

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA EM CLONES ELITE DE *Coffea arabica* : MULTIPLICAÇÃO DE CALOS

Juliana Costa de Rezende², Carlos Henrique Siqueira de Carvalho³, Ana Carolina Ramia Santos⁴, João Batista Teixeira⁵,
Moacir Pasqual⁶,

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café CBP&D/Café

²Pesquisadora, D.Sc., EPAMIG, Lavras-MG, julianacosta@epamig.br

³ Pesquisador, D. Sc., Embrapa Café. carlos.carvalho@embrapa.br (✉)

⁵ Pesquisador, D. Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. batista@cenargem.embrapa.br

⁴ Bolsista do Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café CBP&D/Café carolramia@hotmail.com

⁶ Professor Titular do Departamento de Fitotecnia UFLA mpasqual@ufla.br

RESUMO: Objetivou-se comparar a taxa de multiplicação de calos embriogênicos de dois clones de *Coffea arabica*, selecionados para resistência à ferrugem e de alta produtividade, em dois meios de cultura, nos sistemas de cultivo gelificado e líquido. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Fundação Procafé, em Varginha, MG. Os calos foram induzidos a partir de explantes foliares em meio nos meios PM/SM conforme protocolo descrito por Teixeira et al., (2004) e para a multiplicação, foram testados dois meios de cultura (meio do estágio dois de Albarran et al., 2004 e meio de multiplicação de Teixeira et al., 2004) e dois sistemas de cultivo (gelificado e líquido). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2, com 5 repetições por tratamento. As avaliações foram realizadas aos 21, 42 e 63 dias após a instalação do experimento, por meio da pesagem dos calos. Verificou-se que o potencial de multiplicação de calos embriogênicos é influenciado pelo genótipo e meio de cultura e que o sistema gelificado apresentou maior eficiência na multiplicação de calos embriogênicos dos clones estudados quando comparado ao sistema líquido.

Palavras-chave: café, meios de cultura, micropropagação.

INDIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *Coffea arabica* ELITE CLONES: CALLI MULTIPLICATION

ABSTRACT: This work aimed to compare the embryogenic calli multiplication of two *Coffea arabica* clones selected for rust resistance and high yield in two media in both solid and liquid cultivation systems. The experiments were conducted at the Fundação Procafé Tissue Culture Laboratory in Varginha, MG. The protocol described by Teixeira et al (2004) was used for calli induction. For calli multiplication the treatments were made up of two media (stage two of Albarran et al., 2004, and multiplication medium described by Teixeira et al., 2004) and two cultivation systems (solid and liquid). A randomized –block design with a 2 x 2 factorial arrangement with 5 replications per treatment was used. Evaluations were carried out at 21, 42, and 63 days after the experiment had been installed, by calli weighing. The embryogenic calli multiplication potential is influenced by the genotype. When compared to the liquid system, the solid system had the most influence upon the embryogenic calli of the clones studied.

Key words: coffee, medium, micropropagation.

INTRODUÇÃO

A embriogênese somática tem sido obtida em grande número de famílias e espécies de plantas e vem sendo utilizada para estudos básicos em fisiologia vegetal e aplicações mais práticas, como micropropagação e transformação genética de plantas. A multiplicação acelerada de plantas de café via embriogênese somática é uma importante ferramenta em programas de melhoramento genético e numerosas técnicas que simplificam este processo têm sido desenvolvidas com o intuito de permitir a produção de plantas superiores em larga escala.

A multiplicação de calos embriogênicos é uma etapa importante no processo de produção de mudas clonais em larga escala e alguns estudos visando à otimização da multiplicação de setores embriogênicos de café já foram publicados (Boxtel & Berthouly, 1996; Ducos et al., 2007). Alguns estudos para estabelecer melhores protocolos foram realizados utilizando meio gelificado, porém, a taxa de multiplicação nestes meios mostrou-se muito baixa para seu uso na produção de plantas de café em larga escala (Söndahl & Sharp, 1977). Em vista disso, desde os primeiros trabalhos com café, houve várias tentativas, com diferentes graus de sucesso, para estabelecer protocolos de embriogênese somática em meio líquido (Afreen et al., 2002).

