

**DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS
EM CAFÉ CONILON (*Coffea canephora* PIERRE)**

Maurício Reginaldo Alves dos Santos²; Maria das Graças Rodrigues Ferreira³; Vânia Sarubo⁴

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

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

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

⁴ Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente – Universidade Federal de Rondônia, yannya26@yahoo.com

RESUMO: A cultura de calos tem mostrado grande potencial para multiplicação em larga escala de genótipos superiores e em curto espaço de tempo. O objetivo deste trabalho foi induzir a formação de calos em explantes foliares de *Coffea canephora* var. Conilon, determinar sua curva crescimento e avaliar o desenvolvimento dos calos. Os explantes foram inoculados em meio MS 50 % com 10 mg.L⁻¹ de tiamina, 1 mg.L⁻¹ de piridoxina, 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico, 1 mg.L⁻¹ de glicina, 100 mg.L⁻¹ de inositol, 100 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada e 400 mg.L⁻¹ de extrato de malte, 20 g.L⁻¹ de sacarose, 8 g.L⁻¹ de ágar e acrescido de AIB (10 µM), 2,4-D (20 µM) e 2iP (10 µM). Para determinar a curva de crescimento, calos foram pesados até o 60º dia de cultivo. A curva de crescimento dos calos apresentou duas fases distintas, lag e exponencial.

Palavras-chave: cafeeiro, calogênese, reguladores de crescimento.

**DETERMINATION OF THE CURVE OF GROWTH OF CALLUS
IN CONILON COFFEE (*Coffea canephora* PIERRE)**

ABSTRACT: Callus culture has shown a great potential for large-scale multiplication of superior genotypes in a short period of time. The objective of this work was to establish a methodology for inducing callus formation in leaf segments of *Coffea canephora* var. Conilon, to determine of the growth curve and to analyze the development of the calli. The explants were inoculated in 50 % MS medium with 10 mg.L⁻¹ thiamine, 1 mg.L⁻¹ pyridoxine, 1 mg.L⁻¹ nicotinic acid, 1 mg.L⁻¹ glycine, inositol 100 mg.L⁻¹, hydrolysed casein 100 mg.L⁻¹ and 400 mg.L⁻¹ malt extract, 20 g.L⁻¹ sucrose, 8 g.L⁻¹ agar, supplemented with IBA (10 µM), 2,4-D (20 µM) and 2iP (10 µM). To determine the growth curve, the calli were weighted up to the 60º day of culture. The growth curve presented two separates phases lag and exponential.

Key words: coffee plant, callogenesis, growth regulators.

INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma atividade de elevada importância no cenário do agronegócio brasileiro, sendo que a variedade Conilon tem atraído a atenção dos produtores devido à sua utilização na indústria de café solúvel, atividade em expansão no Brasil (Fazuoli et al., 1986). As técnicas de cultura de tecidos vegetais têm sido utilizadas com sucesso na multiplicação de espécies que apresentam dificuldades na propagação sexuada, além de possibilitar a uniformidade genética do material e permitir a obtenção de um grande número de plantas em pouco tempo (Dublin, 1981). Os trabalhos pioneiros em cultura de tecidos de cafeeiro foram publicados por Staritsky (1970), que obteve êxito na indução de calos a partir de folhas de várias espécies. Após esse período, muitos trabalhos foram realizados com a adoção de métodos e espécies diversas (Sondahl, 1978; Mezzetti et al., 1991; Landa et al., 2000; Serra et al., 2000). Algumas técnicas utilizadas para multiplicação *in vitro* de plantas de café são microestaquia, cultura de embriões, organogênese, calogênese e embriogênese somática (Santana-Buzzy et al., 2007).

