



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.) E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ANATÔMICA DAS DIFERENTES ETAPAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO

PATRÍCIA MONAH CUNHA BARTOS

Brasília – DF
Agosto/2012

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.) E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ANATÔMICA DAS DIFERENTES
ETAPAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO**

Dissertação apresentada ao Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Aluna: Patrícia Monah Cunha Bartos

Orientador: Jonny Everson Scherwinski Pereira

Co-Orientador: João Batista Teixeira

Brasília – DF

Agosto/2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 1001610.

B293e Bartos, Patrícia Mnah Cunha.
Embriogênese somática do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e caracterização bioquímica e anatômica das diferentes etapas envolvidas no processo / Patrícia Mnah Cunha Bartos. -- 2012.
xxi, 151 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, 2012.
Inclui bibliografia.
Orientação: Jonny Everson Scherwinski-Pereira ; Coorientação João Batista Teixeira.

1. Anatomia vegetal. 2. Ontogenia. 3. Café. 4. Embriogênese somática. I. Scherwinski-Pereira, Jonny Everson. II. Teixeira, João Batista. III. Título.

CDU 631.52

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.) E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ANATÔMICA DAS DIFERENTES
ETAPAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO**

Patrícia Monah Cunha Bartos

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Botânica.

Banca Examinadora:

Jonny Everson Scherwinski Pereira
Doutor em Agronomia
Presidente da banca

Marcio Rocha
Doutor em Biologia Vegetal
Membro titular

Sueli Maria Gomes
Doutora em Botânica
Membro titular

Kazumitsu Matsumoto
Doutor em Agrobiologia
Membro suplente

Este trabalho é dedicado a todos os meus familiares e pessoas intimamente ligadas à minha vida, que no período de desenvolvimento deste, me apoiaram com amor, paciência, carinho e compreensão, demonstrando que a superação nos momentos difíceis vale a pena, por estarmos ao lado de quem realmente se importa com nosso sucesso. Por tudo o que aprendi, por todas as conversas agradáveis, pelas horas em que tive o privilégio de trabalhar com essa pessoa tão maravilhosa, sou eternamente grata...

À Professora Dra. Lourdes Isabel Velho do Amaral (*in memoriam*);
À Deus;
Aos meus pais, Paulo Roberto e Maria das Graças;
Aos meus pais de coração, Reinaldo e Sandra;
Aos meus irmãos, Paulo Roberto e Milena Cunha;
E ao meu amado, Hugo.

No momento em que surge um desejo,
surge também um caminho...
Anna Sharp

Agradecimentos

No decorrer destes últimos 2 anos contei com o apoio e a amizade de pessoas e instituições, cujos nomes gostaria de destacar:

Paulo Roberto Bartos, pai, herói e amigo, agradeço pelas palavras certas, nas horas certas e pelo amor incondicional.

Maria das Graças, exemplo de mulher, mãe, agradeço por sua dedicação e carinho e por ser a minha melhor amiga.

Reinaldo, um grande exemplo de superação em minha vida.

Sandra, pelo exemplo de caráter e honestidade.

Paulo Roberto, pelo exemplo de coragem, garra e determinação.

Hugo Teixeira Gomes, por ser essa pessoa tão maravilhosa, esse companheiro mais do que especial que Deus colocou na minha vida. Por todo apoio e compreensão nas horas mais difíceis e principalmente pelo seu amor.

Milena Cunha, pelo amor, carinho e atenção.

Beatriz de Castro e Moacir Cunha, pelas orientações de sempre seguir no caminho do bem.

Carlos, Vanice, Carolina, Alice, Sara, Rafael, pela amizade, amor, carinho e paciência durante toda a minha vida e especialmente nessa fase tão importante para mim.

Robson e família, pelo exemplo de união e amor.

Rogério e família, pessoas que tanto admiro.

Aurora Bartos, pelo exemplo de fé.

Pavleska Bartos, exemplo de determinação, pela sua capacidade de valorização mesmo quando nem tudo está bom e principalmente pela sua sincera amizade.

Jesus e família, por me acolherem com tanto carinho em sua casa.

Aurora e família, pessoas que moram no meu coração.

Stella e família, pessoas tão especiais e importantes em minha vida.

Mestre Francisco, por me apresentar de forma tão carinhosa e sublime o caminho da luz e por guiar esses meus passos, às vezes tão errantes.

Andrea, Adriano e família, laços feitos de amor.

Ana Paula Goveia, pela amizade e sinceridade de longa data. Por ser uma pessoa em minha vida que mesmo longe sempre está perto.

Raissa Guimarães Leite, amiga do coração, mulher formadora de opinião.

Renata Cristina, pela sua capacidade, força e por ter se tornado uma grande amiga durante essa caminhada do mestrado.

Juliane Laner de Toledo, pela sua forma amorosa de ser.

Pedro Souza Berbert, exemplo de humildade, carinho e determinação.

Janiffe, pela alegria de viver.

Marta, pela sua coragem.

Dr. João Batista Teixeira, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela orientação e por tantas informações e ensinamentos a mim confiados.

Dr. Jonny Everson Pereira Scherwinski, pela orientação e por todas as contribuições na minha vida profissional.

Dra. Lourdes Isabel Velho do Amaral, agradeço em memória pela sua amizade e pela sua herança de valores, que contribuíram e contribuem para a minha realização pessoal e profissional.

Dra. Sueli Maria Gomes, por todo o apoio na realização das análises anatômicas efetuadas nesse trabalho.

Dr. Marcio Rocha, por partilhar os seus conhecimentos em Bioquímica Vegetal, me dando maior segurança e apoio para cumprir os meus objetivos.

Dr. Clóvis Oliveira Silva, por permitir a realização das análises bioquímicas no Laboratório de Bioquímica Vegetal da Universidade de Brasília.

Dra. Cristiane da Silva Ferreira e Dr. Augusto César Franco, pela orientação durante o estágio Reuni e pela permissão em utilizar as instalações do Laboratório da Fisiologia Vegetal da Universidade de Brasília.

Dra. Nádia Somavilla, pela ajuda na realização dos estudos da Anatomia Vegetal.

Andre Luís Xavier de Souza, por sua ajuda no trabalho do dia-dia, sua atenção, amizade e carinho, seu exemplo de ética, coerência e seriedade.

Fábio Nakamura Noda, grande companheiro de trabalho no laboratório, agradeço pelas conversas e pelo estudo da química analítica.

Bernardo Kruchak Barros, Daiane Veras e Silvia, por todo apoio no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade de Brasília.

Inésio Marinho, pelas inúmeras conversas recheadas de conhecimento.

Carlos Vinícius, Elínea Oliveira, Gabriela Nogueira, Leandro Gomes, Luanna Pena, Ludmilla Natasha, Paulo César, Rosana, Stênio Steferson, Tatiane Monteiro, Zanderluce Gomes, pelo apoio e convívio diário no Laboratório de Cultura de Tecidos II.

Funcionários da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que, de uma forma ou de outra, colaboraram com a infra-estrutura necessária.

Capes, pela concessão da bolsa.

Universidade de Brasília – Unb, por tanto conhecimento adquirido.

Departamento de Botânica da Unb, pelo apoio.

A todos, porque seria impossível nomeá-los sem esquecer alguém, pelo sorriso, pela força, pelas críticas, importantes apoios que me permitiram vencer mais esta etapa.

SOU TODA AGRADECIMENTO!

