

INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNSE SOMÁTICA EM CLONES DO CAFÉ CONILON (*Coffea canephora* Pierre ex Froenher)

Marlla de Oliveira Hott¹, Ester Ujiie Nogueira², Andreia Barcelos Passos Lima³, Marcelo Antonio Tomaz³, Elaine Manelli Riva⁴

Resumo

O café Conilon (*Coffea canephora* Pierre ex Froenher) possui grande importância econômica e social, sendo a espécie mais plantada no Estado do Espírito Santo. A técnica de embriogênese somática pode auxiliar programas de melhoramento do cafeeiro, garantindo a conservação, multiplicação e caracterização de genótipos e a produção de plantas em grande escala e tempo reduzido. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de indução de embriogênese somática nos clones 3 V, 5 V, 6 V e 11 V de café Conilon. Explantes foliares foram inoculados em meio MS contendo ¼ da concentração de macronutrientes, ½ da concentração de micronutrientes e 5 µM/L de BAP. Em todos os clones a formação de embriões somáticos ocorreu nas bordas dos explantes foliares. O Clone 11 V foi o genótipo mais responsivo com média superior do número de embriões globulares (23). Novos ajustes devem ser realizados no protocolo de indução de embriogênese somática para os Clones 3 V, 5 V e 6 V.

Introdução

No Brasil, a maioria das lavouras de café, conhecido por Robusta, é da cultivar Conilon (*Coffea canephora* Pierre ex Froenher) e o Espírito Santo é o maior produtor nacional. Atualmente, 72,45% do café robusta nacional são produzidos no Espírito Santo (FASSIO; SILVA, 2007).

A utilização de novas tecnologias, como a Biotecnologia, é um dos fatores determinantes para o alcance de qualidade, sustentabilidade e competitividade do café brasileiro (CBP&DC, 2004).

A adoção de ferramentas biotecnológicas e o desenvolvimento de técnicas de propagação vegetativa *in vitro* de cafeeiros fortalecem programas de melhoramento, promovendo uma alternativa viável para a conservação e caracterização de genótipos e rápida multiplicação de genótipos elite. Além disso, fornecem subsídios para a produção de plantas transgênicas e permitem a produção de plantas relativamente uniformes em grande escala, com garantia de sanidade, em período de tempo mais rápido em relação aos métodos convencionais.

Dentre as técnicas utilizadas para a micropropagação do cafeeiro, a embriogênese somática (ES) demonstra ser o melhor método (KUMAR *et al.*; 2006). Van Boxtel; Berthouly (1996), Teixeira *et al.* (2004) e Santos *et al.* (2007) relataram que a resposta à indução da ES no cafeeiro é genótipo-específica. Isso demonstra a necessidade do desenvolvimento de protocolos específicos para o trabalho em cultura de tecidos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de indução de ES em quatro clones de café conilon (*Coffea canephora*).

Material e Métodos

O material vegetal foi constituído pelos Clones 3 V, 5 V, 6 V e 11 V de café Conilon (*Coffea canephora*) que compõem a variedade clonal Conilon Vitória pertencentes ao BAG da Fazenda Experimental do INCAPER, localizada no Município de Marilândia-ES.

Foram realizados dois ensaios preliminares para avaliação do potencial embriogênico. Para o primeiro experimento foram coletadas folhas jovens e totalmente expandidas de plantas do Clone 3 V

¹ Estudante de graduação do Curso de Agronomia, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, CEP 29500-000. E-mail: marllahott@yahoo.com.br

² Estudante de pós-graduação do Curso de Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, CEP 29500-000. E-mail: ester.nog@gmail.com

³ Professor do Departamento de Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, CEP 29500-000. E-mail: albarcelos@hotmail.com; tomazamarcelo@yahoo.com.br

⁴ Pesquisadora do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – Venda Nova do Imigrante, ES, CEP 29375-000. E-mail: manelliriva@incaper.es.gov.br
Apoio financeiro: UFES.

mantidas em casa de vegetação no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. As folhas foram armazenadas em saco plástico por 30 min para fechamento de estômatos. Em capela de fluxo laminar, as folhas foram imersas em etanol 70% por 3 min, hipoclorito de sódio 2% por 10 min e lavadas três vezes com água destilada autoclavada. Segmentos foliares (0,5 cm²) foram inoculados com a face adaxial em contato com o meio de cultura e mantidos durante 90 dias no escuro em sala de crescimento a 25±1°C.

