

INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE 2-iP e 2,4-D NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE FOLHAS DE PLANTAS DE *Coffea canephora* e *Coffea arabica*

TEIXEIRA, J.B.¹; ARIMURA, C.T.¹ E JUNQUEIRA, C.S.¹

¹ Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx.Postal 02372, 70.849-970, Brasília-DF, <batista@cenargen.embrapa.br>.

RESUMO: A exploração da heterozigose em café depende da disponibilidade de uma eficiente metodologia de multiplicação vegetativa, a qual se encontra em fase de teste em escala piloto tanto para *Coffea arabica* quanto para *Coffea canephora*. Dos fatores do meio de cultura que influenciam a taxa de indução de embriogênese somática em café, isopenteniladenina (2-iP) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) têm um papel determinante no processo. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as concentrações relativas de 2i-P e 2,4-D na indução de formação de calos embriogênicos do tipo HFSE (“High frequency somatic embryos”) e LFSE (“Low frequency somatic embryos”), em uma cultivar de *C. arabica* (Catuaí Vermelho) e um genótipo de *C. canephora* (E1571/99). A formação de calo embriogênico do tipo LFSE foi estimulada pelo aumento de 2-iP, enquanto o do tipo HFSE foi estimulado pelo aumento de 2,4-D em ambas as espécies. Em *C. canephora*, a formação de LFSE e HFSE chegou a 100% na presença de 2,5, 5,0 ou 10,0 µM de 2-iP e 5,0 µM 2,4-D, respectivamente. Em *C. arabica*, a percentagem de formação tanto de LFSE quanto de HFSE foi menor, chegando a 63,6 de LFSE em 15 µM de 2-iP e 90,6% de HFSE em 20 µM de 2,4-D. O subcultivo aos 30 dias foi benéfico em explantes de *C. arabica*, o contrário do observado para explantes de *C. canephora*. Em geral, este subcultivo contribuiu para a formação e o crescimento de calo friável não-embriogênico, o que prejudicou a formação de LFSE em *C. canephora*.

Palavras-chave: *Coffea canephora*, *Coffea arabica*, embriogênese somática.

INFLUENCE OF 2-4P AND 2-4D CONCENTRATIONS IN SOMATIC EMBRYOGENESIS IN LEAVES OF *Coffea canephora* e *Coffea arabica*

ABSTRACT: The exploitation of heterozygosity in coffee depends on an efficient protocol for vegetative propagation. This protocol has been tested under small scale either for *Coffea arabica* or *Coffea*

canephora. Two different factors on the culture medium, 2-iP and 2,4-D, have a determinant role on the process. Therefore, the present work had as the main objective the evaluation of relative concentrations of 2-iP and 2,4-D in the induction and formation of high frequency somatic embryos (HFSE), and low frequency somatic embryos (LFSE) on the cultivar “Catuaí Vermelho” of *C. arabica* and on the genotype E1571/99 of *C. canephora*. The formation of LFSE and HFSE was respectively stimulated by 2-iP and 2,4-D, on both species. For *C. canephora*, the LFSE and HFSE formation was observed on 100% of the explants in the presence of either 2.5, 5.0 or 10.0 μM of 2-iP and 5.0 μM of 2,4-D, respectively. For *C. arabica*, the induction of LFSE and HFSE was present on 63,6 and 90,6% of the explants at 15 μM 2-iP and 20 μM 2,4-D, respectively. Subculture after 30 days contributed to increase the percentage of induction either for HFSE or LFSE of *C. arabica* explants, the opposite effect was observed for explants from *C. canephora*. In general, the subculture stimulated the formation of friable non embryogenic calli, which probably contributed to inhibit the LFSE formation on *C. canephora* explants.

Key words: *Coffea canephora*, *Coffea arabica*, somatic embryogenesis.