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.) E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ANATÔMICA DAS DIFERENTES ETAPAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO

RESUMO

A cafeicultura é uma atividade de grande expressão no cenário agroindustrial brasileiro, colocando o Brasil como o maior produtor e maior exportador de café do mundo. *Coffea arabica* L. (Rubiaceae) é responsável por 70% de todo o café produzido e comercializado no mundo. O sucesso dos programas de melhoramento genético do cafeeiro tem disponibilizado variedades mais adaptadas. Entretanto a propagação convencional do cafeeiro é muito lenta. Dessa forma, a propagação clonal da espécie é fundamental para possibilitar uma rápida difusão de novos genótipos de interesse. Sendo assim, a micropropagação via embriogênese somática é a melhor opção para a rápida propagação clonal em larga escala dessa espécie. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi otimizar as estratégias de clonagem via embriogênese somática indireta a partir de folhas jovens do cafeeiro (*Coffea arabica* L. variedade Catuaí Vermelho), além de compreender as principais etapas do processo, com o auxílio de cortes anatômicos e análises bioquímicas. Na fase de indução de calo, foi avaliada a influência de genótipos de *Coffea arabica* (Catuaí Vermelho, Mundo Novo, Híbrido 427-2, Híbrido Clone 12), associados a tipos de folhas fenotipicamente semelhantes; a influência do número de explantes por placa de Petri (4, 6, 8 e 10) e tipos de folhas fenotipicamente semelhantes; o efeito de concentrações de sacarose (1, 2, 3 e 4%); as combinações de caseína hidrolisada (0 e 100 mg.L⁻¹) e extrato de malte (0 e 400 mg.L⁻¹); o efeito de tipos de auxinas (2,4-D e Picloram) e suas concentrações (2,5; 5; 10 e 20 µM) para as variedades Catuaí Vermelho e Mundo Novo, além da citocinina 2-iP (5, 10, 20 e 30 µM). Na fase de multiplicação, foi analisada a influência da densidade inicial de calos embriogênicos (6, 8, 10 e 12 g.L⁻¹); volumes de Erlenmeyers (125 e 250 ml), associados ao ajuste ou não da densidade, bem como a presença e ausência de luz. Experimentos também foram efetuados na fase de regeneração, maturação e germinação de embriões, onde foram testados o número de calos embriogênicos por placa de Petri (4, 6, 8 e 10), o efeito da luz e escuro, associado ao tempo de cultivo (30, 60 e 90 dias), além do efeito da luz e escuro associado a diferentes densidades iniciais de células (1, 5 e 10 g.L⁻¹). Para melhor entender o processo embriogênico, cortes anatômicos seriados foram realizados

em explantes foliares com diferentes períodos de cultivo nos meios primário e secundário (0, 4, 7, 15, 30 dias), calo primário tipo 1, calo primário tipo 2, calo embriogênico, embriões globulares, embriões torpedo, embriões cotiledonares e embriões zigóticos. Por fim, foram extraídos e quantificados os carboidratos, os aminoácidos e as proteínas de diversas fases do desenvolvimento embriogênico. Verificou-se que a variedade Catuaí Vermelho é a que melhor responde ao protocolo de indução de calo. A amostragem de folhas e a percentagem de formação de calo primário tipo 2 influenciam a percentagem de formação de calo embriogênico. A utilização de seis explantes por placa, a concentração de 3% de sacarose, a utilização de caseína hidrolisada associada ao extrato de malte e a concentração de 10 μM de 2-iP proporcionam os melhores resultados para a formação de calo embriogênico. Na fase de multiplicação, o tratamento com densidade inicial de 10 g.L^{-1} de calo embriogênico, o uso do frasco de 250 ml de capacidade, com ajuste parcial da densidade e material cultivado na ausência de luz responderam com as melhores taxas de multiplicação de calo embriogênico. A etapa de regeneração, maturação e germinação de embriões somáticos foi otimizada com a inoculação de quatro ou seis explantes por placa, cultivados por 90 dias em meio de regeneração e, quando transferidos para o meio de germinação líquido, a densidade inicial de 5 g.L^{-1} proporcionou a maior sincronização na maturação dos embriões. Em relação à anatomia das diferentes etapas, foi verificado que a formação de calo primário acontece aos 7 dias de cultivo e esse calos se originaram a partir de divisões sucessivas de células do procâmbio. Calos primários tipo 1 e tipo 2 apresentaram morfologia e tipos celulares distintos e o calo embriogênico é originado do calo primário tipo 1. O metabolismo dos carboidratos, aminoácidos e proteínas auxiliam para uma melhor interpretação e entendimento sobre os processos de indução da embriogênese somática, assim como a regeneração, maturação e germinação dos embriões somáticos.

Palavras-chave: Anatomia vegetal, bioquímica vegetal, ontogênese.

SOMATIC EMBRYOGENESIS OF COFFEE (*Coffea arabica* L.) AND HISTOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS OF THE DIFFERENT STAGES INVOLVED IN THE PROCESS

ABSTRACT

Coffee cultivation is a very important activity for Brazilian agroindustry, positioning Brazil as the largest producer and exporter of coffee in the world. *Coffea arabica* L. (Rubiaceae) is responsible for seventy percent of all the coffee produced and sold worldwide. The success of programs for the genetic improvement of coffee has resulted in the availability of better-adapted varieties. However, conventional propagation of the coffee plant is very slow. Thus, clonal propagation of the species is fundamental to enable rapid proliferation of new genotypes of interest. Micropropagation via somatic embryogenesis is the best option for rapid, large-scale clonal propagation of this species. In this context, this work aimed to optimize cloning strategies via indirect somatic embryogenesis, using young leaves of coffee plants (*Coffea arabica* L. variety Catuaí Vermelho), and to understand the key steps in the process, with the aid of anatomical sections and biochemical analyses. In the callus induction phase, we evaluated the influence of genotypes of *Coffea arabica* (Catuaí Vermelho, Mundo Novo, Híbrido 427-2, Híbrido Clone 12), associated with phenotypically similar leaf types; the influence of the number of explants per Petri dish (4, 6, 8, and 10) and phenotypically similar leaf types; the effect of sucrose concentrations (1, 2, 3, and 4%); combinations of hydrolyzed casein (0 and 100 mg/L) and malt extract (0 and 400 mg/L); the effect of auxin types (2,4-D and Picloram) and their concentrations (2.5, 5, 10, and 20 μ M) for the Catuaí Vermelho and Mundo Novo varieties, as well as cytokinin 2-iP (5, 10, 20, and 30 μ M). In the multiplication phase, we analyzed the influence of the initial density of the embryogenic calli (6, 8, 10, and 12 g/L); the volumes of the Erlenmeyer flasks (125 and 250 ml), associated with the adjustment or non-adjustment of density, as well as the presence or absence of light. Experiments were also conducted in the regeneration, maturation, and embryo-germination phase to test the number of embryogenic calli per Petri dish (4, 6, 8, 10), the effect of light and dark associated with cultivation time (30, 60, and 90 days), in addition to the effect of light and dark associated with the different initial densities of the cells (1, 5, and 10 g/L). In order to gain a better understanding of the embryogenic process, series of anatomical sections

were prepared from foliar explants at different stages of growth in primary and secondary media (0, 4, 7, 15, and 30 days): primary callus type 1, primary callus type 2, embryogenic callus, globular embryos, torpedo embryos, cotyledonary embryos, and zygotic embryos. Finally, carbohydrates, amino acids, and proteins from various phases of embryogenic development were extracted and quantified. It was found that the Catauí Vermelho variety was the one that best responded to the callus induction protocol. The leaf sample and the percentage of primary callus type 2 influenced the formation of embryogenic callus. The use of six explants per dish, a concentration of 3% of sucrose, hydrolyzed casein in combination with malt extract, and a concentration of 10 μ M of 2-iP provide the best results for embryogenic callus formation. In the multiplication phase, treatment with an initial density of 10 g/L of embryogenic callus, the use of a 250 ml capacity flask, with partial adjustment of density, and material cultivated in the absence of light led to the highest rates of multiplication of embryogenic callus. The regeneration, maturation, and germination phase of somatic embryos was optimized with the inoculation of four or six explants per petri dish, cultivated for 90 days in regeneration medium and, when transferred to liquid germination medium, an initial density of 5 g/L yielded the highest synchronization in the maturation of the embryos. In relation to the anatomy of the different stages, it was found that the formation of primary callus occurs at seven days of cultivation, and that these calli originate from the successive division of procambium cells. Primary calli type 1 and type 2 have distinct morphology and distinct cell types, and the embryogenic callus originates from type 1 primary callus. The metabolism of carbohydrates, amino acids, and proteins enables a better interpretation and understanding of the induction processes of somatic embryogenesis, and of the regeneration, maturation, and germination of somatic embryos.

