

# EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA EM EXPLANTES FOLIARES DE *Coffea arabica* L. CV. OBATÃ<sup>1</sup>

ANNA LYGIA DE REZENDE MACIEL<sup>2</sup>  
MOACIR PASQUAL<sup>3</sup>  
ALBA REGINA PEREIRA<sup>5</sup>  
JULIANA COSTA DE REZENDE<sup>3</sup>  
ADRIANO BORTOLOTTI DA SILVA<sup>2</sup>  
LEONARDO FERREIRA DUTRA<sup>4</sup>

**RESUMO** – Objetivou-se, com este trabalho, estudar a embriogênese somática indireta em *Coffea arabica* L. cv. Obatã, incluindo as etapas de indução de calos, diferenciação, regeneração e formação de embriões. Segmentos foliares retirados de plantas em condições de campo foram desinfestados com álcool 70% por 1' e hipoclorito de sódio 1% durante 15' e inoculados em meio IC (indução de calos) suplementado de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg.L<sup>-1</sup>) e Cinetina (0, 2, 4 e 8 mg.L<sup>-1</sup>). Posteriormente, os calos foram transferidos para o meio DC (diferenciação de calos), adicionado de diferentes concentrações de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg.L<sup>-1</sup>) e BAP (0, 2, 4 e 8 mg.L<sup>-1</sup>); em seguida, durante a etapa de regeneração, os calos embriogênicos friáveis foram inoculados em meio R suplementado de BAP (0, 2, 4 e 6 mg.L<sup>-1</sup>) e

sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g.L<sup>-1</sup>). Os meios de cultura utilizados tiveram pH ajustado para 5,6 ± 1 antes de serem autoclavados. Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento a 26 ± 1°C. Durante as etapas de indução e diferenciação de calos, os experimentos ficaram em condições de obscuridade, e na etapa de regeneração, os experimentos foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 35 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Concluiu-se que a combinação entre 4 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina favoreceu a indução de calos primários mistos. Maior frequência de calos embriogênicos friáveis ocorreu na presença de BAP (8 mg.L<sup>-1</sup>), associado ou não ao 2,4-D, e maior número de embriões por explante foram obtidos quando utilizou-se sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>) e BAP (3 mg.L<sup>-1</sup>).

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** Café, calos, embriões somáticos, cultura de tecidos.

## INDIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *Coffea arabica* L. CV. OBATÃ<sup>1</sup>

**ABSTRACT** – It was aimed with this work to study the indirect somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. cv. 'Obatã', including the steps of induction, differentiation and regeneration of plants. Leaf segments withdrawn from plants under field conditions were disinfected with 70% alcohol for 1', 1% sodium hypochlorite for 15' and inoculated in 'CI' medium (callus induction) supplemented with 2,4 D (0, 1, 2 and 4 mg.L<sup>-1</sup>) and kinetin (0, 2, 4 and 8 mg.L<sup>-1</sup>). Later, the callus were

transferred to the 'CD' medium (callus differentiation) to which was added 2,4-D (0, 1, 2 and 4 mg.L<sup>-1</sup>) and BAP (0, 2, 4 and 8 mg.L<sup>-1</sup>). During the regeneration step, friable embryogenic callus were inoculated in 'R' medium supplemented with BAP (0, 2, 4 and 6 mg.L<sup>-1</sup>) and sucrose (0, 15, 30, 45 and 60 g.L<sup>-1</sup>). The culture media utilized had their pH adjusted to 5.6 ± 1 before being autoclaved. The experiments were kept in growth room at 26 ± 1°C. Over the steps of callus

1. Parte da Dissertação apresentada pelo primeiro autor à UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS/UFLA, Caixa Postal 37 – 37200-000 – LAVRAS, MG, como parte das exigências do curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitotecnia.

2. Engenheiro Agrônomo, Mestrado em Fitotecnia.

3. Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Titular/UFLA.

4. Engenheiro Agrônomo, Dr., Bolsista recém-doutor/CNPq.

5. Estudante de Agronomia da UFLA.

induction and differentiation, the experiments were carried out in dark conditions and at the regeneration step the experiments were carried out under 16-hour photoperiod and light intensity of  $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . It was observed that the combination of 2,4-D and kinetin favors

the induction of primary callus. High frequency of friable embryogenic callus was observed with BAP ( $8 \text{ mg.L}^{-1}$ ), combined or not with 2,4-D, and greater number of embryos per explant, when sucrose ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) and BAP ( $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) was utilized.

**INDEX TERMS:** Coffee, callus, somatic embryos, tissue culture.

## INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma atividade de elevada importância no cenário do agronegócio brasileiro.

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 conjunta aos trabalhos de transformação genética de plantas.

