

## INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM EXPLANTES FOLIARES DE GENÓTIPOS DE *Coffea arabica* EM PRESENÇA DA CITOCININA 2-iP

Renato Coelho de Castro Vasconcellos<sup>2</sup>, Julieta Andrea Silva de Almeida<sup>3</sup>, M. Bernadete Silvarolla<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pela FINEP

<sup>2</sup>Aluno de Graduação em Ciências Biológicas, UFLA, Lavras-MG, [renatoccv@hotmail.com](mailto:renatoccv@hotmail.com)

<sup>3</sup>Pesquisador, Centro de Café 'Alcides Carvalho', IAC, Campinas-SP, [julietasa@iac.sp.gov.br](mailto:julietasa@iac.sp.gov.br)

<sup>4</sup>Pesquisador, Centro de Café 'Alcides Carvalho', IAC, Campinas-SP, [bernadet@iac.sp.gov.br](mailto:bernadet@iac.sp.gov.br)

**RESUMO:** Neste estudo, pretendeu-se caracterizar a formação de embriões somáticos dos genótipos de *Coffea arabica* AC1 e cultivar Mundo Novo IAC 376-4 (cv MN) em resposta ao tratamento com a citocinina 2-isopenteniladenina. Para tanto, utilizaram-se explantes foliares com forma retangular que foram inoculados em meio de cultura, o qual consistiu da metade da concentração dos sais de MS e adição de 2-iP nas concentrações de 0, 1, 2, 3, 4 e 5  $\mu\text{M}$ . Os tratamentos foram avaliados quanto à taxa de explantes com formação de estruturas, coloração do explante, número de lados do explante com formação de estrutura, estimativa do tamanho da estrutura, coloração da estrutura e número total de embriões produzidos. Aos 60 dias do início do experimento, observou-se a formação de pequenas estruturas na borda de pelo menos um dos lados dos explantes. A maioria dos explantes apresentava coloração verde enquanto as suas estruturas estavam quase oxidadas. As estruturas formadas pelos dois genótipos atingiram tamanho reduzido, 1 mm, em média. Nesta mesma avaliação, verificou-se também a formação de embriões somáticos para a maioria dos tratamentos, exceto em 2  $\mu\text{M}$  de 2-iP e no controle. Os embriões formaram-se tanto na superfície das pequenas estruturas formadas pelos explantes como também diretamente em suas bordas. Os resultados deste estudo evidenciaram a formação de embriões somáticos a partir de explantes foliares de genótipos de *C. arabica* em resposta somente ao uso do regulador de crescimento 2-iP, num único meio de cultura.

**Palavras-chave:** *Coffea*, embriogenese somática

## INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOS ON LEAF EXPLANT OF *Coffea arabica* GENOTYPES IN PRESENCE OF CYTOKININ 2-IP<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** This study intended to characterize the formation of somatic embryos of the *C. arabica* genotypes AC1 and of the Mundo Novo IAC 376-4 (cv MN) using the cytokinin 2-iP. Rectangular foliar explants of these genotypes were inoculated into a single semi-solid culture medium that consisted of ½ MS salts added of 0, 1, 2, 3, 4 e 5  $\mu\text{M}$  2iP. The treatments were evaluated with respect to the number of explants with formation of structures, color of the explant, the number of sides of the explant showing structures formation, an estimate of the size of the structure formed by the explant, color of structure and the total number of embryos produced. At 60 days, the formation of small structures on the borders of the explants of the AC genotype and MN cv of *C. arabica* was verified and some of these developed embryos on their surface when cultivated in a single culture medium with just the addition of 1, 3, 4, and 5  $\mu\text{M}$  of 2-iP. Besides, embryos were also formed directly on the borders of the explants.

**Key-words:** *Coffea*, somatic embryogenesi,

## INTRODUÇÃO

Plantas de *Coffea* podem ser multiplicadas *in vitro* por meio da embriogênese somática que consiste no desenvolvimento de embriões a partir de células haplóides ou somáticas diplóides, sem que haja a fusão de gametas, e que possibilita a micropropagação acelerada de clones superiores e a manutenção de híbridos interespecíficos. A embriogênese somática apresenta dois padrões básicos de desenvolvimento de embriões: a via indireta ou direta, na primeira os embriões somáticos formam-se a partir de calos, que apresentam células em diferentes estádios de diferenciação (Sharp et al., 1980). Na via direta, os embriões originam-se diretamente de tecidos de matrizes sem a formação de estádios intermediários de calos (Emons, 1994; Yeung, 1995), a partir de células que são predeterminadas e competentes para o desenvolvimento embriogênico (Sharp et al., 1982; Williams & Maheswaran, 1986; Gaj, 2004). Nos dois padrões de formação, o embrião somático segue a mesma seqüência do desenvolvimento zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Gray, 1995; von Arnold et al., 2002).

Segundo Vieira & Kobayashi (2000), uma característica diferencial entre estes dois padrões de desenvolvimento embriogênico é a resposta à ação de reguladores de crescimento, enquanto a via indireta requer alta relação auxina/citocinina para a formação de calos não diferenciados em um meio de cultura inicial e baixa relação para a indução de calos embriogênicos durante cultivos subsequentes. Por outro lado, a via direta

caracteriza-se pelo cultivo dos explantes num único meio de cultura com a adição de apenas citocinina. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito da adição da citocinina 2-isopenteniladenina (2-iP) na capacidade de indução de embriões somáticos em explantes foliares de genótipos de *Coffea arabica* AC1 e cultivar Mundo Novo IAC 376-4 inoculados num único meio de cultura.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Centro de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Café 'Alcides Carvalho', do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Para tanto, utilizaram-se folhas coletadas até do terceiro par dos ramos plagiotrópicos de plantas dos genótipos de *C. arabica* AC1 e da cultivar Mundo Novo IAC 376-4 (cv MN), mantidas em casa de vegetação. Estas foram desinfestadas duas vezes, sendo a primeira logo após a coleta e a segunda no dia seguinte. Na primeira desinfestação cada folha foi lavada com solução de detergente para a remoção de poeira e após em água corrente. A seguir as folhas foram submetidas à solução de hipoclorito de sódio (2 %) por 20 minutos e logo após lavadas três vezes com água corrente. Essas folhas foram mantidas em câmara úmida durante a noite, no dia seguinte desinfestadas novamente com solução de hipoclorito de sódio por 30 minutos e enxaguadas com água destilada estéril (Ramos et al., 1993). Após a desinfestação obtiveram-se explantes (2 cm<sup>2</sup>) em câmara de fluxo laminar horizontal, que foram inoculados individualmente em frascos, contendo 25 mL de meio de cultura. A face adaxial de cada explante ficou em contato com a superfície do meio de cultura.

O meio de cultura utilizado consistiu da metade da concentração dos sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescidos de sacarose (20 g/L) e de diferentes concentrações de 2-iP (0, 1, 2, 3, 4 e 5 µM). O pH do meio foi ajustado para 5,8, solidificado com ágar (5 g/L) e autoclavado a 121°C e 1,5 atm por vinte minutos. Os frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob condições de total ausência de luz, com temperatura de 25 ± 1°C.

Cada tratamento constou de dez repetições, sendo um explante em cada uma. Os tratamentos foram avaliados quanto a taxa de explante com formação de estrutura, cor do explante, número de lados do explante com formação de estrutura, estimativa do tamanho da estrutura formada pelo explante, coloração da estrutura e número total de embriões produzidos. Neste estudo, utilizou-se o termo estrutura para definir a formação de massa celular de tamanho reduzido na borda do explante.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 60 dias do início do experimento, observou-se que a taxa de formação de estruturas nas bordas dos explantes foi em geral próxima de 80 % para os explantes dos genótipos AC1 e da cv MN em todas as concentrações de 2-iP, exceto para o tratamento controle que não apresentou qualquer formação (Figura 1A.). A maioria dos explantes estava com coloração verde, com baixa ocorrência de oxidação (Figura 1B). Os explantes utilizados, neste estudo, tinham a forma retangular e, em média, apenas um dos seus lados formou estrutura em todas as concentrações de 2-iP, exceto o genótipo AC1 que apresentou dois lados em 4 µM e o controle que não o fez (Figura 2C). Quando se considera o tamanho dessas estruturas, nota-se que estas estavam em média com 1 mm na maioria dos tratamentos, exceto em 4 e 5 µM em que as estruturas tenderam a apresentar maior tamanho, para ambos os genótipos (Figura 1D). A avaliação da coloração mostrou que as estruturas do genótipo AC1 estavam próximas do grau de oxidação total enquanto aquelas da cv MN tinham coloração clara (Figura 1E).

Nesta avaliação, verifica-se também que os dois genótipos apresentaram a formação de embriões principalmente nos tratamentos com 1, 3, 4 e 5 µM de 2-iP (Figura 1F). No entanto, dentre os genótipos, observa-se que o AC1 formou embriões em todas essas concentrações enquanto a cv MN só o fez em 4 e 5 µM de 2-iP.

Dos resultados obtidos, nota-se que os dois genótipos apresentaram respostas semelhantes em relação a primeira fase do processo de embriogênese (taxa de explante com estrutura, coloração do explante, número de lados com estrutura e tamanho da estrutura). Verificam-se diferenças entre os tratamentos, quando se observa que as estruturas do genótipo AC1 apresentaram maior grau de oxidação e simultaneamente também elevada frequência de formação de embriões enquanto as estruturas da cv MN tiveram coloração clara e menor número de embriões. Estas observações parecem sugerir que nos genótipos estudados a indução da iniciação de embriões somáticos esteve associada ao evento da oxidação das estruturas formadas pelos explantes. Outro aspecto observado é que a formação dos embriões além de ocorrer a partir da borda do explante também iniciou-se sobre a superfície das estruturas (Figura 2). Considerando que o tamanho dessas estruturas foi reduzido, isto parece sugerir que nestas pode haver a presença de células competentes que passaram a se multiplicar e posteriormente a se diferenciar em embriões.

Quando se considera a embriogênese somática em *Coffea*, é conhecido que a via indireta proporciona maior formação de embriões que a direta. No entanto, a aplicação da via direta é mais desejável uma vez que permite redução da manipulação, do uso de insumos e do tempo da formação dos mesmos, o que torna essa via mais vantajosa (Altmann & Loberant, 1998; Kumar et al., 2006). Desta forma, embora, neste estudo, o número de embriões formados tenha sido reduzido, esse resultado indica que há perspectiva para a obtenção de embriões

somáticos com o uso de 2-iP, como única substância promotora da sua indução, num único meio de cultura. No entanto, há necessidade de maiores estudos para tornar esse processo mais eficiente.

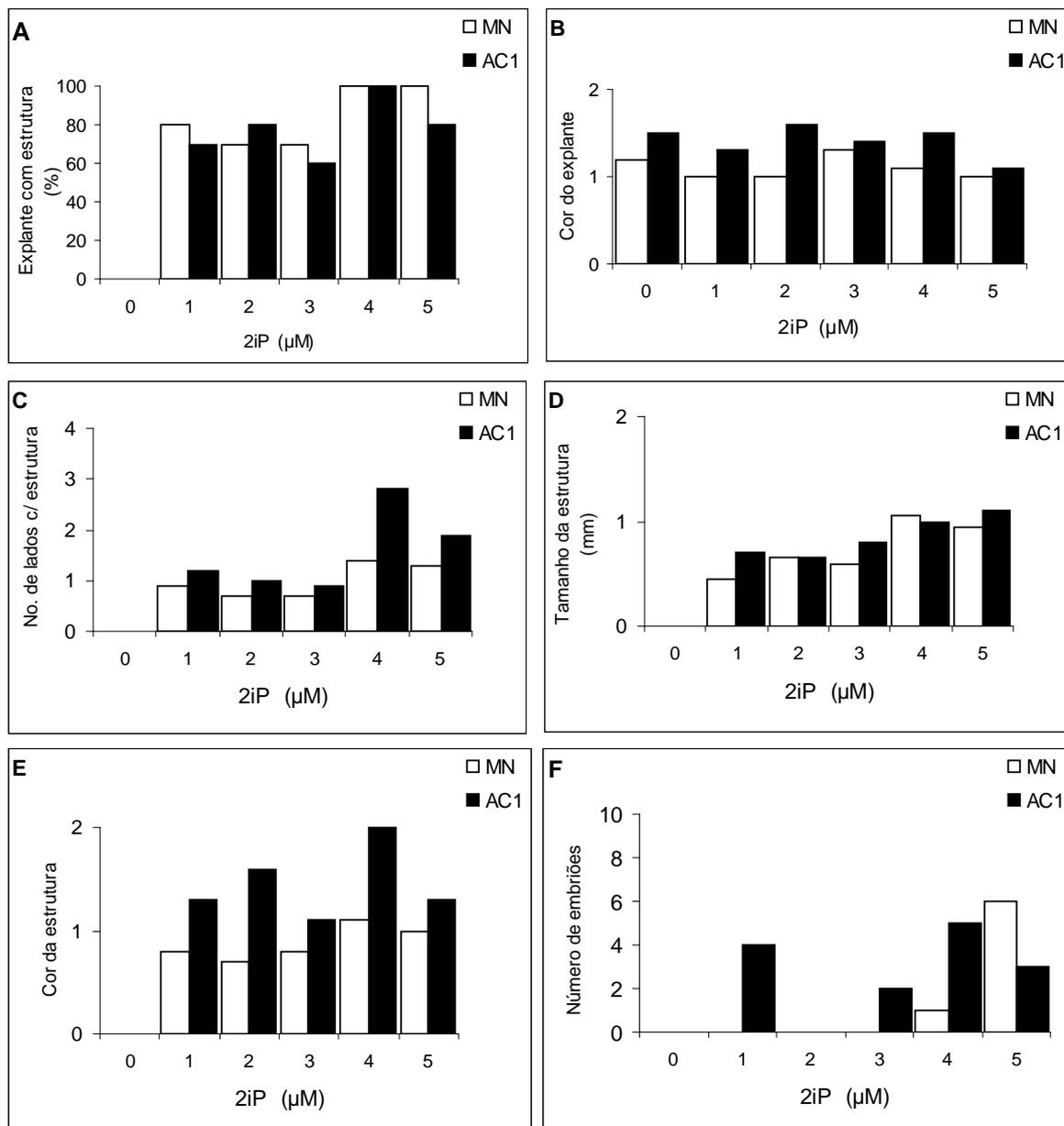


Figura 1 – Avaliação da capacidade de embriogênese somática em explantes foliares provenientes de plantas dos genótipos de *Coffea arabica* AC1 e cv MN inoculados em meio com metade da concentração dos sais de MS e adição de diferentes concentrações de 2-iP, mantidos em ausência de luz e a 25 °C.

**A.** Explante com formação de estrutura; **B.** Cor do explante; **C.** Número de lados do explante com formação de estrutura; **D.** Estimativa do tamanho da estrutura; **E.** Cor da estrutura; **F.** Número de embriões formados.

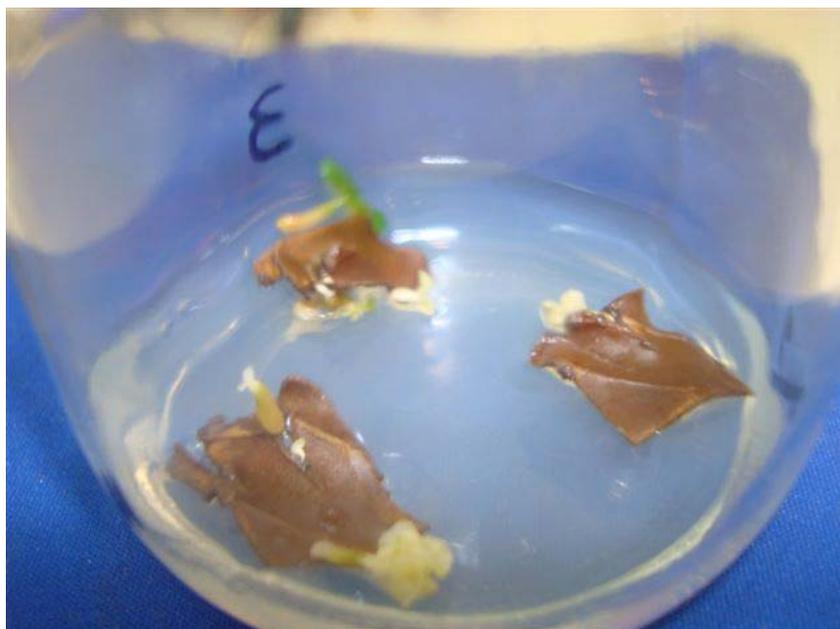


Figura 2 – Formação de embriões somáticos em explantes foliares provenientes de plantas do genótipo de *Coffea arabica* AC1 inoculados em meio com metade da concentração dos sais de MS e adição de diferentes concentrações de 2-iP, mantidos em ausência de luz e a 25 °C.

## CONCLUSÕES

- Nos genótipos estudados a indução da iniciação de embriões somáticos pareceu ser associada à oxidação dos explantes e ou das estruturas formadas por estes.
- Os resultados deste estudo evidenciaram a formação de embriões somáticos a partir de explantes foliares de genótipos de *C. arabica* em resposta somente ao uso do regulador de crescimento 2-iP, num único meio de cultura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMAN, A, LOBERANT; B. 1998 Micropropagation: clonal plant propagation in vitro. In: Altman A (ed) Agricultural biotechnology. Marker Dekker, New York, pp 19–42.
- EMONS, A.M.C. 1994. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. *Acta Botanica Neerlandica*, 43:1-14.
- GAJ, M.D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 43:27-47.
- GRAY, D.J. 1995. Somatic embryogenesis in grape. In: S.M. Jain; P.K. Gupta; R.J. Newton (eds.). *Somatic embryogenesis in wood plants*, V2, pp. 191-218, Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands
- KUMAR, V.; NAIDU, M.M.; RAVISHANKAR, G.A. 2006. Developments in coffee biotechnology *in vitro* plant propagation and crop improvement. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 87(1):49-65.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497.
- RAMOS, L.C.S.; YOKOO, E.Y.; GONÇALVES, W. 1993. Direct somatic embryogenesis is genotype specific in coffee. *ASIC*, 15<sup>o</sup> Colloque, pp. 763-766.
- SHARP, W.R.; SONDAHL, M.; CALDAS, L. S.; MARAFFA, S. B. The physiology on *in vitro* asexual embryogenesis. *Horticultural Review*, New York, v. 2, p. 268-310, 1980.
- SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; SONDHAL, M.R. 1982. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In: Fujiwara, A. (Ed.). *Plant Tissue Culture*, 1982, Japan. *Proceedings 5<sup>th</sup> International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. Japan: Japanese Association for Plant Tissue Culture, p.759-762.
- VIEIRA, L.G.E.; KOBAYASHI, A.K. Micropropagação do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. Palestras... Poços de Caldas: [s.n.], 2000. p. 147-167.
- von ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 69:233-249.
- WILLIAMS, E.G; MAHESWARAN, G. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*. 57:443-462.

YEUNG, E.C. 1995. Structural and development patterns in somatic embryogenesis. In: In vitro embryogenesis in plants. Thorpe, T.A. (ed.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp.205-248.