

Embriogênese somática indireta em explantes foliares de café Conilon.

Medeiros, Emmanuel Cabral¹; Camara, Terezinha Rangel²; Willadino, Lilia³

¹Graduando de Engenharia Agrônômica - UFRPE; Bolsista PIBIC/CNPq/UFRPE. Rua D, Manuel de Medeiros, S/N. Recife-PE. CEP: 52171900. Fone (81) 3320-6364/6366, e-mail: emmanuel.agro@bol.com.br; ²Professora do Depto de Química -(UFRPE), e-mail: tkrcamara@pq.cnpq.br. ³Professora do Depto de Biologia UFRPE, e-mail: lilia@pq.cnpq.br.

INTRODUÇÃO

O café é o segundo maior gerador de riquezas do planeta. O Brasil possui uma área plantada de 2,7 milhões de hectares, com aproximadamente seis bilhões de pés de café. O setor é responsável pela geração de sete milhões de empregos e por uma riqueza anual de cerca de quatro bilhões de dólares. A espécie *Coffea canephora* Pierre Ex-Froehner responde por 27,7% dos dois milhões de toneladas de grãos beneficiados na safra de 2005 (Embrapa Café, 2007). Essa espécie é cultivada em altitudes inferiores a 500 metros e sua principal variedade é conhecida como Conilon. O cultivo do café Conilon na Zona da Mata de Pernambuco traduz-se em importante contribuição sócio-econômica para o estado uma vez que a colheita dessa variedade coincide com a entressafra da cana-de-açúcar.

C. canephora apresenta auto-incompatibilidade e é estritamente alógama. A reprodução por sementes leva à formação de lavouras muito heterogêneas com plantas expressando características muito distintas quanto à arquitetura, vigor, uniformidade de maturação dos frutos, etc (Montagnon et al., 1998a; 1998b).

O melhoramento genético dessa espécie compreende uma etapa sexuada que consiste na seleção fenotípica de indivíduos em campos com população heterogênea; e outra vegetativa, que consiste na clonagem dos genótipos selecionados. A clonagem por estaquia só é feita com ramos ortotrópicos, o que limita a disponibilidade de estacas e danifica a arquitetura da planta. Atualmente, a cultura de tecidos é uma etapa requerida na cultura do café para a propagação de genótipos, para a produção e seleção de novos somaclones e para a transformação genética. A embriogênese somática é um método de regenerar plantas de café, mas seu êxito depende de diversas condições como, estado fisiológico, tipo de explante, tempo de subcultivo e genótipo (Maciel et al., 2003; Brito, 2004).

A partir de genótipo de *C. canephora* selecionado na Zona da Mata de Pernambuco, foram realizados ajustes de protocolo para embriogênese somática.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFRPE. Foi utilizada a planta UFRPE-08 selecionada em cafezal mantido no campus da UFRPE em Recife. Foram retiradas folhas da segunda axila do terceiro ramo plagiotrópico, com comprimento médio de 9,0 cm, segundo metodologia de Brito (2004). As folhas foram levadas para o laboratório, lavadas com detergente neutro e enxaguadas em água corrente durante 60 minutos. Após a lavagem, foram submetidas à assepsia, em câmara de fluxo laminar, colocadas em frascos de vidro previamente autoclavados e imersas em solução comercial de hipoclorito de sódio (2,0-2,5% de cloro ativo), por 30 minutos sob agitação. Em seguida, as folhas foram enxaguadas por quatro vezes com água destilada esterilizada, durante dois, três, quatro e cinco minutos cada enxágüe. Discos com 0,7 cm de diâmetro foram retirados com auxílio de instrumento perfurador. Cada disco era composto de limbo foliar e parte de nervura secundária. Os explantes foram inoculados com a face adaxial em contato com o meio de cultura (30 mL), em frascos com capacidade para 270 mL e 8 cm de diâmetro, fechados com filme plástico. O meio de indução de calo (meios M1) consistiu do meio basal MS (Murashig & Skoog, 1962) suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 0,037 g.L⁻¹ de cisteína, e gelificado com 2,4 g.L⁻¹ de Phytigel. Os tratamentos consistiram de combinações entre 6-benzilaminopurina (BAP: 0,5; 1,0 e 1,5 µM) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D: 2,0 e 4,0 µM), num fatorial 3x2 (B0,5D2; B1D2; B1,5D2; B0,5D4; B1D4; B1,5D4) e 10 repetições, com cinco explantes por frasco. Avaliaram-se os índices de