Os primeiros trabalhos conhecidos de 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*. Desde então, têm-se desenvolvido pesquisas sobre a embriogênese somática no gênero *Coffea* em diversos países (Hermann & Hass, 1975; Sondahl, 1978; Lanaud, 1981; Pierson et al., 1983; Boxtel & Berthouly, 1996; Berthouly & Michaux-Ferriere, 1996; Cordeiro, 1999; Sreenath, 2000).

Segundo Cordeiro (1999), a embriogênese somática em *Coffea* apresenta tipos distintos de calos durante a fase de indução. Os CPN's (calos primários nodulares) referem-se às formações globulares compactas surgidas em parte ou, menos freqüentes, na totalidade dos bordos dos explantes. Os CPM's (calos primários mistos), além da reação globular, apresentam formações amorfas de células alongadas e caracterizam-se pelo crescimento visivelmente mais rápido. Os CE's (calos embriogênicos) são calos primários contendo até 20 embriões/explante, e quando esses apresentam agregados celulares granulados, facilmente destacáveis e de coloração amarelo-creme, são, então, caracterizados como CEF's (calos embriogênicos friáveis).

A implementação da embriogênese somática ocorre a partir de explantes de origem diversa, como: fragmentos de ramos ortotrópicos, ramos plagiotrópicos, folhas e tegumentos de óvulos, destacando-se as fo-

lhas, por serem mais abundantes e de fácil desinfestação (Dublin, 1991).

A sacarose tem sido a fonte de carboidrato mais usada na embriogênese somática, embora outros mono e dissacarídeos possam ser utilizados. A concentração de sacarose influencia nos processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos (Guerra et al., 1999).

As auxinas e citocininas têm papel fundamental na embriogênese somática de várias espécies de plantas. Algumas espécies necessitam de meio suplementado com ácido giberélico ou ácido abscísico para o desenvolvimento de embriões somáticos, enquanto outras não precisam dessa suplementação, uma vez que o processo de indução foi estabelecido.

A embriogênese somática indireta requer a determinação de células diferenciadas, a proliferação de calos e a indução de células embriogênicas determinadas, dependendo da ação de reguladores de crescimento, não apenas para a retomada da atividade mitótica, mas também para a determinação do estado embriogênico (Sondahl et al., 1985; Williams & Maheswaran, 1986). Contudo, duas estratégias têm sido utilizadas com o objetivo de obtenção de tecido embriogênico em *Coffea*: a primeira envolve o cultivo de explante sobre um único meio de cultura, suplementado apenas com citocinina (Yasuda et al., 1995), ou a combinação de auxina e citocinina (Pierson et al., 1983); a segunda estratégia utiliza o cultivo de explantes em um meio primário ou de indução, seguido da transferência dos explantes para o meio secundário, tido como de diferenciação (Dublin, 1984) ou de acondicionamento, que difere do primeiro por possuir menor razão auxina/citocinina (Noriega & Sondahl, 1993; Sondahl et al., 1985; Zamarripa et al., 1991).

O cafeeiro, como outras espécies lenhosas, libera substâncias fenólicas e, por essa razão, deve-se adicionar ao meio de cultura substâncias antioxidantes, tais como: carvão ativado, polivinilpirrolidene (PVP), ácido ascórbico e ácido cítrico (Andrade, 1998).

Objetivou-se com este trabalho estudar a embriogênese somática indireta em *C. arabica* L. cv. Obatã, incluindo as etapas de indução de calos, diferenciação

ou condicionamento, regeneração e formação de embriões.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras – MG.

Os dados obtidos durante as todas etapas deste trabalho foram submetidos à análise estatística, com aplicação do teste de F a 5% de probabilidade, e as médias analisadas por regressão polinomial.

**TABELA 1** – Componentes dos meios de cultura utilizados durante as etapas da embriogênese somática em *C. arabica* L. UFLA, Lavras-MG, 2001.

| Componentes         | IC <sup>1</sup><br>(mg.L <sup>-1</sup> ) | DC <sup>1</sup><br>(mg.L <sup>-1</sup> ) | R <sup>1</sup><br>(mg.L <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|--|--|---|
| MS <sup>2</sup>     | ½ dos sais                               | ½ dos sais                               | ½ dos sais                              |
| Tiamina-HCl         | 10,0                                     | 20,0                                     | 10,0                                    |
| Piridoxina-HCl      | 1,0                                      | -  | 1,0                                     |
| Ácido Nicotínico    | 1,0                                      | -  | 1,0                                     |
| Glicina             | 1,0                                      | 20,0                                     | 2,0                                     |
| L-cisteína          | -  | 40,0                                     | -                                       |
| Mio-inositol        | 100,0                                    | 200,0                                    | 200,0                                   |
| Sulfato de Adenina  | -  | 60,0                                     | 40,0                                    |
| Caseína Hidrolisada | 100,0                                    | 200,0                                    | 400,0                                   |
| Extrato de malte    | 400,0                                    | 800,0                                    | 400,0                                   |
| Sacarose            | 30.000                                   | 30.000                                   | 40.000                                  |
| Ágar                | 5.000                                    | 5.000                                    | 5.000                                   |

