# CALOGÊNESE EM *Coffea* VIA CULTURA SEMI-SÓLIDA[1]

**Aparecida Célia Paula dos** SANTOS**, Antônio Teixeira** CORDEIRO **(atcordei@mail.ufv.br), Maria Rita de Cássia** CAMPOS**, Wagner Campos** OTONI**, Laércio** ZAMBOLIM
**Universidade Federal de Viçosa**

**RESUMO:** O conhecimento das condições genótipo-específicas para as calogêneses embriogênica e friável embriogênica em genótipos de *Coffea* de interesse é de suma importância para as propagações *in vitro* em grande escala. Para tanto, submeteram-se explantes foliares dos híbridos interespecíficos Catimor e Cavimor, do canéfora Apoatã e do arábica Catuaí Vermelho a diferentes meios de cultura supostamente indutores de calos. À exceção do Cavimor, todos os genótipos estudados responderam favoravelmente à calogênese primária tipo embriogênica, aos quatro meses de cultura. Aos sete meses de pós-indução, enquanto explantes foliares de Apoatã expressavam calos embriogênicos em todos os meios, aqueles de Catuaí os expressaram praticamente quando a razão auxina/citocinina (1/5) foi mantida constante nos meios de indução e de diferenciação. Esta mesma combinação de meios induziu a maior freqüência de calos friáveis embriogênicos em explantes de Apoatã. O rendimento embriogênico foi maior em calos de Apoatã relativamente àqueles de Catuaí Vermelho.

**ABSTRACT:** The understanding of specific-genotype conditions for the induction of embryogenic and friable embryogenic calluses in *Coffea* genotypes is of paramount importance for the propagations *in vitro* in large scale. Aiming at that leaf explants of Catimor and Cavimor, interespecific hybrids of the Canephora Apoatã and the Arabica Red Catuai were submitted to several presumptive callus-inducing media. Except for the Catimor, all other genotypes formed primary callus of embryogenic type after 4 months in culture. By 7 months post-induction, leaf explants of Apoatã showed embryogenic calluses in all culturing media, while Catuai explants exhibited the same type of calluses mostly when the ratio auxin/cytokinin (1/5) where kept constant in the induction and differentiation media. The combination of those media induced the largest frequency of friable embryogenic calli in Apoatã explants. The production of embryos was greater in Apoatã calluses than in Red Catuai.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, embriogênese somática, calogênese friável, cultura semi-sólida

## INTRODUÇÃO

A embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas diplóides desenvolvem-se em plantas diferenciadas sem a fusão de gametas. Em explantes foliares de *Coffea*, tal embriogênese pode ser direta ou indireta. Na via direta, os embriões surgem de calos apenas cicatriciais, sem passarem pela fase de calo indiferenciado, originando-se, aparentemente, de células embriogênicas pré-determinadas (Söndahl *et al.*, 1985) que são moduladas, aparentemente, por meios ricos em citocininas e desprovidos de auxinas (Dublin, 1981). Na embriogênese somática indireta, que requer a redeterminação de células diferenciadas, a proliferação de calos e a indução de células embriogênicas determinadas (Williams e Maheswaran, 1986), os embriões surgem de calos primários não diferenciados ou de calos secundários, que são fortemente embriogênicos (Dublin, 1984). Duas estratégias têm sido geralmente utilizadas para a obtenção de tecido embriogênico em *Coffea*: a primeira, unifásica, envolve o cultivo de explantes sobre um único meio que pode conter como regulador de crescimento apenas citocinina (Yasuda *et al.*, 1985) ou a ação combinada de auxina e citocinina (Pierson *et al.*, 1983). A segunda estratégia, bifásica, utiliza o cultivo de explantes sobre um meio primário, tido como de indução, seguido da transferência dos explantes para um meio secundário, tido como de diferenciação (Dublin, 1984) ou de condicionamento (Söndahl *et al.*, 1985), que difere do primeiro por possuir uma menor razão auxina/citocinina (Noriega e Söndahl, 1993; Zamarripa *et al.*, 1991). Para ambas as etapas de isolamento e de diferenciação de tecido friáveis, têm-se verificado que a competência para a embriogênese somática indireta varia inter (Cordeiro, 1999; Zamarripa, 1993) e intraespecificamente (Berthouly e Michaux-Ferriere, 1996; Bieysse *et al*., 1993), sugerindo que uma maior expressão da competência genotípica para esta via de propagação pode requerer condições experimentais particulares. Objetivando-se o conhecimento de tais condições genótipo-específicas com vistas à produção de