Key-words: Plant anatomy, plant biochemistry, ontogenesis.

ÍNDICE

	Página
BANCA EXAMINADORA	i
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
ÍNDICE.....	x
ÍNDICE DE TABELAS	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xx
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Aspectos gerais do cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.).....	04
2.2. Importância econômica.....	06
2.3. Cultura de Tecidos.....	08
2.4. Embriogênese somática.....	11
2.5. Estudos anatômicos.....	16
2.6. Análises bioquímicas.....	17
3. OBJETIVOS	20
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO 1	
OTIMIZAÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA DO	
CAFEEIRO (<i>Coffea arabica</i> L.) A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES	
RESUMO	32
ABSTRACT	34
1. INTRODUÇÃO.....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1. Embriogênese somática indireta de café (<i>Coffea arabica</i>).....	38
2.1.1. Caracterização dos explantes utilizados.....	38
2.1.2. Coleta, desinfestação e inoculação dos explantes.....	38
2.1.3. Indução, proliferação e morfogênese.....	39

2.1.4. Multiplicação de culturas em suspensão.....	45
2.1.5. Diferenciação, maturação e germinação de embriões somáticos.....	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.1. Indução, proliferação e morfogênese.....	50
3.1.1. Influência do genótipo e da folha sobre a resposta embriogênica.....	50
3.1.2. Influência do número de explantes por placa e da folha sobre a resposta embriogênica.....	53
3.1.3. Influência de diferentes concentrações de sacarose sobre a resposta embriogênica da variedade ‘Catuaí Vermelho’.....	55
3.1.4. Influência de Caseína e Extrato de Malte sobre a resposta embriogênica da variedade ‘Catuaí Vermelho’.....	57
3.1.5. Influência de diferentes concentrações Picloram e 2,4-D sobre a resposta embriogênica da variedade ‘Catuaí Vermelho’.....	59
3.1.6. Influência de diferentes concentrações Picloram e 2,4-D sobre a resposta embriogênica da variedade ‘Mundo Novo’.....	61
3.1.7. Influência de diferentes concentrações de 2-iP sobre a resposta embriogênica da variedade ‘Catuaí Vermelho’.....	63
3.2. Multiplicação de células em suspensão.....	64
3.2.1. Influência da densidade sobre a taxa de crescimento de calo embriogênico cultivado em meio líquido.....	64
3.2.2. Influência do volume do frasco e reajuste parcial na multiplicação de calo embriogênico.....	66
3.2.3. Influência da luz e escuro na multiplicação de células embriogênicas.....	67
3.3. Diferenciação, maturação e germinação de embriões somáticos.....	69
3.3.1. Influência do número de calos por placa em RM gelificado.....	69
3.3.2. Influência da luz e do tempo de cultivo em MGM líquido.....	72
3.3.3. Influência da luz e da densidade em MGM líquido.....	74
4. CONCLUSÕES.....	78
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

CAPÍTULO 2

HISTOLOGIA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L. variedade Catuaí Vermelho) E ONTOGÊNESE DE CALOS

RESUMO	87
ABSTRACT	88
1. INTRODUÇÃO.....	89
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	91
2.2. Análise histológica de neo-formações vegetativas e reprodutivas.....	91
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
3.1. Folha adulta.....	93
3.2. Ontogênese dos calos.....	97
3.3. Calos primários tipo 1, tipo 2 e embriogênico.....	101
3.4. Embrião globular.....	104
3.5. Embrião torpedo.....	105
3.6. Embrião cotiledonar.....	107
3.7. Embrião zigótico.....	109
4. CONCLUSÕES.....	111
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

CAPÍTULO 3

BIOQUÍMICA DAS ETAPAS ENVOLVIDAS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.variedade Catuaí Vermelho) A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES

RESUMO	117
ABSTRACT	118
1. INTRODUÇÃO.....	119
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	122
2.1. Caracterização bioquímica da embriogênese somática.....	122
2.2. Açúcares solúveis totais.....	122
2.3. Amido.....	123
2.4. Aminoácidos totais livres.....	124
2.5. Proteínas Totais.....	125
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	127
3.1. Açúcares solúveis totais.....	127
3.2. Amido.....	133
3.3. Aminoácidos totais livres.....	136
3.4. Proteínas Totais.....	141

4. CONCLUSÕES.....	144
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Escala de produção de café (sacas beneficiadas) nos estados brasileiros em 2010.....	7
Tabela 2. Experimentos de indução, proliferação e morfogênese.....	44
Tabela 3. Experimentos de multiplicação de células em suspensão.....	46
Tabela 4. Experimentos de diferenciação, maturação e germinação de embriões.....	49
Tabela 5. Influência do genótipo e da amostragem de folhas na formação de calo primário tipo 1, após 30 dias de cultivo em meio PM.....	50
Tabela 6. Influência do genótipo e da amostragem de folhas na percentagem de formação de calo primário tipo 2, após 30 dias de cultivo em meio PM.....	51
Tabela 7. Influência de genótipo e da amostragem de folhas na percentagem de formação de calo embriogênico, após 120 dias de cultivo em meio SM.....	52
Tabela 8. Influência da amostragem de folhas e diferentes números de explantes por placa na formação de calo primário tipo 1, na variedade ‘Catuaí Vermelho’, após 30 dias em meio PM.....	53
Tabela 9. Influência da amostragem de folhas e diferentes números de explantes por placa na percentagem de formação de calo primário tipo 2, na variedade ‘Catuaí Vermelho’, após 30 dias em meio PM.....	54
Tabela 10. Influência da amostragem de folhas e diferentes números de explantes por placa na percentagem de formação de calo embriogênico, na variedade ‘Catuaí Vermelho’, após 120 dias em meio SM.....	55
Tabela 11. Influência da concentração de sacarose na formação de calos primários tipo 1 e tipo 2 após 30 dias de cultivo em meio PM e calo embriogênico após 120 dias de cultivo em meio SM na variedade ‘Catuaí Vermelho’.....	56
Tabela 12. Influência de Caseína e Extrato de Malte na formação de calos primários tipo 1 e tipo 2 após 30 dias de cultivo em meio PM e calo embriogênico após 120 dias de cultivo em meio SM na variedade ‘Catuaí Vermelho’.....	58
Tabela 13. Influência de diferentes concentrações de 2,4-D e Picloram na formação de calos primários tipo 1 e tipo 2 após 30 dias de cultivo em meio PM e calo embriogênico após 120 dias de cultivo em meio SM na variedade ‘Catuaí Vermelho’....	60