De acordo com Santos et al. (1997), a importância de se estabelecer a curva de crescimento de calos de determinada espécie está na identificação das fases em que ocorrem processos fundamentais ao estudo cinético do seu crescimento. Com isso, pode-se estabelecer o momento exato da repicagem para um novo meio. As etapas que compõem o crescimento do calo são: 1) fase lag: caracterizada pelo número estacionário de células, início da imobilização de metabólitos, sem qualquer divisão celular, síntese de proteínas e de metabólitos específicos; 2) fase exponencial: a divisão celular é máxima, o número de células aumenta, formando agregados compostos por mais de dez células; 3) fase linear: ocorre redução na taxa de divisão celular; 4) fase de desaceleração progressiva: a divisão celular diminui e ocorre expansão das células; e 5) fase estacionária: não ocorre divisão celular, não há síntese de biomassa ou aumento do número de células.

Em Rondônia, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas no sentido de selecionar e desenvolver genótipos de *C. canephora* resistentes a doenças, pois embora se encontre bastante adaptada e ofereça maior facilidade de manejo devido ao seu menor porte, a variedade Conilon apresenta suscetibilidade aos principais estresses bióticos da cultura na

região, tais como ferrugem e nematóides (Souza et al., 2005), e neste sentido a propagação *in vitro* se apresenta como alternativa viável para acelerar as etapas do melhoramento desta espécie.

O presente trabalho teve por objetivo induzir calos em segmentos foliares de *Coffea canephora* var. Conilon, determinar sua curva de crescimento e avaliar as diferentes fases de desenvolvimento do calo, visando facilitar seu posterior desenvolvimento em embriões ou formação de órgãos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia. Foram utilizadas folhas provenientes de plantas de *C. canephora* Pierre, cv. Conilon (clone 194, pertencente ao programa de melhoramento da Embrapa Rondônia) mantidas em casa de vegetação. Foram coletadas folhas do segundo par dos ramos plagiotrópicos e a assepsia foi realizada por meio da lavagem com esponja estéril em água bidestilada estéril por 5 minutos, seguida de imersão em etanol a 70% (v/v) por 1 minuto e em solução de hipoclorito de sódio a 1,25% (v/v) por 30 minutos, com três enxágües em água bidestilada estéril. Secções foliares foram cortadas em pedaços de aproximadamente 1cm² e inoculadas com a face adaxial em contato com meio, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo metade da concentração dos sais, 10 mg.L⁻¹ de tiamina, 1 mg.L⁻¹ de piridoxina, 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico, 1 mg.L⁻¹ de glicina, 100 mg.L⁻¹ de inositol, 100 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 400 mg.L⁻¹ de extrato de malte, 20 g.L⁻¹ de sacarose, 8 g.L⁻¹ de ágar e acrescido de AIB (10 µM), 2,4-D (20 µM) e 2iP (10 µM). Foram inoculados 150 tubos com um explante em cada tubo. Após a inoculação, os tubos foram mantidos no escuro, em câmara de crescimento do tipo BOD, e com temperatura de 24 ± 2°C. As avaliações do desenvolvimento dos calos foram feitas nos 60 dias subsequentes, em intervalos de 10 dias. Em cada avaliação, 20 calos foram cuidadosamente limpos com papel absorvente para retirar excesso de meio de cultura e foram pesados individualmente em balança de precisão. Os dados obtidos foram utilizados para obtenção da equação de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os padrões de crescimento dos calos formados a partir de segmentos foliares de *C. canephora* estão apresentados na Figura 1. Observou-se um crescimento exponencial com 2 fases de crescimento (lag e exponencial) nos explantes utilizados. Santos et al. (2003), estudando a curva de crescimento de calos durante 84 dias de cultivo em explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Rubi, observaram a presença de três fases de crescimento (lag, exponencial e linear), não detectando a presença das fases de desaceleração e estacionária. Santos et al. (2008) observaram um crescimento sigmoidal com cinco fases de crescimento (lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária) de calos formados a partir de segmentos foliares e nodais da cultivar Apoaatã. Mesquita et al. (2003) observou que as curvas de crescimento de calos, obtidas a partir de explantes foliares de lichieira (*Litchi chinensis* Sonn), apresentaram crescimento do tipo sigmoidal.