<sup>1</sup>/ Berthouly & Michaux-Ferriere (1996)

<sup>2</sup>/ Murashige & Skoog (1962)

#### Etapa 1: Concentrações de 2,4-D e Cinetina na indução de calos da cultivar Obatã.

O meio de cultura semi-sólido utilizado foi o “IC”, de indução de calos (Tabela 1), com pH ajustado para  $5,6 \pm 1$  antes de ser autoclavado a  $120^{\circ}\text{C}$ , 1,2 atm, durante 20 minutos.

Foram utilizados como explantes, folhas jovens de ramos plagiotrópicos de plantas de *C. arabica* L. cv. Obatã, mantidas no campo experimental do Setor de Cafeicultura da UFLA. Após a coleta, as folhas foram desinfestadas com álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos. Posteriormente, em câma-

ra de fluxo laminar horizontal, essas foram lavadas três vezes consecutivas com água destilada autoclavada e mantidas em solução de  $600 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido ascórbico até serem inoculadas em meio de cultura e transferidos para sala de crescimento sob condições de obscuridade, com temperatura de  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Após a eliminação da nervura central, os explantes foram excisados em tamanhos de  $1 \text{ cm}^2$  aproximadamente, das extremidades laterais, basais e apicais das folhas. Posteriormente foram inoculados com o lado abaxial voltado para a superfície do meio nutritivo, acrescido de  $600 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido ascórbico, contido em tubos de ensaio ( $150 \times 25 \text{ mm}$ ) com 15 ml de meio cada.

Os tratamentos constituíram-se de diferentes concentrações de 2,4-D (0, 1, 2 e  $4 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e Cinetina (0, 2, 4 e  $8 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $4 \times 4$ , com 4 repetições e 10 explantes por parcela.

As avaliações foram realizadas 90 dias após a instalação do experimento, analisando as seguintes variáveis: % de calos cicatriciais (CC), % de calos primários nodulares (CPN) e % de calos primários mistos (CPM).

#### Etapa 2: Concentrações de BAP e 2,4-D na diferenciação de calos da cultivar Obatã.

Durante a etapa de diferenciação dos calos, utilizou-se para a instalação do experimento o meio nutritivo semi-sólido “DC” de diferenciação ou condicionamento de calos (Tabela 1), com pH aferido para  $5,6 \pm 1$  e distribuído em frascos de 100 ml, vedados com tampas de polipropileno. Em seguida, o meio foi autoclavado a  $120^{\circ}\text{C}$ , 1,2 atm, durante 20 minutos.

Calos Primários Mistos (CPM), com aproximadamente 1 cm de diâmetro, provenientes de segmentos de folhas da cultivar Obatã foram transferidos (inteiros) para meio de cultura “DC”, acrescido de diferentes concentrações de BAP (0, 2, 4 e  $8 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e 2,4-D (0, 1, 2 e  $4 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e transferidos para sala de crescimento sob condições de obscuridade, com temperatura de  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $4 \times 4$ , com 4 repetições e 2 explantes por parcela.

As avaliações foram realizadas 90 dias após a instalação dos experimentos, sendo analisadas as características: % de calos embriogênicos (CE) e % de calos embriogênicos friáveis (CEF).

### **Etapa 3: Concentrações de BAP e sacarose na formação de embriões a partir de calos da cultivar Obatã.**

O meio de cultura semi-sólido utilizado para regeneração de calos foi o "R" (Tabela 1), com pH aferido para  $5,6 \pm 1$  e distribuído em frascos de 100 ml, vedados com tampas de polipropileno. Em seguida, o meio foi autoclavado a  $120^{\circ}\text{C}$ , 1,2 atm, durante 20 minutos.

Calos embriogênicos friáveis (CEF's) foram inoculados asépticamente em meio nutritivo e transferidos para sala de crescimento com temperatura de  $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Os tratamentos constituíram-se de diferentes concentrações de BAP (0; 2; 4 e 6  $\text{mg.L}^{-1}$ ) e sacarose (0, 15, 30, 45 e 60  $\text{g.L}^{-1}$ ).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4X5, com 3 repetições e 250 mg de calos embriogênicos friáveis por parcela.

