

EMBRIOGENESE SOMÁTICA EM GENÓTIPOS DE CAFÉ (*COFFEA ARABICA*) É CITOCININA DEPENDENTE

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN GENOTYPES OF COFFEE (*COFFEA ARABICA*) IS CYTOKININ DEPENDENT

Ricardo Antonio Ayub^{1*}; Audrei Nisio Gebieluca ¹

^{1*} Autor para contato: Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Campus em Uvaranas, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Ponta Grossa, PR, Brasil; (42) 220-3088; e-mail: rayub@uepg.br

Recebido para publicação em 18/08/2003

Aceito para publicação em 24/10/2003

RESUMO

No Brasil encontra-se uma diversidade de genótipos de café, dentre esses se destacam a cv. IAPAR 59 e o híbrido Sachimor para as regiões do sul e sudeste do país. Este trabalho foi realizado com o objetivo de testar o efeito das citocininas TDZ e BAP na embriogênese somática da Cv. IAPAR 59 e do híbrido Sachimor. A maior produção de embriões do híbrido Sachimor para a Citocinina TDZ foi à concentração inicial de 9,08 μM e para a cv. IAPAR 59, à concentração de 5,0 μM de BAP.

Palavras-chave: café, cv. IAPAR 59, cv. Sachimor, TDZ, BAP

ABSTRACT

There is a diversity of genotypes of coffee in Brazil, and among them cv IAPAR 59 and the Sachimor hybrid stand out in the Southern and Southeastern regions of the country. This work was carried out with the aim of testing the effect of the cytokinins TDZ and BAP on the somatic embryogenesis of cv. IAPAR 59 and the Sachimor hybrid. The biggest production of embryos of the Sachimor hybrid for cytokinin TDZ was obtained at the initial concentration of 9.08 μM and for cv. IAPAR 59 at a concentration of 5.0 μM of BAP.

Key words: coffee, cv. IAPAR 59, Sachimor, TDZ, BAP

1. Introdução

O Brasil é o maior produtor e exportador de Café do mundo, com cerca de 28% da produção mundial e 23% das exportações do produto (IAPAR,

2002).

O café IAPAR 59, recomendado para plantio desde 1993 no Estado do Paraná, tem como principal característica a resistência à ferrugem do cafeeiro, eliminando a necessidade de aplicação de produtos quí-

micos para o controle da doença, isso propicia a economia de investimentos e evita a contaminação do ambiente. No entanto, há pequeno número de plantas dessa cultivar no mercado e novas tecnologias estão sendo testadas para que se aumente o número de mudas fornecidas aos produtores.

Os métodos de cultura *in vitro* oferecem potencial para obtenção de taxas de multiplicação a partir de segmentos de tecidos somáticos isentos de microrganismos (Carvalho *et al.*, 1996, Ling *et al.*, 1996).

O primeiro trabalho efetuado com cultura de tecidos em *Coffea arabica* foi publicado por Staritsky (1970), que obteve êxito na indução de calos a partir de folhas e produção de embriões somáticos na espécie *Coffea canephora*.

Sondahl *et al.* (1979) obtiveram alta frequência de calo embriogênico a partir de explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Bourbon, utilizando dois meios de cultura, o condicionante e o estimulante. Os estudos evoluíram tanto que Neuenschwander e Bumann (1992) definiram a embriogênese somática autocontrolada, quando ocorre uma grande quantidade de embriões que são desenvolvidos sequencialmente, diferindo da alta repetibilidade na embriogênese somática, que não requerer um meio para maturação de embriões. Esse sucesso na produção em larga escala de embriões e de mudas de café despertou o interesse no desenvolvimento de protocolos de transferência gênica (Carneiro, 1997; Hatanaka *et al.*, 1999; Spiral *et al.*, 1993). Uma transformação estável de plantas pode originar vários embriões provenientes de uma única célula transformada e às vezes livre de patógenos como bactéria, fungos e vírus.

