

## OBTENÇÃO DE EMBRIÕES A PARTIR DE CALOS DE GENÓTIPOS DE *Coffea*<sup>1</sup>

ALMEIDA, J.A.S.<sup>2</sup>; SIMIONI, K.C.M.<sup>2</sup>; FAZUOLI, L.C.<sup>2</sup> e RAMOS, L.C.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Com suporte do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café; <sup>2</sup> Centro de Genética, Instituto Agrônomo de Campinas, Cx.Postal 28, CEP 13001-970, Campinas-São Paulo <lramos@iac.br>

**RESUMO:** Obtiveram-se embriões a partir de calos de oito genótipos de *Coffea*, que possuem elevado nível de heterozigose, intermediários ao Programa de Melhoramento de Café Icatu do IAC, utilizando a embriogênese somática a partir de explantes foliares. Planeja-se testar os clones desses genótipos mais tarde no campo. Calos de cada genótipo foram obtidos a partir de folhas das plantas desses oito genótipos que se acham no campo. Foram realizadas 25 coletas mensais de folhas, onde foram inoculados 9.750 explantes foliares em fase de pré-cultura, que em seguida foram transferidos para meio de indução de calos. Quando os calos atingiram diâmetro médio de 20 mm, foram transferidos para meio de diferenciação morfológica, para a formação de embriões. No momento, dispõe-se de cerca de 1.001 calos em meio de diferenciação morfológica. Os calos apresentaram respostas diferenciadas em número de embriões formados, destacando-se os genótipos 662, 1300, 1400 e 1977 com o maior número de embriões, enquanto os genótipos 1297, 1076, 1056 e 557 tiveram número menor. O genótipo 557 formou apenas um embrião, caracterizando eficiência baixa. Esse resultado indicou que os calos de todos os genótipos possuem capacidade de formação de embriões.

**Palavras-chaves:** calos, *Coffea*, embriões, embriogênese somática, explante foliar.

### ACQUISITION OF EMBRYOS STARTING FROM CALLUS OF *Coffea* GENOTYPES

**ABSTRACT:** Embryo induction was studied in eight heterozygous *Coffea arabica* mother plants, derived from an interspecific hybrid between *C. arabica* “Bourbon Vermelho” and *C. canephora* cv “Robusta”, the Arabusta, including the Catuai variety as check. Callus were obtained from monthly collected leaves of field grown plants from these eight genotypes. Presently, twenty five leaf collections were done, from which 9750 leaf explants were inoculated in preculture medium. Callus of the genotypes 662, 1300, 1400 and 1977 produced more embryos than the genotypes 1297, 1076, 1056 and 557.

**Key words:** callus, *Coffea*, embryos, somatic embryogenesis, leaf explant.

## INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos nas exportações agrícolas mundiais, movimentando mais de US\$ 10 bilhões por ano. O parque cafeeiro de São Paulo, que está entre os principais Estados produtores do País, é constituído de 549 milhões de pés, contribuindo com cerca de 25% da produção brasileira. Entretanto, a produtividade média do Estado de São Paulo é de 9,8 sacas de café beneficiado/ha, muito aquém da potencialidade média da cultura, que é de 25 sacas/ha. Assim, pesquisas desenvolvidas com o objetivo de melhorar esse desempenho são necessárias.

A micropropagação de plantas de cafeeiro representa uma via tanto para a propagação vegetativa quanto para a preservação de germoplasma. Conforme o tipo de explante utilizado e sua subsequente manipulação, a micropropagação pode ocorrer através da proliferação de gemas axilares e da embriogênese somática direta ou indireta.

A embriogênese somática a partir de explantes foliares de *Coffea* pode ocorrer por via indireta, em que inicialmente há formação de calo, que posteriormente, ao ser transferido para o meio de diferenciação morfológica, originará os embriões; ou via direta, em que os embriões serão formados diretamente de células da borda do explante (Dublin, 1981; Ramos et al., 1993).

O objetivo deste estudo foi obter embriões de cafeeiros a partir de calos, que possuem alta heterozigose, utilizando o processo de embriogênese somática indireta, que posteriormente será estudado quanto ao seu potencial agrônômico, em condição de campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas mensalmente folhas de plantas de oito genótipos de cafeeiros, as quais estão localizadas em área de campo, do IAC. As folhas coletadas foram desinfestadas com solução de detergente comercial (2%) para limpeza grosseira e logo em seguida submetidas à solução de hipoclorito de sódio 2%/20 minutos. Os explantes foliares obtidos destas folhas passaram por duas etapas; na primeira, foram inoculados em meio de pré-cultura, contendo metade dos sais de MS (Murashige & Skoog, 1962), com adição de 0,3 g/L de peptona e 0,1 g/L de extrato de levedura, com o objetivo de triar

os explantes não-contaminados. Na segunda etapa, os explantes sadios foram transferidos para o meio de indução de calos (sais de MS, com adição de 2,5 uM/L de 2,4 D e 5 uM/L de cinetina). Os calos formados a partir destes explantes, com diâmetro superior a 20 mm, foram segmentados em partes semelhantes e transferidos individualmente para o meio de diferenciação morfológica, para a indução da formação de embriões. Os embriões formados a partir destes calos foram transferidos para o meio de germinação (metade dos sais de MS, com 0,5 uM/L de NAA e 2,5 uM/L de cinetina).

