

# THIDIAZURON COMO INDUTOR DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CAFÉ (*Coffea canephora* Pierre)<sup>1</sup>

Adilson Kenji **KOBAYASHI** (adilson@sercomtel.com.br), Luiz Filipe Protasio **PEREIRA**, João Carlos **BESPALHOK FILHO**, Alessandra Ferreira **RIBAS**, Rafaelo Marques **GALVÃO** e Luiz Gonzaga Esteves **VIEIRA**  
**Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR)**

**RESUMO:** Os efeitos de thidiazuron (TDZ) na indução de embriogênese somática em *Coffea canephora* foi investigado. Explantes foliares de *C. canephora* foram cultivados em um meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de TDZ. Embriões somáticos foram observados nas concentrações de 0,25 até 2  $\mu\text{M}$ , após dois meses em cultivo. Dentre os tratamentos testados, TDZ a 1  $\mu\text{M}$  mostrou a mais alta frequência de explantes com regeneração e maior número de embriões por explante. Entretanto, a indução de embriogênese somática ocorreu de forma não-sincronizada com todos os tratamentos investigados apresentando embriões em diferentes estádios de desenvolvimento.

**PALAVRAS-CHAVE:** TDZ, embriogênese somática, *Coffea canephora*.

**ABSTRACT:** The effects of thidiazuron (TDZ) on the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora* were investigated. Leaf explants of *C. canephora* were cultured on a medium supplemented with TDZ at different concentrations. After two months of culture, somatic embryos were observed in treatments ranging from 0.25 to 2  $\mu\text{M}$ . Among the concentrations tested, TDZ at 1  $\mu\text{M}$  showed the highest frequency of regenerating explants and the highest number of embryos per explant. However, the induction of somatic embryogenesis was not synchronized, with all treatments showing embryos at different stages of development.

## INTRODUÇÃO

A multiplicação clonal de genótipos superiores é de grande importância, especialmente em espécies auto-incompatíveis como é o caso de *Coffea canephora*. O estabelecimento de uma metodologia eficiente de regeneração via embriogênese somática é essencial não apenas para multiplicação clonal em larga escala de um determinado genótipo, mas também para trabalhos que visem a manipulação genética.

O regulador de crescimento thidiazuron (TDZ) tem sido descrito como uma substância com potente efeito citocinínico, com capacidade de induzir a diferenciação somática em diferentes espécies vegetais (Sanago et al., 1996; Hutchinson et al., 1996; Leshem et al., 1994; Bretagne et al., 1994). Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito de TDZ na indução de embriogênese somática em *C. canephora*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Folhas jovens e completamente expandidas de *Coffea canephora*, provenientes de plantas cultivadas no campo, foram utilizadas como fonte de explantes. As folhas foram desinfestadas superficialmente com uma solução de 1% de hipoclorito de sódio por 20 minutos e enxaguadas 5 vezes com água destilada estéril. Segmentos foliares de aproximadamente 1  $\text{cm}^2$  foram cultivados em meio de cultura para embriogênese direta descrito por Hatanaka et al. (1991), consistindo de 1/4 da concentração de macronutrientes e 1/2 da concentração de micronutrientes dos sais de MS (Murashige e Skoog, 1962) e as vitaminas de B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado com 5  $\text{g.L}^{-1}$  de Phytigel, 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose e diferentes concentrações de TDZ (0,25; 0,5; 1,0 e 2,0  $\mu\text{M}$ ). O pH da solução foi ajustado para 5,7 antes de autoclavar. As culturas foram mantidas no escuro a 27°C. Para cada tratamento foram feitas três placas contendo dez explantes por placa. Os experimentos foram repetidos três vezes.

Após dois meses em cultivo, os efeitos de TDZ na indução de embriogênese somática em *C. canephora* foram avaliados levando-se em consideração os seguintes parâmetros: número total de embriões por explante, percentual das diferentes fases de desenvolvimento do embrião (i.e. globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) e frequência de explantes com regeneração por tratamento (Tabela 1). Explantes com embriões