Tabela 14. Influência de diferentes concentrações de 2,4-D e Picloram na formação de calos primários tipo 1 e tipo 2 após 30 dias de cultivo em meio PM e calo embriogênico após 120 dias de cultivo em meio SM na variedade ‘Mundo Novo’	62
Tabela 15. Influência de diferentes concentrações de 2-iP na formação de calos primários tipo 1 e tipo 2 após 30 dias de cultivo em meio PM e calo embriogênico após 120 dias de cultivo em meio SM na variedade ‘Catuaí Vermelho’	63
Tabela 16. Influência de diferentes densidades iniciais na multiplicação de calo embriogênico na variedade ‘Catuaí Vermelho’ em meio MM líquido.....	66
Tabela 17. Influência do número de explantes por placa sobre a regeneração de embriões globulares da variedade ‘Catuaí Vermelho’ após 60 dias em meio RM gelificado.....	70
Tabela 18. Efeito da luz e do tempo de cultivo sobre a diferenciação de embriões somáticos da variedade ‘Catuaí Vermelho’ cultivados em meio MGM líquido.....	73
Tabela 19. Efeito da luz e da densidade sobre a diferenciação de embriões somáticos da variedade ‘Catuaí Vermelho’ cultivados em meio MGM líquido.	75
Tabela 20. Quantificação dos aminoácidos de maior relevância nos diferentes estádios de desenvolvimento da embriogênese somática de <i>Coffea arabica</i> variedade Catuaí Vermelho expressos em nmol/mg de Massa Seca.....	139

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Etapas da embriogênese somática indireta de <i>Coffea arabica</i> L.. A) Folha utilizada na clonagem. B) Segmentos de folha prontos para serem inoculados em meio PM (meio primário). C) Explante com início de oxidação no centro do segmento de folha. D) Explante com um mês de cultivo em meio PM com a formação de calo primário. E) Explante de folha com setores embriogênicos após 4 meses no meio secundário. F) Agregados celulares embriogênicos em meio de multiplicação líquido. G) Setor embriogênico com formação de embriões globulares em meio de regeneração gelificado. H) Embriões diferenciados ao final do período de cultivo no meio líquido. I) Mudanças após 3 a 4 meses em tubete, em casa de vegetação. Fonte: João Batista Teixeira (2004).....</p>	12
<p>Figura 2. Planta matriz e folhas jovens e bem expandidas. A) Planta matriz cultivada em casa de vegetação. B) Folhas jovens e bem expandidas provenientes do segundo ou terceiro para de folhas de ramos plagiotrópicos.....</p>	38
<p>Figura 3. Explantes foliares inoculados em meio de indução.....</p>	39
<p>Figura 4. Calo primário tipo 1 avaliado por meio de notas. A) Nota 0 para nenhuma formação de calo. B) Nota 1 para presença de baixa formação de calo. C) Nota 2 para média formação de calo. D) Nota 3 para alta formação de calo.....</p>	41
<p>Figura 5. Calo primário tipo 2 avaliado por meio de percentagem. A) Ausência de calo primário tipo 2. B-D) Presença de calo primário tipo 2 em diferentes níveis de desenvolvimento.....</p>	42
<p>Figura 6. Calo embriogênico avaliado por meio de percentagem. A) Ausência de calo embriogênico. B-D) Presença de calo embriogênico em diferentes níveis de desenvolvimento.....</p>	43
<p>Figura 7. Formação de embriões globulares e torpedos avaliados por meio de notas. A) Nota 0: nenhuma. B) Nota 1: baixa. C) Nota 2: média. D) Nota 3: alta.</p>	48
<p>Figura 8. Avaliação da multiplicação de calo embriogênico da variedade ‘Catuaí Vermelho’ cultivadas em frascos de 125 ml de capacidade em função do período de cultivo e diferentes densidades de células por frasco de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....</p>	65

Figura 9. Avaliação da multiplicação de calo embriogênico da variedade ‘Catuaí Vermelho’ cultivadas em diferentes frascos de Erlenmeyer (125 e 250 ml de volume) com reajuste ou sem reajuste da densidade em função do período de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	67
Figura 10. Avaliação da multiplicação de calo embriogênico da variedade ‘Catuaí Vermelho’ cultivadas em frascos de 125 mL de capacidade em função do período e das condições de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	68
Figura 11. Multiplicação de células embriogênicas em meio líquido. Calos embriogênicos cultivados em frascos de Erlenmeyer de 125 ml na presença de luz (A) e na ausência de luz (B).....	69
Figura 12. Regeneração de embriões da variedade ‘Catuaí Vermelho’ em meio RM gelificado. Explantes nas densidades de 4, 6, 8 e 10 explantes por placa, respectivamente. A-D) Linhagem com alto potencial regenerativo. E-H) Linhagem com baixo potencial regenerativo.....	71
Figura 13. Regeneração de embriões somáticos da variedade ‘Catuaí Vermelho’ em meio RM gelificado. Explantes de diferentes linhagens inoculados na mesma placa.....	72
Figura 14. Diferenciação de embriões somáticos da variedade ‘Catuaí Vermelho’ em meio MGM líquido. Embriões cultivados nas densidades de 1, 5 e 10 g.L ⁻¹ , respectivamente, A-C) na luz e D-F) no escuro.....	76
Figura 15. Regeneração e aclimatização de mudas da variedade ‘Catuaí Vermelho’ clonadas por embriogênese somática indireta. A) regeneração e B) mudas após 60 dias de aclimatização.....	76
Figura 16. Esquema apresentando os melhores tratamentos obtidos para a embriogênese somática de <i>Coffea arabica</i>	77
Figura 17. Folha de <i>Coffea arabica</i> var. Catuaí Vermelho cultivada em casa de vegetação e utilizada como explante inicial da embriogênese somática. A. Morfologia externa. B-F. Secções transversais da nervura mediana: notar sistema vascular fechado no centro, com raio parenquimático típico de crescimento secundário. G-H. Secções transversais da ala foliar. Abreviações: AB = face abaxial; AD = face adaxial; C = câmbio; Col = colênquima; Endo = endoderme; EP = epiderme; ET = estômato; F = floema; FV = feixe vascular; M = medula; MX = metaxilema; PA = parênquima; Pcl = parênquima clorofiliano; Per = periciclo; PL = parênquima lacunoso; PP = parênquima	94

paliçádico; PX = protoxilema; R = raio; X= xilema.....	
Figura 18. Folha de <i>Coffea arabica</i> var. Catuaí Vermelho cultivada em casa de vegetação e utilizada como explante inicial da embriogênese somática - detalhes das domácias. A. Morfologia externa. B-E. Secções transversais: notar ausência de tricomas. Abreviações: AD = adaxial; AB = abaxial; M = medula; DOM = domácia; EP = epiderme.....	96
Figura 19. Aspectos anatômicos (B-E) da formação de calo primário em folha da variedade Catuaí Vermelho. A e B) Explante com 7 dias de cultivo em meio PM. C e D) Explante com 15 dias de cultivo em meio PM. E-H) Explante com 30 dias de cultivo em meio PM. AD = adaxial; AB = abaxial; PP = parênquima paliçádico; PE = parênquima lacunoso; EV = elemento de vaso; C = calo; CP1 = calo primário tipo 1; CP2 = calo primário tipo 2.....	99
Figura 20. Aspectos morfológicos (A, C, E) e anatômicos (B, D, F) dos calos primários tipo 1 (A, B) e tipo 2 (C, D) e dos calos embriogênicos (E, F): variação na cor dos calos e nas características de suas células constituintes; notar região com linearização das células (F, seta).....	102
Figura 21. Aspectos morfológicos (A) e anatômicos (B) do embrião globular formado através da embriogênese somática de <i>Coffea arabica</i> var. Catuaí Vermelho. A) Explante contendo vários embriões globulares (seta) após 90 dias em meio de regeneração gelificado. B) Corte longitudinal do embrião globular. EG = embrião globular; MF = meristema fundamental; PD= protoderme.....	104
Figura 22. Aspectos morfológicos (A) e anatômicos (B-D) do embrião em estágio de torpedo durante o processo de maturação após 30 dias em meio de germinação líquido. A) Amostra contendo vários embriões torpedo (seta). B) Corte longitudinal do embrião torpedo. ET = embrião torpedo; MF = meristema fundamental; PC = procâmbio; PD = protoderme.....	106
Figura 23. Aspectos morfológicos (A) e anatômicos (B-D) do embrião em estágio de cotiledonar durante o processo de maturação após 60 dias em meio de germinação líquido. A) Embrião cotiledonar. B) Corte longitudinal do embrião cotiledonar. AML = amiloplastos; EV = elemento de vaso; MF = meristema fundamenta; PC = procâmbio; PD = protoderme.....	107
Figura 24. Aspectos morfológicos (A) e anatômicos (B-D) do embrião zigótico retirado de frutos maduros de plantas matrizes de <i>Coffea arabica</i> var. Catuaí vermelho	109