formação de calos e de oxidação dos explantes. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento, à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em ausência de luz. Após quatro semanas nos meios M1, os calos formados nos tratamentos com $2,0 \mu\text{M}$ de 2,4-D foram separados dos explantes e transferidos para meios de indução de embriões somáticos (meios M2). Os calos dos tratamentos com $4,0 \mu\text{M}$ de 2,4-D foram transferidos juntamente com o explante, uma vez que durante a manipulação os calos se desestruturavam. Os meios M2 consistiram do meio M1, com modificações nas combinações de BAP e 2,4-D. Ao acaso, metade dos frascos de cada tratamento teve os calos transferidos para meios com as concentrações de BAP quadruplicadas e as de 2,4-D reduzidas a $\frac{1}{4}$ da original (B2D0,5; B4D0,5; B6D0,5; B2D1; B4D1; B6D1). A outra metade dos calos foi transferida para meios sem alteração na concentração de BAP e com supressão do 2,4-D (B0,5D0; B1D0; B1,5D0; B0,5D0; B1D0; B1,5D0). Após a transferência, os calos foram mantidos nas condições descritas anteriormente. Foi avaliada a formação de calo secundário embriogênico e de regiões embriogênicas. A partir do surgimento dos embriões somáticos, os calos foram transferidos para meio de conversão de embriões, que consistiu do meio MS completo sem reguladores de crescimento e transferidos para luz branca fria a $47,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com fotoperíodo de 16 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos seis tratamentos utilizados para indução de calogênese (meios M1), todos proporcionaram a formação de calo em todos os explantes (Figura 1), por volta da primeira semana após a inoculação, não havendo oxidação em nenhum explante.

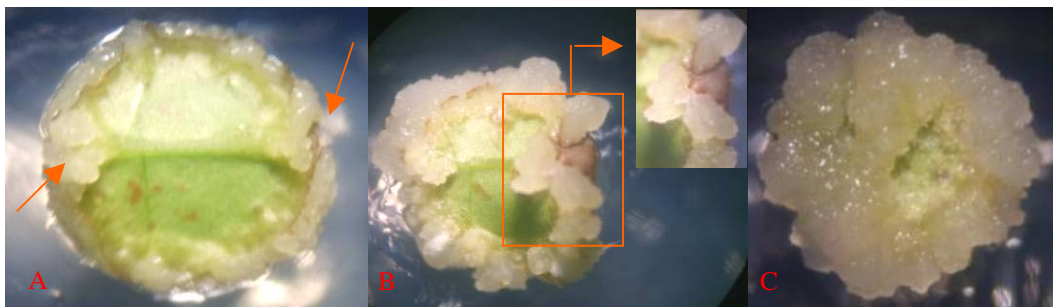


Figura 1: Calos formados em explantes foliares de *C. canephora*. (A) A calogênese ocorreu nas bordas do explante, com destaque para a região da nervura (setas), a partir do 7º dia após a inoculação nos meios de indução de calo. (B) Explantes após quatro semanas de incubação em meios de indução de calos: tratamentos com $2,0 \mu\text{M}$ de 2,4-D, destacando formações globulares na superfície dos calos; (C) tratamentos com $4,0 \mu\text{M}$ de 2,4-D, calos com aspecto aquoso característico de hiperhidricidade.

O aspecto dos calos variou em função da concentração de 2,4-D. Observaram-se calos de textura mais densa e coloração mais amarelada, com formações globulares na superfície, nos tratamentos com $2,0 \mu\text{M}$ de 2,4-D, independente da concentração de BAP. Resposta semelhante foi observada por Sanson (2006), que obteve calos amarelos friáveis em *C. canephora* e *C. arabica* em meio de cultura primário contendo $2,25 \mu\text{M}$ de 2,4-D.