Hatanaka *et al.*, 1991, estudando a embriogênese somática em explantes de *Coffea canephora*, obtiveram o número máximo de embriões em meio de cultura contendo apenas citocinina. As citocininas e auxinas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos (Caldas *et al.*, 1990). O tipo e a concentração influenciam na multiplicação *in vitro*, onde normalmente as melhores concentrações giram em torno de 0,5 e 5,0 mg. L⁻¹.

As auxinas testadas, ANA (ácido naftaleno acético), AIB (ácido indol-butírico), AIA (ácido indol acético e 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), inibi-

ram a formação de embriões. A ótima concentração de citocininas, BAP (6-benzilaminopurina), cinetina e 2-iP (dimetil-alil-amino-purina) para a embriogênese somática foi de 5µM. Cada explante formou mais de 100 embriões com pequenos calos e algumas raízes adventícias. Eles foram formados nas bordas dos explantes e demonstram que as citocininas estão concentradas perto da parte do explante que está em contato com o meio de cultura, demonstrando que as citocininas não foram transportadas para os tecidos mais distantes nos explantes.

O TDZ (Thidiazuron) foi originalmente desenvolvido para ser utilizado como desfoliante para o algodoeiro. Segundo Souza (1978) citado por Salgado *et al.* (2001) essa substância tem mostrado efeito semelhante aos das citocininas, quando aplicado em concentrações muito reduzidas. Na maioria dos casos, o TDZ tem apresentado resultados superiores em relação às outras citocininas na indução e multiplicação de brotos de várias espécies. O TDZ tem sido usado em várias espécies de plantas como *Psidia arguta* (araçá) (Kodja *et al.*, 1998), *Fragaria vesca* L (morango) (Sutter *et al.*, 1997), *Vitis rotundifolia* (videira) (Sudarsono e Goldy, 1991), com excelentes resultados.

No intuito de obter plantas geneticamente idênticas e com grande qualidade e resistência a doenças, foi realizado um ensaio de embriogênese somática de Café (*Coffea arabica* l.) cv IAPAR 59 e híbrido Sachimor com diferentes fitoreguladores.

2. Material e métodos

No laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Estadual de Ponta Grossa - PR, foi conduzido um experimento com genótipos de café em cultura de tecidos. Utilizou-se para o estudo de embriogênese direta de *Coffea arabica* cultivar IAPAR 59 e o híbrido Sachimor.

Os explantes foliares foram retirados do primeiro e segundo pares de folhas jovens de plantas da Cultivar IAPAR 59 e do híbrido Sachimor. Essas folhas foram desinfestadas com lavagem manual em água corrente, e em seguida foram transferidas para capela

de fluxo laminar e imersas em etanol 70% (v/v) por 40 segundos, seguida de imersão em solução constituída de hipoclorito de sódio 2% (v/v) e de 1% de Tween 80 durante 15 minutos. Após esta desinfestação, o material foi novamente lavado em água esterilizada num intervalo de 5 minutos, repetindose o procedimento por mais 4 vezes.

Os explantes retirados dessas folhas foram excisados em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² e distribuídos em placas de Petri, com distâncias regulares para evitar a interferência de um explante com o outro.

O ensaio foi constituído de 5 placas de Petri com 6 explantes, colocados com a face adaxial em contato com o meio de cultura em estudo.

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige e Skoog, 1962), sendo adicionados os reagentes nas concentrações de 7 g.L⁻¹ de ágar, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 33 mg.L⁻¹ de cisteína e 0,5g.L⁻¹ de MES em cada tratamento. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,9 com NaOH 0,1N, antes da adição de ágar e, em seguida, o meio foi esterilizado para evitar contaminação de bactérias, fungos e vírus.

Os ensaios foram constituídos de 8 tratamentos, sendo os tratamentos 1 a 3 com BAP nas concentrações 5,0; 7,0 e 10,0 µM para *Coffea arabica* cv. IAPAR 59 e os tratamentos 4, 5, 6, 7 e 8 com TDZ nas concentrações de 2,27; 4,54; 6,81; 9,08 e 13,62 µM para *Coffea arabica* híbrido Sachimor.

