

## REGENERAÇÃO DE EMBRIÕES A PARTIR DE CALO EMBRIOGÊNICO FRIÁVEL DO TIPO HFSE DE DUAS ESPÉCIES DE CAFÉ (*Coffea canephora*, *Coffea arabica*)

JUNQUEIRA, C.S.<sup>1</sup>; SOUZA, C.W.<sup>1</sup> E TEIXEIRA, J.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, <csjunqueira@hotmail.com>

**RESUMO:** Foram realizados experimentos com a finalidade de propor um protocolo eficiente para a regeneração de embriões somáticos de café, originados a partir de calos embriogênicos friáveis. Foi avaliada para ambas as espécies a influência de diferentes níveis de maltose (2, 4 e 6%) e 4% de sacarose e diferentes combinações de BAP/ANA, mg/L: 2,0/0,0; 2,0/0,25; 2,0/0,5; 2,0/1,0; 1,0/0,0; 2,0/0,0; e 4,0/0,0. Para a espécie de *Coffea canephora*, só houve regeneração no meio com diferentes níveis de açúcar, na presença de 4,0 mg/L de BAP. No entanto, para a espécie *Coffea arabica*, pode-se observar que o subcultivo nos tratamentos com diferentes combinações de BAP e ANA foi essencial para uma melhor resposta na regeneração. Quanto à influência dos açúcares, a melhor resposta foi obtida na presença de 4% de sacarose e 2% de maltose, principalmente para as fases globular e coração. A sincronização não foi marcante em nenhuma das espécies, embora tenha sido observada em alguns tratamentos maior frequência de embriões na fase globular.

**Palavras-chave:** *Coffea canephora*, *Coffea arabica*, regeneração.

### REGENERATION OF EMBRYOS STARTING FROM HFSE FRIABLE EMBRYOGENIC CALLUS OF TWO COFFEE SPECIES (*Coffea canephora*, *Coffea arabica*)

**ABSTRACT:** Experiments were conducted to propose an efficient protocol for coffee somatic embryo regeneration, derived from friable embryogenic calli. For both species, it was evaluated the effect of different levels of maltose (2, 4, and 6%), and 4% sucrose as well as the effect of different combinations of BAP/NAA, mg/L: 2,0/0,0; 2,0/0,25; 2,0/0,5; 2,0/1,0; 1,0/0,0; 2,0/0,0, and 4,0/0,0. For *Coffea canephora*, regeneration was observed only on medium with different levels of sugar, in the presence of 4,0 mg/L BAP. On the other hand, for *Coffea arabica*, it was observed that the subculture was essential for a better regeneration response. Regarding the influence of sugar, the best response was obtained in the presence of

4% maltose, especially for globular and hard stage embryos. The synchronization was not expressive in any species, although higher frequency of globular stage embryos have been observed in some treatments.

**Key words:** *Coffea canephora*, *Coffea arabica*, regeneration.

## INTRODUÇÃO

O primeiro trabalho visando regeneração de embrião somático em café (*Coffea canephora*) foi relatado por Starisky (1970).

A regeneração de embriões somáticos a partir de calos embriogênicos de café do tipo HFSE já está bem documentada (Sondahl & Sharp, 1977; Boxtel, J.van & Berthouly, 1996). Entretanto, a falta de sincronização dos embriões durante a fase de diferenciação tem sido relatada em várias publicações (Sondahl & Sharp, 1977; Boxtel & Berthouly, 1996; Berthouly & Michaux-Ferriere, 1996).

Com o objetivo de induzir a sincronização em embriões somáticos de café do tipo HFSE, foram conduzidos vários experimentos com calos embriogênicos derivados de folhas de *Coffea canephora* e *Coffea arabica*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os calos embriogênicos friáveis do tipo HFSE foram obtidos a partir do protocolo descrito por Boxtel & Berthouly (1996) para uma cultivar de *Coffea arabica* (Catuaí Vermelho) e um genótipo de *Coffea canephora* (E1571/99). Inicialmente, os explantes de folhas foram cultivados no meio C e, após 30 dias, subcultivados para o meio E. Para *C. canephora*, os explantes foram mantidos no meio C por 30 dias, passando por um subcultivo neste mesmo meio. Além da concentração de 2,4-D de 0,5 mg/L, foram obtidos calos embriogênicos em concentrações de 1,0 e 2,0 mg/L. Os explantes foram cultivados no escuro, em câmara de crescimento tipo B.O.D., sob temperatura de 25 °C.

