

EFEITO DO GENÓTIPO E DE MEIO DE CULTURA NA RESPOSTA À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PLANTAS MATRIZES DE *COFFEA*

Camila Lopes Purchatti²; Wallace Gonçalves³; Luis Carlos da Silva Ramos⁴

¹ Trabalho parcialmente financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café - CBP&D/Café

² Bolsista FUNAPE, IAC, Campinas-SP, camislp@gmail.com

³ Pesquisador, D.Sc., IAC, Campinas-SP lramos@iac.sp.gov.br

⁴ Pesquisador, PhD, IAC, Campinas-SP Wallace@iac.sp.gov.br

RESUMO: Foram estudados 12 genótipos de *Coffea* com o objetivo de produzir clones de plantas matrizes via embriogênese somática: 11 plantas matrizes da espécie *C. canephora* e uma de *C. arabica*, IAC 2008 (planta 12). Foram inoculados cerca de 1.025 explantes, testados em três meios de cultivo iniciais: “M”, “Cz” e “JB”. Calos obtidos em meio “M” foram transferidos para meio “C”, o qual favorece a indução de embriões; calos embriogênicos obtidos no meio “JB” e “Cz” foram transferidos para o meio “MM” para fins de multiplicação. Verificou-se um efeito tanto do meio de cultura quanto do genótipo. No meio “M” todos os genótipos produziram calos claros, não embriogênicos. No meio “Cz”, 9 das 12 plantas apresentaram embriogênese direta, sendo que as plantas 1, 3 e 9 foram exceções. Já no meio “JB” os explantes produziram calos claros, típicos de meio “M”, com exceção das plantas 1, 3, 5, e 9, que produziram calos de cor creme. As plantas 4, 5, 8 e 11 consideradas embriogênicas responsivas em meio “Cz”, tiveram uma resposta dos explantes próxima ou igual a 100% de indução de embriões, enquanto as plantas 2, 6, 7, 10 e 12 formaram embriões em uma taxa próxima de 50% e as plantas 1, 3 e 9 produziram apenas calos de cor creme, sendo consideradas como não responsivas, ou recalcitrantes. Explantes das plantas 6 e 10, além de produzirem embriões, produziram calos claros de natureza embriogênica; após serem transferidos para meio “C”, estes formaram embriões. O meio “Cz” induziu embriogênese com maior frequência.

Palavras-Chave: Embriogênese somática, café, genótipos, hormônios, plantas matrizes.

GENOTYPE AND MEDIUM EFFECT ON SOMATIC EMBRYOGENESIS RESPONSES FROM MOTHER PLANTS OF *COFFEA*

ABSTRACT: Twelve special coffee (*Coffea*) mother plants were subjected to somatic embryogenesis studies in order to clone them. Eleven were from *C. canephora* and one from *C. arabica*, the IAC 2008 (plant no. 12). Over 1.025 leaf explants were inoculated in three different media: “M”, “Cz” and “JB”. White and non-embryogenic calli were obtained from medium “M”, which were transferred to the “C” medium for embryogenesis induction. Furtherly, embryogenic calli obtained in media “JB” or “Cz” were transferred to “MM” medium for increasing purposes. Genotype and medium were observed to affect the somatic embryogenesis response. Direct somatic embryogenesis was obtained with medium “Cz” in 9 from the 12 plants, but plants no. 1, 3 and 9 did not respond as such. Cream color calli were produced in medium “JB” for plants no. 1, 3, 5, and 9, but clear calli were produced by the other plants instead. Thus, plants no. 4, 5, 8 and 11 were considered as embryogenic responsive in medium “Cz”, because almost 100% of their explants were embryogenic, while explants from 2, 6, 7, 10 and 12 had a 50% rate and plants 1, 3 and 9 were not embryo responsive (recalcitrant), producing cream calli only. Besides embryos, explants from plants 6 and 10, produced clear calli of embryogenic nature because they generated embryos soon after transferred to the “C” medium. The “Cz” medium induced higher frequency of somatic embryogenesis than “JB”.

Key words: Somatic embryogenesis, coffee, genotype, hormones, mother plants.

INTRODUÇÃO

Plantas de *C. canephora* são autoincompatíveis sendo assim naturalmente heterozigotas. Por isso, a utilização de clones ao invés de sementes, em estudos dessa espécie, é o mais indicado por excluir a variável genotípica em testes experimentais, como estudos de tolerância a pragas ou doenças.