Foram testados 3 meios: **M1**-¼ da concentração de macronutrientes do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), ½ da concentração de micronutrientes do meio MS (DUCOS *et al.*, 2007); **M2**-Meio MS com ½ da concentração dos sais; e **M3**-meio MS completo.

Todos os meios foram suplementados com vitaminas de MS, 30g/L de sacarose e 7g/L de ágar e 5µM/L de BAP e pH ajustado para 5,7 antes de ser autoclavado a 121°C durante 20 min.

Após 90 dias no escuro, os tubos foram submetidos à fotoperíodo de 16h luz. Depois de 30 dias, embriões no estágio torpedo foram transferidos para um meio de igual constituição, porém com 0,5 µM/L de BAP. Após atingir o estágio cotiledonar e coloração verde, cerca de 4 meses, os embriões foram transferidos para o meio de enraizamento contendo ½ da concentração de sais de MS, 20 g/L de sacarose e 7g/L de ágar.

Com base nos resultados obtidos para o Clone 3 V, foi realizado o segundo experimento, testando o meio M1 para os demais clones. Foi estabelecido como controle o Clone 3 V. Após a fase de escuro, foi realizada análise quantitativa do número de embriões em estágio globular.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 repetições, sendo a unidade experimental composta por 5 tubos de ensaio, cada tubo contendo 1 explante. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey a 5%.

Resultados e Discussão

No primeiro experimento foram obtidos embriões somáticos por via direta nas bordas dos explantes submetidos ao meio M1, após 90 dias de cultivo. Ao final dos 120 dias foram obtidos 31 embriões globulares em 80% dos explantes. Todos atingiram o estágio de torpedo na presença de 0,5 µM/L de BAP e após atingirem o estágio cotiledonar, foram transferidos para o meio MS com ½ da concentração de sais para enraizamento e conversão (Fig. 1a).

Dublin (1981), Yasuda *et al.*, (1985; 1995) e Hatanaka *et al.*, (1991), obtiveram indução de ES em explantes foliares somente com BAP e concluíram que as citocininas são reguladores chave no processo embriogênico e que auxinas parecem inibir respostas morfogênicas no gênero *Coffea*.

Nos explantes cultivados nos meios M2 e M3 não foram obtidos embriões somáticos, mas foi observada a diferenciação de algumas células nas bordas do explante, que não se desenvolveram por apresentarem-se oxidadas. Provavelmente, o fator determinante na indução de competência embriogênica foi a variação na concentração de sais, já que os 3 meios apresentavam BAP.

Foi observado que após 120 dias de cultivo a maioria dos explantes tornou-se escuro, o que segundo Quiroz-Figueroa *et al.*, (2002) se deve a um excessivo acúmulo de compostos fenólicos, necessário para o processo de embriogênese somática em café, assim como observado por Neuenschwander e Baumann, (1992), Van Boxtel e Berthouly (1996) e Menéndez-Yuffá e De García (1997).

No segundo experimento, também foram obtidos embriões somáticos por via direta. Para a variável número de embriões globulares, os resultados do teste de média estão descritos na tabela 1. Comparado à média do Clone 3 V, o Clone 11 V apresentou resultados superiores. Os Clones 5 V e 6 V apresentaram médias de embriões estatisticamente iguais ao controle.

Neste experimento todos os embriões somáticos também foram formados nas bordas dos explantes foliares, porém com algumas características individuais. Os Clones 3 V e 5 V apresentaram embriões freqüentemente nas bordas, especificamente em locais de nervura (Figura 1b e 1c). Para os Clones 6 V e 11 V, os embriões foram observados em toda a borda dos explantes (Figura 1d e 1e). No entanto, o Clone 11 V apresentou uma resposta mais rápida de indução de ES, podendo ser observados embriões globulares ainda na fase de escuro aos 70 dias de cultivo.