Diante dos fatos, este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar a multiplicação de calos embriogênicos de dois clones de *Coffea arabica*, em dois meios de cultura, nos sistemas de cultivo gelificado e líquido.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Fundação Procafé, em Varginha, MG, utilizando-se os clones 03 e 28, selecionados para resistência à ferrugem e alta produtividade. O clone 03 é oriundo da população Siriema (*C. racemosa* x *C. arabica*) e apresenta também resistência ao bicho-mineiro. O clone 28 foi selecionado pela Epamig a partir do cruzamento entre Catuaí Vermelho IAC 44 e Híbrido de Timor CIFC 2750.

Para a indução de calos foi utilizado o protocolo de indução de calos descrito por Teixeira et al. (2004). Após 180 dias, estes calos foram multiplicados em meio de multiplicação (Teixeira et al., 2004), com renovação do meio a cada 21 dias, por 6 meses, até que atingissem a quantidade necessária para ser utilizada no experimento. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2, sendo os tratamentos formados por dois meios de cultura (meio do estágio dois de Albarran et al., 2004 e meio de multiplicação de Teixeira et al., 2004) e dois sistemas de cultivo (meio gelificado e meio líquido), com cinco repetições.

O meio Teixeira et al. (2004) é composto por metade dos sais MS (Murashige & Skoog, 1962), tiamina (10mg L⁻¹), piridoxina (1mg L⁻¹), glicina (1mg L⁻¹), ácido nicotínico (1mg L⁻¹), mio-inositol (100mg L⁻¹), L-cisteína (10mg L⁻¹), caseína hidrolisada (100mg L⁻¹), extrato de malte (200mg L⁻¹), ácido cítrico (250mg L⁻¹), 2,4-D (5µM), IBA (4,92 µM), 2iP (9,84 µM) e sacarose (20g L⁻¹). O meio Albarran et al. (2004) é composto por metade dos sais MS, tiamina (10mg L⁻¹), piridoxina (1mg L⁻¹), glicina (1mg L⁻¹), ácido nicotínico (1mg L⁻¹), mio-inositol (100mg L⁻¹), 2,4-D (4,5µM) e cinetina (4,6 µM). Esse meio foi acrescido de sacarose (100mg L⁻¹) e sacarose (20g L⁻¹). A todos os tratamentos gelificados foram acrescidos 3,4g.L⁻¹ de Phytigel®.

O pH dos meios foi ajustado para 5,8±0,1, utilizando NaOH 0,1N ou HCl 0,1N, antes do processo de autoclavagem, realizado a 121°C e 1atm, por 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar foram vertidos 20mL dos meios líquidos em frasco do tipo Erlenmeyer, com capacidade de 125mL e, em seguida, inoculados 160mg de calo embriogênico por frasco. Estes frascos foram vedados com papel laminado e mantidos em agitador orbital a 100 rpm, na ausência de luz e com temperatura de 26 ± 2°C. Os meios gelificados foram vertidos em placas de Petri de 0,9 x 10cm e inoculados com nove setores embriogênicos de 60mg cada. As placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas em caixas de madeira, na ausência de luz, com temperatura de 26 ± 2°C.

Foram realizadas avaliações aos 21, 42 e 63 dias, por meio da pesagem dos calos, com o auxílio de uma balança de precisão colocada em câmara de fluxo laminar. A cada avaliação o meio de cultura era renovado e ajustada a quantidade inicial de calos, ou seja, de 160mg de calos embriogênicos, no caso dos frascos e de nove setores embriogênicos de 60mg cada, no caso das placas de Petri.

