

## AVALIAÇÃO DE CALOGÊNESE EM SEGMENTOS FOLIARES DE CLONES DE CAFÉ CONILON (*Coffea canephora* PIERRE)

Maria das Graças Rodrigues Ferreira<sup>2</sup>; Maurício Reginaldo Alves dos Santos<sup>3</sup>; Ana Cleide Ribeiro Bragado<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup> Pesquisador, D. Sc., Embrapa Rondônia, Porto Velho – RO, [mgraca@cpafro.embrapa.br](mailto:mgraca@cpafro.embrapa.br)

<sup>3</sup> Pesquisador, D. Sc., Embrapa Rondônia, Porto Velho – RO, [mauricio@cpafro.embrapa.br](mailto:mauricio@cpafro.embrapa.br)

<sup>4</sup> Bolsista do PNP&D/Café, [anaefo@yahoo.com](mailto:anaefo@yahoo.com)

**RESUMO:** Segmentos foliares de clones de *Coffea canephora*, **199, 61, 184, 193, 100, 194, 120 e 59**, pertencentes ao programa de melhoramento da Embrapa Rondônia, foram avaliados visando à calogênese para obtenção de embriões somáticos. Os explantes foram inoculados em placas de Petri 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), 2,4-D (2,21 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. Os cultivos foram mantidos em câmara do tipo BOD, no escuro, sob temperatura de 28°C, durante 30 dias, sendo avaliada ao final desse período a presença de calos. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, sendo empregadas 15 placas por repetição, cada uma com cinco explantes. Verificou-se que os clones **199, 184, 193, 194 e 59** foram os mais responsivos, observando-se diferença entre os genótipos empregados.

**Palavras-Chave:** calogênese, *Coffea canephora*, cultivo *in vitro*.

## EVALUATION OF CALLOGENESIS IN LEAF SEGMENTS FROM CLONES OF *COFFEA CANEPHORA*

**ABSTRACT:** Leaf segments from *Coffea canephora* clones **199, 61, 184, 193, 100, 194, 120 e 59** belongs to breeding program of Embrapa Rondônia, were evaluated aiming callogenesis to obtain somatic embryos. Explants were inoculated in Petri dishes 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 extrat (400 mg/L), 2,4-D (2,21mg/L) 2,i-P (1 mg/L), IBA (1 mg/L), supplemented with sucrose (2,0%), agar (0,8%) and pH adjusted to 5,7. The cultures were maintained in BDO in dark conditions at 28°C, for 30 days, being evaluated the callus presence. The experimental design used was entirely randomly being used 15 dishes per repetition, each one with five explants. The clones **199, 184, 193, 194 and 59** were the most responsives, showing difference between genotypes employed.

**Key words:** callogenesis, *Coffea Canephora*, *in vitro* culture.

## INTRODUÇÃO

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. 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.

A propagação vegetativa é indicada para multiplicação de cultivares de alta produtividade e resistentes a enfermidades, 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 cultura de calos proporciona a propagação em larga escala de diversas espécies vegetais, sendo que os trabalhos em cafeeiro foram publicados por Staritsky (1970), que obteve êxito na indução de calos a partir de folhas. A calogênese constitui-se numa 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.

Na cultura de tecidos, as citocininas têm sido apontadas como causadoras do início de brotações em muitos explantes, pois a maioria deles, *in vitro* não sintetizam citocininas suficiente para permitir um crescimento contínuo. 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 5,0mg.L<sup>-1</sup> 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.