Os calos formados nos tratamentos com $4,0 \mu\text{M}$ de 2,4-D apresentavam aspecto aquoso e translúcido característico de hiperhidricidade (Figura 1C). Esse aspecto reflete a deficiência de clorofila e o elevado conteúdo de água, localizado principalmente no apoplasto (Franck *et al.*, 2001). A hiperhidricidade é uma anomalia típica do cultivo *in vitro* de tecidos vegetais e que embora possa ocorrer reversão do estado de hiperhidratação, após transferência para meio ou ambiente não vitrificante (Kevers *et al.*, 2004), também pode evoluir e levar à perda de competência dos tecidos (Camara & Willadino, 2005). A hiperhidricidade se constitui numa síndrome desencadeada pelo desequilíbrio dos componentes do meio de cultura, em especial dos reguladores de crescimento (Joyce *et al.*, 2003). O aumento da concentração do 2,4-D de $2,0$ para $4,0 \mu\text{M}$ pode ter disparado o

processo de hiperidratação nesses calos. A hiperidricidade dos calos não reverteu com a redução da concentração da auxina, mesmo após 10 semanas de cultivo (Figura 2C e 2D).

Na oitava semana após a inoculação nos meios M2, ocorreu oxidação generalizada dos calos primários provenientes dos meios com 2,0 μM de 2,4-D. Observou-se a formação de calo secundário sobre o tecido oxidado dos calos subcultivados nos tratamentos B2D0,5; B4D0,5 e B6D0,5 (Figura 2B). Essa formação de calos secundários também foi constatada por Brito (2004), que observou que os primeiros calos surgidos dos explantes de *C. canephora* adquiriam coloração marron-escura e produziam calos secundários embriogênicos. A oxidação pode ter sido resultante de uma condição estressante capaz de provocar a rediferenciação celular necessária à formação de um calo secundário e desenvolvimento de embriões somáticos. No entanto, essas regiões oxidaram sem qualquer desenvolvimento posterior, talvez por não ter sido suprimido completamente o 2,4-D.

Nos tratamentos B0,5D0; B1,0D0 e B1,5D0 vindos dos meios com 2,0 μM de 2,4-D, a oxidação permaneceu até a 19^a semana após a inoculação, quando surgiram regiões embriogênicas brancas e embriões somáticos. Embriões de formato globular, torpedo, cordiforme e cotiledonar, formaram-se tanto nas extremidades como acima dos calos primários, formados em meio M1 com 1,5 μM de BAP e 2,0 μM de 2,4-D. Essa diferenciação se deu 15 semanas após o subcultivo para meio M2 com 1,5 μM de BAP. Os calos adquiriram um aspecto friável e as estruturas eram facilmente destacáveis (Figura 2E e 2F). Baixas concentrações de citocininas são necessárias para embriogênese somática na maioria das culturas de células de dicotiledôneas e após a iniciação, a auxina, em particular o 2,4-D, inibe o desenvolvimento subsequente dos embriões (Guerra et al. 1999). A transferência para meio MS sem fitorreguladores promoveu o desenvolvimento de embriões e a conversão em plantas (Figura 4), como sugerido por Brito (2004).

