

## OBTENÇÃO DE MUDAS CLONAIIS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

João Batista Teixeira<sup>1</sup>; Ana J. P. Pereira<sup>2</sup>; Cristina S. Junqueira<sup>3</sup>; Raquel I.S. de Mello<sup>3</sup>; Ana Paula D. da Silva<sup>4</sup>; Danielle A. Mundim<sup>3</sup> e E-mail: [batista@cenargen.embrapa.br](mailto:batista@cenargen.embrapa.br)

<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF; <sup>2</sup>Escola Superior Agrária de Bragança, Portugal; <sup>3</sup>Bolsista do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café; <sup>4</sup>Bolsista do IBICT-CNPq;

### Resumo

A exploração da heterozigose, por meio de cruzamentos inter-varietais e inter-específicos, depende da disponibilidade de uma metodologia de multiplicação vegetativa. Esta metodologia é essencial, tanto para avaliação e seleção de clones em condições de campo quanto para plantios comerciais em larga escala das variedades híbridas após o seu lançamento. Visando revisar a metodologia de clonagem de café via embriogênese somática, experimentos foram conduzidos, nos quais foram utilizadas plantas matrizes de vários genótipos, cultivadas em casa de vegetação. Após a desinfestação, explantes de 0,5 x 0,5 cm aproximadamente foram inoculados em placas de Petri contendo 20 ml do meio básico de MS a 50%, acrescido de 4,9  $\mu\text{M}$  de IBA, 9,8  $\mu\text{M}$  de 2-iP e 20  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Após 30 dias, os explantes foram transferidos para placas contendo o mesmo meio fresco, com redução do 2,4-D para 10  $\mu\text{M}$ , onde permaneceram por mais 90 a 120 dias até o aparecimento dos setores embriogênicos, quando foi feita a avaliação final. A taxa de formação de calos primários foi próxima de 100% para a maioria dos genótipos, enquanto que a taxa de formação de setores embriogênicos foi de 8,3; 36,8; 41,9; 100 e 84,3%, respectivamente para 'Mundo Novo', 'Icatu Amarelo', 'Acaia Cerrado', 'Catuaí Vermelho' e 'Rubi'. Os setores embriogênicos foram isolados e diferenciados em meio de regeneração de MS a 50%, acrescido de 1,3  $\mu\text{M}$  de ANA e 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP. A taxa de regeneração foi de 71,5%. Os embriões foram transferidos para maturação e germinação em meio de MS a 50%, acrescido de 1,1  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,6  $\mu\text{M}$  de AIA. Após dois meses, os embriões foram transferidos para meio de crescimento em magenta, constituído do meio básico de DKW a 20%, acrescido de 1,3  $\mu\text{M}$  de BAP. Com mais um a dois meses de cultivo, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação para aclimação.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L.; micropropagação; clonagem; embriogênese somática

## CLONAL PROPAGATION OF COFFEE (*Coffea arabica* L.) VIA SOMATIC EMBRIOGENESIS

### Abstract

The exploitation of heterozygosity, through inter-varieties or inter-specific crossing depends on availability of vegetative multiplication protocol. This methodology is essential for evaluation of selected clones under field conditions as well as for large scale plantations of hybrid varieties after their releasing. With the objective of revising the cloning methodology of coffee through somatic embryogenesis, experiments were conducted, in

which mother plants from several genotypes grown under greenhouse conditions were utilized. After disinfection, explants measuring approximately 0.5x0.5 cm were inoculated in Petri plates containing 20 ml of MS basic medium, half strength, supplemented with 4.9  $\mu\text{M}$  IBA, 9.8  $\mu\text{M}$  2-iP, and 20  $\mu\text{M}$  2,4-D. After 30 days, the explants were transferred to plates containing 10  $\mu\text{M}$  2,4-D and cultured for 90 to 120 days until the formation of embryogenic sectors. After this period, the final evaluation was conducted. Primary callus formation rate was almost 100% for the most of the genotypes. On the other hand, the embryogenic sectors formation was 8.3; 36.8; 41.9; 100, and 84.3%, respectively for 'Mundo Novo', 'Icatu Amarelo', 'Acaiá Cerrado', 'Catuaí Vermelho' e 'Rubi'. The embryogenic sectors were isolated and differentiated on MS regeneration medium, half strength, supplemented with 1.3  $\mu\text{M}$  ANA, and 8.8  $\mu\text{M}$  BAP. The regeneration rate was 71,5%. The embryos were transferred to MS maturation and germination medium, half strength, supplemented with 1.1  $\mu\text{M}$  BAP, and 2.6  $\mu\text{M}$  AIA. After two months, the embryos were transferred to growing medium in Magenta<sup>®</sup> box, containing DKW basal medium, 20% of original formula, supplemented with 1.3  $\mu\text{M}$  BAP. After one or two months of culture, the plantlets were transferred to greenhouse for acclimatization