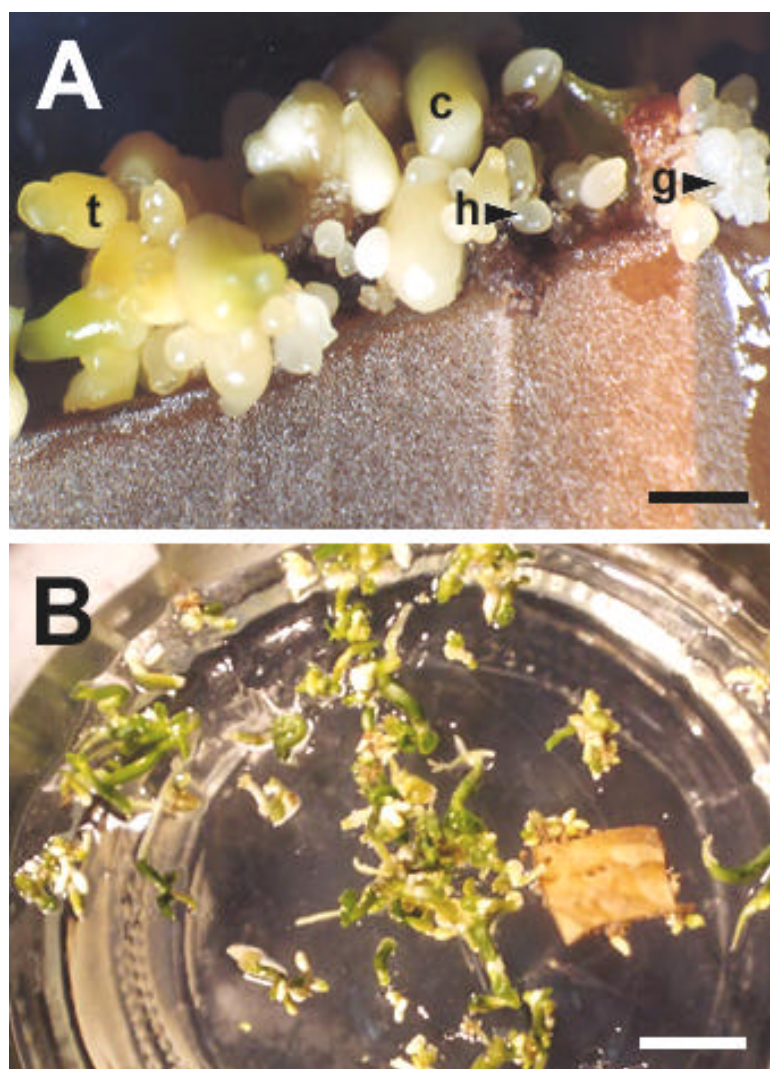
<sup>1</sup> Apoio Financeiro: CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ

somáticos foram transferidos para o mesmo meio de cultura acima descrito, sem a presença de TDZ, para o desenvolvimento das plantas (Figura 1B).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A indução de embriogênese somática foi observada em todos os tratamentos. A concentração de 1  $\mu\text{M}$  TDZ apresentou o melhor resultado com os maiores números de embriões por explante e porcentagem de explantes com embriões (Tabela 1). Em todas as concentrações testadas, a embriogênese ocorreu de uma forma não-sincronizada, indicando diferentes fluxos na indução embriogênica. Após dois meses em cultivo, todos os estádios de desenvolvimento da embriogênese somática puderam ser observados, algumas vezes em um mesmo explante (Figura 1A). O mecanismo pelo qual tal fenômeno ocorre é ainda desconhecido. Entretanto, a falta de sincronia na indução e regeneração embriogênica constitui um fator negativo na micropropagação bem como em estudos de manipulação genética.

Embora TDZ tenha apresentado melhoras significativas na frequência embriogênica em algumas espécies vegetais (Visser et al., 1992; Bretagne et al., 1994), estudos comparativos realizados em nosso laboratório têm demonstrado que 2-ip (2-isopenteniladenina) como fonte de citocinina apresenta resultados superiores, especialmente em relação a sincronia, na indução embriogênica de *C. canephora* (dados não apresentados).



**Figura 1.** Indução de embriogênese somática por TDZ em *C. canephora*. (A) Explantes foliares cultivados na presença de 1  $\mu\text{M}$  TDZ após 2 meses. Letras e setas indicam os diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões (g: globular, h: cordiforme, t: torpedo e c: cotiledonar). Barra = 1 mm. (B) Embriões somáticos transferidos em meio de cultura sem TDZ para desenvolvimento de plantas. Barra = 1 cm.

TDZ ( $\mu$ M)	Embriões por explante <sup>1</sup>	Estádios de diferenciação embriogênica (%)				Frequência <sup>2</sup> (%)
		Globular	Cordiforme	Torpedo	Cotiledonar	
0	0	—	—	—	—	0
0,25	17,2 $\pm$ 7,4	25	13	54	8	39
0,50	28,6 $\pm$ 3,9	46	15	37	2	58
1,00	76,5 $\pm$ 7,8	34	12	42	2	72
2,00	21,3 $\pm$ 6,7	47	37	16	0	63

<sup>1</sup>Média  $\pm$  desvio padrão do número de embriões por explante com regeneração.

<sup>2</sup>Porcentagem de explantes com regeneração por tratamento.

**Tabela 1.** Efeitos de diferentes doses de TDZ na diferenciação somática de *C. canephora* após dois meses de cultivo.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRETAGNE, B.; CHUPEAU, M.C.; CHUPEAU, Y.; FOUILLOUX, G. 1994. Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source. **Plant Cell Reports**, 14: 120-124.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean cells. **Journal of Experimental Research**, 50: 151-158.
- HATANAKA, T.; ORAKAWA, O.; YASUDA, T.; UCHIDA, N.; YAMAGUCHI, T. 1991. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. **Plant Cell Reports**, 10: 179-182.
- HUTCHINSON, M.J.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. 1996. Morphoregulatory role of thidiazuron: Evidence of the involvement of endogenous auxin in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey). **Journal of Plant Physiology**, 149: 573-579.
- LESHEM, B.; RONEN, R.; LURIE, S. 1994. Thidiazuron and paclobutrazol appear to mimic cytokinin and auxin influences on organ regeneration and protein profiles in cultured melon cotyledons. **Journal of Plant Physiology**, 143: 344-348.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, G. F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497.
- SANAGO, M.H.M.; SHATTUCK, V.I.; STROMMER, J. 1996. Rapid plant regeneration of pea using thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 45: 165-168.