A porcentagem de incremento dos calos I(%) foi calculada pela seguinte pela fórmula: $I(\%) = [(MF \times 100)/(MF_{inicial})] - 100$, em que MF é a massa fresca (g) avaliada a cada 21 dias e MF_{inicial}, a massa fresca de calos embriogênicos inoculados inicialmente no frasco ou na placa de Petri. A I(%) foi calculada com o objetivo de possibilitar a comparação entre o crescimento do meio líquido e do meio gelificado, pelo fato de terem concentrações iniciais diferentes.

A porcentagem de incremento dos calos foi analisada pelo procedimento GLM. Foi verificada a significância a 5% de probabilidade pelo teste t de Student. Em caso de diferenças significativas entre os tratamentos e as interações, eram feitos os desdobramentos. Os genótipos foram analisados separadamente em experimentos independentes, já que não era objetivo compará-los entre si.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Clone 03

Os resultados demonstraram significância para a porcentagem de incremento dos calos para os efeitos principais de sistema de cultivo e tempo, bem como para as interações entre fatores sistema de cultivo x meio de cultura, sistema de cultivo x tempo e sistema de cultivo x meio de cultura x tempo.

A interação sistema de cultivo x meio de cultura significativa mostra um comportamento diferenciado dos níveis do fator sistema de cultivo em cada nível do fator meio de cultura (Tabela 1). Para o meio de cultura Albarran et al. (2004), houve diferença significativa entre os sistemas de cultivo líquido e gelificado, sendo o gelificado estatisticamente superior em porcentagem de multiplicação de calos quando comparado ao líquido. Para o meio de cultura Teixeira et al. (2004), não foi observada diferença significativa no comportamento dos sistemas de cultivo.

Tabela 1. Valores médios da porcentagem de incremento dos calos, em função dos sistemas de cultivo e meios de culturas estudados para o clone 03.

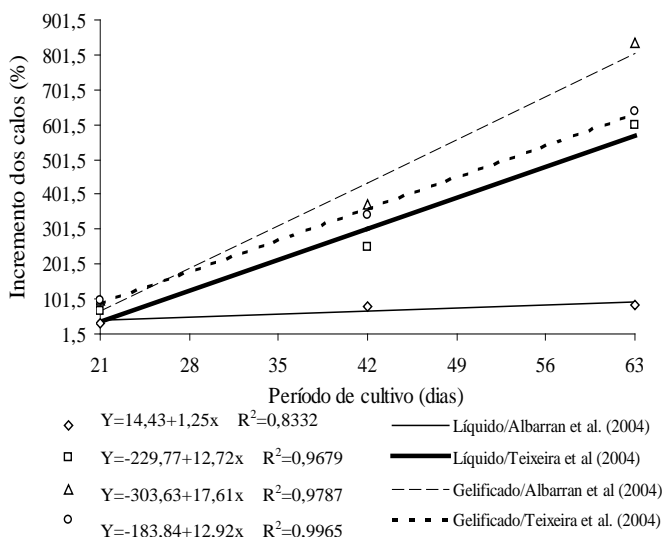
Sistema de cultivo	Meio de cultura ¹	
	Albarran et al. (2004)	Teixeira et al. (2004)
Líquido	67,07 b	304,62 a
Gelificado	436,15 a	359,64 a

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste t de Student, a 5% de significância.

Na Figura 1 observam-se os valores médios de porcentagem de incremento dos calos no clone 03, em função do tempo analisado, para cada meio de cultura e sistema de cultivo em estudo. Para o sistema de cultivo gelificado, estimam-se incrementos em torno de 17,61% ao dia, na multiplicação de calos quando se utiliza o meio Albarran et al. (2004) e de 12,92%, quando o meio de cultura utilizado foi o Teixeira et al. (2004). Para o sistema de cultivo líquido, o incremento foi de 1,25% e 12,72%, para os meios Albarran et al. (2004) e Teixeira et al. (2004), respectivamente.

Estes valores estão próximos aos relatados por Ducos et al. (1999), os quais quantificaram a multiplicação de células embriogênicas de *C. canephora* em meio líquido e encontraram uma taxa de crescimento de cerca de 6,6% a 13,3% ao dia, considerando a quantidade inicial de 1 grama de calo e um crescimento de biomassa de 2 a 3 vezes a quantidade inicial, a cada 15 dias.