As culturas foram incubadas em câmara de crescimento no escuro a temperatura de 25 ± 1 °C. Após 55 semanas de cultivo, os explantes foram recultivados para outro meio de cultura, quando foram reduzidas as

concentrações de citocinina para 10% da concentração inicial, ou seja, nas seguintes concentrações de 0,5; 0,7 e 1,0 mM de BAP representando os tratamentos 1, 2 e 3 e para TDZ as concentrações de 0,227; 0,45; 0,68; 0,908 e 1,362 mM para os tratamentos de 4 a 8. Nesses meios, acrescentou-se 10% da concentração de citocinina.

Na 55^a semana de cultivo foi efetuada a primeira avaliação, a segunda na 68^a semana e a terceira na 74^a semana. Os parâmetros avaliados foram: porcentagem de explantes com embriões e o número médio de embriões somáticos em cada avaliação.

3. Resultados e discussão

Na primeira avaliação foi observado, tanto para a cultivar IAPAR 59 quanto para o híbrido Sachimor, pequeno número de embriões somáticos nos tratamentos testados, mesmo após um período de cultivo prolongado de 55 semanas (Tabelas 1 e 2). Essa formação de massa celular embriogênica e subsequente formação dos embriões somáticos também foram observadas somente nos bordos dos explantes e nas nervuras, de acordo com Garcia *et al.*, (1995) nos estudos histológicos de calos de café Robusta. Hatanaka *et al.*, (1991) também relata que a embriogênese ocorre apenas na face do explante em contato com a citocinina, indicando que esta não é absorvida pela epiderme da folha e, quando absorvida ocorre na face do explante, não sendo transportada dentro do tecido foliar.

Tabela 1 - Números de explantes e porcentagem de explantes com embriões durante a primeira avaliação (55 semanas), segunda avaliação (68 semanas) e terceira avaliação (74 semanas) no Experimento com concentrações de BAP/ANA na embriogênese direta de *Coffea arabica* variedade IAPAR 59.

Tratamentos	Fitorreguladores (µM)	Números de explantes	Porcentagem de explantes com embriões	Número médio de Embriões		
				Avaliações (semanas)		
				1 ^a (55)	2 ^a (68)	3 ^a (74)
1	5-0,5/ 0,05	6	33,3	26	204	207
2	7-0,7/ 0,07	8	100	22	211	214
3	10-1/ 0,1	6	0	0	0	0

Tabela 2 - Números de explantes e porcentagem de explantes com embriões durante a primeira avaliação (55 semanas), segunda avaliação (68 semanas) e terceira avaliação (74 semanas) no Experimento com TDZ/ANA na embriogênese somática de *Coffea arabica* híbrido Sachimor

Tratamentos	Fitorreguladores (µM)	Números de explantes	Porcentagem de explantes com embriões	Número médio de Embriões		
				Avaliações (semanas)		
TDZ/ANA				1 ^a (55)	2 ^a (68)	3 ^a (74)
4	2,27- 0,227/0,023	30	1,87	13	14	24
5	4,54- 0,454/0,046	30	4,54	4	16	25
6	6,81- 0,681/0,068	12	0	0	0	0
7	9,08-0,908/0,091	24	20,85	19	137	139
8	13,62-1,362/0,01	18	16,66	21	102	105

Quando foi realizada a redução na concentração de citocinina no meio de cultura e acrescentou-se a auxina (ANA), o aumento do número de embriões somáticos foi significativo (Tabelas 1 e 2) da primeira para a segunda avaliação (Figura 1A), e quando comparando a segunda avaliação com a terceira avaliação não houve crescimento significativo para a cultivar IAPAR 59, com exceção dos tratamentos 4 e 5 com a citocinina TDZ para o híbrido Sachimor.