Para a etapa de pré-cultura, utilizaram-se dez placas com cinco explantes em cada uma, para cada genótipo, e dez explantes, inoculados em frascos individuais, para a etapa de indução de calos. Todos os tratamentos foram mantidos em sala fotoperiódica com 16 horas de luz ou no escuro e em temperatura de 25 °C, sendo avaliados na etapa de indução de calos, a cada trinta dias, quanto a explantes com formação de calos, medida de diâmetro de calo e contagem do número de embriões formados.

Os dados médios de porcentagem de explantes com formação de calos e de diâmetro de calos foram submetidos à análise de variância pelo teste F; para comparação das médias, utilizou-se o teste de Duncan, ambos em nível de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados referem-se à obtenção de embriões a partir de calos dos oito genótipos de *Coffea* e às coletas mensais de folhas, isto é, dos explantes com formação de calos e do crescimento em diâmetro atingido por estes.

Foram realizadas vinte e cinco coletas mensais de folhas, onde 9750 explantes foram inoculados em fase de pré-cultura e logo em seguida inoculados em meio de indução de calos. Até a nona coleta, os calos formados apresentaram diâmetro de até 3 mm e tornaram-se oxidados. No entanto, a partir da décima coleta, os explantes foliares de todos os genótipos passaram a formar calos com maior diâmetro (20 mm, em média), quando foram mantidos no escuro. Assim, neste estudo serão apresentados os resultados obtidos da 10<sup>a</sup> a 24<sup>a</sup> coleta, a partir de explantes mantidos na luz e no escuro.

Na Tabela 1, nota-se que na maioria das coletas os explantes de todos os genótipos atingiram em média, elevada porcentagem de explantes com formação de calos, tanto na luz quanto no escuro. Entretanto, observaram-se diferenças entre os genótipos, isto é, na luz destacaram-se os genótipos 662, 1056 e 1297, que atingiram as maiores porcentagens médias de explantes com formação de calos, somente diferindo dos genótipos 557 e 1300, que tiveram as menores porcentagens. No escuro, todos os genótipos

tiveram porcentagens semelhantes de explantes com calos, exceto o genótipo 557, em que a porcentagem foi significativamente reduzida.

**Tabela 1** - Porcentagens de explantes foliares com formação de calos, mantidos em meio de indução de calos, provenientes de folhas coletadas mensalmente das plantas dos oito genótipos de *Coffea*

Genótipo	1999		2000								2001					Média
	10a	11a	12a	13a	14a	15a	16a	17a	18a	19a	20a	21a	22a	23a	24a	
	Out	Dez	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Ago	Set	Nov	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	
<b>LUZ</b>																
557	0,0	0,0	70,0	80,0	100,0	77,8	66,7	33,3	0,0	100,0	22,2	0,0	0,0	11,1	100,0	44,1 c
662	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	77,8	100,0	80,0	87,5	100,0	100,0	100,0	88,9	100,0	100,0	88,9 a
1056	100,0	80,0	100,0	100,0	88,9	100,0	77,8	100,0	100,0	80,0	100,0	100,0	20,0	100,0	100,0	89,8 a
1076	80,0	100,0	77,8	100,0	100,0	50,0	*									84,6 ab
1297	20,0	100,0	100,0	77,8	77,8	100,0	100,0	70,0	100,0	100,0	100,0	90,0	100,0	100,0	100,0	89,0 a
1300	100,0	100,0	100,0	11,1	66,7	90,0	0,0	60,0	80,0	83,3	60,0	33,3	0,0	20,0	100,0	60,3 bc
1400	80,0	60,0	60,0	100,0	90,0	100,0	50,0	40,0	66,7	50,0	80,0	50,0	55,6	100,0	100,0	72,2 ab
1977	100,0	100,0	57,1	20,0	71,4	100,0	50,0	0,0	100,0	100,0	100,0	50,0	88,9	70,0	100,0	73,8 ab
Média	60,0	80,0	83,1	73,6	86,8	86,9	63,5	54,8	76,3	87,6	80,3	60,5	50,5	71,6	100,0	75,3
<b>ESCURO</b>																
557	88,9	0,0	90,0	100,0	60,0	55,6	30,0	33,3	25,0	90,0	22,2	37,5	33,3	100,0	100,0	57,7 b
662	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	66,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	91,1 a
1056	100,0	90,0	100,0	100,0	100,0	100,0	44,4	100,0	100,0	70,0	100,0	100,0	50,0	100,0	100,0	90,3 a
1076	70,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	*									95,0 a
1297	44,4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	96,3 a
1300	88,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	90,0	90,0	100,0	100,0	100,0	88,9	33,3	100,0	100,0	92,7 a
1400	100,0	60,0	90,0	100,0	100,0	100,0	100,0	83,3	100,0	90,0	100,0	55,6	100,0	100,0	100,0	91,9 a
1977	100,0	100,0	100,0	100,0	75,0	75,0	44,4	10,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	87,0 a
Média	74,0	81,3	97,5	100,0	91,9	91,3	72,7	69,0	89,3	92,9	88,9	83,1	73,8	100,0	100,0	87,8

