

BALANÇO HORMONAL DE 2,4-D, 2iP e AIB PARA CALOGÊNESE 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: Considerando a relevância da cultura de *Coffea canephora* Pierre para o estado de Rondônia e a necessidade de melhoramento para resistência a doenças, realizou-se este trabalho com o objetivo de induzir calos em explantes foliares da variedade Conilon, visando contribuir com o estabelecimento de um protocolo rápido e eficiente para a clonagem de genótipos de interesse. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia. Após desinfestação, as folhas foram segmentadas em pedaços de 1 cm², os quais foram inoculados em meio MS, em concentrações variáveis de 2,4-D (0, 10, 20 e 40 µM), 2iP (0, 5, 10 e 20 µM) e AIB (10 µM). O material foi mantido em câmara tipo BOD, no escuro e com temperatura de 24±2°C. Cada unidade experimental foi constituída de 30 explantes. Avaliou-se o intumescimento dos explantes e a indução de calos, durante os 30 dias subsequentes. As três combinações mais eficientes na indução de calos foram: 5 µM 2iP + 10 µM AIB; 10 µM 2iP + 10 µM AIB; e 20 µM 2iP + 10 µM AIB.

Palavras-chave: Calogênese, cultura de tecidos vegetais, cafeicultura, Rondônia.

HORMONAL BALANCE OF 2,4-D, 2iP AND AIB FOR CALOGENESIS IN CONILON COFFEE (*Coffea canephora* PIERRE)

ABSTRACT: Due to relevance of *Coffea canephora* Pierre to Rondônia state and the need of breeding for resistance to diseases, the objective of this study was the callus induction on leaf explants of Conilon cultivar to establish fast and efficient protocol of cloning interesting genotypes. The experiments had been carried through in the Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais of Embrapa Rondônia. After decontamination leaves were cut in laminar flow chamber in pieces of 1 cm² and inoculated in MS medium with combinations of 2,4-D (0, 10, 20 e 40 µM), 2iP (0, 5, 10 e 20 µM) and AIB (10 µM). Cultures were kept in BOD chamber at dark and 24±2°C. Experimental unit was constituted of 30 explants. Thickness of explants and callus induction were evaluated during 30 days. Three combinations were most efficient to callus induction: 5 µM 2iP + 10 µM AIB; 10 µM 2iP + 10 µM AIB; and 20 µM 2iP + 10 µM AIB.

Key words: Calogenesis, plant tissue culture, culture of coffee, Rondônia.

INTRODUÇÃO

Técnicas de cultura de células e tecidos vegetais foram inicialmente estudadas e estabelecidas para o cafeeiro a partir do trabalho pioneiro de Staritsky (1970). O autor obteve rápida indução de calos em *Coffea arabica* L. e ainda descreveu a indução de embriões somáticos e plântulas oriundas de ramos ortotrópicos de *Coffea canephora* Pierre. A partir de então, vários trabalhos foram iniciados para a aplicação desses métodos no melhoramento do cafeeiro e, mais especificamente, para acelerar a multiplicação vegetativa desta cultura. Algumas técnicas de multiplicação *in vitro* de plantas de café são a microestaquia, a cultura de embriões, a organogênese, a calogênese e a embriogênese somática (Santana-Buzzy et al., 2007).

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 objetivo deste trabalho foi a indução de calos em explantes foliares de *C. canephora*, var. Conilon, clone 194, a partir da manipulação de concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia. Foram utilizadas folhas provenientes de plantas *C. canephora* Pierre, cv. Conilon (clone 194, pertencente ao programa de melhoramento da Embrapa Rondônia), que foi desenvolvido, selecionado e disponibilizado pela Embrapa Rondônia e mantido em casa de vegetação. Foram coletadas folhas do segundo par dos ramos plagiotrópicos, as quais foram cuidadosamente lavadas em água bidestilada estéril com auxílio de esponja e detergente. Em seguida, em câmara de

fluxo laminar, as mesmas foram imersas em etanol a 70% (v/v) por 1 minuto e em solução de hipoclorito de sódio a 1,25% (v/v) por 30 minutos, seguidas por três lavagens em água bidestilada estéril. As folhas foram segmentadas em pedaços de aproximadamente 1 cm², os quais foram inoculados com a face adaxial em contato com meio. O material inoculado foi mantido em câmara tipo BOD, no escuro e com temperatura de 24±2°C.