As avaliações foram realizadas 90 dias após a instalação do experimento, em todos os calos existentes, determinando-se o número de embriões nos estádios globular, torpedo e cotiledonar.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A contaminação causada por fungos, bactérias e a oxidação por substâncias fenólicas são fatores limitantes no estabelecimento *in vitro* de explantes foliares de *C. arabica* provenientes de material coletado em campo. Por meio do controle fitossanitário realizado nas plantas selecionadas no campo e do processo de assepsia em laboratório, pode-se afirmar que houve 75% de eficiência no controle da contaminação e, com a adição de ácido ascórbico ( $600 \text{mg.L}^{-1}$ ) em meio de cultura, não houve ocorrência de explantes oxidados (dados não mostrados).

### **Etapa 1: Concentrações de 2,4-D e Cinetina na indução de calos na cultivar Obatã.**

#### **□ Porcentagem de Calos Cicatriciais**

Analisando-se as curvas de regressão para essa variável, observa-se na Figura 1 que houve maior reação cicatricial em explantes foliares da cultivar Obatã, quando adicionou-se ao meio de cultura cinetina nas concentrações 2, 1 e 4  $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente. O 2,4-D promoveu inibição na formação desses calos, mesmo na menor concentração utilizada (2  $\text{mg.L}^{-1}$ ).

Comparando-se as três curvas, pode-se notar que a adição de 2  $\text{mg.L}^{-1}$  de cinetina ao meio de cultura, sem a utilização de 2,4-D, apresentou maior frequência de CC's. Resultados similares foram obtidos por Cordeiro (1999), que observou uma reação cicatricial em frequência de cerca de 20% em explantes foliares dos genótipos Catimor e Diplóide DH<sub>3</sub> em meio sem auxina. Santos et al. (2000) obtiveram explantes sem qualquer tipo de reação e/ou calo cicatricial em meios de cultura que continham apenas citocinina para as cultivares Catimor e Catuaí Vermelho.

#### **□ Porcentagem de Calos Primários Nodulares**

Na ausência de cinetina, houve um decréscimo linear associado ao aumento das concentrações de 2,4-D (Figura 2). Para as concentrações de cinetina 2 e 4  $\text{mg.L}^{-1}$ , ocorreu um decréscimo significativo na frequência de CPN's quando adicionaram-se ao meio de cultura concentrações crescentes de 2,4-D. Esses resultados assemelham-se aos obtidos para a característica anterior.

Nesse caso, o fato de a auxina promover inibição na formação de CPN's assemelha-se aos resultados obtidos por Cordeiro (1999), quando os explantes foliares foram cultivados em meio suplementado apenas com citocinina. No entanto, Santos et al. (2000), estudando vários genótipos de *Coffea*, observaram resultados contraditórios, em que a adição simultânea de auxina e citocinina no meio de cultura MS induziu o aparecimento de CPN's.

#### **□ Porcentagem de Calos Primários Mistos**

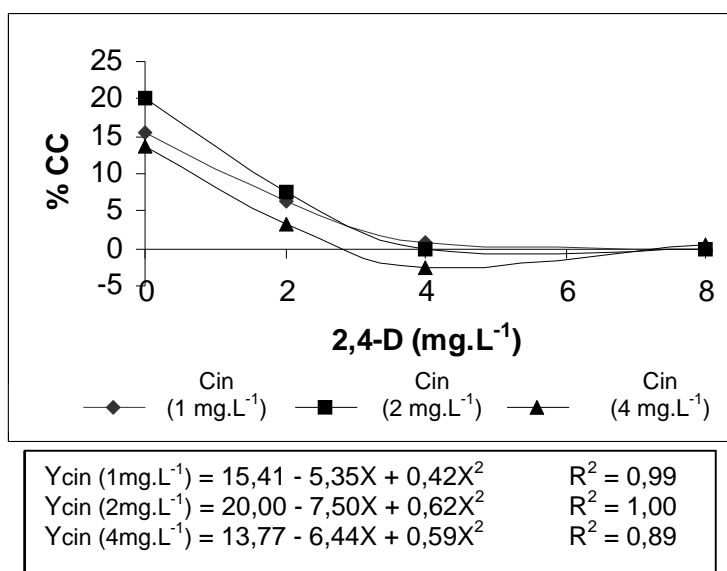
Maior porcentagem de CPM's (Figura 3) foi obtida com a utilização de 4,18  $\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-D combinado com 2  $\text{mg.L}^{-1}$  de cinetina, ou seja, a razão auxina/citocinina 2:1 proporcionou maior formação de CPM's em explantes foliares, correspondendo a uma frequência de 80,5%.

Os resultados obtidos concordam com os de Cordeiro (1999), o qual verificou que explantes foliares de Catimor, ao serem submetidos a diferentes associações de meios de indução à calogênese, adicionados de 2,4-D, cinetina e BAP e em genótipos Apoatã e DH<sub>3</sub>, utilizando-se a relação auxina/citocinina no meio primário, promoveram a formação de CPM's.