Visando a regeneração, os calos friáveis de *C. canephora* foram distribuídos em meio C básico com diferentes combinações de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético (BAP/ANA, mg/L): 2,0/0,0; 2,0/0,25; 2,0/0,5; 2,0/1,0; 1,0/0,0; 2,0/0,0; e 4,0/0,0. Foram colocados nesses meios 10 calos por tratamento, sendo cinco calos por placa. Avaliou-se, após dois meses de cultivo, a formação de embriões nas fases globular, coração e torpedo.

Após dois meses nesses tratamentos, calos provenientes do meio C com 2,0 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de ANA e 2,0 mg/L de BAP + 1,0 mg/L de ANA foram colocados em meio R com 4,0 mg/L de

BAP (Boxtel & Berthouly, 1996), com diferentes tipos de açúcar (sacarose: 4%; maltose: 2, 4 e 6%) e subcultivados após 30 dias. Foram colocados 10 calos por tratamento, sendo cinco por placa. Avaliou-se, após dois meses de cultivo, a formação de embriões nas fases globular, coração e torpedão.

Os calos embriogênicos de *Coffea arabica* foram colocados em meio C básico com diferentes combinações de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético (BAP/ANA, mg/L): 2,0/0,0; 2,0/0,25; 2,0/0,5; 2,0/1,0; 1,0/0,0; 2,0/0,0; e 4,0/0,0. Foram colocados 20 calos por tratamento, sendo cinco por placa. Metade dos explantes foi subcultivada após 30 dias no mesmo meio de regeneração. Avaliou-se, após dois meses de cultivo, a formação de embriões nas fases globular, coração e torpedão.

Calos embriogênicos de *Coffea arabica* foram colocados em meio R com 4,0 mg/L de BAP, segundo Boxtel & Berthouly (1996), com diferentes tipos de açúcar (sacarose: 4%; maltose: 2, 4 e 6%) e subcultivados após 30 dias. Foram colocados 20 calos por tratamento, sendo cinco por placa. Avaliou-se, após dois meses de cultivo, a formação de embriões nas fases globular, coração e torpedão.

A avaliação das diferentes fases dos embriões foi feita por notas, que variaram de 0 a 3.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Calos embriogênicos friáveis de *Coffea canephora* não apresentaram regeneração quando cultivados em meio C, com diferentes combinações de BAP e ANA. A regeneração dos embriões só ocorreu quando os calos embriogênicos foram transferidos para o meio R. Pode-se observar, pela Tabela 1, que a quantidade de embriões globulares foi maior na concentração de 4% de sacarose. Nos tratamentos restantes, a presença de embriões nas diferentes fases foi pequena. A presença de embriões na fase de torpedão só ocorreu na presença de 4% de maltose.

**Tabela 1** - Influência de níveis de maltose e 4% de sacarose no meio R (Boxtel & Bethouly, 1996), na regeneração de calos embriogênicos friáveis tipo HFSE de *Coffea canephora*

Açúcar	Presença de embrião na fase globular	Presença de embrião na fase coração	Presença de embrião na fase torpedão
4% sacarose	2,9 <sup>1</sup>	0,2	0,0
2% maltose	0,7	1,0	0,0
4% maltose	0,9	0,9	0,1
6% maltose	0,9	0,1	0,0

<sup>1</sup>Média de notas dadas à presença de embriões somáticos:

0 - ausência de embriões somáticos.

1 - pequena presença de embriões somáticos.

2 - presença média de embriões somáticos.

3 - presença elevada de embriões somáticos.

Calos embriogênicos friáveis de *C. arabica* apresentaram regeneração em todos os meios testados (Tabelas 2, 3 e 4). A influência de ANA foi maior nos tratamentos com subcultivo aos 30 dias, sobretudo nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg/L. A adição de 1,0 mg/L de ANA foi prejudicial ao desenvolvimento dos embriões (Tabela 2).

