

# 34º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras

## **CALOGÊNESE E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA E INDIRETA EM SEGMENTOS FOLIARES DE CAFFEEIRO (*Coffea arabica*) CV. OBATÃ**

MN Saito e ALB Neto - Técnicos agrícolas, Colégio Técnico Shunji Nishimura [marcelo-saito@hotmail.com](mailto:marcelo-saito@hotmail.com); JC Cardoso - Engenheiro Agrônomo, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Van Vliet Mudanças de Gérberas, Holambra-SP, [jccardoso@cena.usp.br](mailto:jccardoso@cena.usp.br)

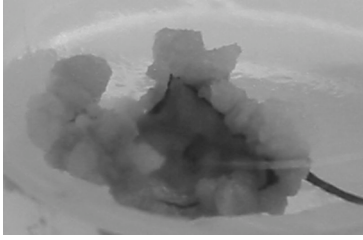
O café é responsável pelo segundo maior capital gerado no planeta, com uma movimentação monetária em torno de 91 bilhões de dólares e gerando cerca de 500 milhões de empregos. O melhoramento genético do café, desde sua implantação no Brasil, já demonstrou grandes avanços em cultivares que apresentam qualidades importantes como rusticidade e resistência a pragas e doenças, vigor vegetativo, além de aumento de produtividade em torno de 300%. As limitações dos métodos tradicionais de melhoramento genético no café se tornaram cada vez mais acentuados por características inerentes do cafeeiro, como o longo ciclo da cultura que torna o processo demorado e a estreita base genética do *Coffea arabica*, causada pela introdução da espécie no país, onde poucas plantas originaram as atuais espécies cultivadas hoje, limitando a variabilidade genética, além da reprodução autógama do *Coffea arabica* que favorece a homozigose da espécie. Dentre as modalidades da cultura de tecidos em café, a embriogênese somática tem sido freqüentemente citada no esforço para estabelecer um protocolo de micropropagação clonal tanto para *C. arabica* quanto para *C. canephora* (Boxtel & Berthouly, 1996, Plant Cell, Tissue and Organ Culture). Estratégias inovadoras como a propagação através de biorreatores e sementes sintéticas colocam a embriogênese somática num alto grau de expectativas dentro da perspectiva da propagação clonal em escala comercial, visando diminuir custos e aumentar a eficiência do processo de micropropagação. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo para a micropropagação do cafeeiro, cultivar Obatã, utilizando-se a embriogênese somática. Somado a este, o uso desta técnica pode servir de fonte para elaborar um protocolo para indução de variações somaclonais no material propagado, utilizando-se como agente indutor de mutação o Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), possibilitando aumentar a variabilidade genética de cultivares de cafeeiro com posterior seleção de genótipos superiores para o uso em plantio comercial.

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia do Colégio Técnico de Pompéia, mantido pela Fundação Shunji Nishimura de Tecnologia, em Pompéia-SP. Foram avaliados diferentes tipos e concentrações de reguladores vegetais na formação de calos, calos embriogênicos e embriões somáticos a partir de explantes foliares de cafeeiro (*Coffea arabica*), cultivar Obatã. Para a indução de calos em segmentos foliares de cafeeiro, utilizou-se o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), com metade da concentração dos nutrientes (1/2) e acrescido de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> de mio inositol, 10mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 1 mg L<sup>-1</sup> de glicina, piridoxina e ácido nicotínico, e 6g L<sup>-1</sup> de Agar-agar. O ajuste do pH foi feito para 5,7. Foram testados 6 tratamentos, com diferentes concentrações e combinações de ANA (Ácido Naftalenoacético), 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e CIN

