

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA EMBRIOGÊNICA EM CLONES DE CAFÉ CONILON (*Coffea canephora* PIERRE)

Maria das Graças Rodrigues Ferreira¹; Maurício Reginaldo Alves dos Santos² e Ana Cleide Ribeiro Bragado³

Resumo

Segmentos foliares de clones de *Coffea canephora*, **199, 61, 184, 193, 100, 194, 120 e 59**, pertencentes ao programa de melhoramento da Embrapa Rondônia, foram avaliados quanto à calogênese, visando à obtenção de embriões somáticos. Os explantes foram inoculados em meio de indução de calos MS/2, tiamina (10 mg.L⁻¹), piridoxina (1 mg.L⁻¹), ácido nicotínico (1 mg.L⁻¹), glicina (1 mg.L⁻¹) e mio-inositol (100 mg.L⁻¹), caseína (100 mg.L⁻¹), extrato de malte (400 mg.L⁻¹), 2,4-D (2,21 mg.L⁻¹), 2,i-P (1 mg.L⁻¹), AIB (1 mg.L⁻¹), acrescido de 2,0% de sacarose, solidificado com 0,8% de ágar. Os cultivos foram mantidos no escuro, a 28°C. Durante os 120 dias subsequentes, avaliou-se a presença de calos e de setores embriogênicos. Verificou-se que os clones **199, 184, 193, 100, 194 e 59** foram os mais responsivos quanto à formação de calos, observando-se diferença entre os genótipos empregados. Apenas nos clones **194, 193 e 199** foi identificada a presença de setores embriogênicos, em 25,0, 13,3 e 4,9% dos explantes, respectivamente.

Introdução

A espécie *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner cobre 90% da área plantada com café em Rondônia, sendo que a variedade Conillon é a mais comum. As baixas produtividades, associadas à qualidade inferior do café produzido, reduzem a competitividade da cultura na região. O baixo nível tecnológico empregado pelos produtores e a ausência de genótipos adaptados às condições climáticas da região constituem a principal causa dos problemas de rendimento e qualidade da produção observados nos cultivos amazônicos de café.

A utilização de cultivares de alto potencial produtivo, com maturação tardia e uniforme e resistentes à ferrugem apresenta-se como a alternativa mais adequada para solucionar os problemas de produção e qualidade do café amazônico, sem causar alterações na rotina dos agricultores e sem onerar a produção. Além disso, não oferece riscos à saúde de produtores e consumidores nem causam danos ao meio ambiente.

A propagação vegetativa é indicada para multiplicação de cultivares de alta produtividade e resistentes a enfermidades, garantindo uniformidade nos povoamentos e mantendo o ganho genético obtido na seleção. No entanto, a multiplicação vegetativa pelos métodos convencionais deve limitar-se à utilização de fragmentos de ramos ortotrópicos, sempre em número limitado (DUBLIN, 1984). As técnicas de cultura de tecidos têm possibilitado, além da obtenção de grande número de plantas, a diminuição do tempo necessário para obtenção de novas progênes e a garantia da uniformidade genética do material.

A cultura de calos proporciona a propagação em larga escala de diversas espécies vegetais, sendo que os trabalhos em cafeeiro foram publicados por Staritsky (1970), que obteve êxito na indução de calos a partir de folhas. A calogênese constitui-se numa etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática. A embriogênese somática em *Coffea* é um importante método de multiplicação de plantas elite *in vitro*, em larga escala, apresentando um grande potencial a ser explorado, e capaz de maximizar a propagação do cafeeiro, tanto de cultivares já recomendadas para plantio como de

¹ Maria das Graças Rodrigues Ferreira é Pesquisadora da Embrapa Rondônia, BR 364, km 5,5, PortoVelho, RO, CEP 76815-800. E-mail: mgraca@cpafro.embrapa.br

² Maurício Reginaldo Alves dos Santos é Pesquisador da Embrapa Rondônia, BR 364, km 5,5, PortoVelho, RO, CEP 76815-800. E-mail: mauricio@cpafro.embrapa.br

³ Ana Cleide Ribeiro Bragado é Bolsista de Iniciação Científica do PNP&D/Café na Embrapa Rondônia, BR 364, km 5,5, PortoVelho, RO, CEP 76815-800. E-mail: anaefo@hotmail.com

híbridos vindos de programas de melhoramento genético. Apresenta-se também como uma técnica auxiliar aos trabalhos de transformação genética de plantas.