Teixeira et al. (2004) observaram que o peso da matéria fresca, ao final de diferentes períodos de cultivo, variou de acordo com a densidade inicial de células, atingindo um valor máximo de crescimento de calos quando a densidade inicial foi de 8g.L⁻¹, a mesma utilizada no presente trabalho, no qual foi obtido um aumento médio de peso fresco de 9,8 vezes para o clone 28 e de 7,0 vezes, para o clone 03, aos 63 dias, quando utilizado o meio Teixeira et al. (2004). Corrobora, assim, os resultados encontrados por esses autores, os quais obtiveram aumento da densidade de células próximo a 10 vezes, após 56 dias de cultivo (dados não apresentados).

**Figura 1.** Valores médios de porcentagem de incremento de calos, em função do tempo analisado, para cada meio de cultura e sistema de cultivo em estudo no clone 03.

Clone 28

Os resultados, demonstraram efeito significativo para os efeitos principais do sistema de cultivo e tempo, bem como para as interações entre os efeitos de sistema de cultivo x tempo e meio de cultura x tempo. O incremento na porcentagem de multiplicação de calos, para o sistema de cultivo gelificado, foi superior quando comparado ao líquido (Figura 2). Estima-se um incremento em torno de 23,6% ao dia na multiplicação de calos quando se utiliza o sistema gelificado e de cerca de 10%, quando é utilizado o sistema de cultivo líquido. É provável que a menor taxa de crescimento observada nos meios líquidos seja devido à baixa oxigenação à qual ficaram expostas as suspensões celulares.

Segundo Curtis et al. (2005), o sistema de cultivo líquido pode provocar forte condição de anaerobismo, devido à redução do oxigênio dentro do tecido, causada pela limitação de transferência, causando limitações fisiológicas nos tecidos. De Faria et al. (2003) compararam a multiplicação de embriões em meio de cultura líquido com 50% e 80% de oxigênio dissolvido e obtiveram melhor multiplicação de calos e regeneração de embriões em 80% de oxigênio dissolvido, provavelmente devido à melhor atividade metabólica das suspensões celulares neste meio.

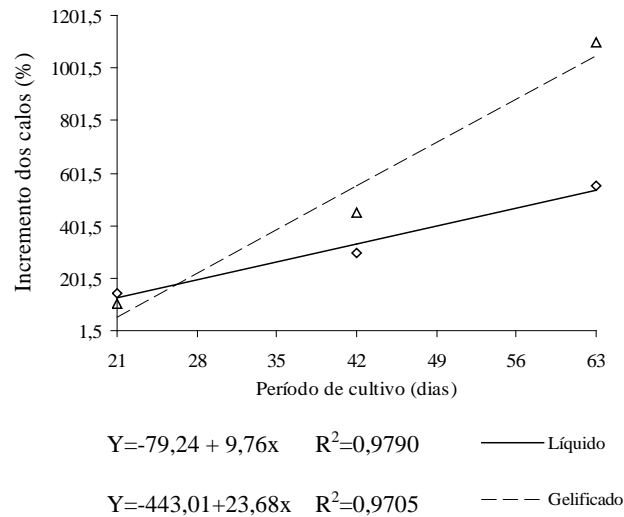


Figura 2. Valores médios de porcentagem de incremento dos calos, em função do tempo analisado, para cada sistema de cultivo em estudo no clone 28.

Embora o sistema de cultivo líquido empregado neste experimento tenha sido realizado sob condições de agitação, o que permite maior penetração de oxigênio no meio de cultura e melhoria da distribuição do oxigênio recém-solubilizado, ainda assim o sistema de cultivo gelificado apresentou maior crescimento de calos. Este fato pode ser explicado pela maior intensidade de oxigenação que ocorre superfície de meios sólidos, uma vez que os explantes estão em contato direto com o ar, fazendo com que o oxigênio fique mais disponível ao metabolismo (Pinto et al., 1995). Sendo assim, o emprego de agentes gelificantes cria condições para melhor aeração das bases dos explantes. Vale ressaltar que o meio de cultura utilizado no presente trabalho foi o gelificado, no qual foram aplicadas baixas concentrações do agente gelificante, permitindo, assim, uma difusão de nutrientes no meio.