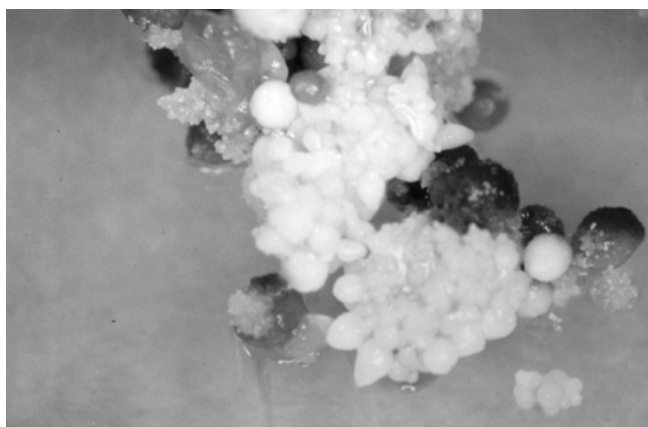


Figura 1A - Embriões globulares do híbrido Sachimor

De acordo com a Tabela 2, o crescimento de embriões do híbrido Sachimor da primeira para a segunda avaliação foi o seguinte: no tratamento 4 praticamente não houve crescimento, no tratamento 5 quadruplicou, no tratamento 6 não foi observada a produção de embriões, no tratamento 7 cresceu 7 vezes, e no tratamento 8, o número de embriões aumentou 5

vezes. Analisando o crescimento de embriões da 68^a semana para 74^a semana de cultivo, os resultados obtidos foram os seguintes: nos tratamentos 4 e 5 aumentaram quase duas vezes, nos tratamentos 7 e 8 praticamente não houve aumento de embriões, enquanto o tratamento 6 não apresentou a formação de embriões.

Na embriogênese da cultivar IAPAR 59 testada com três concentrações da citocinina BAP, a resposta positiva ocorreu com as menores doses de BAP, indicando que a dosagem de 1,0µM de BAP é tóxica para o explante (Figura 2). O crescimento de embriões no tratamento 1, comparando a 1^a com a 2^a avaliação aumentou 8 vezes e no tratamento 2 aumentou 10 vezes; enquanto da 2^a para a 3^a avaliação, o crescimento foi quase nulo, utilizando o tratamento 3 ou insignificante utilizando os tratamentos 1 e 2.

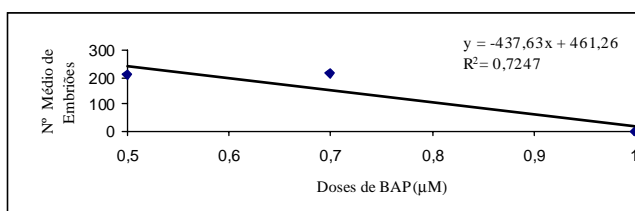


Figura 2 - Embriogênese direta de café cultivar IAPAR 59 em função de 3 doses do fitorreguladores BAP com 74 semanas de cultivo

Quando foi executada a terceira avaliação, foram observados os embriões na fase torpedo e coração. O que não foi observado na primeira avaliação, onde se verificou a presença somente de embriões no

estágio globular (Figura 1A). Notou-se que o número de explantes com embriões permaneceu constante, mas os embriões se desenvolveram mais (Figura 1B), em seguida estes foram isolados e transferidos para meio MS com metade da concentração normal e sem hormônios (Figura 1C). Hatanaka *et al.*, (1991) cultivaram explantes foliares de *Coffea canephora* em meio de cultura na presença de vários reguladores de crescimento com diferentes concentrações, principalmente, as citocininas 2iP, BA e Ki e as auxinas ANA, AIB, AIA e 2,4-D. Esses autores observaram que não era necessário auxinas em todos os tratamentos, entretanto as citocininas eram essenciais na embriogênese, cuja concentração ótima era 5µM em todos os tratamentos estudados com fitohormônios.



Figura 1B - Embriões em desenvolvimento no meio sólido



Figura 1C - Plântulas desenvolvendo em meio com metade da concentração e sem fitormônios.

Nos tratamentos realizados com BAP para o híbrido Sachimor e TDZ para o IAPAR 59 não foram observados desenvolvimento embriogênico. Porém, notou-se que o TDZ apresentou maior desenvolvimento embriogênico para híbrido Sachimor (Figura 3) e para Cultivar IAPAR 59 nas menores doses de BAP (Figura 2).