cultivadas em casa de vegetação. A) Embrião zigótico. B) Corte longitudinal do embrião zigótico. EP = epiderme; PA = parênquima; PC = procâmbio; MF = meristema fundamental.....	
Figura 25. Estádios da embriogênese somática de <i>Coffea arabica</i> variedade Catuaí Vermelho. A) Folha jovem e bem expandida. B) Calo primário tipo 1. C) Calo primário tipo 2. D) Calo embriogênico. E) Embriões globulares após 90 dias de cultivo em meio RM gelificado. F) Embriões torpedo após 30 dias de cultivo em meio MGM líquido. G) Embriões cotiledonares após 60 dias de cultivo em meio MGM líquido. H) Embrião zigótico de frutos maduros.....	127
Figura 26. Concentrações de açúcares totais solúveis nos diferentes estádios da embriogênese somática de <i>Coffea arabica</i> variedade Catuaí Vermelho. As análises foram realizadas a partir de 10 mg de massa seca (MS).....	128
Figura 27. Concentrações de açúcares nos diferentes estádios da embriogênese somática de <i>Coffea arabica</i> variedade Catuaí Vermelho. As análises foram realizadas a partir de 10 mg de massa seca (MS).....	131
Figura 28. Concentrações de amido nos diferentes estádios da embriogênese somática de <i>Coffea arabica</i> variedade Catuaí Vermelho. As análises foram realizadas a partir de 10 mg de massa seca (MS).....	134
Figura 29. Concentrações de aminoácidos totais livres nos diferentes estádios da embriogênese somática de <i>Coffea arabica</i> variedade Catuaí Vermelho. As análises foram realizadas a partir de 10 mg de massa seca (MS).....	137
Figura 30. Concentrações de proteínas totais nos diferentes estádios da embriogênese somática de <i>Coffea arabica</i> variedade Catuaí Vermelho. As análises foram realizadas a partir de 10 mg de massa seca (MS).....	141

SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

- μM** – micromolar
- 2,4-D** – ácido diclorofenoxiacético
- 2-iP** – dimetil-alil-amino-purina
- AB** – face abaxial
- AD** – face adaxial
- AIA** – ácido indolacético
- AIB** – ácido indol butírico
- AMG** – amiloglucosidase
- AML** – amiloplastos
- ANA** – ácido naftalenoacético
- AST** – açúcares solúveis totais
- Atm** – atmosfera
- ATP** – Adenosina trifosfato
- BAP** – 6-benzilaminopurina
- BSA** – Albumina soro bovina
- C** – calo
- CAM** – câmbio
- C.V.** – coeficiente de variação
- CE** – Calo embriogênico
- Col** – colênquima
- CP1** – calo primário tipo 1
- CP2** – calo primário tipo 2
- CV** – Catuaí Vermelho
- DOM** – domácia
- EC** – Embrião cotiledonar
- EG** – Embrião globular
- Endo** – endoderme
- EP** – epiderme
- ESD** – embriogênese somática direta
- ESI** – embriogênese somática indireta
- EST** – estômato

ET – Embrião torpedo
et al. – expressão latina que significa “e outros”
EV – elemento de vaso
Ext. – Extrato
EZ – Embrião zigóticos
F1 – floema
F – folha
F1 – Folha 1
F2 – Folha 2
F3 – Folha 3
F4 – Folha 4
FAA - formaldeído , ácido acético glacial e álcool etílico
FeSO₄H₂O – sulfato ferroso monohidratado
FV – feixe vascular
g – grama
GODPOD – Glicose PAP Liquiform/ Centerlab
h – hora
H₃BO₃ – ácido bórico
Haupt A – solução adesiva
Haupt B – solução de formalina diluída
Hib. – Híbrido
KOH – hidróxido de potássio
L – litro
M – medula
MF – meristema fundamental
mg – miligramas
MGM – Meio de germinação
ml – mililitro
MM – Meio de multiplicação
MN – Mundo Novo
MOPS – ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico
MS – Murashige & Skoog
MX – metaxilema
Na₂.EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico

NaClO – hipoclorito de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

nm – nanometro

°C – Celsius

PA – parênquima

PC – procâmbio

Pcl – parênquima clorofiliano

PD – protoderme

Per – periciclo

Phytigel – agente gelificante

PL – parênquima lacunoso

PM – Meio primário

PP – parênquima paliçádico

PX – protoxilema

R – raio

RM – Meio de regeneração

Rpm – rotações por minuto

SM – Meio secundário

U – unidade

Var. – Variedade

X – xilem

1. INTRODUÇÃO GERAL

O cafeeiro sempre teve grande importância para a economia brasileira e, diante disto, o Brasil se tornou seu maior produtor mundial. Desde a sua chegada ao país, em 1727, o café foi o maior gerador de riquezas e o produto mais importante da história nacional (Carvalho, 1946). Desde então, continua sendo um importante gerador de divisas, rendendo anualmente ao país cerca de 2 bilhões de dólares através da exportação de 26 milhões de sacas ao ano, correspondendo a mais de um terço da produção mundial e contribuindo com mais de 2% do valor total das exportações brasileiras. A cultura do café ainda representa um mercado em franca expansão no mundo, cujo agronegócio gera recursos na ordem de 91 bilhões de dólares ao comercializar as 115 milhões de sacas que, em média, são produzidas, envolvendo aproximadamente meio bilhão de pessoas desde a produção ao consumo final, cerca de 8% da população mundial (Agriannual, 2010).

É nesse mercado em ascensão que estão centrados os interesses da cadeia produtiva do café brasileiro e o volume equivalente à soma da produção dos outros seis maiores países produtores, gerando mais de 8 milhões de empregos diretos e indiretos no país, sendo o setor do agronegócio brasileiro que mais emprega no Brasil (Anuário, 2010).

O café é a segunda bebida mais consumida no mundo sendo o Brasil o segundo maior mercado consumidor, atrás somente dos Estados Unidos. Avaliando a importância desse produto, estudos foram feitos sobre os fatores que influenciam a qualidade do grão e da bebida. De acordo com os resultados, observou-se que os fatores ambientais são os principais responsáveis pela qualidade do sabor, do aroma e do corpo da bebida, consumida diariamente por mais de um bilhão de pessoas no mundo (Reis & Cunha, 2010).

Dentre as plantas produtoras de café, *Coffea arabica* L. é responsável por 70% de todo o café produzido e comercializado no mundo. Esta espécie, pertencente à família Rubiaceae, é uma planta perene de porte arbustivo, produtora de frutos do tipo drupa, contendo, normalmente, duas sementes que representam seu produto econômico (Santos *et al.*, 2003). Esta planta é originária do sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia, pertencente ao gênero *Coffea* L., que com cerca de 103 espécies possui apenas duas espécies de importância comercial: *C. arabica* e *C. canephora* Pierre, representando praticamente 100% da produção mundial (Privat *et al.*, 2008).