Apesar da maior eficiência do sistema de cultivo gelificado observada no presente trabalho, muitos autores afirmam que utilização de culturas líquidas é um pré-requisito para a automação e a redução dos custos em sistemas comerciais de propagação (Debergh, 1988; Adu-Ampomah et al., 1988; Aitken-Christie, 1991; Castillo et al., 1998). Entretanto, as vantagens da cultura em meio líquido são freqüentemente contrabalanceadas por outros problemas, tais como asfixia das células, hiperhidricidade, necessidade de equipamentos complexos (Etienne et al., 2006) e maior gasto de meio de cultura.

No presente trabalho, para o sistema de cultivo gelificado, foram utilizados 25mL de meio de cultura para a inoculação de 0,54g de calo, o que resultou num peso médio, ao final de 63 dias, de 4,25g, para o clone 03 e de 6,75g, para o clone 28 (dados não apresentados). Para inocular os mesmos 0,54g de calo em meio líquido, seriam necessários 67,5mL de meio de cultura, o que representaria um acréscimo de, no mínimo, 227,5% no volume de meio a ser utilizado, considerando, ainda, que a taxa de crescimento no sistema líquido foi menor.

Na Figura 3 observam-se os valores médios de porcentagem de incremento de calos, em função do tempo analisado, para cada meio em estudo. Os incrementos na porcentagem de multiplicação de calos, para os meios Albarran et al. (2004) e Teixeira et al. (2004), foram bastante semelhantes entre si, cerca de 15,5% ao dia, quando se utilizou o meio Albarran et al. (2004) e, aproximadamente, 18% quando o meio Teixeira et al. (2004) foi utilizado, indicando que os dois meios de cultura apresentaram comportamentos muito próximos.

No meio proposto por Teixeira et al. (2004) são utilizadas duas auxinas (5,0 μ M de 2,4 -D e 4,92 μ M de IBA) e uma citocinina (9,84 μ M de 2-iP), enquanto que no meio Albarran et al. (2004) utilizam-se apenas uma auxina (4,5 μ M de 2,4-D) e uma citocinina (4,6 μ M de cinetina). Embora tenham sido utilizadas auxinas e citocininas em concentrações e tipos diferentes, os valores médios de porcentagem de incremento de calos foram bastante próximos, indicando que os calos embriogênicos apresentam grande plasticidade de resposta ao meio de cultura.

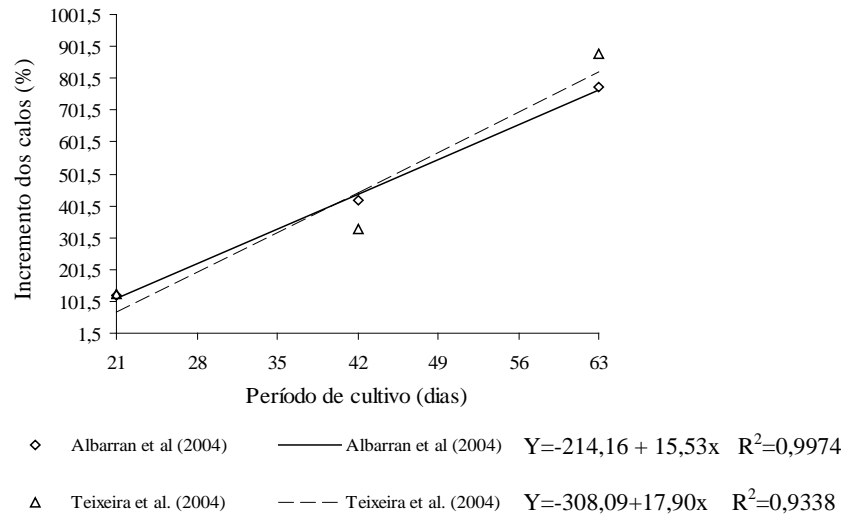


Figura 3 Valores médios, da porcentagem de incremento dos calos em função do tempo analisado, para cada meio de cultura em estudo no clone 28.