Conclusões

- O meio M1 com 5 µM/L de BAP induziu ES direta nos Clones 3 V, 5 V, 6 V e 11 V;

- Todos os clones mostraram a formação de embriões somáticos nas bordas dos explantes foliares;
- O Clone 11 V apresentou média superior do número de embriões globulares, sendo o genótipo mais responsivo;
- Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, sugere-se novos ajustes no protocolo de indução de embriogênese somática para os Clones 3 V, 5 V e 6 V.

Agradecimentos

A UFES pela concessão de bolsa de iniciação científica; ao Incaper pelo fornecimento do material vegetal e à técnica Edir Morosini pelo auxílio no período inicial deste trabalho.

Referências

- CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ. 2004. *Relatório de Gestão*. Embrapa. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em http://www22.sede.embrapa.br/cafe/outros/arg_Relat_Gestao/Capa_Apresenta%E7%E3o.pdf. Acessado em: 03 nov 2008.
- DUBLIN, P. Techniques de reproduction végétative in vitro et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. *Café Cacao Thé*, v. 25, p. 237-244, 1984.
- DUCOS, J. P.; LABEE G.; LAMBOT, C.; PÉTIARD, V. Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*. 2007. 43:652–659 DOI 10.1007/s11627-007-9075-0
- FASSIO, L.H.; SILVA, A.E.S. Importância econômica e social do café conilon. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A. DA; BRAGANÇA, S. M.; FERRÃO, M. A. G.; MUNER, L. H. DE. (Eds.). *Café conilon*. Vitória, ES: Incaper, 2007. p. 37-49, Cap. 1.
- HATANAKA, T., O. ARAKAWA, T. YASUDA, N. UCHIDA, AND T. YAMAGUCHI. 1991. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell Rep*. 10:179–182.
- KUMAR, V.; NAIDU, M.M.; RAVISHANKAR, G.A. Developments in coffee biotechnology – in vitro plant propagation and crop improvement. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, v. 87, p. 49-65, 2006.
- MENÉNDEZ-YUFFÁ A, DE GARCÍA EG (1997) Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "Catimor". *Protoplasma* 199:208-214.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NEUENSCHWANDER, B. AND T. W. BAUMANN. 1992. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep*. 10:608–612.
- QUIROZ-FIGUEROA, F. R., C. F. J. FUENTES-CERDA, R. ROJAS-HERRERA, AND V. M. LOYOLA-VARGAS. 2002. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep*. 20:1141–1149.
- TEIXEIRA, J. B.; JUNQUEIRA, C. S.; PEREIRA, A. J. P. C.; MELLO, R. I. S.; SILVA, A. P. D.; MUNDIM, D. A. *Multiplificação clonal de café (Coffea arabica L.) via embriogênese somática*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 40 p.
- SANTOS, A.C.P.; OLIVEIRA, P.L.; TEIXEIRA, J.B.; PADILHA, L.; CARVALHO, C.H.S. *Produção de calos embriogênicos em genótipos elite de café arábica*. In: V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2007, Águas de Lindóia. *Anais...*, Águas de Lindóia, 2007, CD Rom.
- VAN BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. *Plant Cell Tiss. Organ Cult*. 44:7–17. 1996
- YASUDA, T., M. TAHARA, T. HATANAKA, T. NISHIBATA, AND T. YAMAGUCHI. Clonal propagation through somatic embryogenesis of *Coffea* sp. In: *16th ASIC colloque*, Kyoto, Japan. Ed by ASIC. 1995. 537–541.
- YASUDA, T.; FUJII, Y.; YAMAGUCHI, T. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant and Cell Physiology*, v. 26, p. 595-597, 1985.

Tabela 1 – Número médio de embriões globulares em explantes foliares dos Clones 03, 05, 06 e 11 de *Coffea canephora*.