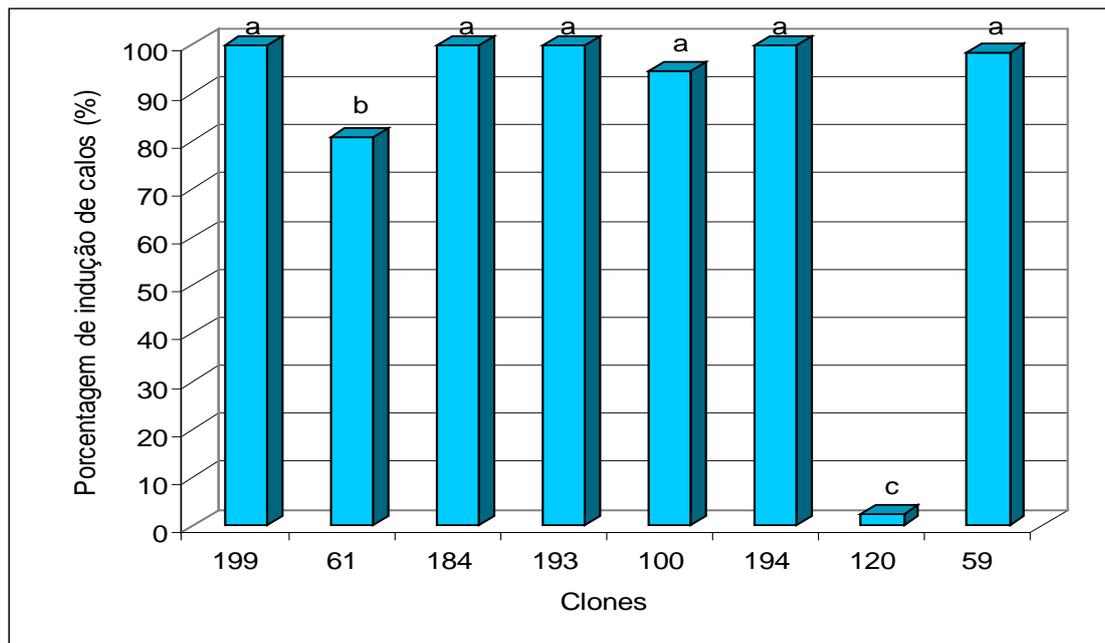
Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de segmentos foliares de clones de *C. canephora* à calogênese, visando suporte para futuros trabalhos com embriogênese somática.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais 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 do segundo par dos ramos plagiotrópicos de café Conilon dos clones **199, 61, 184, 193, 100, 194, 120 e 59**, selecionados no Estado e incorporados ao programa de melhoramento genético de café nos anos 1998, 1999, 2000 e 2001. As mesmas passaram por uma pré-limpeza, sendo lavadas com água bidestilada e uma esponja com algumas gotas de detergente comercial. As folhas foram segmentadas em quadrados de aproximadamente 4 x 4 cm<sup>2</sup> e colocadas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto. Em câmara de fluxo laminar, os segmentos foram retirados do álcool e esterilizados com concentrações de 50% de alvejante comercial (hipoclorito de sódio a 2,5%), durante 30 minutos, sendo, em seguida, lavados 3 vezes com água bidestilada estéril e segmentados em quadrados de aproximadamente 1 x 1 cm<sup>2</sup>. Os explantes foram inoculados em placas de Petri descartáveis 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) e mio-inositol (100 mg/L), caseína (100 mg/L), extrato de malte (400 mg/L), 2,4-D (2,21 mg/L), 2,i-P (1 mg/L), AIB (1mg/L), acrescido de 2,0% de sacarose, solidificado com 0,8% de ágar e pH ajustado para 5,7. Os cultivos foram mantidos em câmara do tipo BOD, no escuro, sob temperatura de 28°C, durante 30 dias, sendo avaliada ao final desse período a presença de calos. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, sendo empregadas 15 placas, cada uma com cinco explantes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificamos que os clones 199, 184, 193, 194 e 59 foram mais responsivos ao protocolo empregado, não havendo diferença significativa entre os mesmos (Figura 1). Houve diferença significativa entre esses e os clones 61 e 120, sendo que este último apresentou o menor índice de calosidade. 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).



**Figura 1** – Porcentagem de indução de calos em clones de *Coffea canephora*.

## CONCLUSÃO

Os clones 199, 184, 193, 194 e 59 foram responsivos ao protocolo empregado, observando-se diferença entre os genótipos empregados.

## 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.
- 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.
- 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.
- LITZ, R.E.; JARRET, R.L. Regeneracion de plantas en el cultivo de tejidos, embriogênese somática y organogênese. 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.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: ENCUESTRO 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 biossay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- 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.