O cultivo tradicional de *C. arabica* é geralmente afetado por diversos insetos, tais como o bicho-mineiro, as cigarras, as cochonilhas, a lagarta dos cafezais e a broca-do-café, além de vários patógenos como fungos, ácaros e nematóides endoparasíticos, que causam anualmente aos produtores bilhões de dólares em prejuízos (Zambolin, 2003).

Na cafeicultura, os programas de melhoramento genético têm colocado à disposição dos cafeicultores variedades mais resistentes a doenças e pragas. A utilização de cultivares de cafeeiros mais adaptadas favorece a redução do uso de agrotóxicos, a redução de perdas nas produções e garantem melhor rentabilidade para os produtores. Por outro lado, o período para o desenvolvimento de genótipos superiores de café é longo e trabalhoso, pois são necessários cerca de 30 anos para a obtenção de uma cultivar com características agrônômicas desejáveis. Dessa forma, a propagação acelerada do cafeeiro é fundamental para possibilitar uma rápida difusão dos novos genótipos (Pereira *et al.*, 2003).

De acordo com Ferreira *et al.* (2005), a micropropagação via embriogênese somática é, teoricamente, a melhor opção para a propagação clonal em larga escala de espécies fruteiras, devido às seguintes vantagens: taxa de multiplicação superior a qualquer outro processo de propagação, escalonamento da produção pela manutenção das culturas em meio líquido, eliminando a dependência de períodos específicos de disponibilidade do material propagativo, permitindo estabelecer o período desejado para a obtenção e diminuição dos custos e do tempo da produção.

A embriogênese somática é definida como o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas, possibilitando a propagação acelerada de clones superiores e a manutenção de híbridos interespecíficos (Pereira *et al.*, 2007).

A micropropagação via embriogênese somática do cafeeiro pode ser realizada utilizando-se duas rotas de desenvolvimento: direta, na qual os embriões somáticos originam-se diretamente dos tecidos matrizes sem a formação de estádios intermediários de calos; e indireta, na qual os embriões somáticos formam-se a partir de calos, uma massa de células com crescimento desordenado. A metodologia de embriogênese somática indireta na espécie é a mais promissora, no entanto, ainda precisa ser otimizada e adaptada para a realidade encontrada na produção em larga escala (Donato *et al.*, 2000).

Nas técnicas de propagação *in vitro*, o estabelecimento de células, tecidos ou órgãos vegetais sob condições controladas tem como consequência a interrupção do controle hormonal a que estas células estavam submetidas. Quando expostas a uma nova condição ambiental, as células vegetais podem expressar um potencial morfogênico que não se expressaria fora desse ambiente. As condições de cultivo podem tanto permitir a continuidade de um padrão de desenvolvimento inviabilizado na planta, quanto promover a desdiferenciação e a neomorfogênese vegetal. As etapas que constituem estes eventos podem ser detalhadas pelo emprego de técnicas de análise anatômica (Rodrigues *et al.*, 2004).

A Anatomia Vegetal é o ramo da botânica que estuda as estruturas internas do corpo das plantas, permitindo a descrição de células, tecidos e órgãos quanto à sua ontogênese, constituição e função, podendo auxiliar na compreensão de diversos fenômenos relacionados aos organismos vegetais, dentre os quais as respostas à embriogênese somática e ao cultivo *in vitro* (Apezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro 2003).

A possibilidade de manipulação do sistema de cultivo *in vitro* para fins tecnológicos depende do domínio preciso de princípios de fisiologia do desenvolvimento. Dessa forma, estudos bioquímicos, associados aos estudos morfológicos e histológicos estão sendo realizados durante a embriogênese somática em diferentes plantas, proporcionando uma grande quantidade de informações, incluindo aquelas associadas às alterações bioquímicas relacionadas com a indução da competência embriogênica (Komamine *et al.*, 1991), ao acúmulo de proteínas em calos embriogênicos ou não embriogênicos (Hahne & Lörz, 1988), assim como nas demais etapas envolvidas no processo da embriogênese somática.

Diante desse contexto, o trabalho objetiva otimizar as estratégias de clonagem via embriogênese somática indireta do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e compreender as principais etapas do processo com o auxílio de cortes anatômicos e das análises bioquímicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais do cafeeiro (*Coffea arabica* L.)

A espécie *Coffea arabica* pertence à família Rubiaceae, tribo *Coffeae*, que é composta por dois gêneros: *Coffea* L. (subgêneros: *Coffea* e *Baracoffea*) e *Psilanthus* Hook f. (subgêneros: *Psilanthus* e *Afrocoffea*) que juntos abrangem por volta de 120 espécies. O subgênero *Coffea* possui cerca de 103 espécies e tem como centro de origem regiões tropicais e subtropicais do continente africano, sendo a espécie *C. arabica*, a primeira descrita para o gênero e até hoje a espécie mais importante comercialmente (Bridson, 1994).

Apesar do elevado número, apenas duas espécies são importantes comercialmente: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre. Das espécies citadas, *C. arabica* e *C. canephora* representam, praticamente, todo o café produzido e comercializado no mundo, sendo responsáveis por 70 e 30%, respectivamente. (Privat *et al.*, 2008). As demais espécies, como as *Coffea eugenioides* Moore, *C. salvatrix* Swynn., *C. racemosa* Lour., *C. dewevrei* De Wild, et Th. Dur., *C. liberica* Hiern., *C. congensis* Froehner. e *C. humilis* Chev., entre outras, têm sido importantes para os programas de melhoramento, como fontes de alelos favoráveis para a resistência a pragas, a doenças, a nematóides, à seca, bem como para a qualidade de grãos e demais problemas que afetam a produtividade e a qualidade das variedades de café em nível mundial (Charrier & Berthaud, 1985).

O cafeeiro é uma planta tetraplóide, autofértil, com ocorrência de 10 a 12% de fecundação cruzada. Apresenta raiz pivotante profunda e raízes secundárias ramificadas. O caule único e os ramos ortotrópicos podem dar origem a folhas e também a ramos plagiotrópicos, que produzem folhas e botões florais. As folhas apresentam coloração verde-escura, são elípticas e apresentam lâminas brilhantes. Os frutos são drupas com coloração amarelada ou avermelhada após o amadurecimento. Possuem superfície lisa, exocarpo delgado, mesocarpo carnoso e endocarpo fibroso. O endosperma possui uma película prateada, cuja base abriga o embrião (Graner & Godoy Júnior, 1967).

C. arabica é uma espécie nativa do sudoeste da Etiópia e montanhas circunvizinhas do Sudão e do Quênia. Em 1727 foi introduzida no Brasil a variedade *Typica*, também denominada *Arábica*, *Comum*, *Crioula* ou *Nacional* pelo Sargento Francisco de Melo Palheta, em Belém do Pará, e em seguida levada para o Maranhão e

para a Bahia, e posteriormente para o Rio de Janeiro, expandindo-se para o Vale do Paraíba, Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná, Mato Grosso e Rondônia (Carvalho, 1993).

A variedade ‘Bourbon Vermelho’ foi introduzida provavelmente, em 1859, e foi muito cultivada devido à sua alta produtividade. ‘Sumatra’, foi introduzida em 1896, embora tenha sido pouco cultivada, originou, por hibridação natural com ‘Bourbon Vermelho’ a variedade ‘Mundo Novo’, selecionada a partir de 1943 e até hoje é uma das variedades mais plantadas. A mutação mais importante para a cafeicultura brasileira ocorreu provavelmente na variedade ‘Bourbon Vermelho’, dando origem às cultivares ‘Caturra Vermelho’ e ‘Caturra Amarelo’. Não há informações completas a respeito da origem dessas variedades, porém existem relatos de plantações existentes no Espírito Santo em 1937 (Carvalho *et al.*, 1952).