Neste trabalho, foram feitos estudos com o objetivo de clonar plantas de café via embriogênese somática. A embriogênese somática pode ser feita na forma direta ou indireta. Na forma direta pode-se usar meio de cultura provido com citocininas, mas desprovido de auxinas, como o meio “Cz” desenvolvido por Ramos, et al. (1993), notavelmente para *C. canephora*. Nesta espécie já foi demonstrada pelos mesmos autores a existência de um forte componente genotípico na resposta à embriogênese somática

A via indireta foi estabelecida por Sondahl et al. (1977) e faz uso de um meio inicial de indução de calos, os quais são transferidos para um meio secundário para indução de embriões. Similarmente a este processo, Boxtel e Bertouly (1996) desenvolveram também um protocolo para *C. arabica*.

Com o objetivo de estudar o efeito do genótipo e do meio de cultura na resposta embriogênica, foram usados doze genótipos, bem como foram usados três meios distintos, abordando as vias direta e indireta com as 12 plantas matrizes. Esses doze genótipos apresentam tolerância a nematóides e a ferrugem do cafeeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 12 genótipos de *Coffea* (Tabela 1), cujas plantas se achavam em uma estufa climatizada, sendo 11 plantas matrizes da espécie *C. canephora* e uma de *C. arabica* (planta 12). Para a desinfestação das folhas foi seguido o procedimento descrito por Ramos, et. al (1993).

Tabela 1: Listagem dos genótipos de *Coffea* utilizados para clonagem .

Número	Genótipo
1	<i>C. canephora</i> var. Robusta nº 108
2	<i>C. canephora</i> var. Robusta nº 76
3	<i>C. canephora</i> var. Robusta nº 4
4	<i>C. canephora</i> var. Robusta nº 98
5	<i>C. canephora</i> var. Kouillou nº 8
6	<i>C. canephora</i> var. Robusta nº 18
7	<i>C. canephora</i> var. Robusta nº 35
8	<i>C. canephora</i> var. Kouillou nº 2
9	<i>C. canephora</i> var. Robusta nº 17
10	<i>C. canephora</i> var. Laurentis nº 30
11	<i>C. canephora</i> var. Robusta nº 24
12	<i>C. arabica</i> var. IAC 2008

Foram testados três protocolos de cultura de tecidos iniciais com as doze plantas: (1) o meio “M”, adaptado por Ramos (1986, não publicado) a partir de Sondahl et al. 1977, consistindo de 2,5 mM/L de 2,4-D e 5 mM/L de cinetina, utilizado para obtenção de calos; (2) o meio “Cz” (Ramos, et al. 1993) contendo 5 mM/L de Zeatina para indução de embriogênese direta e (3) o meio “JB” foi adaptado por Teixeira (2004) a partir de Boxtel e Bertouly (1996) utilizado para a indução de embriões. Todos os meios iniciais foram geleificados com 2,4g/L de fitagel. Parte dos calos obtidos a partir de meio “M” foram transferidos para meio “C” modificado por Ramos (1986, relatório não publicado), de Sondahl et al. 1977, contendo cinetina a 2,5mM/L e NAA a 0,5 mM/L, usado para proporcionar o desenvolvimento embrionário. Parte dos calos cremosos ou amarelos obtidos no meio “JB” foram transferidos para meio “MM”, conforme protocolo de Teixeira (2004) também para multiplicação; parte também foi transferida para meio “C”.

No total foram inoculados cerca de 1.025 explantes de aproximadamente um cm², das 12 plantas. Cerca de 432 explantes foram inoculados inicialmente; após dez dias foi feita uma segunda inoculação com 462 explantes, e decorridos 50 dias da primeira, foram inoculados 134 explantes adicionais dos genótipos menos responsivos nas duas inoculações anteriores. Inicialmente as inoculações foram feitas em placas de petri com seis explantes por placa; após cinco dias os explantes que se mantinham sadios foram transferidos para frascos de 20 cm de diâmetro, sendo que cada frasco continha um explante. Estes foram mantidos na ausência de luz durante os primeiros 180 dias, expondo-os a luz fluorescente posteriormente.