[1] Apoio financeiro: **CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ, CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO** e **FINEP-FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS**

calos embriogênicos, para a propagação *in vitro* de microestacas, e de calos friáveis embriogênicos, para a propagação clonal em grande escala, submeteram-se explantes foliares de genótipos de *Coffea* de interesse a diferentes meios de cultura supostamente indutores de calos.

## MATERIAL E MÉTODOS

As fontes de explantes foliares foram plantas mantidas em casa-de-vegetação das espécies de *Coffea canephora*, cv. Apoatã IAC LC 2258, de *C. arabica*, cv. Catuaí Vermelho IAC LC2077, e dos híbridos interespecíficos Catimor e Cavimor. Folhas jovens completamente expandidas de ramos plagiotrópicos foram imediatamente lavadas em água corrente. Em seguida, as folhas foram imersas em solução de hipoclorito de cálcio 5% contendo Tween 20 (0,04%). Após 20 min de desinfecção, sob agitação moderada, as folhas foram lavadas quatro vezes com água destilada autoclavada. Fragmentos foliares nas dimensões aproximadas de 7 x 7 mm foram obtidos e, então, distribuídos, com o lado adaxial em contato com o meio semi-sólido contido em placas de Petri. Cada placa recebeu cinco explantes, sendo o conjunto repetido vinte vezes. As placas de Petri contendo os explantes foram mantidas em condições de obscuridade a 25°C. Estudaram-se oito meios de cultura supostamente indutores de calos (A, B, C, D1, D2, E1, E2 e E3), que resultaram nos tratamentos: A, A/B, B, C, D1/D2, E1/E2 e E1/E3. A barra indica sucessão de dois meios, com o segundo introduzido na primeira repicagem. Para todos os tratamentos, a primeira repicagem ocorreu aos trinta dias do início da indução e as subsequentes ocorreram a intervalos variando de 30 a 60 dias entre si, dependendo da taxa de crescimento do calo. Os meios A, B e C são constituídos no que se refere à composição dos macro e microelementos e das vitaminas pelos mesmos compostos usados por Yasuda et al. (1985) e por Gamborg et al. (1968). Os meios D e E são constituídos pelos macro e microelementos de Murashige e Skoog (1962) (MS) e pelas vitaminas usadas por Morel e Wetmore (1951). Com relação aos reguladores de crescimento: (A) BAP 20µM, (B) BAP 5µM, (C) 2iP 5µM, (D1) 2,4-D 4,5µM e KIN 18,6µM, (D2) ANA 0,54µM e KIN 4,6µM, (E1) 2,4-D 1,5µM e BAP 7,5µM, (E2) 2iP 25µM e IBA 5µM e (E3) BAP 5µM. Todos os meios continham, ainda, sacarose 30 $gL^{-1}$, cisteina 20 $mgL^{-1}$ e gelrite 3 $gL^{-1}$. O pH foi corrigido para 5,6, após o que os meios foram autoclavados, durante 20 min, a temperatura de 115 °C e pressão de 12 psi. Os explantes foram avaliados mensalmente, quando eram contados os tipos diferentes de calos e fazia-se