões produzidos por explante. Porém, esta combinação resultou também na formação de raízes adventícias na parte aérea da maioria dos embriões, o que resulta em má formação do embrião, além de direcionar reservas inadequadamente. Hatanaka et al. [7], utilizando 1,0 mg L⁻¹ de 2iP, em combinação ou não com ácido naftalenoacético (ANA), obtiveram médias variando de 10 a 190 embriões por explante foliar de *C. canephora* – porém, os autores não especificaram a variedade com a qual trabalharam.

Tabela 2. Médias do número de embriões cotiledonares por explante, em 15 híbridos ‘Conilon x Robusta’, aos 82 dias de cultivo, em relação a três suplementações hormonais no meio de cultivo.

Híbridos	2iP (1,0 mg L ⁻¹)	BAP (1,1 mg L ⁻¹)	2iP (1,0 mg L ⁻¹) + AIB (5,0 mg L ⁻¹)
C125	1,14 a*	0,00 c	0,76 b
C160	1,30 b	0,00 c	5,33 a
C193	0,93 b	0,00 b	12,40 a
C194	5,66 c	34,00 a	20,33 b
C57	0,57 c	5,33 b	9,36 a
C836	8,80 b	0,00 c	10,33 a
C837	0,00 b	0,00 b	8,80 a
P09	1,80 ab	2,30 a	1,00 b
P10	7,75 a	0,00 b	0,00 b
P12	2,85 b	8,16 a	2,83 b
P13	8,00 b	0,00 c	46,00 a
P14	3,57 a	1,00 b	0,00 b
P15	18,00 a	1,71 c	5,50 b
P16	5,50 a	2,30 c	4,25 b
P20	3,71 a	3,00 a	0,00 b
Médias	4,64 ab	3,85 b	8,46 a

*Médias seguidas pela mesma letra dentro da mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05).

Embriões globulares foram identificáveis aos 56 dias após a inoculação dos explantes foliares; embriões cordiformes aos 69 dias; embriões torpedo aos 76 dias; e embriões cotiledonares aos 82 dias de cultivo. Os embriões cotiledonares, subcultivados em meio de cultivo contendo AIB, produziram raízes e se desenvolveram em plântulas, aos 172 dias de cultivo (Tabela 3). Os quatro estádios embrionários também foram relatados por Pierson et al. [6], que menciona o surgimento de embriões globulares aos 37 dias após a inoculação dos explantes, utilizando a combinação de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de $2iP + 5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, a qual também foi utilizada no presente estudo.

A fase de aclimatização resultou em 100% de sobrevivência e levou 60 dias (232 dias a partir da inoculação inicial), ao final dos quais as mudas tinham cinco pares de folhas. Teixeira [9] estabelece o padrão de cinco pares de folhas para considerar completa a fase de aclimatização de *C. arabica*, sendo que o ciclo completo de produção de mudas descrito por este autor, da inoculação à planta aclimatizada, leva aproximadamente 600 dias.

Na combinação de $2iP$ e AIB foram obtidos até 46 embriões cotiledonares por explante. Considerando a utilização de 20 explantes por folha, teoricamente poderíamos, ao final do processo, obter 920 plantas a partir de uma única folha.

Tabela 3. Duração média das fases que compreendem o processo de embriogênese somática em explantes foliares de *C. canephora*, da folha inicial à muda pronta para ir ao campo.

Fases	Tempo médio (dias)	Tempo médio acumulado (dias)
Formação de embriões globulares nos explantes foliares	56	56
Conversão dos embriões globulares em cordiformes	13	69
Conversão dos embriões cordiformes em torpedo	07	76
Conversão dos embriões torpedo em cotiledonares	06	82
Conversão dos embriões cotiledonares em plântulas	90	172
Conversão das plântulas em mudas	60	232

(aclimatização)

4. CONCLUSÕES

Na embriogênese somática a partir de explantes foliares, os clones híbridos das variedades Conilon e Robusta de *C. canephora* apresentam diferentes respostas em relação à suplementação hormonal no meio de cultivo, tanto em relação à porcentagem de explantes que geram embriões quanto em relação ao número de embriões cotiledonares formados por explante.

Todos os clones testados se mostraram embriogênicos, respondendo a pelo menos uma suplementação hormonal no meio de cultivo.

Com a utilização da embriogênese somática, potencialmente, é possível obter 920 plantas a partir de uma única folha de *C. canephora*, em 232 dias.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa de Iniciação Científica (PIBIC).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SPINELLI, V.M.; MORAES, M.S.; ALVES, D.S.B.; ROCHA, R.B.; RAMALHO, A.R.; TEIXEIRA, A.L. Contribution of agronomic traits to the coffee yield of *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner in the Western Amazon region. **Coffee Science**, v. 13, n. 3, p. 333-340, 2018.
- [2] OLIVEIRA, L.N.L.; ROCHA, R.B.; FERREIRA, F.M.; SPINELLI, V.M.; RAMALHO, A.R.; TEIXEIRA, A.L. Selection of *Coffea canephora* parents from the botanical varieties Conilon and Robusta for the production of intervarietal hybrids. **Ciência Rural**, v. 48, n. 4, p. 1-7, 2018.
- [3] LANDEY, R.B.; CENCI, A.; GEORGET, F.; BERTRAND, B.; CAMAYO, G.; DECHAMP, E.; HERRERA, J.C.; SANTONI, S.; LASHERMES, P.; SIMPSON, J.; ETIENNE, H. High genetic and epigenetic stability in *Coffea arabica* plants derived from embryogenic suspensions and secondary embryogenesis as revealed by AFLP, MSAP and the phenotypic variation rate. **Plos One**, v. 8, n. 2, p. 1-15, 2013.

- [4] HERVÉ, E.; BENOÎT, B.; EVELINE, D.; PATRICK, M.; FREDERIC, G.; ROMAIN, G.; JEAN CHRISTOPHE, B. Are genetic and epigenetic instabilities of plant embryogenic cells a fatality? The experience of coffee somatic embryogenesis. **Human Genetics and Embryology**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2016.
- [5] SANTOS, M.R.A.; FERREIRA, M.G.R.; OLIVEIRA, C.L.L.G.; RAMALHO, A.R.; ESPÍNDULA, M.C. Vegetative vigor of Conilon coffee and its potential for *in vitro* callus induction. **Coffee Science**, v. 8, n. 4, p. 432-438, 2013.
- [6] PIERSON, E.S.; VAN LAMMEREN, A.A.M.; SCHEL, J.H.N.; STARITSKY, G. In vitro development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora*. **Protoplasma**, v. 115, p. 208-216, 1983.
- [7] HATANAKA, T.; ARAKAWA, O.; YASUDA, T.; UCHIDA, N.; YAMAGUCHI, T. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 179-182, 1991.
- [8] FUENTES, S.R.L.; CALHEIROS, M.B.P.; MANETTI-FILHO, J.; VIEIRA, L.G.E. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 60, p. 5-13, 2000.
- [9] TEIXEIRA, J.B. **Mudas clonais de café: produção por meio de embriogênese somática**. Brasília: Embrapa, 2017.