O meio de cultura utilizado foi MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 20,0 g.L⁻¹ de sacarose, extrato de malte 400 mg.L⁻¹, caseína hidrolisada 100 mg.L⁻¹ e solidificado com 0,8 % de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C, durante 20 minutos. Os tratamentos utilizados para indução de calos foram as 16 combinações de reguladores de crescimento adicionados ao meio, as quais estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações dos reguladores de crescimento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 2-isopenteniladenina (2iP) e ácido indolbutírico (AIB) utilizados nos tratamentos de indução de calos em explantes foliares de *C. canephora*.

Concentrações dos reguladores de crescimento (µM)							
Tratamentos	2,4-D	2iP	AIB	Tratamentos	2,4-D	2iP	AIB
1	0	0	10	9	0	10	10
2	10	0	10	10	10	10	10
3	20	0	10	11	20	10	10
4	40	0	10	12	40	10	10
5	0	5	10	13	0	20	10
6	10	5	10	14	10	20	10
7	20	5	10	15	20	20	10
8	40	5	10	16	40	20	10

Cada unidade experimental foi constituída de 30 explantes. O intumescimento dos explantes e a indução de calos foram avaliados durante os 30 dias subsequentes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme pode-se observar na Figura 1, aos 10 dias de cultivo após a inoculação, a maior parte dos tratamentos induziu mudanças nos explantes foliares, indicando desta forma o início do processo de indução de calos. Os tratamentos 6, 8 e 9 apresentaram taxa de indução de calos de 3,3%. Os tratamentos 7, 10 e 14 apresentaram taxa de indução de calos de 6,7%. Os tratamentos 11, 13, 15 e 16 apresentaram taxa de indução de calos de 10%. Com exceção do controle (tratamento 1) todos os demais tratamentos apresentaram explantes intumescidos.

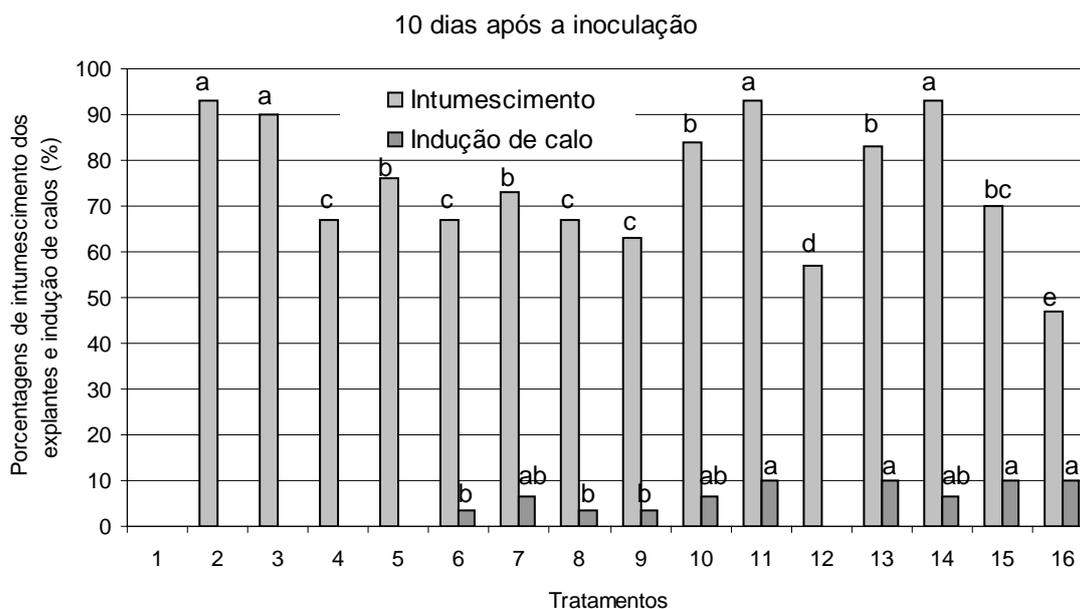


Figura 1 - Efeito dos tratamentos no intumescimento dos explantes e na indução de calos em explantes foliares de *C. canephora*, aos 10 dias de cultivo.

