

CALOGÊNESE FRIÁVEL EM *Coffea arabica* E *C. canephora*¹

SANTOS, A.C.P.²; CORDEIRO, A.T.³; FIGUEIRA, M.L.⁴; ZANETTI, R.S.⁵; CRUZ, A.C.F.⁵ e ZAMBOLIM, L.⁶

¹ Pesquisa financiada pelo CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ, CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO e FINEP - FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS; ² Doutoranda/UFV; ³ DBV/UFV, <atcordei@mail.ufv.br>, telefone 031 3899 2590, fax 031 3899 2580); ⁴ Bolsista INI-CBP&D/Café; ⁵ Graduando/UFV; ⁵ Graduanda/UFV; ⁶ DFP/UFV.

RESUMO: O conhecimento das condições genótipo-específicas para a calogênese friável embriogênica em genótipos de *Coffea* de interesse é de suma importância para a propagação clonal em grande escala. Para isso, submeteram-se explantes foliares do arábica Catuaí Vermelho e do canéfora Apoatã a diferentes meios de cultura para a indução de calos friáveis embriogênicos. Estes calos, que foram obtidos em explantes de Apoatã e de Catuaí Vermelho aos sete e aos dez meses do início da indução, respectivamente, foram utilizados para o estabelecimento de culturas líquidas. As suspensões celulares revelaram, imediatamente após subcultura, uma fase exponencial de crescimento celular até um ponto de inflexão, a partir do qual as taxas de crescimento reduziram progressivamente, para atingir um peso de matéria fresca dos agregados celulares assintótico. A diferenciação embriogênica de agregados celulares Apoatã, em cultura líquida, rendeu cerca de 12.000 embriões g⁻¹ matéria fresca de agregados celulares.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, Catuaí Vermelho, *Coffea canephora*, Apoatã, calogênese friável, embriogênese somática, cultura líquida.

FRIABLE CALLUSGENESIS IN *Coffea arabica* AND *Coffea canephora*.

ABSTRACT: The knowledge on the genotype-specific conditions required for induction of embryogenic friable calli of economic *Coffea* genotypes is of utmost importance for clonal propagation on a large scale. Aiming at that leaf explants of the Arabica 'Catuaí Vermelho' and the Canephora 'Apoatã' were conducted in several media in order to inducing the formation of embryogenic friable calli. These were obtained by the seventh ('Apoatã') and the tenth ('Catuaí Vermelho') month from the beginning of the inducing-treatment and were employed for the establishment of liquid cultures. Soon after subculturing, suspensions exhibited an exponential cell growth up to the inflexion point which was followed by an stage characterized by gradually decreased growth rates. The latter phase described an asymptotic fresh matter

growth of the cell aggregates. The embryogenic differentiation of 'Apoatã' aggregates in liquid culture produced about 12,000 embryos per gram cell aggregate on a fresh matter basis.

Key words :

INTRODUÇÃO

A propagação em grande escala de genótipos elites de *Coffea*, segregantes e/ou representados por poucos indivíduos, pode ser realizada por meio da embriogênese somática indireta. Essa via, que requer a redeterminação de células diferenciadas, a proliferação de calos e a indução de células embriogênicas determinadas, depende da ação de reguladores de crescimento não só para a retomada da atividade mitótica, mas também para a determinação do estado embriogênico (Söndahl et al., 1985; Williams e Maheswaran, 1986). Duas estratégias têm sido geralmente utilizadas para a obtenção de tecido embriogênico em *Coffea*: a primeira, unifásica, envolve o cultivo de explantes sobre um único meio que contém como regulador de crescimento apenas citocinina (Yasuda et al., 1985) ou a ação combinada de auxina e citocinina (Pierson et al., 1983). A segunda estratégia, bifásica, utiliza o cultivo de explantes sobre um meio primário, de indução, seguido da transferência dos explantes para um meio secundário, de diferenciação (Dublin, 1984) ou de condicionamento (Söndahl et al., 1985), que difere do primeiro por possuir menor razão auxina/citocinina (Noriega e Söndahl, 1993; Zamarripa et al., 1991). Para ambas as etapas de isolamento e de diferenciação de tecido friáveis, tem-se verificado que a competência para a embriogênese somática indireta varia inter (Cordeiro, 1999; Zamarripa et al., 1991) e intra-especificamente (Berthouly e Michaux-Ferriere, 1996; Bieysse et al., 1993), sugerindo que uma maior expressão da competência genotípica para esta via de propagação pode requerer condições experimentais particulares. Objetivando-se o conhecimento de tais condições genótipo-específicas com vistas à produção de calos friáveis embriogênicos, para a propagação clonal em grande escala, submeteram-se explantes foliares de plantas de *Coffea arabica* cultivar Catuaí Vermelho e de *C. canephora* cultivar Apoatã a diferentes meios de cultura supostamente indutores de calos.