Key words: *Coffea arabica* L.; micropropagation; cloning; somatic embryogenesis

## Introdução

O uso de variedades de *Coffea arabica* geneticamente estáveis, embora tenha contribuído substancialmente para se atingir um patamar elevado de produtividade, limita as possibilidades de exploração da variabilidade genética existente, sobretudo no que se refere ao potencial representado pela heterozigose em plantas híbridas. A exploração da heterozigose, por meio de cruzamentos inter-varietais e inter-específicos, depende da disponibilidade de uma metodologia de multiplicação vegetativa. Esta metodologia é essencial, tanto para a multiplicação do material genético para os experimentos de avaliação e seleção de clones em condições de campo quanto para plantios comerciais em larga escala das variedades híbridas após o seu lançamento. Visando revisar a metodologia de clonagem de café via embriogênese somática, experimentos foram conduzidos, nos quais foram utilizadas plantas matrizes de vários genótipos, cultivadas em casa de vegetação.

## Material e Métodos

Folhas expandidas de plantas de café das variedades Mundo Novo, Icatu Amarelo, Acaiá Cerrado, Catuaí Vermelho e Rubi foram desinfestadas em álcool a 70% por 1-3 minutos, seguido de hipoclorito de sódio a 2,4% por 10 minutos e lavadas três vezes com água estéril. Explantes de 0,5 x 0,5cm, aproximadamente, foram inoculados em placas de Petri contendo 20 ml do meio básico de MS a 50%, acrescido de 4,9  $\mu\text{M}$  de IBA, 9,8  $\mu\text{M}$  de 2-iP e 20  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Após 30 dias, os explantes foram transferidos para placas contendo o mesmo meio fresco, com redução do 2,4-D para 10  $\mu\text{M}$ , onde permaneceram por mais 90 a 120 dias até o aparecimento dos setores embriogênicos, quando foi feita a

avaliação final. Os setores embriogênicos foram isolados e diferenciados em meio de regeneração de MS a 50%, acrescido de 1,3  $\mu\text{M}$  de ANA e 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP. Os embriões foram transferidos para maturação e germinação em meio de MS a 50%, acrescido de 1,1  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,6  $\mu\text{M}$  de AIA. Após dois meses, os embriões foram transferidos para meio de crescimento em Magenta<sup>®</sup>, constituído do meio básico de DKW a 20%, acrescido de 1,3  $\mu\text{M}$  de BAP. Ao final de dois meses de cultivo, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação para aclimatação.

## Resultados e Discussão

O início da formação de calos primários se deu após duas a três semanas de cultivo e a partir de 30 dias já era possível avaliar a intensidade e frequência de formação desse tipo de calo. Em geral, os calos primários se formavam a uma taxa de 100% para a maioria dos genótipos avaliados, entretanto, houve uma tendência de menor produção de calos na variedade Mundo Novo. Após o primeiro mês de cultivo, observou-se uma gradual oxidação tanto do explante quanto dos calos primários presentes, os quais se formavam exclusivamente nos bordos do explante.

Ao final de 90 a 100 dias do início do cultivo, era possível observar através de microscópio estereoscópico a presença dos primeiros setores com características embriogênicas e, ao final de quatro meses de cultivo, já era possível observá-los a olho nu. Os setores com características embriogênicas eram observados sobre os calos primários oxidados, em número de um ou mais por explante. A taxa de formação de setores embriogênicos foi de 8,3; 36,8; 41,9; 100 e 84,3%, respectivamente para 'Mundo Novo', 'Icatu Amarelo', 'Acaia Cerrado', 'Catuaí Vermelho' e 'Rubi' (Fig. 1). Em vários experimentos realizados, foi observada uma influência marcante do genótipo.

Ao serem transferidos para meio de regeneração, nem todos os setores aparentemente embriogênicos resultaram na formação de embriões. Em três experimentos realizados, a taxa de regeneração foi de 71,5%. (Tabela 1).