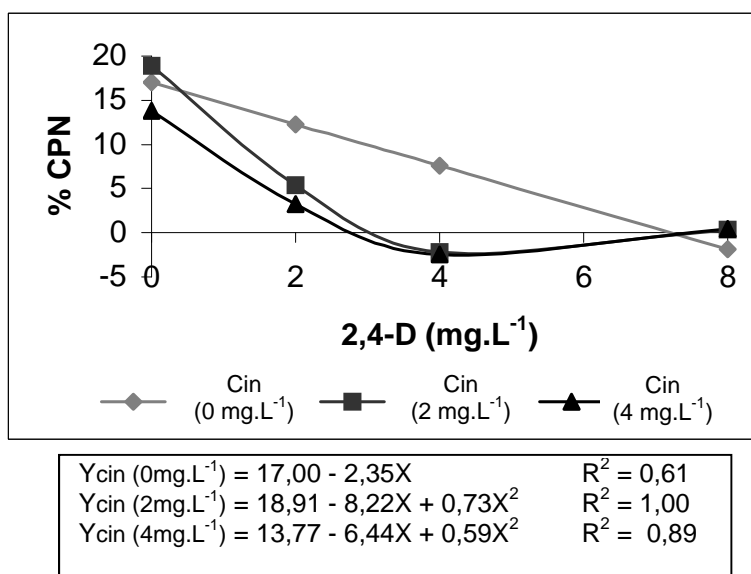
Os CPM's, além da reação globular, apresentam formações amorfas de células alongadas, que se caracterizam por crescimento visivelmente mais rápido. Os calos primários têm sido associados às células perivasculares (Berthouly & Michaux-Ferriere, 1996; Bieysse et al., 1993) e às do parênquima lacunoso do mesofilo (Piererson et al., 1983; Sondahl & Sharp, 1979). Segundo

Berthouly & Michaux-Ferriere (1996), as células mesofílicas, ao retornarem a divisão celular, originam os calos primários, que podem conter duas distintas popula-

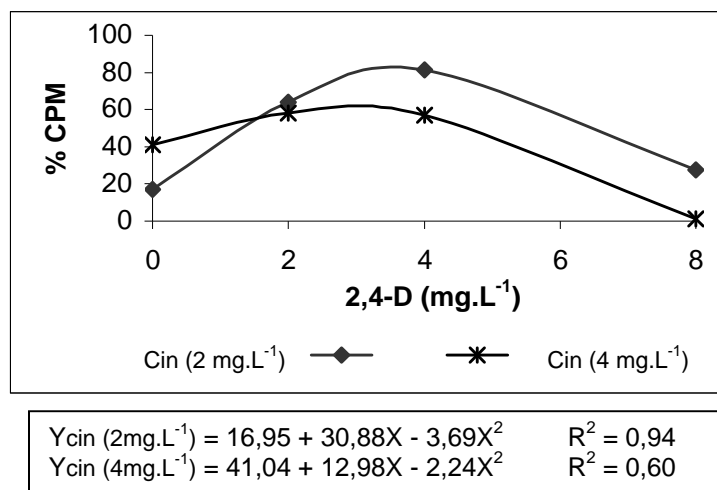
ções de células, uma constituída de células alongadas e vacuolizadas, e a outra, de pequenas células cilíndricas com citoplasma denso, ou seja, células embriogênicas.



**FIGURA 1** – Porcentagem de calos cicatriciais (CC) formados em explantes foliares de *C. arabica* cv. Obatã, em diferentes concentrações de 2,4-D e Cinetina. UFLA, Lavras-MG, 2001.



**FIGURA 2** – Porcentagem de calos primários nodulares (CPN) formados em explantes foliares de *C. arabica* cv. Obatã, em diferentes concentrações de 2,4-D e Cinetina. UFLA, Lavras-MG, 2001.



**FIGURA 3** – Porcentagem de calos primários mistos (CPM), formados em explantes foliares de *C. arabica* cv. Obatã, em diferentes concentrações de 2,4-D e Cinetina. UFLA, Lavras-MG, 2001.

### **Etapa 2: Influência das concentrações de BAP e 2,4-D na diferenciação de calos de *C. arabica* L. cv. Obatã**

#### □ Porcentual de Calos Embrionários

Conforme se observa na Figura 4, a maior frequência de CE's, que corresponde aos calos embrionários de baixa frequência (CEBF), foi obtida com a utilização de 1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D associado à concentração máxima de BAP (8 mg.L<sup>-1</sup>), apresentando frequência de 40%. Porém, resultados obtidos com 1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D na ausência da citocinina foram bastante satisfatórios, atingindo frequência de 33% de CE's.