As avaliações foram feitas a cada trinta dias nas quais foram analisados os seguintes aspectos: oxidação dos explantes, utilizando notas visuais de 0 (não oxidado), 1 (leve oxidação) e 2 (oxidação acentuada); diâmetro dos calos formados bem como a intensidade de formação de calos ao redor do explante, adotando-se notas visuais de 0 (sem formação de calos) a 5 (com formação de calos em todas as bordas do explante).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os doze genótipos usados neste trabalho não eram de resposta embriogênica conhecida, por essa razão foram testados os três protocolos, com os meios iniciais “Cz”, “M” e “JB”. Observou-se a formação de embriões 120 dias após a inoculação dos explantes no meio “Cz” (Fig. 1), com exceção das três plantas 1, 3 e 9, conforme mostra a Tabela 2. Destas três, as plantas 1 e 9 produziram calos amarelos de natureza embriogênica (Fig. 2), já a planta 3 produziu aos 270 dias. Também foi notado que a oxidação foi constante em todos os explantes independente do meio inoculado,

enquanto o diâmetro dos calos foram maiores em meio “M” e “JB” do que em “Cz”, por fim, a intensidade de formação tanto de calos como de embriões apresentou maior quantidade em meio “M” e “Cz” do que em meio “JB”.

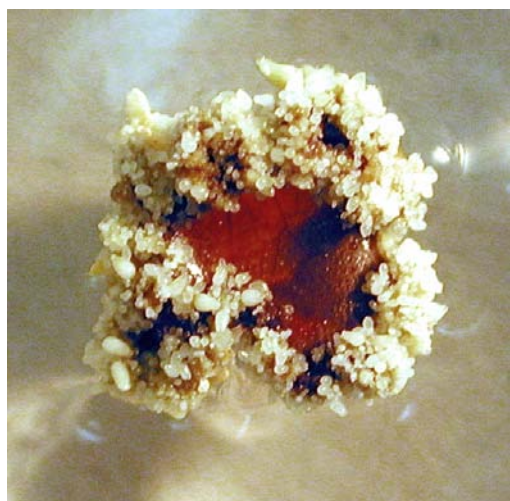


Figura 1. Explante embriogênico proveniente de genótipo responsivo em meio “Cz”, planta 4, aos 120 dias após inoculação.



Figura 2. Explante não-embriogênico proveniente de genótipo não-responsivo em meio “Cz”, planta 9, aos 120 dias.

Tabela 2: Formação de calos (Cal), de embriões (Emb), oxidação dos explantes (Ox), intensidade de formação dos calos (Int) e diâmetro (Dia) dos mesmos, aos cinco meses após a inoculação de explantes foliares das plantas matrizes de café nos meios “M”, “Cz” e “JB”.

Gen	Meio Cz					Meio JB					Meio M				
	Cal	Emb	Ox	Int	Dia	Cal	Emb	Ox	Int	Dia	Cal	Emb	Ox	Int	Dia
					mm					mm					Mm
1	CA	NE	2,0	5,0	2,0	CC	NE	2,0	3,0	5,0	Peq	NE	2,0	4,0	1,5
2	CG	E	2,0	3,0	2,5	CC	NE	1,5	3,0	13,0	Grde	NE	2,0	4,5	16,0
3	CG	NE	2,0	4,5	3,0	CA	NE	2,0	3,0	7,0	Peq	NE	2,0	5,0	4,0
4	CG	E++	2,0	4,5	2,5	CC	NE	1,5	5,0	11,0	Grde	NE	2,0	5,0	13,0
5	CG	E	1,0	4,5	1,5	CA	NE	2,0	3,0	8,0	Peq	NE	2,0	5,0	5,0
6	CF	E, R	0,0	5,0	12,0	CC	NE	1,5	4,0	10,0	Grde	NE	2,0	4,0	12,0
7	CF	E	2,0	4,5	13,0	CC	NE	2,0	5,0	13,0	Peq	NE	2,0	5,0	10,0
8	CF	E	1,0	4,0	7,5	CC	NE	2,0	5,0	10,0	Grde	NE	0,0	5,0	7,0
9	CA	NE	2,0	5,0	4,0	CA, CC	NE	2,0	4,0	7,0	Peq	NE	2,0	5,0	4,0
10	CF, CV	E--	1,0	5,0	10,0	CC, CA	NE	2,0	1,0	1,5	Grde	NE	0,0	5,0	12,0
11	CG	E--	0,5	1,0	2,0	CA, CC	NE	2,0	3,0	12,0	Peq	NE	2,0	5,0	3,0
12	CC	E--, R	2,0	3,5	3,0	CC	NE	2,0	5,0	13,0	Peq	NE	2,0	4,5	6,0