O subcultivo foi igualmente benéfico na regeneração em diferentes concentrações de BAP (Tabela 3). A presença de embriões em diferentes fases de desenvolvimento foi maior em concentrações mais altas de BAP (2,0 e 4,0 mg/L).

**Tabela 2** - Influência de ANA na presença de 2 mg/L de BAP no meio C básico e do subcultivo aos 30 dias sobre a regeneração de calos embriogênicos friáveis de *Coffea arabica*, cultivar Catuaí Vermelho, em meio C, sem os reguladores de crescimento (Boxtel & Bethouly (1996)

ANA (mg/L)	Presença de embrião na fase globular	Presença de embrião na fase coração	Presença de embrião na fase torpedo
Com subcultivo			
0,0	2,3 <sup>1</sup>	1,2	1,0
0,25	2,9	0,8	0,8
0,5	2,9	1,6	0,5
1,0	0,5	0,0	0,0
Sem subcultivo			
0,0	0,8	0,0	0,0
0,25	0,6	0,0	0,0
0,5	0,4	0,0	0,0
1,0	0,4	0,0	0,0

<sup>1</sup> Média de notas dadas à presença de embriões somáticos:

- 0 - ausência de embriões somáticos.
- 1 - pequena presença de embriões somáticos.
- 2 - presença média de embriões somáticos.
- 3 - presença elevada de embriões somáticos.

**Tabela 3** - Influência do BAP e do subcultivo aos 30 dias sobre a regeneração de calos embriogênicos friáveis de *Coffea arabica*, cultivar Catuaí Vermelho, em meio C, sem os reguladores de crescimento (Boxtel & Bethouly (1996)

BAP (mg/L)	Presença de embrião na fase globular	Presença de embrião na fase coração	Presença de embrião na fase torpedo
Com subcultivo			
1,0	1,6 <sup>1</sup>	0,9	0,4
2,0	2,6	1,9	1,5
4,0	2,8	1,7	1,2
Sem subcultivo			
1,0	0,4	0,0	0,0
2,0	0,2	0,0	0,0
4,0	0,2	0,4	0,4

<sup>1</sup> Média de notas dadas à presença de embriões somáticos:

- 0 - ausência de embriões somáticos.
- 1 - pequena presença de embriões somáticos.
- 2 - presença média de embriões somáticos.
- 3 - presença elevada de embriões somáticos.

A influência do açúcar está representada na Tabela 4. Pode-se observar que concentrações elevadas de maltose (4 e 6%) foram prejudiciais ao desenvolvimento dos embriões. A melhor resposta foi obtida na presença de 4% de sacarose e 2% de maltose, principalmente para as fases globular e coração.

**Tabela 4** - Influência de níveis de maltose e 4% de sacarose no meio R (Boxtel & Bethouly, 1996) na regeneração de calos embriogênicos friáveis de *Coffea arabica*, cultivar Catuaí Vermelho

Açúcar	Presença de embrião na fase globular	Presença de embrião na fase coração	Presença de embrião na fase torpedo
4% sacarose	2,1 <sup>1</sup>	1,9	0,2
2% maltose	2,4	1,3	0,1
4% maltose	1,7	0,3	0,2
6% maltose	1,0	0,3	0,2

<sup>1</sup>Média de notas dadas à presença de embriões somáticos:

0 - ausência de embriões somáticos.

1 - pequena presença de embriões somáticos.

2 - presença média de embriões somáticos.

3 - presença elevada de embriões somáticos.

A maior frequência observada de embriões na fase globular provavelmente se deve ao período de cultivo, que foi de 60 dias, em todos os experimentos realizados. A melhor resposta de regeneração foi obtida no meio R, com 4% de sacarose para *Coffea canephora*, o que confirma os dados apresentados por Boxtel & Bethouly (1996).

A sincronização não foi marcante em nenhuma das espécies, embora tenha sido observada em alguns tratamentos maior frequência de embriões na fase globular.

## 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.
- BOXTEL, 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.
- 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.