Na cultura de tecidos, as citocininas têm sido apontadas como causadoras do início de brotações em muitos explantes, pois a maioria deles, *in vitro* não sintetiza citocinina suficiente para permitir um crescimento contínuo. As citocininas e auxinas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos (CALDAS *et al.*, 1990). O tipo e a concentração influenciam na multiplicação *in vitro*, onde normalmente a melhor faixa fica entre 0,5 e 5,0mg.L⁻¹ para ambos fitorreguladores. Segundo Litz e Jarret (1991), frequentemente se induz a formação de calos em explantes cultivados em meio contendo auxina, ou com uma alta relação citocinina/auxina.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de segmentos foliares de clones de *C. canephora* à calogênese, visando suporte para futuros trabalhos com embriogênese somática.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia, em Porto Velho-RO. O material foi coletado de mudas estabelecidas em viveiro telado, localizado no campo experimental da Embrapa Rondônia. Foram coletadas folhas jovens do segundo par dos ramos plagiotrópicos de café Conilon dos clones **199, 61, 184, 193, 100, 194, 120 e 59**, selecionados no Estado e incorporados ao programa de melhoramento genético de café nos anos 1998, 1999, 2000 e 2001. As mesmas passaram por uma pré-limpeza, sendo lavadas com água bidestilada e uma esponja com algumas gotas de detergente comercial. As folhas foram segmentadas em quadrados de aproximadamente 4 x 4 cm² e colocadas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto. Em câmara de fluxo laminar, os segmentos foram retirados do álcool e esterilizados com concentrações de 50% de alvejante comercial (hipoclorito de sódio a 2,5%), durante 30 minutos, sendo, em seguida, lavados 3 vezes com água bidestilada estéril e segmentados em quadrados de aproximadamente 1 x 1 cm². Os explantes foram inoculados em placas de Petri descartáveis contendo meio de indução de calos, de acordo com protocolo descrito por Boxtel e Bertouly (1996), composto por meio MS/2 (Murashige e Skoog, 1962), tiamina (10 mg/L), piridoxina (1 mg/L), ácido nicotínico (1 mg/L), glicina (1 mg/L) e mio-inositol (100 mg/L), caseína (100 mg/L), extrato de malte (400 mg/L), 2,4-D (20 µM), 2,i-P (1 mg/L), AIB (1mg/L), acrescido de 2,0% de sacarose, solidificado com 0,8% de ágar e pH ajustado para 5,7. Os cultivos foram mantidos em câmara do tipo BOD, no escuro, sob temperatura de 28°C, durante 30 dias, sendo avaliada ao final desse período a presença de calos. Em seguida, os cultivos foram transferidos para o meio secundário, constituído do mesmo meio mas com a concentração de 2,4-D reduzida pela metade (10 µM). Os explantes foram mantidos neste meio por um período de cinco meses, sem repicagem, e ao final desse período foi avaliada a presença de setores embriogênicos nos explantes. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, sendo empregadas 20 repetições.

Resultados e Discussão

Verificamos que os clones 199, 184, 193, 100, 194 e 59 foram mais responsivos ao protocolo empregado, não havendo diferença significativa entre os mesmos (Fig.1). Houve diferença significativa entre esses e os clones 61 e 120, sendo que este último apresentou o menor índice de calosidade. As diferentes respostas observadas entre os clones provavelmente estão relacionadas ao potencial genético. As respostas de desenvolvimento *in vitro* são regidas pela constituição genética (HU; FERREIRA, 1998). Os efeitos genéticos em muitos aspectos da cultura *in vitro* foram observados por Keyes; Bingham (1979). Em cafeeiro, diversos autores comprovaram diferentes respostas em relação a cultivares e espécies, seja trabalhando com segmentos nodais (KRIKORIAN, 1991), embriogênese somática indireta (BERTHOULY; MICHAUX- FERRIERE, 1996; CALDAS *et al.*, 1998; CORDEIRO, 1999; MACIEL, 2001) ou desenvolvimento de embriões (Santos, 2001). Diferentes genótipos podem ter diferentes condições ótimas de crescimento, pré-tratamento, composição de meio de cultura e condições físicas de cultura (MAGALHÃES JÚNIOR *et al.*, 1995). Apenas nos clones **194, 193 e 199** foi identificada a presença de setores embriogênicos, em 25,0, 13,3 e 4,9% dos explantes, respectivamente (Tab.1).