Berthouly & Michaux-Fierrere (1996), estudando genótipos de *C. canephora*, observaram que a adição de BAP em concentrações acima de 1,5µM favorece mais a diferenciação de células embrionárias em relação a sua multiplicação, provavelmente por alterar a polaridade e o plano de divisão da célula (Williams & Maheswaran, 1986).

A relação auxina/citocinina e a utilização de BAP isoladamente promoveram a diferenciação em calos embrionários. Garcia & Menendez (1987) verificaram que a associação de 2,4-D e BAP induziu calos embrionários, durante a fase de diferenciação; em meio de cultura com a presença apenas de BAP, ocorreu embriogênese direta em baixa frequência em *Coffea*. Contudo, Cordeiro (1999), estudando cultivares de *C. arabica*, verificou que calos embrionários foram produzidos, aos sete meses de indução, tanto na ausência quan-

to na presença de auxina; porém, as maiores frequências desses calos foram observadas quando a auxina esteve presente na cultura primária associada à cinetina, seguida da repicagem para o meio com BAP combinado ou não com 2,4-D.

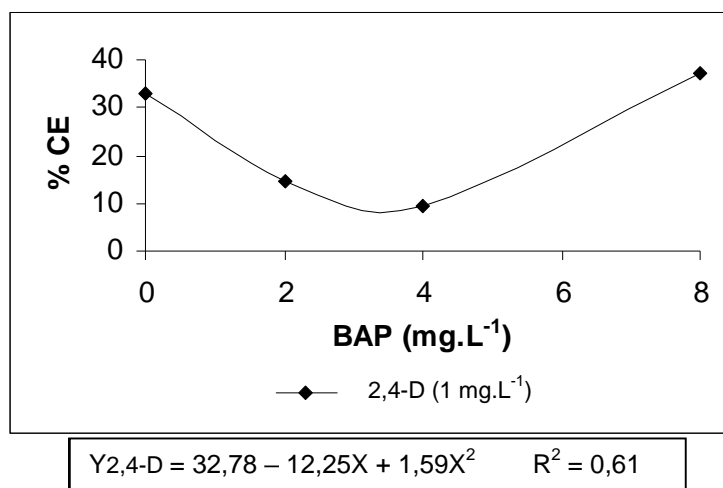
#### □ Porcentagem de Calos Embrionários Friáveis

De acordo com a Figura 5, maiores frequências de CEF's foram obtidas com a utilização de 1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D com concentrações crescentes de BAP, seguindo uma tendência linear, sugerindo, portanto, a possibilidade de incrementar concentrações de BAP acima de 8 mg.L<sup>-1</sup>, com o objetivo de aumentar a frequência de CEF's. Resultados semelhantes foram obtidos com a concentração de 8 mg.L<sup>-1</sup> de BAP sem a adição ao meio de cultura de 2,4-D

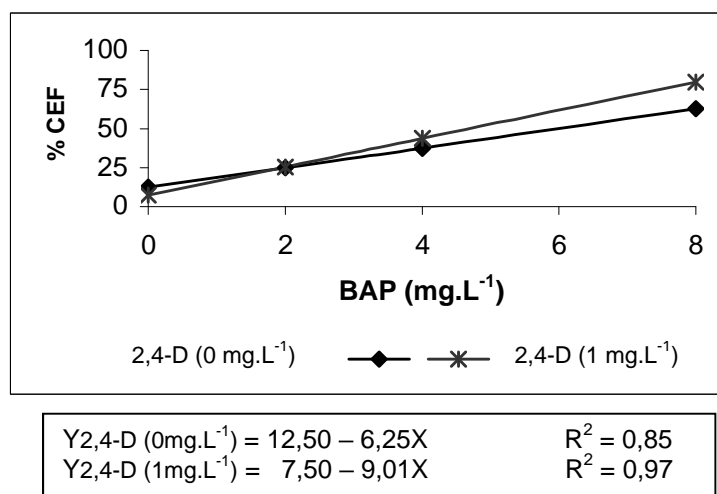
Segundo Sondahl & Sharp (1977), a ação combinada de auxina/citocinina é fundamental para obtenção de calos embrionários friáveis em *Coffea*, o que foi posteriormente comprovado por Garcia & Menendez (1987) em explantes foliares de Catimor. Os resultados obtidos no presente experimento foram semelhantes àqueles apresentados por Cordeiro (1999), que verificou um efeito negativo da auxina 2,4-D na frequência de CEF's, sendo similares ao efeito inibidor de ANA em explantes foliares da variedade Typica, em meio contendo BAP (Yasuda, et al., 1995). A formação de CEF's foi obtida também por Tahara et al. (1994), adicionando ao meio de cultura apenas a citocinina BAP.

Contudo, Caligari & Shohet (1993) têm sugerido que a manutenção prolongada das culturas embriogênicas em meio de cultura com 2,4-D

causas variações genéticas e epigenéticas que afetam o potencial embriogênico em algumas espécies.



