

## Produção Cafeeira

# Regeneração de plantas duplo-haploides de *Coffea canephora* a partir de embriogênese em anteras

Gisele Balbino de Almeida<sup>1</sup>, Maurício Reginaldo Alves dos Santos<sup>2</sup>, Rodrigo Barros Rocha<sup>3</sup>, Eveline Teixeira Caixeta Moura<sup>4</sup>, Letícia de Faria Silva<sup>5</sup>

## Resumo

A tecnologia de cultura de anteras oferece a possibilidade de desenvolver plântulas duplo-haploides com genótipos completamente homocigotos a partir de genitores heterocigotos em uma única geração, assim possibilitando desenvolver variedades híbridas F1, que poderiam combinar as vantagens de benefício total da heterose e homogeneidade. O objetivo deste estudo foi aplicar a técnica da cultura de anteras em diferentes genótipos de *C. canephora* para regenerar plantas duplo-haploides. Para tanto, foi efetuada a assepsia dos botões e excisão das anteras que foram inoculadas em meio de cultura basal com sais e vitaminas Morel contendo 1,5 mg/L de 2,4-D e 2,0 mg/L de BAP, resultando na indução de calos friáveis, seguido por quatro estágios de desenvolvimento do embrião – globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. Os embriões foram convertidos em plântulas e estas foram aclimatizadas dando origem a plantas adultas, as quais estão sendo cultivadas em condições de campo.

**Palavras-chave:** Embriogênese gamética; androgênese indireta; café.

## Regeneration of double-haploids of *Coffea canephora* from embryogenesis in anthers

## Abstract

Anther culture technology offers the possibility to develop double-haploid seedlings with completely homozygous genotypes from heterozygous parents in a single generation, thus making it possible to develop F1 hybrid varieties, which could combine the full benefit advantages of heterosis and homogeneity. The objective of this study was to apply the anther culture technique in different genotypes of *C. canephora* to regenerate double-haploid plants. For this purpose, asepsis of the buds and excision of the anthers were performed, which were inoculated in a basal culture medium with salts and Morel vitamins containing 1.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D and 2.0 mg L<sup>-1</sup> BAP, resulting in the induction of friable calluses, followed by four stages of embryo development - globular, cordiform, torpedo and cotyledonar. The embryos were converted into seedlings, which were acclimatized giving rise to adult plants that are being cultivated under field conditions.

**Keywords:** Gametic embryogenesis, indirect androgenesis, coffee.

---

<sup>1</sup> Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rondônia - UNIR.  
E-mail: geissa.balbino@gmail.com.

<sup>2</sup> Biólogo, Doutor em Fitotecnia pela UFC pesquisador Embrapa Rondônia.

<sup>3</sup> Dr. em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Rondônia.

<sup>4</sup> Professora, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - UFV.

<sup>5</sup> Doutoranda, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - UFV.

## Introdução

O café é um dos produtos mais notável no mercado nacional e mundial, deste modo sendo uma cultura de extrema importância econômica. O *Coffea canephora* é uma das duas espécies cultivadas extensivamente, sendo alógama e diploide ( $2n=2x=22$  cromossomos). Os avanços biotecnológicos na área de cultura in vitro do café vêm permitindo a otimização de vários sistemas do café de forma que essas plantas atinjam seus potenciais agronômicos de forma rápida, barata e eficiente (Morais et al., 2011)

A autoincompatibilidade é a incapacidade de uma planta fértil se fertilizar com o seu próprio pólen, sendo um mecanismo fisiológico benéfico para a planta, pois promove a alogamia e, conseqüentemente, a variabilidade genética da espécie. Porém, para a produção agrônômica isso se torna muitas vezes uma limitação (Schifino Wittmann; Dall'Agnol, 2002). A autoincompatibilidade de *C. canephora* é do tipo gametofítica monogênica ligada ao loco do gene "S", contendo três alelos  $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ . Se o alelo S presente no grão de pólen haploide for igual aos presentes no estilete, ocorrerá a inibição ou o bloqueio do alongamento do tubo polínico, não sendo possível alcançar o óvulo (Berthaud, 1980). Nesse sistema reprodutivo, em uma planta duplo-haploide (DH) pode ocorrer a fecundação de seu óvulo com pólen de qualquer planta diploide -  $S_1S_2$ ,  $S_2S_3$  ou  $S_1S_3$ , já que seu genótipo só pode ser  $S_1S_1$ ,  $S_2S_2$  ou  $S_3S_3$  (Madan et al., 2019).