Essas variedades apresentam um gene mutante que determina a redução do comprimento dos internódios e, conseqüentemente, do porte da planta (Carvalho *et al.*, 1984). Uma hibridação realizada em 1949, no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), entre ‘Caturra Amarelo’ e ‘Mundo Novo’, deu origem às variedades ‘Catuaí Vermelho’ e ‘Catuaí Amarelo’, que reuniram as características de produtividade e rusticidade do ‘Mundo Novo’ com o porte reduzido de ‘Caturra’ (Carvalho & Monaco, 1972). Existem diversas linhagens de ‘Catuaí Vermelho’ e ‘Catuaí Amarelo’, sendo as cultivares mais plantadas no Brasil (Pereira & Sakiyama, 1999; Fazouli *et al.*, 2002).

No processo de dispersão do café foram utilizadas pequenas quantidades de sementes, em consequência a base genética da cafeicultura no Brasil e no mundo é estreita (Carvalho *et al.*, 1993). O estudo da diversidade genética em café, utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD, comprovou a pequena diversidade genética existente entre as variedades (Orozco *et al.*, 1994; Lashermes *et al.*, 1996).

Em relação ao desenvolvimento de variedades resistentes ao bicho mineiro, encontramos trabalhos utilizando tanto os métodos de seleção clássica como os de modificação genética por transgenia (Guerreiro Filho, 1999). No entanto, a cafeicultura brasileira ainda sofre enormes prejuízos causados por insetos-praga, sendo a espécie *Coffea arabica* susceptível à maioria deles. Os principais danos são devidos aos ataques do bicho mineiro (*Perileucoptera coffeella* Guérin & Méneville), da broca do café (*Hypothenemus hampei* Ferrari), das cigarras (*Quesada gigas* Oliver, *Carineta* spp., *Fidicina pronoe* Walker e *Dorisiana* spp.) e das cochonilhas de raiz (*Dysmicoccus cryptus* Hempel). O manejo destas pragas por produtos químicos contribui para

aumentar o custo de produção da cultura e exige especial atenção em relação à época e às condições de aplicação. Além disso, excessivas aplicações de inseticidas poluem o meio ambiente e ameaçam a saúde humana.

2.2. Importância econômica

A espécie *C. arabica* é a mais plantada em todo mundo, sendo de importância econômica para o Brasil, que está classificado como o principal produtor, o maior exportador e o segundo maior consumidor de café do mundo (Mendes, 1997).

O agronegócio internacional do café é uma das atividades mais importantes no aspecto econômico, pela movimentação de mais de 91 bilhões de dólares por ano, e no social, por empregar, direta e indiretamente, mais de meio bilhão de pessoas, ou em torno de 8% da população mundial (Embrapa Café, 2004).

No cenário nacional temos que a safra de café beneficiado em 2009/10 atingiu 48.094,8 mil sacas de 60 quilos cada. Esse resultado representa um acréscimo de 21,9% ou 8.620 mil sacas, quando comparado com a produção de 39.470 mil sacas obtidas na safra de 2009. O maior acréscimo foi observado na produção de café arábica, estimada em 36,72 milhões de sacas, o que representa um ganho sobre a safra anterior de 27,2%, (7.958,1 mil sacas). Para a produção do conilon (robusta) a previsão indica um volume de 11,27 milhões de sacas, ou seja, crescimento de 6,3% (666,3 mil sacas).

Dentro desse cenário de produção nacional, podemos observar detalhadamente na Tabela 1 a produção anual de cada um dos estados brasileiros responsáveis pelo destaque do país no mercado mundial.

Tabela 1. Escala de produção de café (sacas beneficiadas) nos estados brasileiros em 2010.

<i>ESTADOS</i>	<i>ARÁBICA</i>	<i>CONILON</i>	<i>TOTAL</i>
Minas Gerais	24.903,0	252,0	25.155,0
Espírito Santo	2.792,0	7.355,0	10.147,0
São Paulo	4.662,0	-	4.662,0
Paraná	2.284,0	-	2.284,0
Bahia	1.727,9	564,8	2.292,7
Rondônia	-	2.369,0	2.369,0
Mato Grosso	16,3	186,8	203,1
Pará	-	228,6	228,6
Rio de Janeiro	237,6	12,5	250,1
Demais Estados	201,3	302,0	503,3
Brasil	36.824,1	11.270,7	48.094,8

Segundo Tristão (1995), a cafeicultura é a atividade agrícola que mais gera empregos no Brasil, sendo um relevante fator de distribuição de renda. O agronegócio do café, em toda sua cadeia, envolve a produção, o transporte, o armazenamento, a comunicação, a rede bancária, os serviços financeiros, os portos, a embalagem, o processamento, a industrialização e a comercialização, empregando cerca de três milhões de brasileiros. O complexo agroindustrial do café no país movimenta, anualmente, cerca de 8,1 bilhões de reais, assim distribuídos: 3,6 na indústria, 4,3 na exportação e 0,2 em solúveis (Rufino & Arêdes, 2009), envolvendo, direta e indiretamente, 10 milhões de pessoas e, pelo menos, 1.700 municípios (Resende *et al.*, 2000).

O café é um dos poucos produtos cujo valor econômico cresce significativamente com a melhoria da qualidade. Com a globalização, torna-se importante que a cafeicultura brasileira seja mais moderna, para o país ser mais competitivo na atividade. Um dos fatores determinantes que vêm provocando o declínio da participação brasileira no mercado internacional do café tem sido a falta de um bom padrão de qualidade de seu produto. A estratégia nacional era exportar grandes quantidades para um mercado em que a exigência de qualidade era crescente. Os principais concorrentes brasileiros perceberam mais cedo a importância de oferecer um

produto de melhor qualidade e de adotar estratégias de *marketing*. Dessa forma, alcançaram maior segurança de venda, conquistaram novos mercados e obtiveram melhores preços no mercado internacional (ABIC, 2009). Cafés de boa qualidade, denominados especiais, sempre terão destino certo, mercado comprador e consumidor disposto a pagar bons preços pelo prazer de ter uma bebida que lhe agrada, o que descortina uma nova dimensão da cadeia produtiva do café (Leite & Silva, 2000).

O cafeeiro *Coffea arabica* é cultivado em cerca de 70 países dos diversos continentes, ocupando área em torno de 12 milhões de hectares, sendo consumido por centenas de milhões de pessoas, apesar de apenas 19% da população mundial apreciar a bebida (Zambolin, 2003). Diante disto, os consumidores de café têm exigido cada vez mais qualidade, associada a produtos diferenciados, produzidos com responsabilidade social, com o mínimo de agressão ao meio ambiente e com certificado de origem. No entanto, para se ter boa qualidade e atender às exigências dos consumidores e também dos compradores e industriais, deve-se desenvolver, através do melhoramento genético, variedades que possuam diversos atributos que confirmam boa qualidade ao produto, tais como a resistência a pragas e doenças, para que haja menor utilização de defensivos e características bioquímicas adequadas para proporcionar um bom sabor, aroma e o corpo que o consumidor deseja (Leite & Silva, 2000).