MATERIAL E MÉTODOS

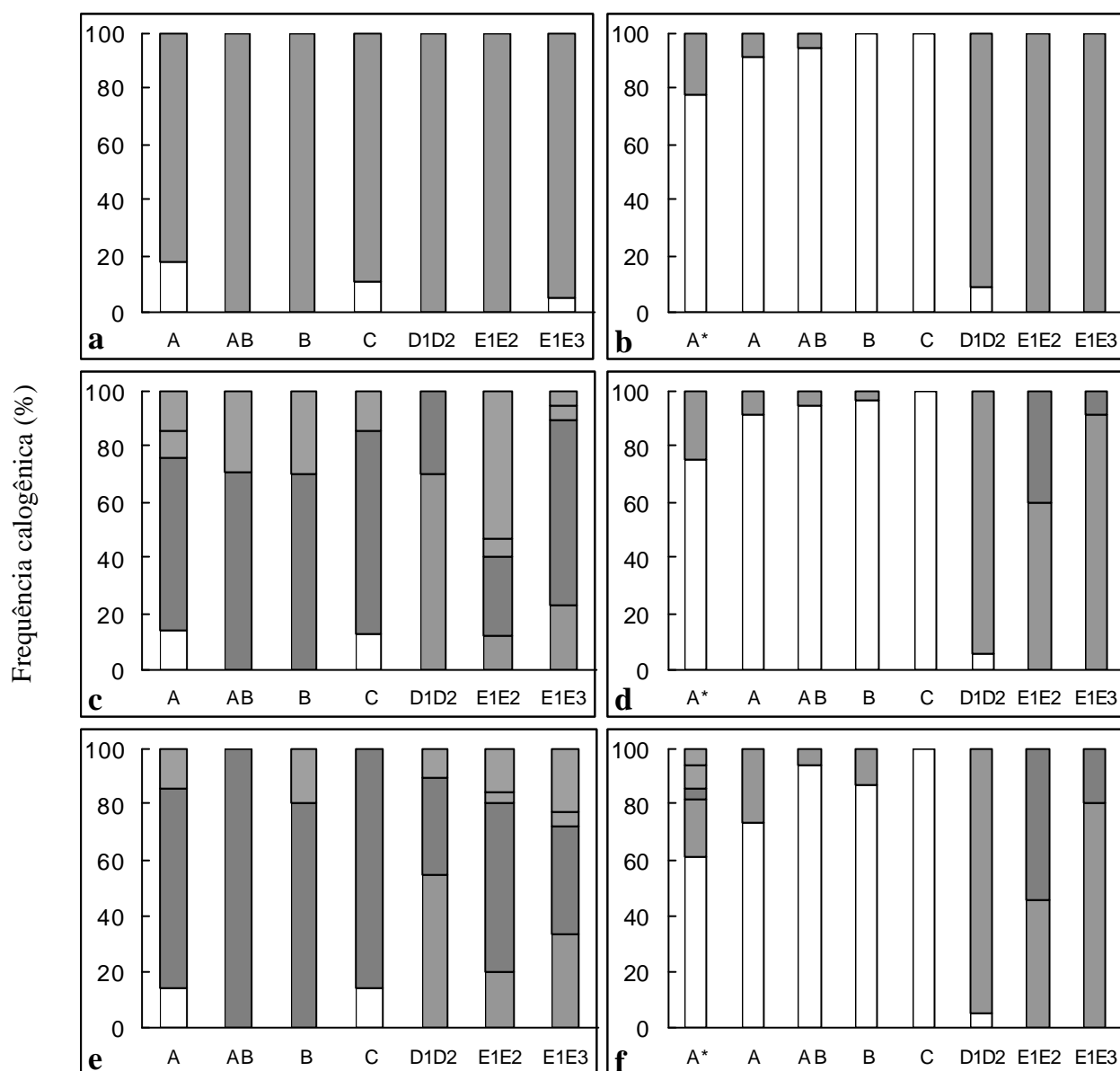
As fontes de explantes foliares foram plantas mantidas em casa de vegetação de *Coffea arabica* cultivar Catuaí Vermelho e *Coffea canephora* cultivar Apoatã. Para reduzir a incidência de explantes