A regeneração foi conduzida em meio contendo BAP e ANA, sendo a concentração de ANA menos de 1/6 da concentração de BAP. Se a relação de BAP/ANA for diminuída principalmente pelo aumento dos níveis de ANA, era observada uma inibição da regeneração acompanhada por uma multiplicação da massa celular embriogênica. Após um mês no meio de regeneração, já era possível observar os primeiros embriões que se destacavam da massa embriogênica por sua coloração esbranquiçada e textura granular. Após mais um mês de cultivo, os embriões eram subcultivados em meio de maturação, de mesma composição, apenas reduzindo a quantidade de massa por volume de meio para 10g/L ao contrário da regeneração que teve início na densidade de 1g/L de células. A maturação se completou com um a dois meses de cultivo onde ocorreu a formação, mas não a germinação dos embriões. A germinação dos mesmos foi inibida pela alta densidade de embriões por volume, o que conferia um certo grau de sincronização no desenvolvimento dos mesmos.

A germinação foi conduzida no mesmo meio, mas já na presença de luz, com a redução da densidade novamente para 10 g/L, o que foi suficiente para estimular a germinação e crescimento das plântulas. Este procedimento foi conduzido em frascos de Erlenmeyer, mantidos em agitadores orbitais, em roladores de frascos ou em biorreatores de

imersão temporária. Quando as plântulas apresentavam alguns centímetros de altura e formação das primeiras raízes, foi conduzida a aclimação. A sobrevivência em condições *ex vitro* foi alta, acima de 80%, para plântulas com altura superior a 2 cm.

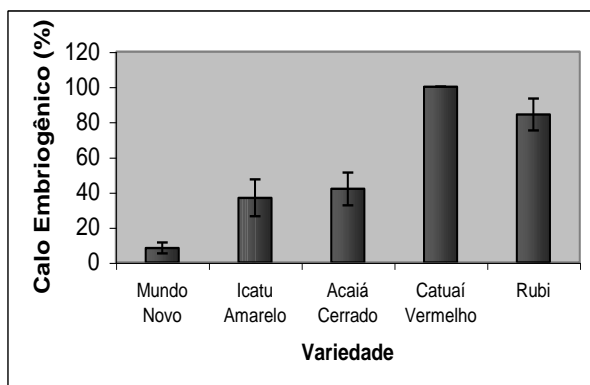


Figura 1. Resposta embriogênica de cinco variedades de café (*Coffea arabica* L.)

Tabela 1. Regeneração de embriões em meio gelificado, a partir de calos embriogênicos friáveis obtidos em três diferentes experimentos.

	Total de linhagens	Nota de regeneração							
		zero	%	um	%	dois	%	três	%
Experimento 1	61	17	27,4	13	21,3	13	21,3	18	30
Experimento 2	30	6	19,7	12	40	7	23,3	5	17
Experimento 3	56	21	37,5	26	46,4	6	10,7	3	5,4
Média	49	14,7	28,2	17	35,9	8,7	18,4	8,7	17,5

Nota um: poucos embriões; dois: quantidade mediana; três: regeneração considerada máxima

## Conclusões

- A formação de calos primários foi observada na maioria dos explantes após duas a três semanas para todos os genótipos avaliados;
- A quantidade de calos primários variou de explante para explante;
- Setores embriogênicos ocorreram sempre sobre os calos primários e só foram observados após três meses e meio a quatro meses do início do cultivo;
- Ao contrário do esperado, quanto mais vigoroso o calo primário menor era a frequência de formação de setores embriogênicos. Parece haver uma competição entre o crescimento de calos primários e a indução de formação de setores embriogênicos;
- Os setores embriogênicos novos apresentavam invariavelmente coloração amarela intensa, textura granular e friável;
- A capacidade regenerativa do calo embriogênico não reduziu com a idade. Em alguns experimentos, observou-se uma certa correlação positiva entre o envelhecimento dos calos embriogênicos e sua capacidade de regeneração;

- Algumas linhagens consideradas embriogênicas, tomando como base o seu aspecto visual, não regeneraram embriões quando transferidas para meio de regeneração;
- Visualmente, não foi detectada nenhuma variação que sugerisse a presença de variação somaclonal.
- A metodologia pode ser utilizada para multiplicação em escala piloto de clones promissores, para avaliação do seu comportamento no campo.

## **Referência Bibliográfica**

GALLAIS, A. **Théorie de la sélection en amélioration des plantes**. Paris: Masson, 1990. 588 p.;

SÖNDAHL, M.R.; SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, v.81,p.395-408, 1977;

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15,p.473-497, 1962;

BOXTEL, J. & BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 44, p.7-17, 1996;

DRIVER, J.A. & KUNIYUKI, A.H. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, Alexandria, VA, v.19, p.507-509, 1984.