**FIGURA 4** – Porcentagem de calos embriogênicos (CE), formados em explantes foliares de *C. arabica* cv. Obatã, em diferentes concentrações de BAP e 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.



**FIGURA 5** – Porcentagem de calos embriogênicos friáveis (CEF's), formados em explantes foliares de *C. arabica* cv. Obatã, em diferentes concentrações de BAP e 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

**Etapa 3: Concentrações de BAP e sacarose na formação de embriões a partir de calos da cultivar Obatã.**

□ **Número de Embriões Globulares**

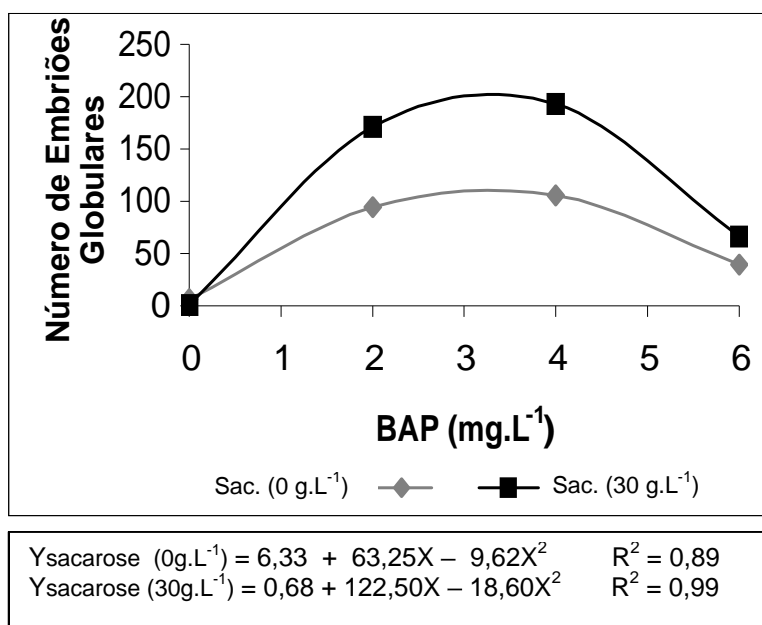
Analisando-se a Figura 6, pode-se observar que a utilização de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao meio de cultura promoveu uma média de 202 de embriões globulares até o nível máximo de 3,3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, registrando-se redução na presença de concentrações mais elevadas.

Confirma-se, assim, a importância da utilização de uma fonte de carboidrato no meio de cultura, e a sacarose influencia diretamente os processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos (Guerra et al., 1999). Esses resultados também são coerentes com aqueles apresentados por Berthouly & E-

tienne (2000), que obtiveram formação de embriões somáticos a partir de calos embriogênicos friáveis cultivados em meio secundário contendo apenas BAP.

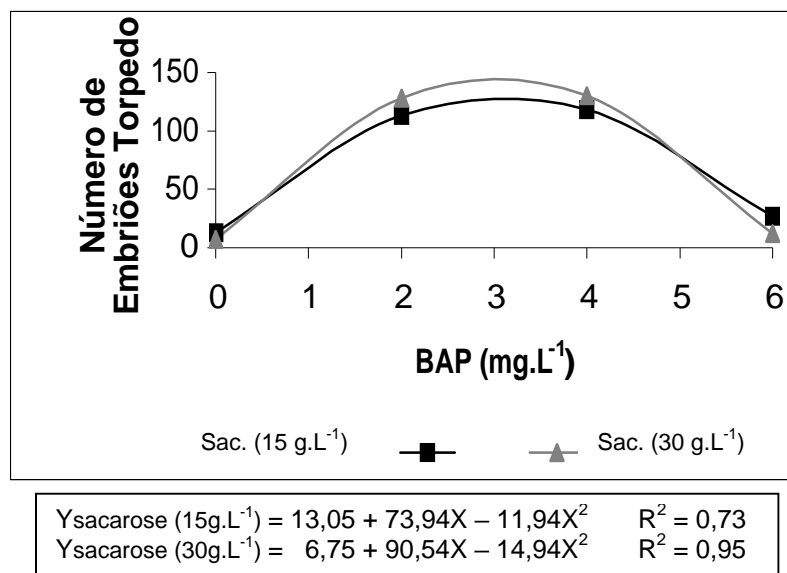
□ **Número de Embriões Torpedo**

A concentração de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, assim como na variável anterior, proporcionou o maior número de embriões torpedo, quando associada a 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 7). Com a adição ao meio de 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, houve uma pequena redução no número de embriões quando comparado com o dobro dessa concentração. A sacarose tem sido a fonte de carboidrato mais recomendada na embriogênese somática. Normalmente a concentração de 3% de sacarose é satisfatória para a iniciação e diferenciação dos embriões somáticos (Guerra et al., 1999), evidenciando, assim, os resultados obtidos para essa variável.



