

# 34º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras

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

ALB Neto e MN Saito - 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)

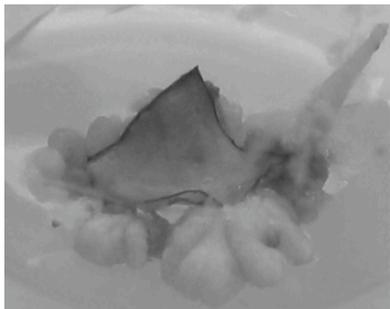
O café é responsável pelo segundo maior capital gerado no planeta, com uma movimentação monetária em torno de 91 bilhões de dólares e gerando cerca de 500 milhões de empregos. O melhoramento genético do café desde sua implantação no Brasil já demonstrou grandes avanços em cultivares que apresentam qualidades 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 frequentemente 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.

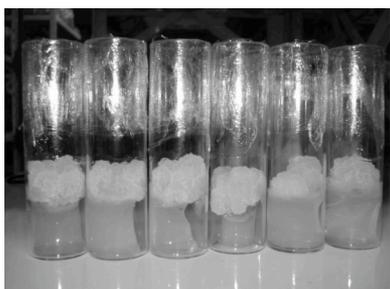
O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia do Colégio Técnico de Pompéia, mantido pela Fundação Shunji Nishimura de Tecnologia, em Pompeia-SP. Foram avaliados diferentes tipos e concentrações de reguladores vegetais na formação de calos, calos embriogênicos e embriões somáticos a 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 e acrescido de 15g 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 8 tratamentos, com diferentes concentrações e combinações de ANA (Ácido Naftalenoacético), 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e CIN (Cinetina). 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 multiplicação de calos e indução de embriões somáticos, utilizou-se respectivamente os meios CE1 e CE2, os quais foram constituídos pelo meio 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.



**Figura 1** - Calos primários, embriogênicos e embriões somáticos obtidos em meio de indução T4, a partir de segmentos foliares de café cv. Obatã, Pompéia, 2008.



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

## Resultado e Conclusões

Os melhores resultados obtidos para indução de calos na primeira fase, ocorreram nos meios T7 ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de CIN e  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA), obtendo-se 41,3% de explantes que formaram calos, T4 ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D), com 31,3% de explantes que formaram calos e T6 ( $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D) com 25% de explantes que formaram calos. Nestes meios de cultura, houve a formação de calos, calos embriogênicos e embriões somáticos nos estádios globular, cordiforme e torpedo (Figura 1), sem a necessidade de transferência do material para outro meio de cultura. No meio de cultura que continha apenas ANA a  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  (T3) 25% dos explantes formaram calos, porém houve apenas formação de calos primários, sem a formação de calos embriogênicos e embriões somáticos. 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 dediferenciação, 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 café. 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 externa. Conclui-se, portanto, que tanto tratamentos com 2,4-D aplicados isoladamente ou com a adição de CIN promovem a formação de calos, calos embriogênicos e embriões somáticos em segmentos foliares de cafeeiro, porém, há necessidade de adição de citocininas externas ao meio para indução de calos embriogênicos a partir de calos primários isolados. A adição de CIN ao meio de indução, associado a uma auxina, aumenta a porcentagem de explantes com calogênese.