Legenda: CA: Calos amarelos ou de cor creme; CC: Calos claros; CG: Calos Globulares; CF: Calos Friáveis; E --, E-, E, E+, E++: Intensidade de formação de embriões: -- (mínima); ++ (máxima); NE: ausência de embriões; R: formação de raízes Peq.: formação de calos com diâmetro menor que 10 mm, Grde.: Formação de calos com diâmetro maior que 10 mm

Ao analisar as taxas de formação de embriões (Tabela 3) as plantas 4, 5, 8 e 11 foram consideradas responsivas em meio “Cz” (Fig. 1), por apresentarem valores próximos a 100%, as plantas 2, 6, 7, 10 e 12 formaram embriões em uma taxa próxima de 50%, consideradas de resposta intermediária, enquanto que as plantas 1, 3 e 9 produziram apenas calos de cor creme, sendo consideradas não responsivas, ou recalcitrantes (Fig. 2). Explantes das plantas 6 e 10, além de produzirem embriões, produziram calos claros de natureza embriogênica; o que foi verificado após serem transferidos para meio “C” quando formaram embriões (Tabela 4; Fig. 3).

Todos os genótipos produziram calos em meio “M”; todavia, calos produzidos em meios “Cz” e “JB”, mas que produziram pouco, ou nenhum, embrião nestes meios, foram transferidos para meio “C”, como tentativa de aumentar a taxa de formação de embriões. Parte dos calos também foi transferida para meio fresco “M” para crescimento. Com isso obteve-se uma indução adicional de embriões em quinze dos 58 calos transferidos para meio “C”. Ademais, observou-se a formação de raízes nos calos da planta 6 (Tabela 4).

Os dados obtidos corroboram a existência do efeito genotípico bem como do tipo do meio de cultura empregado, conforme já descrito por Ramos et. al (1993).

Tabela 3: Taxas de formação de calos de calo amarelo (CA), de embriões (Embr) em 12 genótipos (Gen), aos nove meses após a inoculação de explantes foliares das plantas matrizes de café nos meios “M”, “Cz” e “JB”.

Gen	Cz					JB					M				
	Inoc	Embr	CA	emb	CA	Inoc	Embr	CA	Emb	CA	Inoc	Embr	CA	emb	CA
				%	%				%	%				%	%
1	36	0	33	0,0	100	18	0	0	0,0	0,0	18	0	5	0	35,7
2	36	14	0	46,7	0	18	0	0	0,0	0,0	18	0	0	0	0,0
3	36	0	34	0,0	100	48	17	23	47,2	63,9	17	0	17	0	100,0
4	41	32	32	100,0	100	18	0	0	0,0	0,0	18	0	1	0	5,9
5	36	32	32	100,0	100	48	2	10	5,1	25,6	18	0	12	0	100,0
6	36	7	0	20,6	0	18	0	0	0,0	0,0	18	0	0	0	0,0
7	38	14	0	38,9	0	12	0	0	0,0	0,0	18	0	1	0	6,3
8	42	29	0	82,9	0	41	0	0	0,0	0,0	17	0	0	0	0,0
9	36	0	31	0,0	100	45	0	2	0,0	4,7	24	0	0	0	0,0
10	36	9	0	25,0	0	44	0	0	0,0	0,0	18	0	3	0	33,3
11	36	23	0	85,2	0	46	0	1	0,0	2,5	18	0	2	0	11,8
12	36	15	0	45,5	0	15	0	0	0,0	0,0	18	0	0	0	0,0

Tabela 4: Formação de embriões (Embr), calos amarelos (CA) e raízes nos doze genótipos (Gen) após 60 dias da transferência de calos claros formados em meio “M”, “JB” e “Cz”, para meio “C” e “M”.