CONCLUSÕES

O potencial de multiplicação de calos embriogênicos é influenciado pelo genótipo. O sistema gelificado apresentou maior eficiência na multiplicação de calos embriogênicos dos clones estudados quando comparado ao sistema líquido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADU-AMPOMAH, Y.; NOVAK, F. J.; AFZA, R.; VAN DUREN, M.; PEREA-DALLOS, M. Initiation and growth of somatic embryos of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Café, Cacao, Thé**, v.32, n.3, p.187-200, 1988.

AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M. A.; KOZAI, T. Photoautotrophic cultura of *Coffea arabusta* somatic embryos: development of a bioreactor for large-scale plantlet conversion form cotyledonary embryos. **Annals of botany**, v.90, p.21-29, 2002.

AITKEN-CHRISTIE J. Automation. In: DEBERGH P.C.; ZIMMERMAN, R.J. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. The Netherlands: Kluwer Academic, Dordrecht, 1991. p.363-388.

ALBARRAN, J.; BERTRAND, B.; LARTAUD, M.; ETIENNE, H. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.81, p.27-36, 2004.

BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N.M. High frequency somatic embryogenesis from *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.44, n.2, p.169-176, 1996.

BOXTTEL, J. van; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.44, p.7-17, 1996.

CASTILLO, B.; SMITH, M.A.L.; YADAVA, U.L. Liquid system scale up of *Carica papaya* L. somatic embryogenesis. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, London, v.73, n.3, p.307-311, 1998.

CURTIS, W.R. Application of bioreactor design principles to plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.81, p.255-264, 2005.

DEBERGH, P.; HARBAOUI, Y.; LEMEURE, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*) evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. **Physiology Plantarum**, v.53, p.181-187, 1981.

De FERIA, M.; JIMENEZ, E.; BARBON, R.; CAPOTE, A.; CHAVEZ, M.; QUIALA E. Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, p.1-16, 2003.

DUCOS, J.P.; GIANFORCARO, M.; FLORIN, B.; PÉTIARD, V.; DESHAYES, A. A technically and economically attractive way to propagate elite *Coffea canephora* (Robusta) clones: in vitro somatic embryogenesis. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 18., 1999, Helsinki. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1999. p.295-301.

DUCOS, J.P.; LAMBOT, C.; PETIARD, V. Bioreactors for coffee propagation by somatic embryogenesis. **International Journal of plant developmental biology**, v.1, n.1, p.1-12, 2007.

ETIENNE, H.; DECHAMP, E.; BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B. Bioreactors in coffee micropropagation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.1, p.45-54, 2006.

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

PINTO, J.E.B.P.; ARELLO, E.F.; BARBOSA, M.H.P. Efeito do pH, de concentrações de sais e de ágar no enraizamento *in vitro* de *Kielmeyra caribaea* (Spr.) Mart. Guttiferae. **Revista Ceres**, v.42, n.242, p.331-343, 1995.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em 20 abr. 2008.

SAS INSTITUTE. **Statistical analysis system**: procedures guide: version 6. Cary, NC: 1990. 705p.

SÖNDHAL, M.R.; SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift fuer pflanzen physiologie**, v.81, n.4, p.395-408, 1977.

TEIXEIRA, J.B.; JUNQUEIRA, C.S.; PEREIRA, A.J.P. da C.; MELLO, R.I.S. de; SILVA, A.P.D. da; MUNDIM, D.A. **Multiplificação clonal de café (*Coffea arabica* L) via embriogênese somática**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39p. (Documentos).