INTRODUÇÃO

A exploração da heterozigose em café, por meio de cruzamentos intervarietais e, interespecíficos, depende da disponibilidade de uma eficiente metodologia de multiplicação vegetativa. Esta metodologia, quando aplicada em pequena escala, permite a instalação de experimentos de avaliação e seleção de clones em condições de campo. Para essa finalidade, a metodologia desenvolvida já se encontra disponível para uso imediato. Após a seleção de clones de alta performance específicos para condições de solo e clima definidos, é necessária a disponibilidade de uma metodologia para produção de mudas em larga escala e que seja economicamente viável. Esta metodologia deve permitir a produção de mudas uniformes, vigorosas e estáveis genética e epigeneticamente, a um custo compatível com a rentabilidade do cultivo dos novos clones. Ela encontra-se disponível para teste em escala piloto tanto para *Coffea arabica* quanto para *Coffea canephora* (Boxtel & Berthouly, 1996).

A metodologia de multiplicação clonal de *C. canephora* pode ser conduzida alternativamente por estaquia convencional ou por embriogênese somática, enquanto para *C. arabica* a metodologia mais promissora é a por embriogênese somática.

Os primeiros trabalhos de micropropagação de café via embriogênese somática foram publicados por Staritsky (1970) para *C. canephora* e por Sondahl & Sharp (1977) para *C. arabica*.

Um dos principais fatores relacionados à embriogênese somática em café diz respeito à influência do genótipo. Boxtel & Berthouly (1996) mostraram que, dependendo do genótipo, a percentagem de formação de calos embriogênicos em *C. canephora* pode variar de 0,0 a 96,9%. A indução de embriogênese somática em quatro variedades de *C. arabica*, conforme os mesmos autores, variou de 0,0 a 10,0%. No primeiro trabalho sobre embriogênese somática de *C. arabica*, Sondahl & Sharp (1977) obtiveram taxas relativamente elevadas, chegando a 60% de calos embriogênicos. Em *C. canephora* (cv. Robusta), Berthouly & Michaux-Ferriere (1996) conseguiram até 100% de calos embriogênicos, dependendo da qualidade, quantidade e idade das culturas.

Dos fatores que influenciam a taxa de indução de embriogênese somática de café, a citocinina isopenteniladenina (2i-P) e a auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) têm papel determinante no processo (Boxtel & Berthouly, 1996). Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as concentrações relativas de 2i-P e 2,4-D na indução de formação de calos embriogênicos do tipo HFSE (“High frequency somatic embryos”) e LFSE (“Low frequency somatic embryos”), segundo a nomenclatura proposta por Sondahl & Sharp (1977), em uma cultivar de *C. arabica* (‘Catuaí Vermelho’) e um genótipo de *C. canephora* (E1571/99).

MATERIAL E MÉTODOS

A linhagem embriogênica E1571/99 de *C. canephora* foi gentilmente cedida pelo Dr. Luis C. S. Ramos, IAC. Esse material foi derivado da germinação *in vitro* de embriões somáticos. As plântulas foram mantidas em meio de cultura de MS (Murashige & Skoog, 1962), ½força, 0,5 mg/l de AIB, 3% de sacarose e 0,2% de fitagel, sob condições de 16 horas de fotoperíodo, intensidade luminosa de $30 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura variando entre 25 e 28 °C.

O material de *C. arabica* consistiu de plântulas da variedade Catuaí Vermelho derivadas de embriões somáticos obtidos na Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. Estas plântulas foram aclimatadas e mantidas em casa de vegetação, em sacos plásticos contendo aproximadamente 5 litros da mistura solo, areia, palha de arroz carbonizada e esterco bovino curtido na proporção de 5:1,5:1,5:1, em temperatura variando entre 20 e 30 °C. As plantas foram irrigadas diariamente, de modo a manter o solo úmido.

Folhas bem desenvolvidas de ‘Catuaí Vermelho’ foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% por 20 minutos, seguido de álcool a 70% por 3 minutos e três lavagens com água destilada estéril. A seguir, as folhas foram cortadas em retângulos de, aproximadamente, 5 x 5 mm e inoculadas em meios de

cultura, onde se variou a concentração de 2i-P e 2,4-D. Paralelamente, segmentos de folhas de mesmo tamanho foram retirados das plântulas de *C. canephora* mantidas *in vitro* e inoculados nos diferentes meios de cultura. Os seguintes tratamentos foram testados para *C. canephora*: 2i-P (0,0; 2,5; 5,0; e 10,0 μM) e 2,4-D (0,0; 2,5; 5,0; e 10 μM), com e sem subcultivo ao final de um mês de cultivo. Cada tratamento consistiu de seis placas de Petri, com seis explantes por placa. As placas foram mantidas no escuro sob temperatura de 25 a 28 °C.