Transferência 1						
Gen	Calos	Meio		Embr	CA	Raiz
	#	Inicial	Final	#	#	#
6	6	M	M	0	0	0
6	6	M	C	2	0	0
6	4	Cz	M	0	0	1
6	8	Cz	C	3	0	2
8	8	M	M	0	0	0
8	16	M	C	1	0	0
10	3	M	M	0	0	0
10	6	M	C	0	2	0
10	4	Cz	M	0	0	0
10	8	Cz	C	7	0	0
11	3	JB	M	0	0	0
11	6	JB	C	1	0	0
12	2	M	M	0	0	0
12	8	M	C	1	0	0

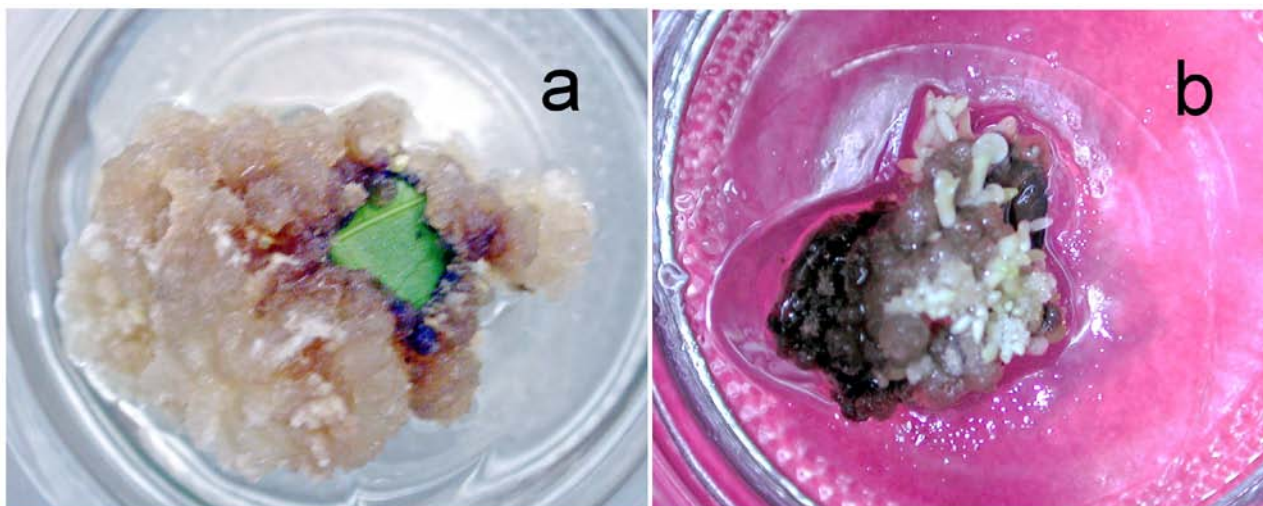


Figura 3. (a) Explante de embriogênese intermediária, produzindo calos claros em meio “Cz”, planta 10, aos 120 dias. **(b)** Explante de embriogênese intermediária, produzindo embriões após transferência a meio “C”, planta 10, aos 150 dias.

CONCLUSÕES

Foi possível analisar a resposta à embriogênese somática nas doze plantas matrizes utilizadas, bem como o meio mais propício para a indução de embriões.

Observou-se que a resposta à embriogênese somática variou tanto para o genótipo testado quanto para meio. O meio “Cz” induziu a embriogênese com maior frequência, podendo ser considerado mais indicado para as plantas responsivas. Enquanto o protocolo “JB” induziu a produção de calos amarelos em quatro plantas.

Para o meio “Cz”, as plantas 4, 5, 8 e 11 foram consideradas embriogênico-responsivas, as plantas 2, 6, 7, 10 e 12 foram consideradas de resposta intermediária, enquanto que as plantas 1, 3 e 9 foram consideradas como não responsivas, ou recalcitrantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOXTEL, VAN J. ; BERTHOULY, M. 1996. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell Tissue Org. cult.* 44:7-17.
- RAMOS, L. C. S. ; YOKOO, E. Y. ; GONÇALVES, W. 1993. Direct embryogenesis is genotype specific in coffee. XV international Congress of “Assoc. Scientifique Internationale du Café”. Montpellier, France. ASIC 15(2):763-766.
- SONDAHL, M. R. & SHARP, W. R. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 81:395-408.
- TEIXEIRA, J. B., JUNQUIERA C. S., PEREIRA, A. J. P. C, MELLO, R. I. S., SILVA, A. P. D., MUNDIM D. A. 2004. Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática. Embrapa Documentos 121. Brasília, DF.