

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Coffea arabica* A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES

BARRUETO CID, L.P.¹ e CRUZ, A.R.R.¹

¹ Área de Biologia Celular-Embrapa-Cenargen, C.P. 02372, CEP 70849-970, Brasília-DF. Fax 613403624; <lpedro@cenargen.embrapa.br>

RESUMO: Explantes foliares de “seedlings” cultivados *in vitro* de *Coffea arabica* cv. Rubi, Catuaí Vermelho 81 e IAPAR 59 foram inoculados *in vitro*. Dois tipos de experimentos foram realizados. No primeiro, os explantes foram inoculados em MS suplementados com 4 µM de Picloram. Todos os explantes ficaram no escuro à temperatura padrão de 27 ± 2 °C. Depois de quatro semanas, os explantes revelaram 100% de indução de calos. Por isso, o material de Rubi e Catuaí Vermelho 81 foi transferido para meio SP suplementado com 0, 12, 24 e 48 µM de BAP, enquanto o material de IAPAR 59, para 48 µM de BAP. Quando a indução de embriões somáticos começou, eles foram transferidos para meio SP sem BAP, presença de luz e temperatura-padrão. No segundo experimento, explantes foliares dos três cultivares foram colocados em meio SP suplementado com 0, 2,5 e 5,0 µM de BAP. O material ficou no escuro à temperatura-padrão. Nestas condições, apenas o material de IAPAR 59 apresentou embriogênese somática, direta neste caso, enquanto os outros dois cultivares, nem embriogênese nem calogênese. Por isso, apenas o material de IAPAR 59 foi transferido para meio SP sem BAP para promover a germinação e crescimento dos embriões somáticos igual que no experimento anterior, ficando na luz e temperatura padrão. Em geral, a germinação transcorreu em alta percentagem, porém foram observadas anormalidades em alguns casos: no desenvolvimento radicular ou parte aérea. Por outro lado, as plântulas desenvolvidas foram transferidas para vermiculita e mantidas no laboratório por 15 dias, e depois para terra em casa de vegetação, onde originaram plantas similares às originadas por sementes. Embora se tenha conseguido um protocolo simples e inédito de embriogênese somática nas cultivares mencionadas, são necessários maiores estudos para aumentar a qualidade e quantidade da frequência embriogênica.

Palavras-chave:

INTRODUÇÃO

Dentre as modalidades da cultura de tecidos em café, a embriogênese somática tem sido freqüentemente citada no esforço por estabelecer um protocolo de micropropagação clonal tanto para *C. arabica* quanto para *C. canephora* (Staritsky, 1970; Herman & Haas, 1975; Dublin, 1981; Sondal et al., 1984; Hatanaka et al., 1995; Boxtel & Berthouly, 1996; Etienne, 1999; Fuentes et al., 2000). Por outro lado, estratégias inovativas como a propagação através de biorreatores (Preil et al., 1988; Noriega & Sondal, 1993) e sementes sintéticas (Onishi et al., 1994; Castillo et al., 1998) 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 apresentar resultados preliminares sobre embriogênese somática de três cultivares de *C. arabica*, almejando estabelecer um protocolo eficiente de regeneração, seja para ser usado em multiplicação clonal, transformação de genótipos elites, ou conservação de embriões somáticos através de criopreservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Usando segmentos de folhas oriundas de *seedlings* cultivadas *in vitro*, pertencentes a três cultivares de *Coffea arabica*: Rubi, Catuaí Vermelho 81 e IAPAR 59, dois experimentos foram realizados. Todos os explantes foram inoculados com a superfície adaxial em contato com o meio, e seu tamanho aproximado foi de 10 x 5 mm.

Experimento 1

Explantes foliares de Rubi e Catuaí Vermelho 81 e IAPAR 59 foram inoculadas em meio Murashigue & Skoog (1962) – MS – suplementado com 4 µM de Picloram (ácido 4-amino 3,5,6-tricloropico-línico). Foram colocados 10 explantes por placa de Petri (90 x 15 mm) num total de 40 placas. O material ficou no escuro à temperatura de 27 ± 2 °C (temperatura-padrão) por quatro semanas.

Depois desse tempo, o material cologênico foi transferido para meio SP (Barrueto Cid et al., 1999) modificado, mais sacarose 20 gr l⁻¹, phytigel 2.5 gr l⁻¹ e 6-benzilaminopurina, BAP, nos seguintes níveis: 0, 12, 24 e 48 µM. Foram utilizadas 10 placas por tratamento, com cinco explantes por placa de Petri. O material foi deixado no escuro à temperatura-padrão por algum tempo.

Após desse período, e visando a germinação e crescimentos dos embriões somáticos, o material foi transferido para SP sem BAP, com o objetivo de consolidar seu crescimento, permanecendo à luz com

fotoperíodo de 16h, irradiância de aproximadamente $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura como já mencionado anteriormente.

Experimento 2

Explantes foliares de Rubi, Catuaí Vermelho 81 e IAPAR 59 foram inoculados em placas Petri com meio SP suplementado com 0, 2,5 e 5 μM de BAP mantidos no escuro à temperatura-padrão. Foram usadas 10 placas por tratamento, com cinco explantes por placa; após umas semanas, apenas o material embriogênico de IAPAR 59 foi transferido para o mesmo meio, mas sem BAP.