Uma técnica valiosa para a propagação de DHs é a cultura de anteras, essa ferramenta de cultivo in vitro possui vantagens tais como: redução de tempo para a obtenção de linhagens homozigóticas, comparada com as técnicas convencionais que levariam de sete a oito ciclos de autofecundações para ocorrer e estabilizar os genes em homozigose (Silva et al., 2009;Morais et al., 2011); como todos os genes apresentam-se em dose simples, torna mais fácil e rápida a detecção de mutações (Fernandes, 1987); a utilização de anteras é um método relativamente simples e que permite a obtenção de plantas em larga escala (Germanà et al., 2011).

A obtenção de DHs pode ocorrer de duas maneiras, por meio da androgênese direta ou por androgênese indireta. O que diferencia ambos é que na forma direta o micrósporo se comporta de forma semelhante ao que ocorre in vivo, passando por estágios de embriogênese. Já na indireta os micrósporos formam calos que emergem da parede da antera, os quais por sua vez dão origem a embriões, que então passam pelas fases embriogênicas; esta última é utilizada com maior frequência (Peters et al., 1998).

No presente trabalho, objetivou-se a obtenção de indivíduos duplo-haploides de plantas de *Coffea canephora* dos dois grupos varietais Robusta e Conilon, a partir da cultura de anteras e a conseqüente obtenção de calos e embriões haploides, os quais subseqüentemente podem sofrer duplicação cromossômica para dar origem a plantas DHs.

## Material e Métodos

Botões florais foram coletados em campo, entre as 8 e 9 horas da manhã, um dia antes da antese, a partir de plantas de *C. canephora* cultivadas no campo experimental da Embrapa Rondônia, em Porto Velho, Rondônia, Brasil. Os mesmos foram colocados em frascos de vidro e levados ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais. Foram utilizados os clones C57, R125, P10, P14, P20 e C836.

A assepsia dos botões foi realizada por meio de imersão em água destilada com detergente por 5 minutos sob agitação, em solução de etanol 70% por 1 minuto e em solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 5 minutos sob agitação, sendo em seguida enxaguados três vezes em água esterilizada. Sob condições assépticas, as anteras foram retiradas mediante incisão com o auxílio de pinça e bisturi, sendo estes

flambados por 20 segundos e imersos em água destilada até esfriar a cada novo botão. As anteras foram individualmente inoculadas em tubos de ensaio contendo 10,0 mL de meio de cultura basal com vitaminas e sais Morel e Wetmore (1951), suplementado com dois reguladores de crescimento vegetal: 1,5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 2,0 mg/L de 6-Benzilaminopurina (BAP), 30,0 g/L de sacarose, 6,0 g/L de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 e o meio submetido a autoclavagem por 20 minutos a 120 °C.

Os tubos de ensaio foram incubados em câmara de crescimento, na ausência de luz, à temperatura de 26 °C ± 1 °C, até a formação de calos. Nos 180 dias subsequentes, os estágios de desenvolvimento dos embriões gaméticos - globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar foram registrados para as cultivares R125 e C57. Os embriões foram individualmente transferidos para meio fresco sem reguladores de crescimento, permanecendo por 60 dias para a indução de enraizamento e posterior conversão em plântulas. A aclimatização foi realizada em casa de vegetação, e as mudas foram mantidas por 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).

## Resultados e Discussão

O uso combinado de 2,4-D e BAP induziu a formação abundante de calos e, posteriormente, embriões. A indução de calos friáveis ocorreu em todos os explantes, e foi seguida por quatro estágios de desenvolvimento do embrião - globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. Os clones C57 e R125 produziram 9,6 e 16,4 embriões cotiledonares por antera, respectivamente, os quais foram convertidos com sucesso em plântulas. Os demais clones – P10, P14, P20 e C836, estão ainda em fase embriogênica. A aclimatização das plântulas foi realizada com 100% de sobrevivência. Dentre as plantas que estão sendo cultivadas em condições de campo, uma planta apresenta características típicas de duplo-haploides – folhas albinas e folhas com manchas vermelhas. Folhas desta planta foram coletadas e submetidas à clonagem in vitro, por meio da embriogênese somática. Os explantes foliares desta planta já apresentam embriões globulares, os quais vão dar origem a plantas com o mesmo genótipo da planta-mãe.

Utilizando marcadores microssatélites identificou-se homologia cromossômica nas plantas aclimatizadas, demonstrando o seu potencial como DH. Essa duplicação ocorreu de forma espontânea ao longo de todo o processo. Em geral, a duplicação ocorre durante as primeiras divisões do micrósporo embriogênico e por meio de um mecanismo de fusão nuclear (Germanà et al., 2011), tornando desnecessária a aplicação de antimetabólitos.