Para *C. arabica*, os seguintes tratamentos foram avaliados: 2i-P (5,0 ;10,0; 15; e 20 μM) e 2,4-D (5,0; 10; 15; e 20 μM).

O meio básico utilizado foi o C, empregado por Boxtel & Berthouly (1996) na fase inicial de cultivo. A concentração de 2,4-D foi de 2,5 μM , nos tratamentos com variações de 2-iP, enquanto o nível de 2-iP foi mantido em 10 μM , para os tratamentos com 2,4-D. Todos os outros componente do meio C foram mantidos em suas respectivas concentrações.

Após cinco meses de cultivo, foram feitas as análises, que consistiram em avaliar o número de explantes com formação de calo primário, calo embriogênico do tipo HFSE, calo embriogênico do tipo LFSE e calo friável não-embriogênico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação de calo primário foi incipiente em explantes de folhas de *C. canephora* tanto na presença de 2-iP quanto na de 2,4-D (Tabela 1). A formação de calo embriogênico do tipo LFSE foi estimulada pelo aumento de 2-iP, enquanto a do tipo HFSE foi estimulada pelo aumento de 2,4-D (Tabela 1). A formação de calos do tipo LFSE chegou a 100% em meio contendo 2,5 e 5,0 μM de 2-iP, sem subcultivo, e 10 μM , com subcultivo. O subcultivo aos 30 dias redundou em proliferação excessiva de calo friável não-embriogênico, o que prejudicou a formação de calo embriogênico do tipo LFSE. Por outro lado, embora a frequência desse tipo de calo tenha sido alta na presença de 2,4-D, tanto com subcultivo quanto sem subcultivo, a quantidade de calos friável não-embriogênico foi consideravelmente menor na presença de 2,4-D, sobretudo nas concentrações mais elevadas, isto é, 5 e 10 μM .

Tabela 1 - Influência dos níveis de 2i-P, 2,4-D e subcultivo aos 30 dias sobre a percentagem de indução de calo embriogênico friável do tipo HFSE e LFSE e calo friável não-embriogênico em explantes de folha de plântulas *in vitro* de *C. canephora* derivadas de embriões somáticos. A concentração de 2,4-D foi mantida em 2,5 μ M em todos os tratamentos com 2-iP e este em 10 μ M em todos os tratamentos com 2,4-D

Concentração de 2i-P (μ M)	Formação de calo primário	Formação de calo embriogênico do tipo HFSE	Formação de calo embriogênico do tipo LFSE	Formação de calo friável não-embriogênico
2-iP (Com subcultivo)				
0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
2,5	0,0	10,0	70,0	100,0
5,0	0,0	0,0	70,0	100,0
10,0	0,0	40,0	100,0	80,0
2-iP (Sem subcultivo)				
0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
2,5	0,0	0,0	100,0	0,0
5,0	0,0	0,0	100,0	0,0
10	0,0	50,0	85,0	0,0
2,4-D (Com subcultivo)				
0,0	0,0	0,0	100,0	-
2,5	0,0	85,0	10,0	90
5,0	0,0	94,0	0,0	10
10,0	0,0	90,0	0,0	40
2,4-D (Sem subcultivo)				
0,0	0,0	0,0	100,0	-
2,5	0,0	45,0	60,0	80
5,0	0,0	100,0	0,0	10
10	0,0	95,2	0,0	40

Para a espécie *C. arabica*, os resultados foram semelhantes. O aumento de 2,4-D no meio de cultura levou a um aumento na formação de calos embriogênicos do tipo HFSE e aumento dos níveis de 2-iP redundou em aumento da formação de calos embriogênicos do tipo LFSE. Entretanto, ao contrário de *C. canephora*, o subcultivo aos 30 dias contribuiu para aumentar a percentagem de ambos os tipos de calos (Tabela 2). Embora a presença de 2-iP tenha sido essencial para o aparecimento de calo embriogênico do tipo LFSE, o teor de 2,4-D foi determinante no processo. Com o aumento de 2,4-D de 5 para 10 μ M, a frequência de calos do tipo LFSE baixou de 46,4 para 8,6% (Tabela 2), levando-se em consideração que o experimento de 2,4-D foi conduzido na presença de 10 μ M de 2-iP.