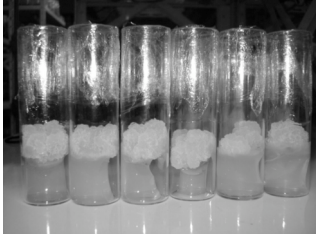
(Cinetina). Utilizou-se 15 repetições (segmentos foliares) por tratamento. As folhas, provenientes do terceiro par a partir do ápice, de plantas cultivadas no campo, foram lavadas com água corrente e detergente neutro, sendo em seguida transferidas para a capela de fluxo laminar. Estas então foram imersas em álcool 70% por 1 minuto, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1:1 (v/v) durante 15 minutos. Após a assepsia, as folhas, sem a nervura central, foram imersas em água destilada por 4 minutos, repetindo-se o processo duas vezes. Em seguida, imergiu-se as folhas em solução de ácido ascórbico ( $600 \text{ mg L}^{-1}$ ) por 8 minutos para evitar a oxidação dos explantes. Após a assepsia, o material vegetal foi dividido em segmentos foliares de cerca de  $1 \text{ cm}^2$  e introduzidos em tubos de ensaio contendo 15ml de meio de cultura com um explante em cada. O material foi isolado e encaminhado para sala de crescimento a uma temperatura média de  $27^\circ\text{C}$ , na ausência de luz. Na segunda fase, para a multiplicação de calos e indução de embriões somáticos, utilizaram-se respectivamente os meios CE1 e CE2, os quais foram constituídos pelos meios MS  $\frac{1}{2}$  com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  inositol e  $6 \text{ g L}^{-1}$  de agar-agar. Para o meio CE1 foram utilizados como reguladores vegetais o 2,4-D a  $2,2 \text{ mg L}^{-1}$ , o AIB a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  e o 2-ip a  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  (Teixeira et al., 2004, Documentos EMBRAPA) e no meio CE2, utilizou-se apenas o 2,4-D a  $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ . As condições de cultivo foram as mesmas descritas para a primeira fase.

## Resultado e Conclusões

Os melhores resultados de porcentagem de obtenção de calos foram verificados nos tratamentos T2 ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D) que apresentou 31,3% de segmentos foliares que regeneraram calos (Figura 1), T4 ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de CIN e  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D) com 23,5% e T5 ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de CIN e  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA) com 23,1% de segmentos foliares que regeneraram calos. Em todos os tratamentos, além da formação de calos primários, também houve regeneração de calos embriogênicos e formação de embriões, pela via indireta, ou seja, após a formação de calos. No meio T6 ( $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e  $8,0 \text{ mg L}^{-1}$  de CIN) observou-se que em 6,7% dos segmentos foliares, houve a formação de embriões somáticos nos estádios globular e cordiforme diretamente do tecido foliar, sem a formação prévia de calos e sem a necessidade de transferência para outro meio de cultura, podendo este meio ser utilizado para estudos com a embriogênese somática direta de cafeeiro. Não houve explantes com formação de calos no meio T6. Outros autores também observaram a embriogênese somática tanto pela via indireta como pela direta, utilizando-se altas concentrações de citocininas no meio de cultura. O controle, sem a adição de reguladores vegetais, não apresentou regeneração de calos ou embriões, demonstrando a influência dos reguladores vegetais na indução da calogênese e embriogênese somática. Os calos primários obtidos foram colocados para multiplicação, sendo que 100% dos calos multiplicaram vigorosamente, em ambos os meios de cultura CE1 (Figura 2) e CE2, mas apenas em CE1 foi possível obter calos embriogênicos a partir de calos primários. A interação entre auxinas e citocininas promovem um controle genético da desdiferenciação, divisão e do alongamento celular, promovendo a formação de calos em tecidos diferenciados. Mas também o uso do 2,4-D, isoladamente, promoveu esse processo, demonstrando certa independência de citocininas externas para a indução e posterior diferenciação dos calos obtidos a partir de segmentos foliares de cafeeiro. Já no caso de calos primários cultivados na segunda fase e sem o tecido foliar, não foi possível obter calos embriogênicos, sem a presença de uma citocinina no meio de cultura. Concluiu-se no presente experimento que o 2,4-D pode ser substituído pelo ANA na indução de calos primários e embriogênicos e embriões em segmentos foliares de cafeeiro. Também, o uso de citocininas em altas concentrações permite a formação de embriões somáticos diretamente do tecido, podendo servir de alternativa ao processo de micropropagação, diminuindo o período de obtenção de embriões somáticos e a variação genética do material cultivado.



**Figura 1** - Calos primários obtidos a partir de segmentos foliares de cafeeiro cv. Obatã em meio T2, Pompéia, 2008.



**Figura 2** - Multiplicação de calos primários e obtenção de calos embriogênicos em meio CE1 a partir de calos primários isolados de cafeeiro cv. Obatã, Pompéia, 2008.