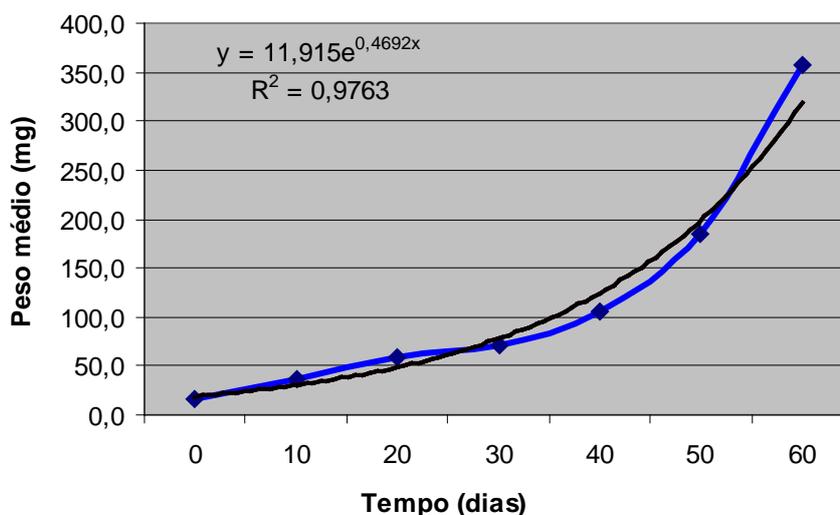


Figura 1 – Curva de crescimento de calos formados a partir de segmentos foliares *Coffea canephora* durante 60 dias de cultivo.

A fase Lag se caracteriza pelo número estacionário de células na qual células do explante preparam-se para divisão celular, acumulando biomassa. Nesse experimento ocorreu até o 10º dia de inoculação (equivalente a 57 % de crescimento) no segmento foliar. Segundo Scragg & Allan (1993), a fase lag pode ser considerada como produtora de energia. Landa et al. (2000) verificou que para calos obtidos a partir de segmentos foliares de pequiheiro, a fase lag ocorre até o 7º dia após a inoculação. Santos et al. (2008) verificaram em segmentos foliares e nodais da cultivar Apoatã que a fase lag ocorreu até o 28º e 49º dia de inoculação, respectivamente. Santos (2002) verificou em *C. arabica* cv Rubi que a fase lag ocorreu até o 42º dia de inoculação, com 64% de crescimento. Mezzetti et al. (1991), avaliando o crescimento de calos obtidos a partir de segmentos foliares de *Actinidia deliciosa*, observaram um acúmulo de matéria fresca e seca até o 30º dia após a inoculação. Serra (2000) verificou em castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) que a fase Lag aconteceu entre 0 e 30 dias de inoculação.

A fase de crescimento exponencial é o período em que ocorre a máxima divisão celular e ocorreu do 11º ao 58º dia após a inoculação, com crescimento de 96% em relação ao explante inicial. Em *Smilax japecanga*, a fase de crescimento exponencial, considerada por Scragg & Allan (1993) como fase biossintética, período em que ocorre máxima divisão celular, ocorreu entre o 18º e o 26º dia após a inoculação dos explantes, apresentando ao final de 38 dias um padrão sigmóide típico (Santos et al., 1997). Em segmentos foliares de pequiheiro essa fase foi observada entre o 7º e o 35º dia após a inoculação (Landa et al., 2000). Santos (2002) verificou em *C. arabica* cv. Rubi que a fase de crescimento exponencial ocorreu entre o 42º e 47º dia, com 87% de crescimento. Em castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) a fase de crescimento exponencial aconteceu entre 30 e 53 dias após a inoculação (SERRA, 2000). A Figura 2 mostra os calos formados a partir de segmentos foliares de *C. canephora* aos 10, 40 e 60 dias de cultivo, a partir de explantes inoculados em meio ½ MS acrescido de AIB (10 µM), 2,4-D (20 µM) e 2iP (10 µM).



Figura 2 – Calos formados a partir de segmentos foliares *Coffea canephora* aos 10 (A), 40 (B) e 60 (C) dias de cultivo, respectivamente.