**FIGURA 6** – Número de embriões globulares formados em calos de *C. arabica* cv. Obatã em diferentes concentrações de BAP e Sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2001.





**FIGURA 7** – Número de embriões torpedos formados em calos de *C. arabica* cv. Obatã, em diferentes concentrações de BAP e sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2001.

### CONCLUSÕES

A ação combinada entre 2,4-D e Cinetina é necessária para indução de calos primários mistos.

Os explantes foliares provenientes de plantas da cultivar Obatã induzem a:

Maior diferenciação de calos embriogênicos friáveis quando utiliza-se BAP (8mg.L<sup>-1</sup>) associado ou não com 2,4-D;

Maior formação de embriões a partir de calos embriogênicos friáveis, em meio de cultura acrescido BAP (3 mg.L<sup>-1</sup>) e sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>).

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. M. da C. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1998. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BERTHOULY, M.; ETIENNE, H. Somatic embryogenesis of coffee (Ed.). In: SERA, T.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S. **Coffee biotechnology and quality**. Londrina: SIBAC, 2000. v. 1, p. 71-90.

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, p. 1496-1502, 1993.

BOXTTEL, J. V.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 44, p. 7-17, 1996.

CALIGARI, P. D. S.; SHOHET, S. Variability in somatic embryos. In: REDENBAUGH, K. (Ed.). **Synseeds: applications of synthetic seeds to crop improvement**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 163-174.

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. Multiplicación vegetativa de café, hevea e cacao. In: ROCA, N. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos e aplicaciones**. Turrialba: [s.n.], 1991. p. 612-642.

- DUBLIN, P. Tequíniques de reproduction végétative "in vitro" et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v. 28, n. 4, p. 231-244, oct./dec. 1984.
- GARCIA, E.; MENENDEZ, A. Embryogénese somática a partir de explantes foliares Del cafeto Catimor. **Café, Cacao e Thé**, Paris, v. 31, n. 1, p. 15-22, 1987.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogénese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1999. p. 533-568.
- 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.
- 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.
- 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.
- NORIEGA, C.; SONDAHL, M. R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15., 1993. Montpellier. **Annales...** Paris: ASIC, 1993. p. 73-81.
- 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, A. C. P.; CORDEIRO, A. T.; CAMPOS, R. C.; OTONI, W. C.; ZAMBOLIM, L. Calogénese em *Coffea* via cultura semi-sólida. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos...** [S.l.]: EMBRAPA/CAFÉ, 2000. v. 1, p. 156-159.
- SONDAHL, M. R. Interações de citoquininas e auxinas no crescimento e embriogénese de explantes de *Coffea* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 6., 1978, Ribeirão Preto. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1978. p. 67.
- SONDAHL, M. R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W. R. Propagation of coffee. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. P.; HOLLAENDER, A. (Ed.). **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. New York: Plenum, 1985. p. 215-232.
- SONDAHL, M. R.; SHARP, W. R. High frequency induction of somatic embryos in cultura leaf explant of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift fuer pflanzen physiologie**, Zurich, v. 81, n. 4, p. 395-408, 1977.
- SONDAHL, M. R.; SHARP, W. R. Research in *Coffea* spp and applications of tissue culture methods. In: SHARP, W.; LARSEN, P. D.; PADDOCK, E. F.; RAGHAVAN, V. (Ed.). **Plant Cell and Tissue Culture – principles and applications**. Columbus: Ohio State University, 1979. p. 527-584.
- 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.
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus culture tissue of coffee. **Acta Botanica Neerlandica**, Netherlands, v. 19, n. 4, p. 509-514, 1970.
- TAHARA, M.; YASUDA, T.; UCHIDA, N.; YAMAGUCHI, T. Formation of somatic embryos from protoplast of *Coffea arabica* L. **Hortscience**, Alexandria, v. 29, n. 3, p. 172-174, Mar. 1994.
- WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as na embryogenic group. **Annals of Botany**, London, v. 57, p. 443-462, 1986.
- YASUDA, T.; TAHARA, M.; HATANAKA, T.; NISHIBATA, T.; YAMAGUCHI, T. Clonal propagation through somatic embryogenesis of *Coffea* species. In: COLLOQUE DE L'ASSOCIATION SCIENTIFIQUE INTERNATIONALE DU CAFÉ (ASIC), 16., 1995. **Proceedings...** Kyoto: [s.n.], 1995. v. 2, p. 537-541.
- ZAMARRIPA, A.; DUCOS, J. P.; BOLLON, H.; DUFOUR, M.; PETIARD, V. Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. **Café, Cacao e Thé**, Paris, v. 35, n. 4, p. 233-244, 1991.