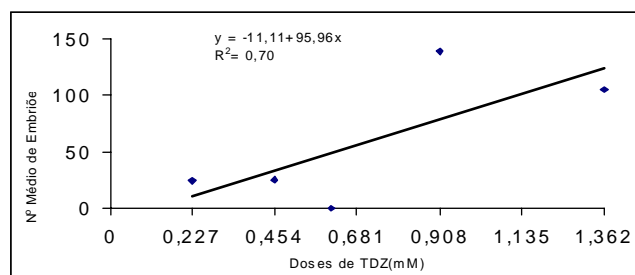


Figura 3 - Embriogênese direta de café híbrido Sachimor em função de cinco doses do fitorregulador TDZ com 74 semanas de cultivo.

4. Conclusões

Existe uma relação específica entre o genótipo e a citocinina para a indução da embriogênese somática.

As melhores concentrações para desenvolvimento de embriões de plântula de café foram 9,08mM de TDZ para o híbrido Sachimor e 5µM BAP para a cv. IAPAR 59.

REFERÊNCIAS

- CALDAS, L. S.; HARADASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C. e CALDAS, L. S. ed. Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTB/EMBRAPA-CNPQ, 433p., 1990.
- CARNEIRO, M. F. Coffee biotechnology and its application in genetic transformation. *Euphytica* 96: 167-172, 1997.
- CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; ANTUNES, L. E. C.; RAMOS, J. D. Q. e MACIEL, A.L. R. Influência do Benomyl e Benzilaminopurina sobre a proliferação in vitro de café Cv. Catuaí. *Revista Ceres* 43 (248): 402-408. 1996
- GARCIA, M. E.; BRAVO, J.; MONTES, S. Estudio histológico de la embriogénesis somática in *Coffea canephora* variedad Robusta y callogénesis. *Cultivos Tropicales* 2(16): 35-39, 1995.

5. HATANAKA, T.; ARAKAWA, O.; YASUDA, T.; UCHIDA, N.; YAMAGUCHI, T. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. **Plant Cell Reports** 10: 179-182, 1991.
6. HATANAKA, T.; CHOI, Y.E.; KUSANO, T.; SANO, H. Transgenic plants of *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Cell Reports** 19: 106-110, 1999.
7. IAPAR. O café no mundo – produção e consumo. Disponível em <http://www.pr.gov.br/iapar/cafe.htm>. Acesso em 02 de novembro de 2002.
8. KODJA, H.; GOVINDE, S. J.; GURIB, F. A.; ROBENE, S. I.; HUMEAU, L.; FIGIER, J. Micropropagation of *Psidia arguta* through cotyledonary axillary bud culture. **Plant Growth Regulation**, v. 25, n. 2, p. 75-80, 1998.
9. LING, P.P.; CHENG, Z. e MUSACCHIO, D. J. Quantification os somatic coffee embryo growth using machine vision. American Society of Agriculture Engineers, v. 38, n. 6, p. 1911 – 1917, 1996
10. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue Cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497, 1962.
11. NEUENSCHWANDER, B. e BUMANN, T. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Plant Cell Reporter** 10: 608-612, 1992.
12. SALGADO, S. M. L.; CUNHA, R. L.; NIELLA, G. R.; TEIXEIRA, H.; PASQUAL, M. Efeito da utilização de TDZ e Benomyl na micropropagação do crisântemo (*Dendranthema morifolium*). **Ciênc. Agrotec**, Lavras, v.25, n.2, p.274-280, mar/abril. 2001.
13. SONDAHL, M. R.; SALISBURY, J. I.; SHARP, W. R. SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in *Coffee* callus cells. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, 94: 185-188, 1979.
14. SPIRAL, J.; THIERRY, C.; PAILLARD, M.; PÉTIARD, V. Obtention de plantules de *Coffea canephora* Pierre (Robusta) transformées par *Agrobacterium rhizogenes*. **C R Acad Sci t** 316 Série III, p. 1-6. 1993.
15. STARITSKY, G. Embryoid formation in callus cultures of coffee. **Acta Botanica Neerlandica** 19: 509-514, 1970.
16. SUTTER, E.G.; AHMADI, H.; LABAVITCH, J. .M. Direct regeneration of strawberry from leaf disks. **Acta Horticulturae**, v. 447, p. :243-246, 1997.