O período de crescimento linear, em que os calos diminuem a divisão celular e aumentam a área celular (Serra et al., 2000) não foi observado no presente trabalho. Santos (2002) verificou em *C. arabica* cv. Rubi que o período de crescimento linear ocorre entre o 77º e o 84º dia da inoculação, com crescimento de 6%. Em castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) a fase de crescimento linear aconteceu entre 53º e 60º dia após a inoculação (Serra et al., 2000). Santos et al. (2008) observaram que fase de crescimento linear ocorreu entre 63º a 70º dia após a inoculação em explantes de *C. canephora* L. cv. Apoatã.

CONCLUSÃO

Na curva de crescimento dos calos de *Coffea canephora* cv. Conilon foram obtidas somente duas fases, a lag (0 a 10 dias) e a exponencial (10 a 60 dias). Não foram observadas as fases linear, de desaceleração e estacionária, sugerindo que os calos continuam crescendo após este período.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DUBLIN, P. Multiplication végétative in vitro de l'Arabusta. **Café Cacao Thé**, v. 24, p. 281-290, 1981.
- FAZUOLI, L.C.; CARVALHO, A.; COSTA, W.M.; LIMA, M.M.A. Observações sobre a seleção de cafeeiros robusta em Campinas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 13, 1986. São Lourenço, MG. **Trabalhos apresentados**. Rio de Janeiro : IBC, p. 28-29, 1986.
- LANDA, F. S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. BUENO FILHO, J. S. S. Indução *in vitro* de calos explantes foliares de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 56-63, 2000.

- MESQUITA, A. C.; PAIVA, R.; SANTIAGO, E. J. A.; PAIVA, P. D. O.; GOMES, G. A. C.; SANTOS, C. G. Efeito de 2,4-D e ANA na formação de calos em explantes foliares de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 50, n.29, p. 593-601, 2003.
- MEZZETTI, B.; CONTE, L. S.; ROSATI, P. *Actinidia deliciosa in vitro*: II. Growth and exogenous carbohydrates utilization by explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 26, p. 153-160, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- SANTANA-BUZZI, N.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-ÁVALOS, R.M.; KU-CAUICH, J. R.; MIJANGOS-CORTÉS, J.; GUTIÉRREZ-PACHECO, L. C.; CANTO, A.; QUIROZ-FIGUEROA, F.; LOYOLA-VARGAS, V. M.; Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cellular and Developmental Biology.- Plant**, v.43, p.507-520, 2007.
- SANTOS, A. C. P. dos. **Embriogênese somática indireta em genótipos de *Coffea arabica* e de *C. canephora***. 2002. 90p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.
- SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. APOATÁ **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, n. 1, p. 22-29, 2008.
- SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E.. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar Rubi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n.3, p. 571-577, 2003.
- SANTOS, M. R. A.; PAIVA, R.; BENDADIS, A. K. Cultura de tecidos de *Smilax japecanga* Grisebach: indução e crescimento de calos. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 28, p. 37-43, 1997.
- SCRAGG, A. H.; ALLAN, E. J. *Picrasma quassioides* Bennet (Japanese quassia tree): in vitro culture and production of quassin. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants IV**. Berlin: Springer-Verlag, v. 21, p. 249-268, 1993.
- SERRA, A. G. P.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 40, p. 833-840, 2000.
- SONDAHL, M. R. Interações de citocininas e auxinas no crescimento e embriogênese de explantes de *Coffea* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 6., 1978, Ribeirão Preto. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC., p. 67, 1978.
- SOUZA, F. F.; SANTOS, M. M.; VENEZIANO, W.; NEVES, L. R. S. ; SOUZA, E. B. A.; SILVA, A. C. G. Obtenção de híbridos intra e intervarietais de café Robusta em Rondônia. In: SIMPOSIO DE PESQUISA DOS CAFES DO BRASIL, 4, 2005. Londrina.. **Anais**. Brasília, D.F. : Embrapa - Café, 3p., 2005.
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Botanica**, v. 19, n. 4, p. 509-514, 1970.