Clones	Número de embriões
Clone 11	23,0 a
Clone 03	13,16 b
Clone 06	9,83 b
Clone 05	8,0 b

As médias seguidas por mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

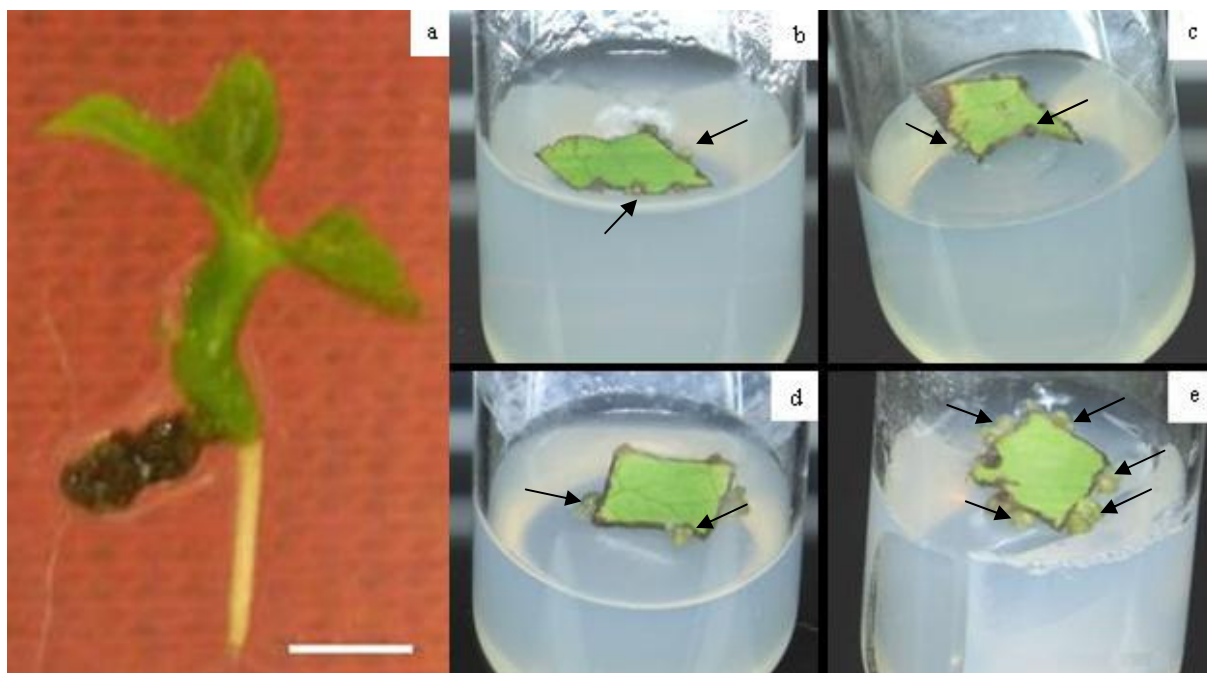


Figura 1 – a) Embrião somático do Clone 3 obtidos no primeiro experimento após 8 meses de cultivo. b) Explante foliar do Clone 03 com embriões globulares (seta). c) Explante foliar do Clone 05 com embriões globulares (seta). d) Explante foliar do Clone 06 com embriões globulares (seta). e) Explante foliar do Clone 11 com embriões globulares em cluster (seta). Escala = 0,5 cm.

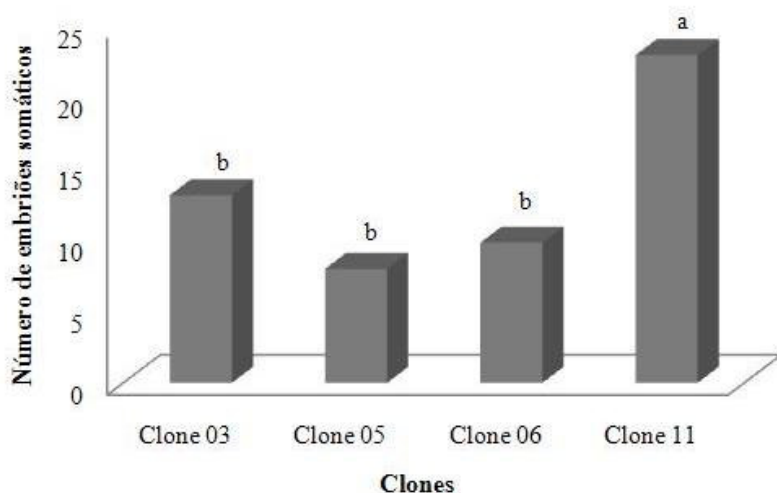


Gráfico 1 – Número de embriões globulares aos 120 dias de cultivo.