Tabela 2 - Influência dos níveis de 2i-P, 2,4-D e subcultivo aos 30 dias sobre a percentagem de indução de calo embriogênico friável dos tipos HFSE e LFSE e calo friável não-embriogênico em explantes de folha de plântulas *in vitro* de *C. arabica* derivadas de embriões somáticos. A concentração de 2,4-D foi mantida em 2,5 µM para todos os tratamentos com 2-iP e este mantido em 10 µM para todos os tratamentos com 2,4-D

Concentração de 2i-P (µM)	Formação de calo primário	Formação de calo embriogênico do tipo HFSE	Formação de calo embriogênico do tipo LFSE	Formação de calo friável não-embriogênico
2-iP (Com subcultivo)				
5,0	100	0,0	56,7	0,0
10,0	100	0,0	54,3	8,6
15,0	100	0,0	63,6	0,0
20,0	100	7,4	33,3	7,4
2-iP (Sem subcultivo)				
5,0	100	17,1	2,9	0,0
10,0	100	0,0	5,9	0,0
15,0	100	3,1	0,0	0,0
20,0	100	2,8	0,0	0,0
2,4-D (Com subcultivo)				
5,0	100	35,7	46,4	7,1
10,0	100	34,2	8,6	48,6
15,0	100	47,2	8,3	38,9
20,0	100	90,6	0,0	9,4
2,4-D (Sem subcultivo)				
5,0	100	40,7	3,7	0,0
10,0	100	20,0	0,0	0,0
15,0	100	54,5	3,0	3,0
20,0	100	65,6	3,1	3,1

O calo embriogênico em folhas de *C. canephora* apresenta o mesmo aspecto tanto em textura quanto em coloração que o do *C. arabica*. Entretanto, a formação do calo embriogênico friável em *C. canephora* diferiu da observada em *C. arabica*. Em explantes foliares de *C. canephora*, o calo embriogênico friável formou-se provavelmente a partir das células originais do explante, sem a ocorrência visual de formação de calo primário. O mesmo foi observado para o calo embriogênico de baixa frequência (LFSE). Essa denominação não parece ser a mais adequada para descrever a embriogênese direta em explantes de *C. canephora*, uma vez que a frequência de embriões formados por esse processo foi bastante elevada e, talvez, a expressão embriogênese direta de alta frequência seja mais adequada.

O calo primário visualmente presente apenas nos explantes de *C. arabica* apresenta aspecto globular, em torno de 2 a 3 mm de diâmetro aproximadamente, de coloração marrom-escuro e começa a se formar algumas semanas após a inoculação das folhas, aumentando de tamanho até 4 a 6 semanas de

cultivo. Ao final desse período, o seu crescimento torna-se aparentemente mínimo. Após alguns meses de cultivo do calo primário, ocorre a formação do calo secundário do tipo friável, que é de dois tipos: um embriogênico e outro não-embriogênico. O calo friável embriogênico (HFSE) apresenta coloração amarelo-ouro e é constituído de grânulos pequenos, menores que um milímetro de diâmetro. Este calo pode ser mantido por longos períodos de cultivo em meios apropriados e apresenta alta capacidade regenerativa na presença de citocininas. Por outro lado, o calo friável não-embriogênico tem coloração esbranquiçada e textura amorfa. Embora possa ser mantido por longos períodos, este tipo de calo não tem capacidade regenerativa.

Um terceiro tipo de crescimento a partir do calo primário é o calo embriogênico de baixa frequência (LFSE). Neste tipo de calo, observa-se a formação de um tecido regenerativo, que evolui diretamente para a formação de embriões somáticos geralmente de baixa frequência, embora o número de embriões por explante possa ser bastante elevado, principalmente na espécie *C. canephora*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTHOULY, M. & MICHAUX-FERRIERE, N.M. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, vol.44, p.169-176, 1996.
- BOXTTEL, J.VAN & BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, vol.44, p.7-17, 1996.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, vol. 15, p.473-497, 1962.
- SONDAHL, M.R. & SHARP, W. R. High frequency induction somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. (1977). **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, vol. 81, p.395-408, 1977.
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Bot. Neerl.**, vol. 18, p.509-514, 1970.