É de extrema importância o papel das interações entre os componentes do meio de cultura, sendo os principais os reguladores de crescimento, pois esses disparam as divisões celulares morfogenéticas (Fernandes, 1987). Segundo Silva et al. (2009), as concentrações de citocinina e auxina em concentrações iguais ou próximas, proporcionam maior produção de calos friáveis em anteras de *C. arabica*. Esses reguladores de crescimento são os mais extensivamente usados na androgênese (Esteves et al., 2014). Araújo et al. (2004) também confirmam que a combinação da ação de uma auxina e uma citocinina são necessárias para a indução de calos em anteras de cafeeiro.

A obtenção de DHs de *C. canephora* por meio da embriogênese gamética levou 300 dias e envolveu a ocorrência de calos friáveis, embriões globulares, cordiformes, torpedos e cotiledonares, os quais foram enraizados e convertidos em plântulas e, após aclimatização, em plantas DHs. A utilização de DH facilita a análise genética, pois com essa técnica se elimina os obstáculos do estado de heterozigose, e proporciona de maneira mais rápida novas linhagens com homozigose, o que seria um processo lento com a utilização de

técnicas convencionais (Fernandes, 1987). Cafeeiros DH são, também, de importância para explicitar o controle genético da autoincompatibilidade em genótipos de alelo S (Lashermes et al., 1996). Uma das principais vantagens que torna a técnica de embriogênese gamética uma ferramenta poderosa é devido à grande quantidade de micrósporos potencialmente indutíveis nas anteras de um único botão (Asadi et al., 2018).

### **Conclusão**

A androgênese indireta ocorre com sucesso em *C. canephora*, a partir da embriogênese gametofítica dos clones R125 e C57, envolvendo a indução de calos friáveis, formação de embriões globulares, cordiformes, torpedos e cotiledonares, conversão em plântulas e plantas DHs. Durante o processo de regeneração da planta, a duplicação dos cromossomos ocorre espontaneamente, produzindo esses indivíduos DHs. Os clones P10, P14, P20 e C836 ainda estão em processo de formação de embriões globulares.

**Apoio Financeiro:** Os autores agradecem à FAPERO pelo apoio financeiro e ao CNPq pela concessão de bolsa PIBIC.

### **Referências**

ARAÚJO, J.S. **Calogênese em anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L.** 2004. 41f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras.

ASADI, A.; ZEBARJADI, A.; ABDOLLAHI, M. R.; SEGUÍ-SIMARRO, J. M. Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Euphytica**, v. 214, p. 1-17, 2018.

BERTHAUD, J. L'incompatibilité chez *Coffea canephora*: méthode de test et déterminisme génétique. **Café Cacao Thé**, v. 24, n. 1, p. 167-174, 1980.

ESTEVES, P.; CLERMONT, I.; MARCHAND, S.; BELZILE, F. Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: II-exploring novel growth regulators to maximize embryogenesis and reduce albinism. **Plant Cell Reports**, v. 33, p. 871-879, 2014.

FERNANDES, M. I. B. de M. Perspectivas da biotecnologia para o melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, p. 881-896, 1987.

GERMANÀ, M. A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, p. 283-300, 2011.

LASHERMES, P.; COUTURON, E.; MOREAU, N.; PAILLARD, M.; LOUARN J. Inheritance and genetic mapping of self-incompatibility in *Coffea canephora* Pierre. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 458-462, 1996.

MADAN, N. S.; AROCKIASAMY, S.; NARASIMHAM, J. V.; PATIL, M. Anther culture for the production of haploid and doubled haploids in *Jatropha curcas* L. and its hybrids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 138, p. 181-192, 2019.

MORAIS, T. P.; MELO, B. Biotecnologia aplicada ao melhoramento genético do cafeeiro, **Ciência Rural**, v. 412, n. 5, p. 753-760, 2011.

MOREL, G.; WETMORE, R. M. Fern Callus Tissue Culture. **American Journal of Botany**, v. 38, p. 141-143, 1951.

PETERS, J. A. BOBROWSKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. Produção de haplóides e duplo haplóides. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998, v. 2, p. 569-612.

SCHIFINO-WITTEMANN, M. T.; DALL'AGGNOL, M. Autoincompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 1083-1090, 2002.

SILVA, A. S.; LUZ, J. M. Q.; RODRIGUES, T. M.; BITTAR, C. A.; LINO, L. de O. BAP, 2,4-D e ácido acetilsalicílico na indução e diferenciação de calos em anteras de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 5, p. 1205-1212, 2009.