Aos 20 dias de cultivo, observando a Figura 2, pode-se verificar que a formação de calos aumentou significativamente na maioria dos tratamentos. É possível observar também que os tratamentos 5, 9 e 13 apresentaram taxa de indução de calos de 66,7%, 73,3% e 63,3%, respectivamente.

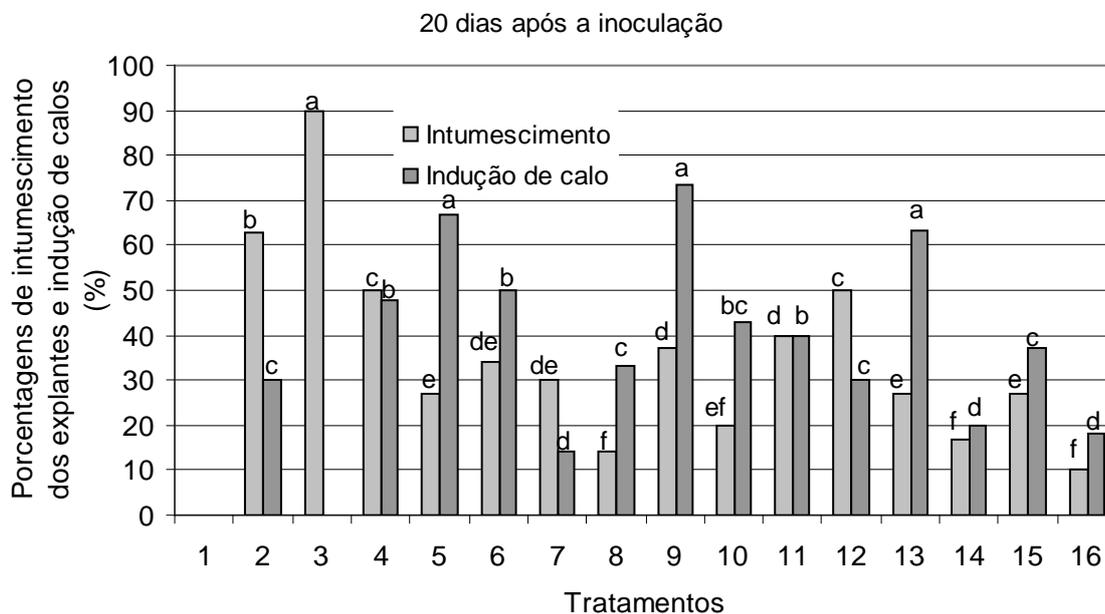


Figura 2 - Efeito dos tratamentos no intumescimento dos explantes e na indução de calos em explantes foliares de *C. canephora*, aos 20 dias de cultivo.

Santos (2002) relatou a presença de explantes sem reação ou com a formação de calos cicatriciais nos meios contendo apenas citocinina aos 30 dias de cultivo em Catimor (*Coffea arabica* L 'Caturra' x Híbrido de Timor) UFV 395-141. As frequências de 75% de explantes com calos nodulares e 25% com calos brancos não-embriogênicos (calos mistos) foram obtidas nos meios de indução contendo citocinina e auxina.

Barbosa (2003), após 28 dias de cultivo, verificou que houve a formação de calos cicatriciais na maioria dos explantes quando cultivados em meios apenas com BAP. Nos explantes do genótipo Catimor (*Coffea arabica* L 'Caturra' x Híbrido de Timor) UFV 395-141 houve maior desenvolvimento dos calos, sendo nesta mesma época foi observada a formação de calos nodulares e de calos mistos, em aproximadamente 50% dos explantes para cada tipo de calo.

Na Figura 3 pode-se verificar que, aos 30 dias de cultivo, a formação de calos aumentou significativamente na maioria dos tratamentos. É possível observar que os tratamentos 5 (5 μM 2iP + 10 μM AIB), 9 (10 μM 2iP + 10 μM AIB) e 13 (20 μM 2iP + 10 μM AIB) apresentaram taxa de indução de calos de 93,3%, 76,7% e 90%, respectivamente. É importante observar que nenhum destes tratamentos contém 2,4-D.