contaminados, as folhas jovens completamente expandidas a serem utilizadas eram pulverizadas com Folicur 1 mL⁻¹, Mancozeb 3 gL⁻¹ e Agrimicina 1 gL⁻¹ dois a cinco dias antes da remoção, quando eram imediatamente lavadas em água corrente. Em seguida à desinfecção com hipoclorito de cálcio 5% contendo Tween 20 0,03%, as folhas foram lavadas três vezes com água destilada autoclavada, após o que removiam-se fragmentos foliares nas dimensões aproximadas de 7 x 7 mm. Estes foram distribuídos com o lado adaxial em contato com a superfície do meio semi-sólido contido em placas de Petri de ϕ 55 mm. Cada placa recebeu, inicialmente, cinco explantes, que foram repetidos vinte vezes e mantidos em condições de obscuridade a 25°C. Estudaram-se oito meios de cultura (A, B, C, D1, D2, E1, E2 e E3), que resultaram nos tratamentos: A, A*, A/B, B, C, D1/D2, E1/E2 e E1/E3. A barra indica sucessão de dois meios, com o segundo introduzido na primeira repicagem realizada aos trinta dias de pós-indução. As subsequentes ocorreram a intervalos variando de 30 a 60 dias entre si. Os meios A, B e C são constituídos no que se refere à composição dos macro e microelementos e das vitaminas, pelos mesmos compostos usados por Yasuda et al. (1985) e Gamborg et al. (1986), respectivamente. Os meios D e E foram constituídos pelos macro e microelementos de Murashige e Skoog (1962) e pelas vitaminas usadas por Morel e Wetmore (1951). Os reguladores de crescimento foram os seguintes: (A) BAP 20 μ M, (B) BAP 5 μ M, (C) 2iP 5 μ M, (D1) 2,4-D 4,5 μ M e KIN 18,6 μ M, (D2) ANA 0,54 μ M e KIN 4,6 μ M, (E1) 2,4-D 1,5 μ M e BAP 7,5 μ M, (E2) 2iP 25 μ M e IBA 5 μ M e (E3) BAP 5 μ M. Todos os meios continham, ainda, Gelrite™ 3 gL⁻¹ ou ágar 8 gL⁻¹ (A*), sacarose 30 gL⁻¹, cisteína 20 mgL⁻¹. Após a correção do pH para 5,6; os meios eram autoclavados durante 20 min à temperatura de 121 °C e pressão de 12 psi. A reatividade dos explantes foi avaliada e os calos friáveis embriogênicos obtidos foram cultivados em meios líquidos contidos em erlenmeyers, que correspondiam aos semi-sólidos de suas origens. O conjunto era deixado sobre agitador com movimento giratório excêntrico a 110 rpm e sujeito a um fotoperíodo de 12h e irradiância de 5 μ mol m⁻²s⁻¹. A densidade inicial de biomassa foi mantida em 10 gL⁻¹ de meio (Zamarripa et al., 1991) e as suspensões celulares eram subculturadas a intervalos de 14 dias. Para a diferenciação de agregados celulares a embriões, a biomassa, na densidade de 1 gL⁻¹, era transferida para os mesmos meios líquidos de manutenção desprovidos de um ou mais reguladores de crescimento. Após quatro semanas, renovava-se o meio líquido. Cerca de oito semanas do início, aproximadamente, a biomassa com embriões era recuperada e obtinha-se o peso da sua matéria fresca. Em seguida, eram efetuadas contagens de embriões em três amostras, por erlenmeyer, de 10⁻¹ g de biomassa imobilizada em meio semi-sólido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos dois meses do início da indução calogênica, todos os meios de cultura estudados induziram calos primários, cicatriciais, nodulares ou mistos, em explantes foliares do canéfora Apatã, em frequências que variaram de 80 a 100% (Figura 1a). Essas frequências foram verificadas em explantes de Catuaí Vermelho quando cultivados apenas nos meios D1D2, E1E2 e E1E3, que continham ambos os reguladores de crescimento, auxinas e citocininas, em suas composições (Figura 1b). Cinco meses após essas observações iniciais, embora todos os meios de cultura testados induzissem o surgimento de calos embriogênicos em explantes Apatã, naqueles de Catuaí Vermelho, a produção de embriões somáticos ocorreu somente em resposta às seqüências de meios E, principalmente E1E2. Para o genótipo Apatã, as maiores frequências de calos primários embriogênicos foram verificadas em explantes cultivados em meios de cultura que continham como reguladores de crescimento apenas citocininas (Figura 1c e 1e).