As plântulas assim obtidas, após 60 dias, com tamanho médio de 20 mm de altura e raiz de 15 mm, foram transferidas para copo de plástico com vermiculita umedecida, cobertas por um saco plástico transparente e mantidas transitoriamente sob condições de laboratório por um período de duas semanas. Durante a transferência para vermiculita, no cv. Rubi, foram observados embriões somáticos numa pequena formação calogênica na base do caule.

Depois da vermiculita, as plântulas foram transferidas para terra, mantidas em casa de vegetação com umidade relativa ambiental não-controlada e irrigadas periódica e manualmente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao primeiro experimento, foi observado que Rubi Catuaí Vermelho 81 e IAPAR 59, sob a ação do Picloram, 100 % dos explantes apresentaram calos de cor bege, branco e não-marrom. No controle, isto é, zero de Picloram, calos não foram observados. Interessante que esta auxina não tinha sido reportada em trabalho de embriogênese com café. Por outro lado, estes calos foram, na maioria das vezes, emergindo da nervura central da face adaxial dos explantes e não tanto da margem cortada das folhas (Figura 1A).

Nos três cultivares, a produção de embriões somáticos em SP mais BAP, se deve a partir de calos marrons e aconteceu sem ter as características de embriogênese de alta frequência relatadas em outros casos (Sondahl & Sharp, 1977; Boxtel & Berthouly, 1996). Chamou a atenção o fato de que os embriões observados foram avermelhados no caso de IAPAR 59 e brancos nos outros casos (Figura 1B-C). Tanto para Rubi como para Catuaí Vermelho 81 nas diferentes concentrações de BAP: 0, 12, 24 e 48 μM , a percentagem de calos embriogênicos foi aproximadamente de: 0,0; 2,0; 10,0; e 40,0%, respectivamente. No caso de IAPAR 59 essa percentagem foi menor: 26%.

Em relação ao segundo experimento, foi constatado que Rubi e Catuaí Vermelho 81 não apresentaram nenhuma resposta embriogenética ou calogênica, apesar de os explantes terem se mantidos verdes. Em oposição a Rubi e Catuaí Vermelho 81, IAPAR 59 apresentou embriogênese somática direta, isto é, sem passar pela fase de calo, como consequência da ação do BAP (Figura 1D). Contudo, este tipo de padrão embriogenético não tem sido freqüentemente descrito na literatura (Reynolds & Murashige, 1979; Barrueto Cid, 1987; Huong et al., 1999). Aproximadamente uns 30% dos explantes de IAPAR 59 produziram embriogênese somática na concentração de 5 μ M, contra 12% da concentração de 2,5 μ M. No controle, 0 μ M de BAP, não foi observada embriogênese. Chamou a atenção o fato de que este cultivar foi capaz de apresentar embriogênese indireta e direta, sendo os embriões no primeiro caso avermelhados e, no segundo, brancos, fato ainda não conhecido pela literatura. Em geral, a tendência foi a formação de um a dois “clusters” por explante foliar, contendo aproximadamente de 10 a 15 embriões por “cluster”; na concentração de 5 μ M os “clusters” apresentaram maior número de embriões.

Quando os embriões dos três cultivares foram transferidos para meio de germinação e crescimento, SP sem BAP, eles apresentaram crescimento normal e vigoroso (Figura 1E), mas aproximadamente um terço destes apresentou anormalidades independentemente da via embriogenética, se direta ou indireta, e não se desenvolveram como plântula. Essas anormalidades estavam relacionadas com o não-desenvolvimento da raiz ou parte aérea, porém, as plântulas com raiz e parte aérea, quando transferidas para vermiculita primeiro e depois para terra, apresentaram um fenótipo normal, se comparadas a plantas originadas de sementes (Figura 1F).

Pelos presentes resultados, conclui-se que foi estabelecido um protocolo de obtenção de plantas a partir de embriogênese somática de três cultivares de *C. arabica* de importância agrônômica; a partir daqui, com certeza outros protocolos com maior eficiência e maior número de embriões deverão ser alcançados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRUETO CID, L. P. (1987). Regeneração de plantas de *Elaeis oleifera* e de seu híbrido com *Elaeis guineensis* via embriogênese somática. **Pesp. agropec.bras.**, Brasília, 22:109-113
- BARRUETO CID, L.P.; MACHADO, A C.M.G.; CARVALHEIRA, S.B.R.C. & BRASILEIRO, A C.M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Plant Cell Tiss. Org. Cul.**, 56:17-23, 1999.
- BOXTEL, J. VAN & BERTHOULY, M. (1996). High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 44:7-17.