Estes dados discordam de Crocomo et al. (1979), os quais concluíram que a combinação da auxina 2,4-D com uma citocinina é essencial à proliferação de calos de explantes foliares e de entrenós. Os dados também discordam de Araújo et al. (2003) que verificaram uma interação significativa entre 2,4-D (2 mg.L^{-1}) e cinetina (2 mg.L^{-1}) na indução de calos de *C. arabica* Acaia Cerrado. Os resultados diferem também dos obtidos por Cordeiro (1999), que obteve melhores resultados utilizando benzilaminopurina (BAP) na indução de calos em explantes foliares de *Coffea arabica* L. O 2,4-D é uma auxina reconhecida pelo seu efeito de indução de calos na maioria das plantas (Caldas et al, 1998). Alguns trabalhos relatam a alta eficiência do 2,4-D na indução de calos quando comparado com calos induzidos apenas com citocininas (Nakamura et al., 1992). Porém alguns autores têm relatado a eficiência de algumas citocininas, como o 2ip, na indução de calos. Santos (2002), trabalhando com explantes foliares de clones de *C. arabica*, obtiveram indução de calos mais eficiente quando adicionaram 2ip ao meio, no lugar de BAP, para formação de calos friáveis. Santos et al. (2001) obtiveram indução de calos em *C. arabica* Catuaí Vermelho somente em resposta ao 2,4-D (1,5 μM) combinado com BAP (7,5 μM) e 2iP (25,0 μM) combinado com AIB (5,0 μM).

Comparando-se o efeito dos reguladores de crescimento adicionados isoladamente no meio de cultura, observou-se que o 2,4-D apresentou uma diminuição da produção de calos no explante foliar, em relação ao 2ip. O efeito negativo do 2,4-D na produção de calos discorda dos relatos feitos por Araújo & Pasqual (2007), que verificaram que combinações de cinetina e AIB atuam favoravelmente na indução de calogênese em anteras de *C. arabica* L. Palú et

al.(2004), em experimentos de indução de calos em anteras de *C. arabica* L. Rubi e Acaia Cerrado, verificaram que as maiores porcentagens de indução de calos ocorreram com 2 mg.L⁻¹ de AIB, na ausência de 2,4-D, com 0,86 mg.L⁻¹ de 2,4-D combinado com a concentração de 1 mg.L⁻¹ de AIB e com 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D, na ausência de AIB.

Sondahl (1978), estudando os efeitos das auxinas na proliferação de calos de explantes foliares de *C. arabica* cv. Bourbon observou que o 2,4-D foi a auxina mais efetiva na promoção da proliferação celular; em relação às concentrações de 2,4-D utilizadas (0,5 e 1,0 mg.L⁻¹), a indução de calos apresentou um acréscimo de 25% quando foi utilizada a concentração de 0,5 mg.L⁻¹ em comparação com a de 1,0 mg.L⁻¹.