Calos friáveis embriogênicos (CFE), necessários ao estabelecimento de culturas líquidas com vistas à propagação clonal em grande escala, foram observados mais cedo e em frequências maiores em explantes foliares do canéfora Apatã que naqueles do arábica Catuaí Vermelho (Figura 1c e 1d). Enquanto todos os meios testados induziram CFE's em explantes Apatã, nos de Catuaí foram produzidos somente em resposta ao meio A*, que continha como regulador de crescimento e agente gelificante BAP 20 μ M e ágar, respectivamente. CFE's de Apatã e de Catuaí Vermelho, induzidos nos respectivos meios semi-sólidos E1E2 e A*, foram utilizados para iniciar culturas líquidas nos mesmos meios de origem sem o agente gelificante. Quatro meses mais tarde, o estudo da cinética de crescimento das culturas líquidas estabelecidas revelou, imediatamente após a subcultura, uma fase exponencial de crescimento celular até um ponto de inflexão (t_i), a partir do qual as taxas de crescimento reduziram progressivamente para atingir um peso de matéria fresca de agregados celulares assintótico (Figura 2). A fase exponencial parece sugerir que apenas uma fração das células participa do crescimento da suspensão celular, em concordância com as observações de Vasil e Vasil (1982, 1986). Os t_i 's para as culturas líquidas Apatã e Catuaí Vermelho foram de 14,1 e 8,3 dias, respectivamente. Esses resultados indicam que o intervalo de tempo entre repicagens de culturas não é necessariamente o mesmo entre diferentes cepas. A diferenciação embriogênica dos agregados celulares das duas cepas estabelecidas foi tentada em diferentes condições, mas somente aquela do canéfora Apatã produziu embriões, sugerindo que a cepa Catuaí Vermelho não era mais embriogênica ou que as condições indutoras testadas não foram adequadas.



Sequência de meios de cultura indutivos

Figura 1 - Reação calogênica aos dois (a, b), sete (c, d) e dez (e, f) meses do início da indução de explantes foliares de *Coffea canephora* Apoatã (a, c, e) e de *C. arabica* Catuaí Vermelho (b, d, f) submetidos a diferentes sequências de meios de cultura (□ sem reação, ■ calo primário, ■ calo primário embriogênico, ■ calo friável, ■ calo friável embriogênico).

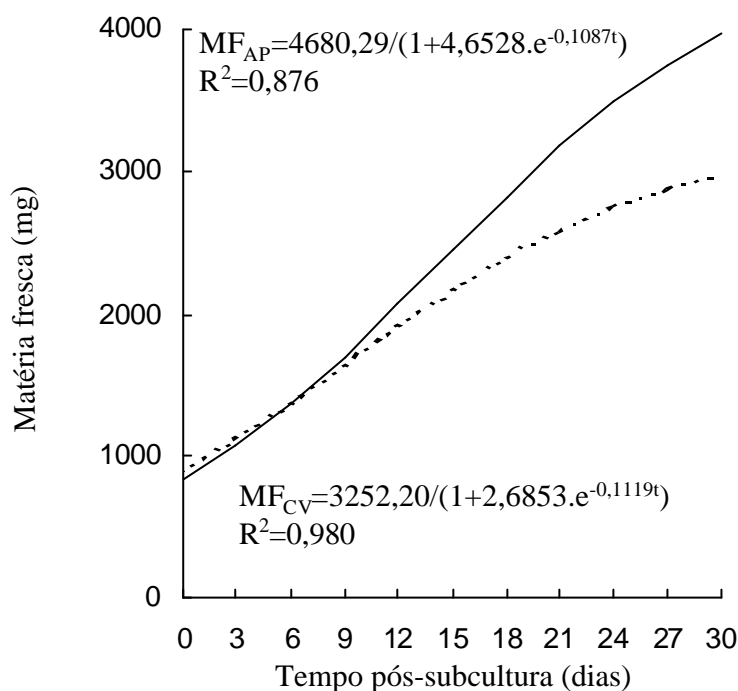


Figura 2 - Acúmulo de matéria fresca de agregados celulares dos genótipos arábica Catuai Vermelho (CV,) e canéfora Apatã (AP, —) em resposta ao tempo pós-subcultura. Os agregados celulares foram cultivados em meio líquido na densidade inicial de 10gL^{-1} , em volumes de 100 mL contidos em erlenmeyers de volumes de 250 mL.