- CASTILLO, B.; SMITH, M.A & YADAVA, U. L. (1998). Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. **Plant Cell Reports**, 17:172-176.
- DUBLIN, P. (1981). Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier arabusta. **Café Cacao Thé**, 25:237-241.
- ETIENNE, H.; BARRY-ETIENNE, D.; VÁSQUEZ, N. & BERTHOULY, M. (1999). Aportes de la biotecnología al mejoramiento genético del café; el ejemplo de la multiplicación por embriogénesis somática de híbridos F1 en América Central. In: Bertrand B & Rapidel, B (eds). **Desafios de la cafeicultura en Centroamérica**. Agromerica, San José - Costa Rica.
- FUENTES, S.R.L.; CALHEIROS, M.B.P., FILHO, J.M. & VIEIRA, L.G.E. (2000). The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell Tiss. and Org. Cult.**, 60:5-13
- HATANAKA, T.; SAWABE, E; AZUMA, T.; UCHIDA, N. & YASUDA, T. (1995). The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. **Plant Science**, 107:199-204
- HERMAN, E.B. & HAAS, G.J. (1975). Clonal propagation of *coffea arabica* L. from callus culture. **HortScience**, 10: 588-589
- HUONG, L.H. ; BAIOTTO, M.; HUY, B.P.; MEZZETTI, B.; SANTILOCCHI, R. & ROSATI, P. (1999). Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 56:1-7.
- NORIEGA, C. & SONDAHL, M.R. (1993). *Arabica coffea* micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactor. In: 15ème Colloq. Sci. Int. Café, Montpellier, 6-11 June. ASIC Paris.
- ONISHI, N.; SAKAMOTO, Y. & HIROSAWA, T. (1994). Synthetic seeds na application of mass production of somatic embryos. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 39: 137-145.
- PREIL, W.; FLOREX, P.; WIX, U. & BECK, A. (1988). Towards mass propagation by use of biorreactor. **Acta Horticulturae**, 226: 99 –106.
- REYNOLDS, J.F. & MURASHIGE, T. (1979). Asexual embryogenesis in callus cultures of palm. **In vitro**, 15: 383-387.
- SONDAHL, M.R. & SHARP, W.R. (1977). High frequency induction of somatic embryos in culture leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. **Pflanzenphysiol.**, 81:395-408.
- SONDAHL, M.R.; NAKAMURA,T.; MEDINA-FILHO, A ; CARVALHO,L.C. & COSTA,W.M. Coffee. In: Ammirato,P.V.; Evans, D.A. ; Sharp, W.R. & Yamada,Y. (eds). **Handbook of plant cell culture**. V 3, Crop species, New York:Macmillan Publ. Comp. 1984. p 564590.
- STARITSKY, G. (1970). Embryoid formation in callus cultures of coffee. *Acta Botanica Neerlandica*, 19:509-514.

LISTA DE FIGURAS



Figura 1A - Em explante foliar de Rubi, indução de calo pelo efeito de Picloram (aumento 1,5 x).

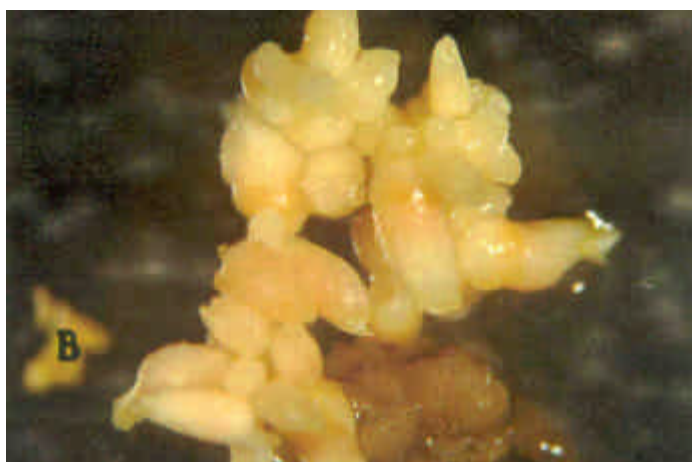


Figura 1B - A partir de explante foliar de Rubi, embriogênese somática indireta (2,5 x).



Figura 1C - Idem a B, mas em IAPAR 59 (2 x).



Figura 1D - A partir de explante foliar de IAPAR 59, embriogênese somática direta (2,5 x).



Figura 1E - Plântula de Catuaí Vermelho 81 originada de embriogênese somática indireta com 50 dias de idade desde a germinação do embrião (20 mm).

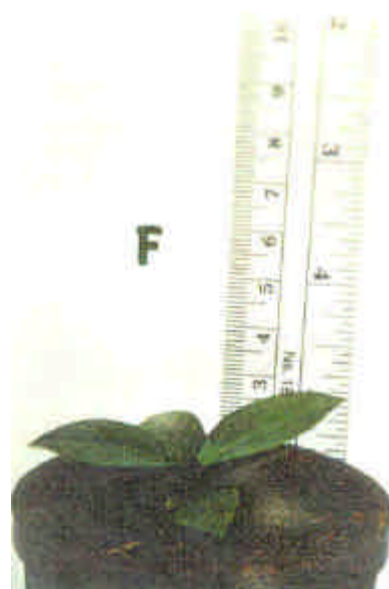


Figura 1F - Planta de Catuaí Vermelho 81, em casa de vegetação, após 45 de transferência para terra.