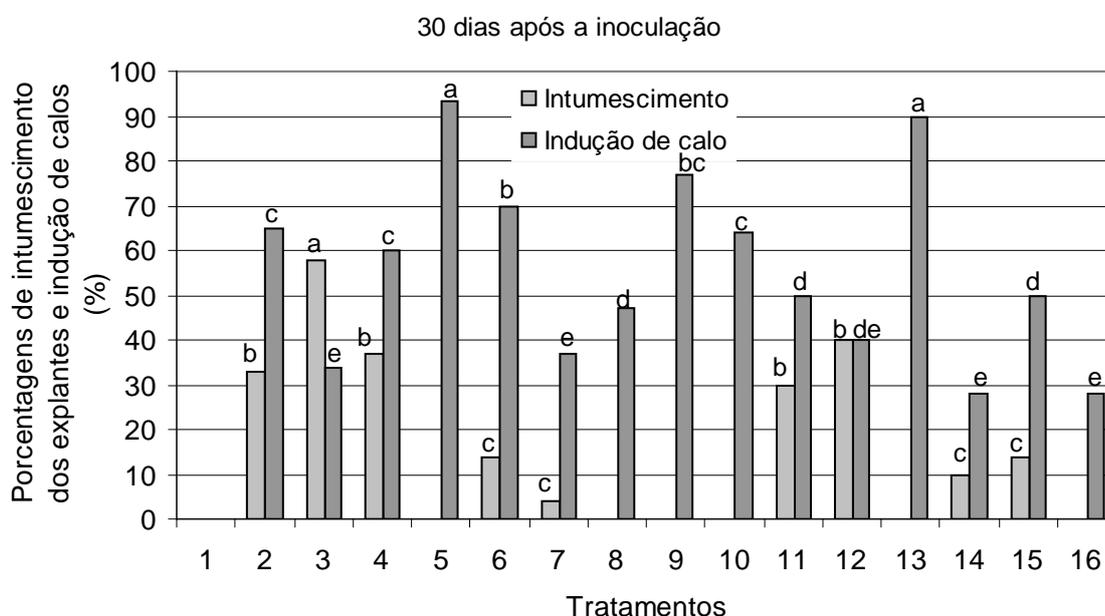


Figura 3 - Efeito dos tratamentos na indução e aparecimento de calos aos 30 dias de cultivo.

Estudando a indução e crescimento de calo de *C. canephora* cv Apoatã, Santos et al. (2008) determinaram que, para a indução de calos em segmentos foliares e nodais, a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura é essencial, sendo que o 2,4-D foi mais eficiente que o AIB na formação de calos.

Segundo Almeida et al (2000), a indução de calos e o seu posterior desenvolvimento também podem estar associados às condições fisiológicas e ao estado fenológico dos explantes. Os autores chegaram a esta conclusão quando observaram que as taxas de indução de calos eram diferentes ao longo do ano e haviam diferentes respostas na indução de calos entre os oito genótipos de *C. arabica* estudados.

CONCLUSÃO

Condições adequadas para a rápida indução de calos em explantes foliares *Coffea canephora* v. Conilon podem ser obtidas com a utilização das combinações de reguladores de crescimento no meio de cultivo: 5 µM 2iP + 10 µM AIB; 10 µM 2iP + 10 µM AIB; e 20 µM 2iP + 10 µM AIB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. A. S.; SIMIONI, K. C. M.; FAZUOLI, L. C.; RAMOS, L. C. da S. Indução de calos de explantes foliares de genótipos de café. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2000, Poços de Caldas. **Resumos expandidos**. Brasília, D.F: Embrapa Café;. 2v. (1490p.), p. 145-147, 2000.
- ARAÚJO, J. S. de; REZENDE, J. C. de; PEREIRA, A. R; PEREIRA, B. C.; PASQUAL, M. Calogênese em anteras de cafeeiro 'Acaia cerrado' utilizando 2,4-D, cinetina e AIB. In: SIMPOSIO DE PESQUISA DOS CAFES DO BRASIL E WORKSHOP INTERNACIONAL DE CAFÉ E SAUDE, 3, 2003. Porto Seguro. **Anais**. Brasília, DF : Embrapa Café, p. 88, 2003.
- ARAÚJO, J. S. de; PASQUAL, M. Influência de cinetina e ácido indol butírico na indução de calos em anteras de cafeeiro. In: SIMPOSIO DE PESQUISA DOS CAFES DO BRASIL, 5, 2007. Águas de Lindóia. **Anais**. Brasília, D.F. : Embrapa – Café, 5p., 2007.
- BARBOSA, W. M. **Embriogênese somática em cafés arábica e robusta**. 2003, 100p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformações genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPQ, v.1. 509p. 1998.
- CORDEIRO, A. T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplastos em *Coffea***. 1999. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.
- CROCOMO, O.J.; GALLO, L.A.; TONIN, G.S.; SACCHI, N. Developmental control of *Phaseolus vulgaris* using embryo axis cultures. **Energia Nuclear na Agricultura**. Piracicaba, v. 1, n.1, p.55-58, 1979.
- 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.
- NAKAMURA, T.; TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. **Japan Journal Crop Science**, v.61, p. 476–486, 1992.
- PALÚ, E. G.; SILVA, A. B. DA; PASQUAL, M. Calogênese in vitro em anteras de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.4, p. 736-742, 2004.
- 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, A. C. P.; CORDEIRO, A. T.; FIGUEIRA, M. L.; ZANETTI, R. S.; CRUZ, A. C. F.; ZAMBOLIM, L. Calogênese friável em *Coffea arabica* e *C. canephora*. In: SIMPOSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DE CAFÉ NO BRASIL, 2. 2001. Vitória, **Anais**. Brasília, D.F., Embrapa Café, p. 285-292, 2001.
- 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. APOATÃ **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, n. 1, p. 22-29, 2008.
- 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.