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

\* Planta morta.

O crescimento em diâmetro dos calos de todos os oito genótipos foi maior no escuro e menor na presença de luz (Tabela 2). No entanto, observou-se também que esse crescimento em diâmetro foi diferenciado entre os genótipos. Na luz, os calos do genótipo 1056 (3,1 mm) tiveram diâmetro significativamente maior, não diferindo dos genótipos 1076, 662 e 1297, enquanto os calos dos genótipos 557, 1300, 1400 e 1977 apresentaram os menores diâmetros. Já no escuro os genótipos não diferiram quanto ao diâmetro médio dos calos, exceto o genótipo 557, cujo diâmetro médio de calo foi significativamente menor.

Observou-se ainda que os genótipos apresentaram respostas diferenciadas conforme a época de coleta das folhas, assim estes resultados parecem sugerir que o estágio fisiológico da planta poderia influenciar a capacidade de embriogênese somática desses genótipos. Isto levando-se em conta, por

exemplo, que na luz os calos do genótipo 1056 tiveram maior diâmetro nas 15<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> coletas (14,4 e 6,2 mm, respectivamente) no escuro também observou-se a ocorrência de calos com diâmetro menor, igual ou inferior a 10 mm, principalmente para os genótipos 1400, 1300 e 1297, nas 10<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup> e 22<sup>a</sup> coletas. No entanto, conclusões maiores em relação a esse aspecto somente poderão ser feitas a partir de resultados referentes a um número maior de coletas, já que o cafeeiro é uma cultura bianual.

**Tabela 2** - Valores médios de diâmetro (mm) de calos formados a partir de explantes foliares, mantidos em meio de indução de calos, provenientes de folhas coletadas mensalmente das plantas dos oito genótipos

Genótipo	1999		2000								2001					Média
	10a	11a	12a	13a	14a	15a	16a	17a	18a	19a	20a	21a	22a	23a	24a	
	Out	Dez	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Ago	Set	Nov	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	
<b>LUZ</b>																
557	0,0	0,0	1,5	0,4	0,6	1,2	0,2	0,2	0,0	2,7	0,8	0,0	0,0	0,1	0,0	0,5 cd
662	0,0	2,3	2,3	3,0	2,8	1,2	3,4	0,7	1,9	3,5	4,3	1,6	1,0	1,0	0,3	2,0 abc
1056	2,4	1,5	3,8	2,0	2,2	14,4	1,5	3,4	3,0	2,3	6,2	2,0	0,1	1,2	0,0	3,1 a
1076	2,4	3,2	2,6	2,8	3,0	1,3	*									2,6 ab
1297	0,6	2,4	1,8	1,6	1,7	2,6	1,8	0,7	2,9	4,5	3,7	1,9	2,0	1,3	0,3	2,0 abc
1300	1,1	1,5	2,6	0,1	0,8	2,2	0,0	0,3	1,4	1,3	0,7	0,5	0,0	0,1	0,0	0,8 cd
1400	1,6	0,5	1,0	2,8	2,4	2,8	0,5	0,3	1,1	0,4	1,0	0,7	0,4	1,4	0,0	1,1 cd
1977	0,7	1,4	0,6	0,1	1,5	3,0	0,4	0,0	2,8	4,3	3,4	0,4	0,9	1,0	0,1	1,4 ecd
Média	1,1	1,6	2,0	1,6	1,9	3,6	1,1	0,8	1,9	2,7	2,9	1,0	0,6	0,9	0,1	1,7
Catuai	2,0	4,0	8,8	7,9									1,0	5,0	5,0	4,8
<b>ESCURO</b>																
557	5	0	3,5	14,9	5,8	2,9	4,7	3,3	0,6	23,3	2,8	0,4	0,8	1	1,6	4,7 b
662	0	26,8	21,3	25,8	28	26	23	9,7	30	27,8	24,3	11,1	9,3	10,9	4,5	18,6 a
1056	15	20,9	22,8	23,5	22,2	21,1	9,4	11,2	26,8	17,6	24,3	9,1	2,5	8,2	4	15,9 a
1076	16	20,9	17,7	18,4	21	7,4	*									16,9 a
1297	5,7	27,2	24,7	12,7	23,9	11,7	22,3	20,3	27,4	26,3	18,5	8,8	7,8	9,4	3,3	16,7 a
1300	7,7	36,3	27,5	15,9	15	20,1	20,8	18,9	27,8	14,2	14,5	4,6	2,6	5,5	1,5	15,5 a
1400	10	9,3	28,3	23,8	30,2	27,2	27,6	22,5	25	16	12,9	1,3	5,1	7,3	1,9	16,6 a
1977	11,3	21,7	27	23,7	18,4	19,6	12	0,2	27,1	26,8	14,1	11,9	8,2	7,9	0	15,3 a
Média	8,8	20,4	21,6	19,8	20,6	17	17,1	12,3	23,5	21,7	15,9	6,7	5,2	7,2	2,4	15
Catuai	14,6	27,5	24,7	21,1						17,1	15,7	3,4	2,3	7	3	13,6