De maneira geral, o rendimento embriogênico da cepa Apatã foi maior quando se removeu a auxina AIB da cultura de manutenção, relativamente à remoção de ambos os reguladores de crescimento, o AIB e a citocinina 2iP (Figura 3). Nesta condição mais favorável, o número de embriões produzidos foi maior quando a diferenciação foi iniciada em agregados celulares recuperados aos nove dias, relativamente aos quinze dias de pós-epicagem. Rendimentos superiores a 100.000 embriões. g^{-1} matéria fresca de agregados celulares têm sido obtidos para cepa diferente do mesmo genótipo (Cordeiro, 1999) e de outros genótipos canéforas (Van Boxtel e Berthouly, 1996; Zamarripa et al., 1991).

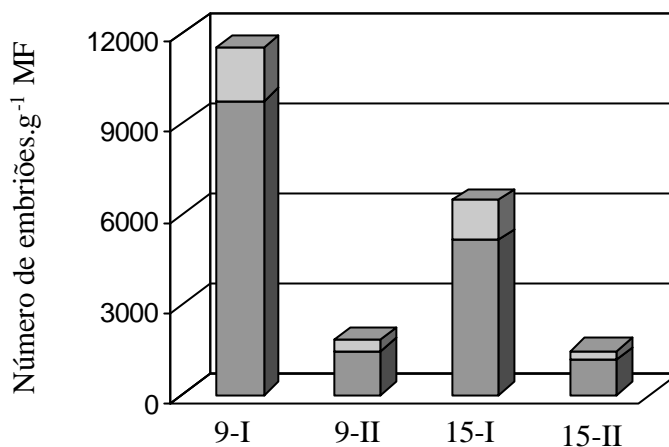


Figura 3 - Diferenciação embriogênica (torpedo ■ e globular □) de agregados celulares do canéfora Apatã aos 60 dias de pós-indução nos meios de cultura líquidos I (E2 – AIB) e II (E2 – AIB e 2iP) e na densidade celular de 1 gL⁻¹. Os agregados celulares foram obtidos de culturas de manutenção no meio E2, aos 9 e 15 dias de pós-epicagem.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos confirmam a genótipo-especificidade das condições indutoras para a produção de calos friáveis embriogênicos em explantes foliares do arábica Catuaí Vermelho e do canéfora Apatã. Culturas líquidas de ambos os genótipos foram estabelecidas a partir dos calos friáveis embriogênicos obtidos. Todavia, somente os agregados celulares da cepa Apatã diferenciaram-se em embriões somáticos, com rendimentos que variaram de 1.500 a 12.000 embriões.g⁻¹ de matéria fresca de biomassa original em função das condições indutoras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE N. 1996. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, v.44, p.169-176.
- BIEYSSE, D.; GOFFLOT, A.; MICHAUX-FERRIERE N. 1993. *Can. J. Bot.*, v.71, p.1496-1502.
- CORDEIRO, A.T. 1999. *Tese doutorado-UFV*, Viçosa-MG, 111p.
- DUBLIN P. 1984. *Café Cacao Thé*, v.28, p.231-244.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. 1968. **Exp. Cell Res.**, v.50, p.151-158.

MOREL, G.; WETMORE, R.H. 1951. **Am. J. Bot.**, v.38, p.141-143.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. **Physiol. Plant.**, v.15, p.473-479.

NORIEGA, C.; SÖNDAHL, M.R. 1993. **Colloque Scientifique International sur le Café**, 15, Montpellier. ASIC (Paris), p.763-766.

SÖNDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W.R. 1985. In: RR HENKE, KW HUGHES, MP CONSTANTIN, A Hollaender (eds), **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. Plenum Press, New York. p.215-232.

VASIL, V.; VASIL, IK. 1986. **J Plant Physiol.**, v.124, p.399-408.

VASIL, V.; VASIL, IK. 1982. **Am. J. Bot.**, v.69, p.1441-1449.

YASUDA, T.; FUJII, Y.; YAMAGUCHI, T. 1985. **Plant Cell Physiol.**, v.26, p.595-597.

ZAMARRIPA, A.; DUCOS, JP.; BOLLON, H.; DUFOUR, M.; PETIARD, V. 1991. **Café Cacao Thé**, v.35, p.233-244.