a remoção e a contagem dos embriões somáticos por ventura existentes no estádio torpedo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após quatro meses do início da indução de calos nos genótipos híbridos, Catimor e Cavimor, e do arábica Catuaí Vermelho, observou-se que as maiores freqüências de explantes sem reação e/ou com calo apenas cicatricial ocorreram em meios de cultura que continham como regulador de crescimento apenas citocinina (A, A/B, B e C; Figuras 1a, 1b e 1c). A adição simultânea de auxinas e de citocininas aos meios de cultura contendo macro e microelementos MS induziu o surgimento praticamente único de calos primários, nodulares (CPN's), mistos (CPM's) ou embriogênicos (CE's), esses últimos em explantes foliares de Catuaí. Os CPN's referem-se às formações globulares compactas surgidas em parte ou, menos freqüentemente, na totalidade dos bordos dos explantes. Aqueles CPM's, além da reação globular mais ou menos compacta dos CPN's, apresentam, também, formações amorfas de células alongadas, com aspecto de algodão, e que se caracterizam por crescimento visivelmente mais rápido. Os CE's referidos acima são calos primários contendo embriões somáticos. Quando esses calos apresentam agregados celulares granulosos, de aproximadamente 1 mm de diâmetro, facilmente destacáveis e de coloração amarelo-creme, são então caracterizados como calos friáveis embriogênicos (CFE's). Tais calos, adequados ao estabelecimento de suspensões celulares (Zamarripa, 1993), quando desprovidos de embriões, são reconhecidos como calos friáveis (CF's). Ao final do mesmo período de tempo indutivo de quatro meses, explantes foliares do canéfora Apoatã exibiam freqüências de 10 a 80% de CE's, as maiores freqüências se verificando, de maneira geral, quando o regulador de crescimento nos meios de cultura era unicamente citocinina (Figura 1d). Três meses após estas observações, todos os meios indutivos, à exceção da seqüência D1D2, promoveram o aparecimento de CFE's em explantes foliares Apoatã (Figura 1f). Quando o regulador de crescimento era apenas citocinina, as maiores freqüências de CEF's ocorreram na presença exógena de BAP 5µM, introduzido na primeira repicagem (A/B) ou presente desde o início da indução (B). Estas freqüências foram, contudo, duplicadas em resposta à ação combinada de auxina e citocinina (E1E2). Da comparação entre os resultados obtidos com as seqüências D1D2, E1E2 e E1E3 pode-se inferir que compostos com ação de auxinas, de citocininas ou de ambas, em associação, e/ou suas concentrações alteram diferentemente a magnitude da desdiferenciação celular (D1D2/E1E2) e que a ação exógena da auxina AIB, na presença de citocinina, pode favorecer mais a multiplicação que a diferenciação de células meristemáticas em explantes

foliares de Apoatã (E1E2/E1E3), à semelhança dos resultados obtidos por Berthouly e Michaux-Ferrière (1996) e por Cordeiro (1999). Embora a freqüência de CE's tenha aumentado em explantes foliares de Catuaí Vermelho, nos últimos três meses dos sete meses de indução, principalmente nos meios E, não se observaram CFE's em resposta aos meios indutivos testados (Figura 1e). A capacidade para a embriogênese somática tem sido encontrada variar inter (Cordeiro, 1999; Zamarripa, 1993) e intraespecificamente em *Coffea*, ao nível de variedades (Bieysse *et al*., 1993; Sondahl e Sharp, 1979) e de clones (Berthouly e Michaux-Ferrière, 1996; Ramos *et al*., 1993) e parece requerer condições experimentais genótipo-específicas para a sua expressão.

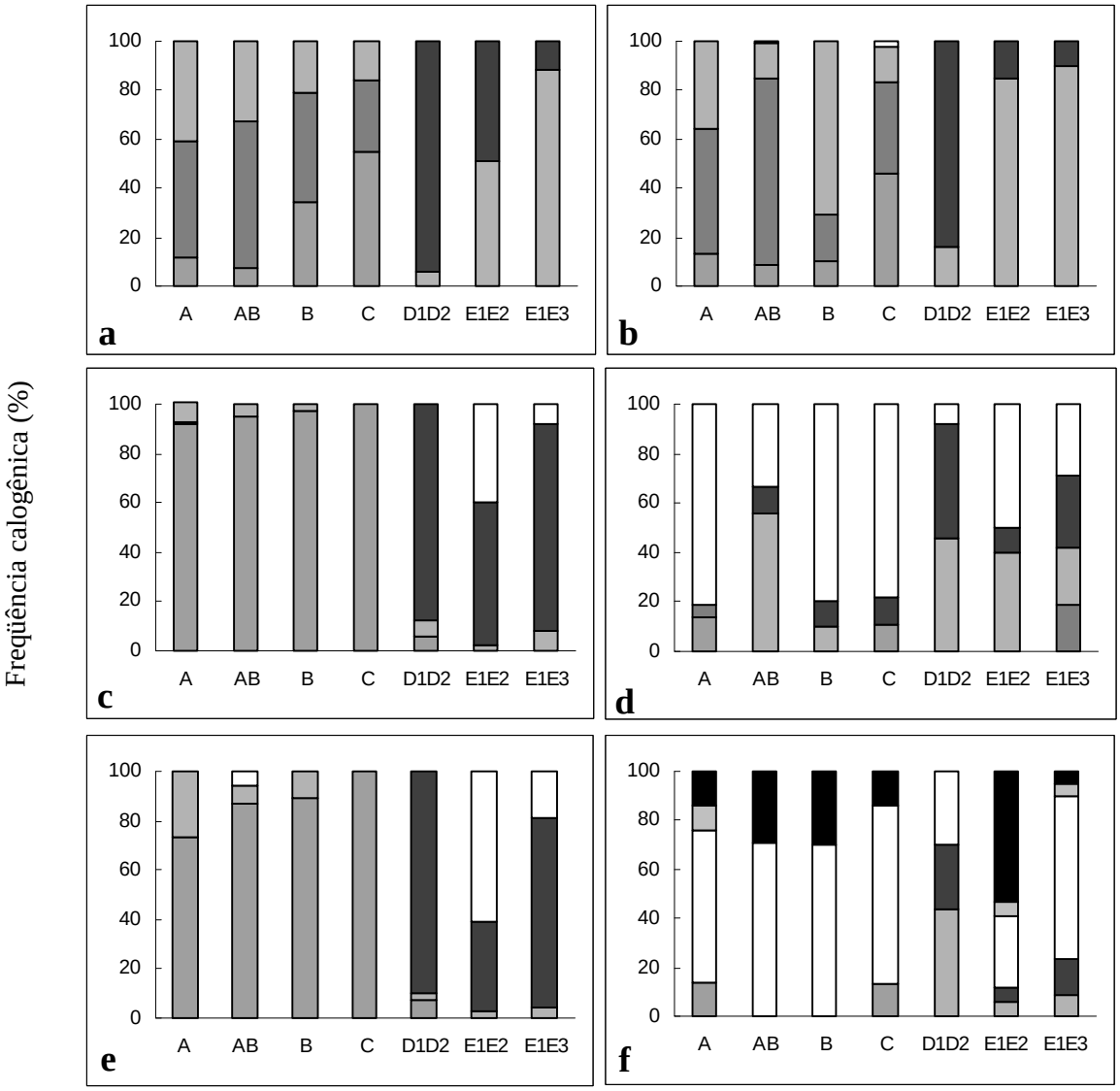


Figura 1 - Reação calogênica aos quatro (a, b, c, d) e sete (e, f) meses da indução de explantes foliares dos híbridos Catimor (a) e Cavimor (b), do arábica Catuaí Vermelho (c, e) e do canéfora Apoatã (d, f) submetidos a diferentes sequências de meios de cultura (▨. sem reação, ▬ calo cicatricial, ▩. calo primário nodular, ▩ calo primário misto, □. calo embriogênico, ▒ calo friável, ■ calo friável embriogênico)

De maneira geral, a produção média de embriões por explante foi maior para o canéfora Apoatã relativamente ao arábica Catuaí Vermelho (Figura 2). À exceção da seqüência de meios E1E3, para CE's de

Catuaí Vermelho, os demais CE's de Apoatã e de Catuaí tenderam a apresentar maiores rendimentos embriogênicos com o aumento do tempo de cultivo no intervalo entre seis e nove meses de pós-indução.

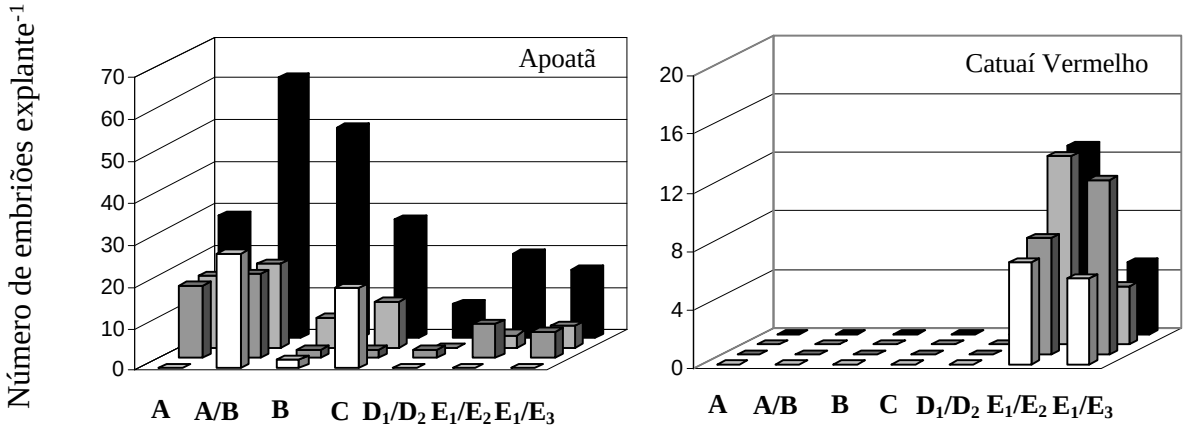


Figura 2 - Produção média de embriões por explante aos seis ( ), sete ( ), oito ( ) e nove meses ( ) do início da indução calogênica com diferentes seqüências de meios de cultura.

## CONCLUSÕES

Aos quatro meses do início da indução calogênica, todos os genótipos estudados, à exceção do híbrido interespecífico Catimor, responderam favoravelmente a calogênese primária tipo embriogênica, com magnitudes diferentes. Em ordem crescente, o híbrido Cavimor, o arábica Catuaí e o canéfora Apoatã. Três meses mais tarde, enquanto explantes foliares de Apoatã expressavam calos embriogênicos em resposta a todos os meios testados, os explantes de Catuaí os produziram praticamente quando a razão auxina/citocinina (1/5) foi mantida constante nos meios de indução e de diferenciação. A mesma combinação de meios induziu a maior freqüência de calos friáveis embriogênicos em explantes de Apoatã, que também se expressaram em resposta à adição de citocininas, principalmente BAP 5µM. O rendimento embriogênico foi maior em explantes do canéfora Apoatã relativamente ao Catuaí Vermelho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Berthouly M, Michaux-Ferriere N. 1996. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 44:169-176; Bieysse D, Gofflot A. Michaux-Ferriere N. 1993. **Can. J. Bot.**, 71:1496-1502;

Cordeiro AT. 1999. Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 111p;

Dublin P. 1981. **Café Cacao Thé**, 25:237-242;

Dublin P. 1984. **Café Cacao Thé**, 28:231-244;

Morel G, Wetmore RH. 1951. **Am. J. Bot**., 38:141-143;

Murashige T, Skoog F. 1962. **Physiol. Plant.**, 15:473-479;

Noriega C, Söndahl MR. 1993. **Colloque Scientifique International sur le Café**, 15, Montpelier. ASIC (Paris). p.73-81;

Pierson ES, van Lammeren AAM, Schel JHN, Staritsky G. 1983. **Protoplasma**, 115:208-216;

Ramos LCS, Yokdo EY, Gonçalves W. 1993. **Colloque Scientifique International sur le Café**, 15, Montpelier. ASIC (Paris). p.763-766;

Söndahl MR, Nakamura T, Sharp WR. 1985. In: RR Henke, KW Hughes, MP Constantin, A Hollaender (eds.), **Tissue Culture in Forestry and Agriculture.** Plenum Press, New York. p. 215-232;

Söndahl MR, Sharp WR. 1979. In: W.R. Sharp, P.D. Larsen, E.F. Paddock, V. Raghavan (eds), **Plant Cell and Tissue Culture – Principles and Applications.** Ohio State Univ. Press, Columbus. p.527-584;

Söndahl MR, Spahlinger DA, Sharp WR. 1979. **Z. Pflanzenphysiol**. Bd, 94:101-108 (Suppl);

Williams EG, Maheswaran G. 1986. **Ann. Bot.**, 57:443-462;

Yasuda T, Fujii Y, Yamaguchi T. 1985. **Plant Cell Physiol.**, 26:595-597;

Zamarripa A. 1993. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Rennes, France. 191p;

Zamarripa A, Ducos JP, Bollon H, Dufour M, Petiard V. 1991. **Café Cacao Thé**, 35:233-244.