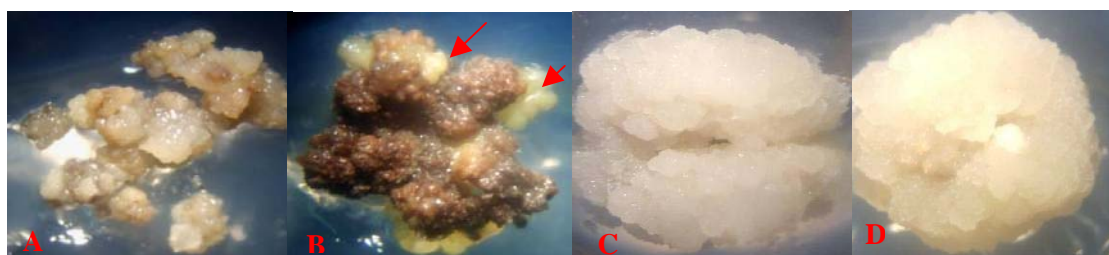


Figura 2: Calos formados em discos foliares de *C. canephora*. (A) Calo após a 4^a semana, em meio MS com 1,0 μM de BAP e 2,0 μM de 2,4-D (B1D2,); (B) Calos secundários (setas) formados sobre calos primários oxidados, provenientes do meio B1D2, na 10^a semana em meio MS com 4,0 μM de BAP e 0,5 μM de 2,4-D; (C) Calos formados em explantes incubados por quatro semanas em meio MS com 1,0 μM de BAP e 4,0 μM de 2,4-D; (D) Calos do tratamento B1D4, na 10^a semana em meio MS com 4,0 μM de BAP e 1,0 μM de 2,4-D (figuras com aumento de 30x).



Figura 4: (A) Embriões formados após 15 semanas no meio MS com 1,5 μM de BAP sobre calos primários provenientes do meio MS com 1,5 μM de BAP e 2,0 μM de 2,4-D (aumento de 40x). (B) Conversão de embriões somáticos de *C. canephora* em meio MS sem reguladores de crescimento (aumento de 30x).

CONCLUSÃO

A concentração de 4,0 μM de 2,4-D em meio MS inibe a formação de calos com regiões embriogênicas e favorece a hiperhidricidade em discos foliares de *C. canephora* incubados no escuro. O meio mais promissor para indução de calo secundário e de embriões somáticos é o meio MS com 1,5 μM de BAP isento de 2,4-D. A conversão dos embriões se dá com a supressão dos reguladores de crescimento e transferência para luz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRITO, J. Z. **Indução e expressão da embriogênese somática em *Coffea canephora* Pierre Ex Fröhner: Aspectos histológicos do desenvolvimento**. 2004. 66p. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

CAMARA, T. R., WILLADINO L. Compreendendo o stresse abiótico *in vitro*. **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**, Recife, v.1, n.29, p.325-335, 2005.

EMBRAPA CAFÉ. **Histórico**. Disponível em <http://www22.sede.embrapa.br/cafe/unidade/historico.htm>. Acesso em 05/01/2007.

FRANCK T., GASPAR T., KEVERS C., PENEL C., DOMMES J., HAUSMAN J. F. Are hyperhydric shoots of *Prunus avium* L. Energy deficient? **Plant Science**, n. 160, p.1145-1151, 2001.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. T.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. V2. Brasília/DF. Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq. 1999. p. 533-568.

JOICE S. M., CASSELLS A. C., JAIN S. M. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.74, p.103-121, 2003.

KEVERS C., FRANCK T., STRASSER R. J., DOMMES J., GASPAR T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: at typically stress-induced change of physiological state, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.77, p.181-191, 2004.

MACIEL, A.L.R.; PASQUAL, M; PEREIRA, A.R.; REZENDE, J.C.; SILVA, A.B.; DUTRA, L.F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Oboatã. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, 27(1):107-116. 2003.

MONTAGNON, C., LEROY, T.; ESKEES, A B. Amélioration Variétale de *Coffea canephora* I. Critères Et Méthodes de Sélection. **Plantations, Recherche, Développement**, 5(1):18-33. 1998a.

MONTAGNON, C., LEROY, T.; ESKEES, A.B. Amélioration Variétale de *Coffea canephora* li. Les Programmes de Sélection et Leurs Résultats. **Plantations, Recherche, Développement**, 5(2):89-98. 1998b.

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

SANSON, N. P.; et al,. Effect of primary medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, n.86, p. 37-45, 2006.

PALAVAS CHAVE: *Coffea canephora*; 2,4-D; BAP; Cultivo *in vitro*; Biotecnologia.¹

Grato ao BNB pelo financiamento do projeto e ao PIBIC/CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa.