

NÍVEIS DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NA OBTENÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS FOLIARES DE CAFÉ CONILON (*Coffea canephora* PIERRE)

Maria das Graças Rodrigues Ferreira²; Maurício Reginaldo Alves dos Santos³; Ana Cleide Ribeiro Bragado⁴

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D/Café

² Pesquisador, D. Sc., Embrapa Rondônia, Porto Velho – RO, mgraca@cpafro.embrapa.br

³ Pesquisador, D. Sc., Embrapa Rondônia, Porto Velho – RO, mauricio@cpafro.embrapa.br

⁴ Bolsista do PNP&D/Café, anaefo@hotmail.com

RESUMO: Segmentos foliares de clones de *Coffea canephora* foram submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D visando seu cultivo para produção de embriões somáticos. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de indução de calos (Boxtel & Bertouly), composto por meio MS/2, tiamina (10 mg/L), piridoxina (1 mg/L), ácido nicotínico (1 mg/L), glicina (1 mg/L) e mio-inositol (100 mg/L), caseína (100 mg/L), extrato de malte (400 mg/L), 2,i-P (1 mg/L), AIB (1 mg/L), acrescido de 2,0% de sacarose, solidificado com 0,8% de ágar e pH ajustado para 5,7. A este meio foram acrescidas várias concentrações de 2,4-D (0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg/L). Os cultivos foram mantidos em câmara do tipo BOD, no escuro, sob temperatura de 28°C, durante 30 dias, e, ao final desse período, efetuadas as avaliações do desenvolvimento dos calos. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 5 (quatro clones x cinco concentrações de 2,4-D), sendo empregadas 20 repetições. As menores concentrações de 2,4-D (2,5 e 5,0 mg/L) resultaram em maior crescimento de calos, observando-se redução na velocidade de produção dos mesmos com o emprego de concentrações mais altas. Os clones apresentaram diferentes respostas às concentrações de 2,4-D.

Palavras-Chave: calogênese, propagação *in vitro*, regulador de crescimento.

GROWTH REGULATORS LEVELS IN OBTENTION OF CALLUS FROM LEAF SEGMENTS OF CONILON COFFEE (*Coffea canephora*)

ABSTRACT: Leaf segments from *Coffea canephora* clones were submitted to different concentrations of 2,4-D, aiming the culture to produce somatic embryos. Explants were inoculated in test tubes containing callus induction medium (Boxtel & Bertouly), consisting of MS/2 salts, thiamine (10 mg/L), pyridoxine (1 mg/L), nicotinic acid (1 mg/L), glycine (1 mg/L) e mio-inositol (100 mg/L), casein (100 mg/L), malt extract (400 mg/L), 2,i-P (1 mg/L), IBA (1 mg/L), supplemented with sucrose (2,0%), 0,8% (agar) and pH adjusted to 5,7. The medium was supplemented with 2,4-D (0; 2,5; 5,0 and 10,0 mg/L) and the cultures were maintained in BDO, in dark conditions, 28°C temperature, for 30 days, being evaluated the callus development. The experimental design used was entirely randomly in factorial scheme 4 x 5 (four clones x five concentrations of 2,4-D), with twenty repetitions. The lower concentrations (2,5 and 5,0 mg/L) presented higher callus growth in clones observing reduction in production velocity with the employ of higher concentrations. The clones presented different responses to concentrations of 2,4-D.

Key words: calogenesis, *in vitro* propagation, growth regulator.

INTRODUÇÃO

A expansão da cafeicultura na região Norte ocorreu a partir de 1970, com o advento dos núcleos de colonização oficial. Atualmente, são mais de 215 mil hectares, dos quais 87%, ou seja, cerca de 188 mil hectares, estão localizados em Rondônia, estado que apresenta o mais intenso processo de expansão da cafeicultura regional (IBGE, 2004).

A espécie *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner cobre 90% da área plantada com café em Rondônia, sendo que a variedade Conillon é a mais comum. Os cultivos de *Coffea arabica* L., principalmente das variedades Mundo Novo e Catuaí, ocorrem nas regiões de maior altitude, as quais representam uma pequena porção do Estado. As baixas produtividades, associadas à qualidade inferior do café produzido, reduzem a competitividade da cultura na região. O baixo nível tecnológico empregado pelos produtores e a ausência de genótipos adaptados às condições climáticas da região constituem a principal causa dos problemas de rendimento e qualidade da produção observados nos cultivos amazônicos de café. A utilização de cultivares de alto potencial produtivo, com maturação tardia e uniforme e resistentes à ferrugem apresenta-se como a alternativa mais adequada para solucionar os problemas de produção e qualidade do café amazônico, sem causar alterações na rotina dos agricultores e sem onerar a produção. Além disso, não oferece riscos à saúde de produtores e consumidores nem causam danos ao meio ambiente.

Um dos desafios no melhoramento genético do cafeeiro está na redução do tempo gasto na seleção para produtividade no desenvolvimento de cultivares de café, pois ocorre um período longo do florescimento até a produção de sementes. Nesse contexto, a propagação vegetativa é indicada para multiplicação de cultivares de alta produtividade e resistentes a doenças, garantindo uniformidade nos povoamentos e mantendo o ganho genético obtido na seleção. No entanto, a multiplicação vegetativa pelos métodos convencionais deve limitar-se à utilização de fragmentos de ramos ortotrópicos, sempre em número limitado (Dublin, 1984). As técnicas de cultura de tecidos têm possibilitado, além da obtenção de grande número de plantas, a diminuição do tempo necessário para obtenção de novas progênes e a garantia da uniformidade genética do material.

A calogênese, formação de calos em um explante, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática. A embriogênese somática em *Coffea* é um importante método de multiplicação de plantas elite *in vitro*, em larga escala, apresentando um grande potencial a ser explorado, e capaz de maximizar a propagação do cafeeiro, tanto de cultivares já recomendadas para plantio como de híbridos vindos de programas de melhoramento genético. Apresenta-se também como uma técnica auxiliar aos trabalhos de transformação genética de plantas. Os primeiros trabalhos com embriogênese somática no gênero *Coffea* foram realizados por Starisky (1970), que obteve rápida proliferação de calos nas espécies *C. arabica* e embriões e plântulas em explantes de *C. canephora*. A partir daí, várias outras pesquisas sobre a embriogênese somática no gênero *Coffea* foram desenvolvidas (Hermann & Hass, 1975; Sondahl, 1978; Lanaud, 1981; Pierson et al., 1983; Boxtel & Berthouly, 1996; Berthouly & Michaux-Ferriere, 1996; Cordeiro, 1999; Sreenath, 2000).

As citocininas e auxinas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos (Caldas et al., 1990). O tipo e a concentração influenciam na multiplicação *in vitro*, onde normalmente a melhor faixa fica entre 0,5 e 5,0 mg/L para ambos fitorreguladores. Segundo Litz & Jarret (1991), frequentemente se induz a formação de calos em explantes cultivados em meio contendo auxina, ou com uma alta relação citocinina/auxina.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as concentrações de 2,4-D na indução de calos em segmentos foliares de clones de *C. canephora*, visando seu cultivo para obtenção de embriões somáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Rondônia, em Porto Velho, RO. O material foi coletado de mudas estabelecidas em viveiro telado, localizado no campo experimental da Embrapa Rondônia. Foram coletadas folhas jovens de café Conilon dos clones 184, 193, 194 e 199. As mesmas passaram por uma pré-limpeza, sendo lavadas com água destilada, esponja e detergente comercial. As folhas foram segmentadas em quadrados de aproximadamente 4 x 4 cm² e colocadas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto. Em câmara de fluxo laminar, os segmentos foram retirados do álcool e imersos em hipoclorito de sódio a 1,25% durante 30 minutos, sendo, em seguida, lavados 3 vezes com água bidestilada estéril, segmentados em quadrados de aproximadamente 1 x 1 cm². Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de indução de calos, de acordo com protocolo descrito por Boxtel & Bertouly (1996), composto por meio MS/2 (Murashige & Skoog, 1962), tiamina (10 mg/L), piridoxina (1 mg/L), ácido nicotínico (1 mg/L), glicina (1 mg/L), mio-inositol (100 mg/L), caseína (100 mg/L), extrato de malte (400 mg/L), 2,i-P (1 mg/L), AIB (1 mg/L), acrescido de 2,0% de sacarose, solidificado com 0,8% de ágar e pH ajustado para 5,7. A este meio foram acrescidas várias concentrações de 2,4-D (0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg/L). Os cultivos foram mantidos em câmara do tipo BOD, no escuro, sob temperatura de 28°C, durante 30 dias, sendo as avaliações do desenvolvimento dos calos efetuadas ao final desse período. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 5 (quatro clones x cinco concentrações de 2,4-D), sendo empregadas 20 repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se maior crescimento de calos com o emprego das menores concentrações de 2,4-D (2,5 e 5,0 mg/L), nos clones 184, 193 e 194 (Figura 1), observando-se redução na velocidade de produção dos mesmos, com o aumento das concentrações. É provável que tenha ocorrido um efeito fitotóxico promovido por concentrações maiores da auxina utilizada. Resultados semelhantes foram observados por Santos et al. (2008), utilizando várias concentrações de 2,4-D (0, 0,5 e 1,0 mg/L) na indução de calos em segmentos foliares de *Coffea canephora* cv. Apotã. Os autores constataram um acréscimo de 25 % na produção de calos com o emprego da menor concentração (0,5 mg/L) em relação à maior concentração empregada (1,0 mg/L). Esses resultados estão de acordo com Pasqual et al. (1998), os quais consideraram essencial o uso de auxinas em concentrações reduzidas para promover a formação e crescimento de calos. O clone 199 apresentou apenas indução de calos em todas as concentrações testadas.

As diferentes respostas observadas entre os clones provavelmente estão relacionadas ao potencial genético. As respostas de desenvolvimento *in vitro* são regidas pela constituição genética (Hu & Ferreira, 1998). Os efeitos genéticos em muitos aspectos da cultura *in vitro* foram observados por Keyes & Bingham (1979). Em cafeeiro, diversos autores comprovaram diferentes respostas em relação a cultivares e espécies, seja trabalhando com segmentos nodais (Krikorian, 1991), embriogênese somática indireta (Berthouly & Michaux-Ferriere, 1996; Bieysse et al., 1993; Caldas

et al., 1998; Cordeiro, 1999; Dublin, 1984; Dublin, 1991; Maciel, 2001; Zamarripa, 1993) ou desenvolvimento de embriões (Santos, 2001).

Diferentes genótipos podem ter diferentes condições ótimas de crescimento, pré-tratamento, composição de meio de cultura e condições físicas de cultura (Magalhães Júnior et al., 1995). Silva Filho (1989) sugere a necessidade de um estudo específico com cada regulador de crescimento, além da observação do efeito de diferentes concentrações em diferentes genótipos e até mesmo dentro da mesma espécie.

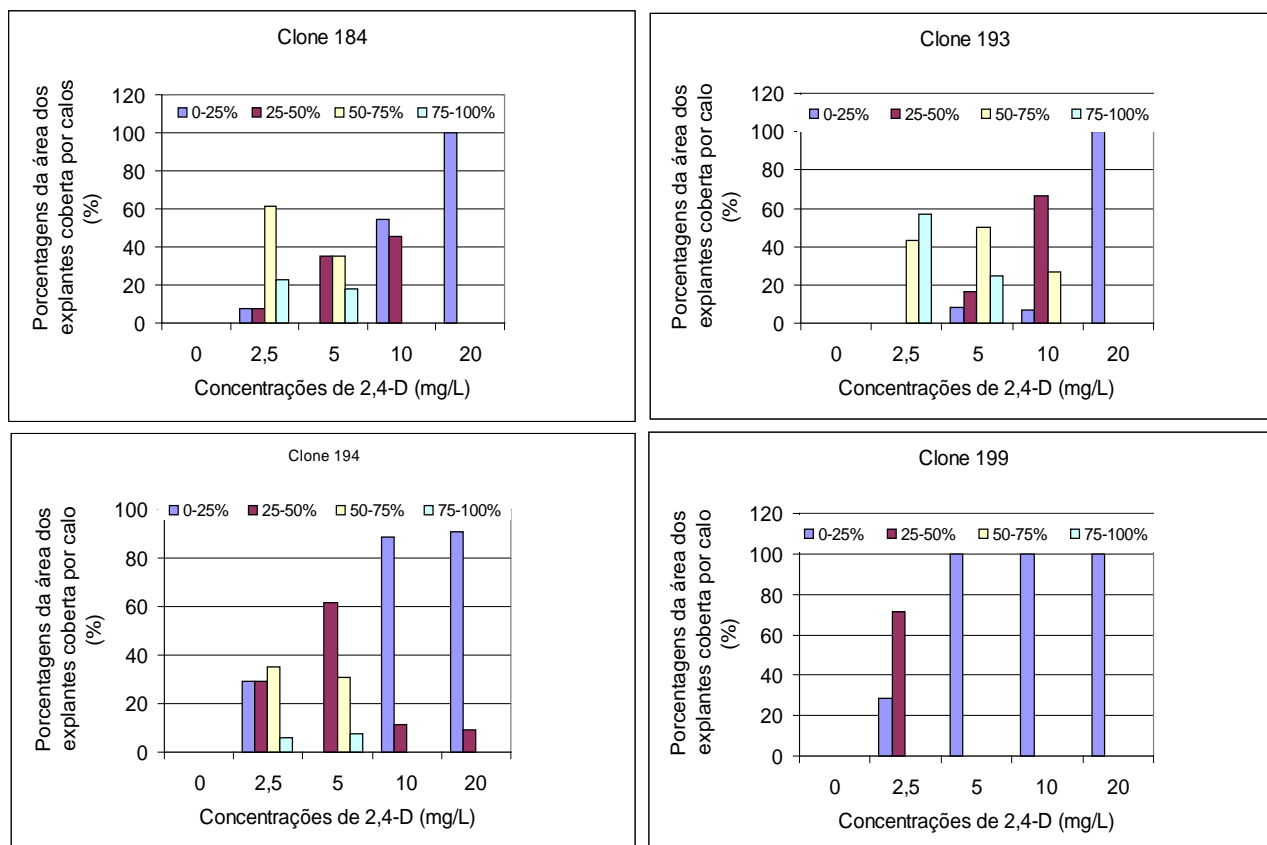


Figura 1 – Porcentagem de calos em segmentos foliares de *Coffea canephora*, em função das concentrações de 2,4-D.

CONCLUSÕES

Menores concentrações de 2,4-D (2,5 e 5,0 mg/L) resultaram em maior crescimento de calos nos clones 184, 193 e 194, observando-se redução na velocidade de produção dos calos com o emprego de concentrações maiores de 2,4-D.

Os clones apresentaram diferentes respostas às concentrações de 2,4-D.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. M. High frequency somatic embryogenesis from *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 44, p. 169-176, 1996.
- BIEYSSE, C.; GOFFLOT, A.; MICHAUX-FERRIERE, N. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 71, n. 11, p. 1496- 1502, 1993.
- BOXTEL, J. VAN.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 44, p. 7-17, 1996.
- CALDAS, L.S.; HARADASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. ed. **Técnicas e Aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTB/EMBRAPA - CNPH, 433p, 1990.
- CALDAS, L. S.; HARADASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPASPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. p. 87-132.

- CORDEIRO, A. T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplastos em *Coffea***. 1999. 11 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- DUBLIN, P. Techniques de reproduction végétative "in vitro" et amelioration génétique chez les caféiers cultivés. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v. 28, n. 4, p. 231-244, 1984.
- DUBLIN, P. Multiplicación vegetativa de café, hevea e cacao. In ROCA, N. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos e aplicaciones**. [S.l.: s.n.], 1991. p. 612-642.
- HERMAN, E. B.; HASS, G. J. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. **HortScience**, Alexandria, v. 10, n. 6, p. 588-589, 1975.
- HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. p.371-393.
- IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**: Rio de Janeiro v.16 n.04 p.1-78 Abr.2004.
- KEYES, G. J.; BINGHAM, E. T. Heterosis and ploidy effects on the growth of alfalfa callus. **Crop Science**, Madison, v. 19, p. 473-476, 1979.
- KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos e aplicaciones**. [S.l.: s.n.], 1991. p. 41-77.
- LANAUD, C. Production de plantules de *C. canephora* par embryogénese somatique réalisée à partir de culture *in vitro* d'ovules. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v. 25, n. 4, p. 231-236, 1981.
- LITZ, R.E.; JARRET, R.L. Regeneracion de plantas en el cultivo de tejidos, embriogénese somática y organogénese. In: ROCA, W.M.; MROGINSKY, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos e aplicaciones**., Cali: CIAT, 1991, p.143-172.
- MACIEL, A. L. de R. **Embriogênese somática indireta em *Coffea arabica* L.** 2001. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; AVOZANI, O. A.; PETERS, J. A.; VIÉGAS, J.; TERRES, A. L.; ABIBI, F. R. Colchicine effect on chromosome duplication of irrigated rice haploids obtained from anther culture. In: ENCUENTRO LATINO AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., 1995, Puerto Iguazu. **Resumos...** Puerto Iguazu: REDBIO, 1995. p. 76.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMANN, A.; CARVALHO, G. R. Meios de Cultura. In: **Curso de pós-graduação Lato sensu (especialização) à distância: cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 127 p.
- PIERSON, E. S.; VAN LAMMENRN, A.; SCHEL, J. H.; STARITSKY, G. In vitro development of embryoids from punched leaf disc of *Coffea canephora*. **Protoplasma**, Vienne, v. 115, n. 2/3, p. 208-216, 1983.
- SANTOS, C. G. dos. **Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SANTOS, C. G. DOS; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. DE O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* cv. Apoatã. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, n. 1, p. 22-29, jan./mar., 2008.
- SREENATH, H. L. Biotechnology for genetic improvement of Indian coffee. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY IN THE COFFEE AGROINDUSTRY, 3., 1999, Londrina. **Proceedings...** Londrina: IAPAR/IRD, 2000. p. 247-250.
- SILVA FILHO, M. C. **Efeito de cultivares e meios de cultura na indução de calos de anteras de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1989. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1989.
- SONDAHL, M. R. Interações de citoquininas e auxinas no crescimento e embriogênese de explantes foliares de *Coffea* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, **Resumos...**, Ribeirão Preto, 1978. p. 67.
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus culture tissue of *Coffea*. **Acta Botanica Neerlandica**, Netherlands, v. 19, n. 4, p. 509-514, 1970.
- ZAMARRIPA, A. **Etude et développement de l'embryogenèse somatique em milieu liquide du caféier (*Coffea canephora* P., *Coffea arabica* L. et l'hibryde Arabusta)**. 1993. 191 p. Tese (Doutorado) - Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Rennes.