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

\*Planta morta.

Calos de todos os genótipos atingiram o diâmetro médio de 20 mm com cerca de 120 dias. Quando os calos atingiram este diâmetro, parte deles foi transferida para meio de diferenciação morfológica (meio “C”), objetivando a formação de embriões, e a outra parte foi mantida ainda em meio de indução de calos (meio “M”), com o objetivo de preservar o material de cada coleta, tanto na luz quanto no escuro, respectivamente. Já foram transferidos para esses meios calos da 10<sup>a</sup> a 19<sup>a</sup> coleta. Assim, atualmente,

cerca de 1.001 calos foram inoculados em meio de diferenciação morfológica e 597 em meio de indução de calos, provenientes da 10<sup>a</sup> a 19<sup>a</sup> coleta (Tabela 3).

O número total de embriões formados foi de 1.160, desde a 10<sup>a</sup> a 19<sup>a</sup> coleta (Tabela 3). Esses embriões foram transferidos para meio de germinação, e a maioria se encontra entre os estádios de torpedo e de plântulas, com até 1 cm de altura. Na Figura 1 observa-se um *cluster* de embriões formado a partir de calo do genótipo 1300. O número de embriões formados foi diferenciado entre os calos de cada um dos oito genótipos, sendo maior para os genótipos 1400 (329), 662 (183), 1297 (181), 1300 (178) e 1977 (178), e formaram número menor os genótipos 1076 (85), 1056 (25) e 557 (1). Dentre os genótipos, o 557 apresentou maior dificuldade para a formação de embriões, caracterizando eficiência baixa.

Verificou-se também a formação de embriões em meio de indução de calos. Este resultado é relevante e contradiz o que normalmente se verifica com calos de *Coffea*, já que neste meio não é comum a ocorrência de embriões, e sim apenas a formação de calos. Esse aspecto deverá ser estudado, posteriormente, em maiores detalhes.

**Tabela 3** - Número de calos dos oito genótipos mantidos em meio de diferenciação morfológica "C" e meio de indução de calos "M" e o número total de embriões formados a partir desses calos

Genótipos	Número de calos						Total geral	
	Meio C			Meio M			Calos	Embriões
	Luz	Escuro	Total	Luz	Escuro	Total		
557	26	36	62	23	22	45	107	1
662	80	61	141	44	54	98	239	183
1297	47	57	104	30	44	74	178	181
1300	78	73	151	30	41	71	222	178
1400	73	81	154	35	52	87	241	329
1977	62	52	114	32	41	73	187	178
1076	32	59	91	18	15	33	124	85
1056	61	63	124	27	45	72	196	25
Total	39	21	60	17	27	44	104	1160
Catuaí	498	503	1001	256	341	597	1598	2620



**Figura 1** - Calo com formação de *cluster* de embriões do genótipo 1300.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DUBLIN, P. 1981. Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. **Café-Cacao-Thé**. WWv, (4): 237-242.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. 15:473-498.
- RAMOS, L.C.S.; Yokoo, E.Y.; Gonçalves, W. 1993. Direct somatic embryogenesis is genotype specific in coffee. **ASIC, 15<sup>o</sup> Colloque**, pp. 763-766.