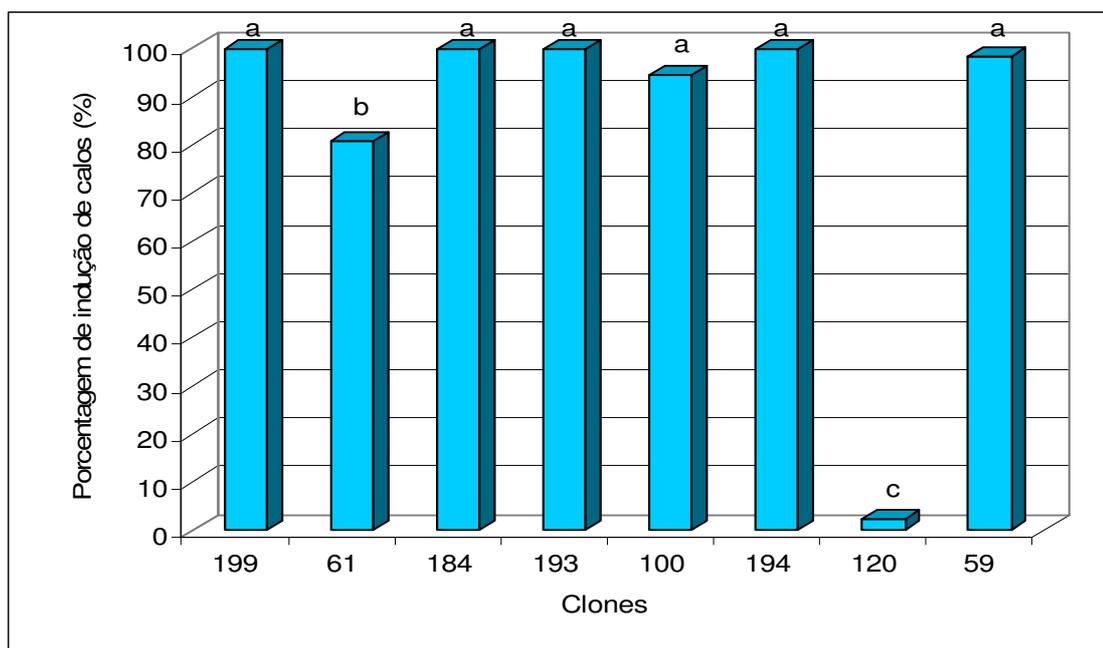


Figura 1. Porcentagens de indução de calos em clones de *Coffea canephora*.

Tabela 1. Número de explantes, explantes com calos, explantes com setores embriogênicos e porcentagem de explantes com setores embriogênicos.

| Clone | Nº de explantes | Nº de explantes com calos | Nº de explantes com setores embriogênicos | % de explantes com setores embriogênicos |
|-------|-----------------|---------------------------|---|--|
| 194 | 44 | 44 | 11 | 25,0 |
| 193 | 30 | 30 | 4 | 13,3 |
| 199 | 61 | 61 | 3 | 4,9 |

Conclusão

Os clones 199, 184, 193, 100, 194 e 59 foram responsivos ao protocolo empregado, observando-se diferença entre os genótipos empregados, sendo que nos clones 194, 193 e 199 houve formação de setores embriogênicos a partir dos calos.

Referências

BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N.M. High frequency somatic embryogenesis from *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v. 44, p. 169-176, 1996.

BOXTTEL, J. VAN.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Hague, v. 44, p. 7-17, 1996.

CALDAS, L.S.; HARADASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. ed. *Técnicas e Aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTB/EMBRAPA - CNPH, 433p, 1990.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas*. Brasília: EMBRAPASPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. p. 87-132.

CORDEIRO, A.T. *Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplastos em Coffea*. 1999. 11 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

DUBLIN, P. Techniques de reproduction végétative "in vitro" et amelioration génétique chez les caféiers cultivés. *Café, Cacao, Thé*, Paris, v. 28, n. 4, p. 231-244, 1984.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. p.371-393.

KEYES, G.J.; BINGHAM, E.T. Heterosis and ploidy effects on the growth of alfalfa callus. *Crop Science*, Madison, v. 19, p. 473-476, 1979.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos e aplicaciones*. [S.l.: s.n.], 1991. p. 41-77.

LITZ, R.E.; JARRET, R.L. Regeneracion de plantas en el cultivo de tejidos, embriogênese somática y organogênese. In: ROCA, W.M.; MROGINSKY, L.A. *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos e aplicaciones.*, Cali: CIAT, 1991, p.143-172.

MACIEL, A.L.R. *Embriogênese somática indireta em Coffea arabica L.* 2001. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MAGALHÃES JÚNIOR, A.M.; AVOZANI, O.A.; PETERS, J.A.; VIÉGAS, J.; TERRES, A.L.; ABIBI, F.R. Colchicine effect on chromosome duplication of irrigated rice haploids obtained from anther culture. In: ENCUESTRO LATINO AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., 1995, Puerto Iguazu. *Resumos...* Puerto Iguazu: REDBIO, 1995. p. 76.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

STARITSKY, G. Embryoid formation in callus culture tissue of *Coffea*. *Acta Botanica Neerlandica*, Netherlands, v. 19, n. 4, p. 509-514, 1970.