2.3. Cultura de tecidos

A cultura de tecidos de plantas é uma biotecnologia que envolve diferentes técnicas, nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é cultivado de forma asséptica em um meio nutritivo, sob condições controladas de temperatura e luminosidade (Souza *et al.*, 2006). O princípio básico da cultura de tecidos vegetais se baseou na teoria da totipotencialidade das células, proposta por Schleiden, em 1838 e Schawann, em 1839, ou seja, a capacidade de células vegetais poderem originar um novo indivíduo, em razão de toda a informação genética necessária para a regeneração completa de outra planta estar presente no ambiente celular (Gautheret, 1983). Somente em 1902 é que o botânico alemão Haberlandt mostrou a aplicação prática desta teoria *in vitro*, culminando com a formulação do conceito de cultura asséptica de células ao cultivar células de tecidos somáticos de plantas em solução nutritiva (Krikorian & Berquam, 1969).

As principais técnicas da cultura de tecidos vegetais são constituídas da propagação clonal de mudas em larga escala (micropropagação), da regeneração de plantas livres de vírus e patógenos (limpeza clonal), da conservação de recursos genéticos de plantas (conservação de germoplasma), da produção de haplóides e duplos haplóides e da produção de plantas transgênicas (Torres *et al.*, 1998).

De forma geral, para que o sucesso das diferentes técnicas da cultura de tecidos seja alcançado, é necessário que ocorra o crescimento e a diferenciação celular dos explantes utilizados (Kerbaudy, 1999). O crescimento e o desenvolvimento das plantas são controlados por substâncias orgânicas naturais denominadas fitormônios, as quais são sintetizadas em pequenas concentrações e em determinadas regiões das plantas, sendo distribuídas para diferentes órgãos, nos quais exercem suas funções, inibindo ou estimulando processos fisiológicos e/ou bioquímicos vitais. Substâncias com efeitos similares ao de fitormônios podem ser sintetizadas em laboratório e são denominados reguladores de crescimento ou fitorreguladores (Taiz & Zeiger, 2004).

Na maioria dos sistemas de cultura de tecidos, esse padrão de desenvolvimento é determinado principalmente pela utilização de reguladores de crescimento (Kerbaudy, 1999), que reproduzem o que ocorre naturalmente nas plantas e exercem sua ação por reconhecimento de receptores específicos, presentes em células responsivas, que traduzem os sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos na planta (Guerra *et al.*, 1999).

Outro fator importante para a capacidade das células se desdiferenciarem e rediferenciarem é a presença de componentes orgânicos e inorgânicos dos meios de cultura (Wareing & Phillips, 1982). Historicamente, diversas formulações de meio de cultura têm sido empregadas no cultivo *in vitro*, as quais diferem entre si basicamente em relação à composição e concentração destes componentes. Diante disso, diversos estudos de nutrição mineral foram realizados para o desenvolvimento de soluções nutritivas que atendessem às necessidades vitais das plantas, estudos esses que culminaram na formulação da solução nutritiva de Knop. A partir dessa solução Gautheret (1934) formulou os macronutrientes do seu meio nutritivo. Em paralelo, White (1932; 1933; 1934; 1938) desenvolveu uma composição diferente de macronutrientes com base na solução nutritiva de Uspenski & Uspenskaia (1925) através de uma série de estudos com cultura de raízes de trigo e de tomate. Durante muito tempo, o meio White foi utilizado como meio básico para a cultura de uma grande variedade de tecidos de diversas espécies (Caldas *et al.*, 1998).

Posteriormente, foram realizadas modificações nesse meio nutritivo visando otimizar o crescimento de calos na cultura *in vitro*. Essas mudanças envolveram, principalmente, o aumento das concentrações dos sais em geral, uma diminuição na concentração de sódio e o acréscimo de nitrogênio na forma de amônio para complementar o nitrato, originando o meio MS que é assim chamado em referência aos seus autores, Murashige & Skoog, (1962). Esse meio foi desenvolvido a partir de testes de suplementação do meio White com extrato de folhas de fumo por Murashige & Skoog, (1962).

Diante do aumento das concentrações dos sais no meio nutritivo MS, principalmente amônio e nitrato, um maior crescimento de células e tecidos de plantas foi alcançado para a maioria das espécies vegetais, tornando o meio de cultura MS o mais utilizado em trabalhos com a cultura de tecidos de plantas (Pasqual, 2001). No entanto, em *C. arabica* diversos trabalhos têm demonstrado que os melhores resultados no cultivo *in vitro* da espécie são obtidos quando a concentração dos sais de MS é reduzida à metade (Boxtel, 1994), ou mesmo à quarta parte (Yasuda *et al.*, 1985).

O nitrogênio, sob forma de nitrato de amônio, é um elemento chave no meio de cultura MS. Este componente afeta numerosas respostas *in vitro*, sendo determinante no sucesso da cultura de tecidos (Ammirato, 1983; Elkonin & Pakhomova, 2000; Leljak-Levanic *et al.*, 2004). Por ser constituinte de várias biomoléculas essenciais como aminoácidos, ácidos nucléicos, proteínas, enzimas e outros, sua assimilação se dá em diversos processos metabólicos da planta (Magalhães & Wilcox, 1987).

Segundo Ammirato (1983), a presença do ferro no meio nutritivo MS também é um fator chave, pois além de ser essencial na diferenciação celular e nas transformações energéticas, está diretamente relacionado ao metabolismo de ácidos nucléicos, atuando dessa forma como ativador enzimático (Caldas *et al.*, 1998; Utino *et al.*, 2001).

Além dos reguladores de crescimento e dos compostos orgânicos e inorgânicos, as plantas cultivadas *in vitro* também requerem a adição de carboidratos, como a sacarose, para suprir suas necessidades metabólicas, seja participando na geração de energia ou como fontes de esqueletos carbônicos para os vários processos biossintéticos implicados na diferenciação e crescimento de suas células (Leifert *et al.*, 1995).

2.4. Embriogênese somática

A micropropagação via embriogênese somática é uma técnica da cultura de tecidos definida como o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, formando uma estrutura bipolar, chamada embrião somático, que ao final do processo de diferenciação dará origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas. Isso possibilita a produção clonal de um elevado número de plantas em um curto espaço de tempo, ocupando uma área física bastante reduzida, se comparada com os métodos convencionais de multiplicação. Além do mais, permite a retirada de explantes sem a destruição da planta matriz, um fator de considerável importância em se tratando da raridade de algumas plantas, propagação acelerada de clones superiores e a manutenção de híbridos interespecíficos (Pereira *et al.*, 2007).

A embriogênese somática também pode servir como sistema modelo para estudar os eventos moleculares, citológicos, fisiológicos e de desenvolvimento envolvidos no processo embriogênico das plantas (Dodeman *et al.*, 1997). A principal vantagem desses sistemas experimentais *in vitro* é que as células embriogênicas são acessíveis para manipulação pela maioria das técnicas moleculares e celulares, em contraste com as células gaméticas e zigóticas que se desenvolvem intimamente ligadas ao tecido maternal.

A embriogênese somática *in vitro* apresenta dois padrões básicos de desenvolvimento de embriões somáticos (Sharp *et al.*, 1980). Um padrão é a embriogênese somática direta (ESD), na qual os embriões somáticos originam-se diretamente de tecidos matrizes sem a formação de estádios intermediários de calos, realizada em mais de 60% dos protocolos (Gaj, 2004) já na embriogênese indireta (ESI), os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação. Em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma sequência de desenvolvimento do zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Guerra *et al.*, 1999).

A embriogênese somática indireta na maioria das espécies vegetais é a metodologia mais promissora, no entanto, ainda precisa ser otimizada e adaptada para a realidade encontrada na produção de mudas em larga escala. Essa metodologia é composta de quatro etapas principais: indução, multiplicação, regeneração e diferenciação, que envolvem desde a indução de massas desdiferenciadas até a

formação de novas plantas (Donato *et al.*, 2000) A Figura 1 ilustra todas essas etapas envolvidas na embriogênese somática indireta do cafeeiro, *Coffea arabica* var. Catuaí Vermelho.

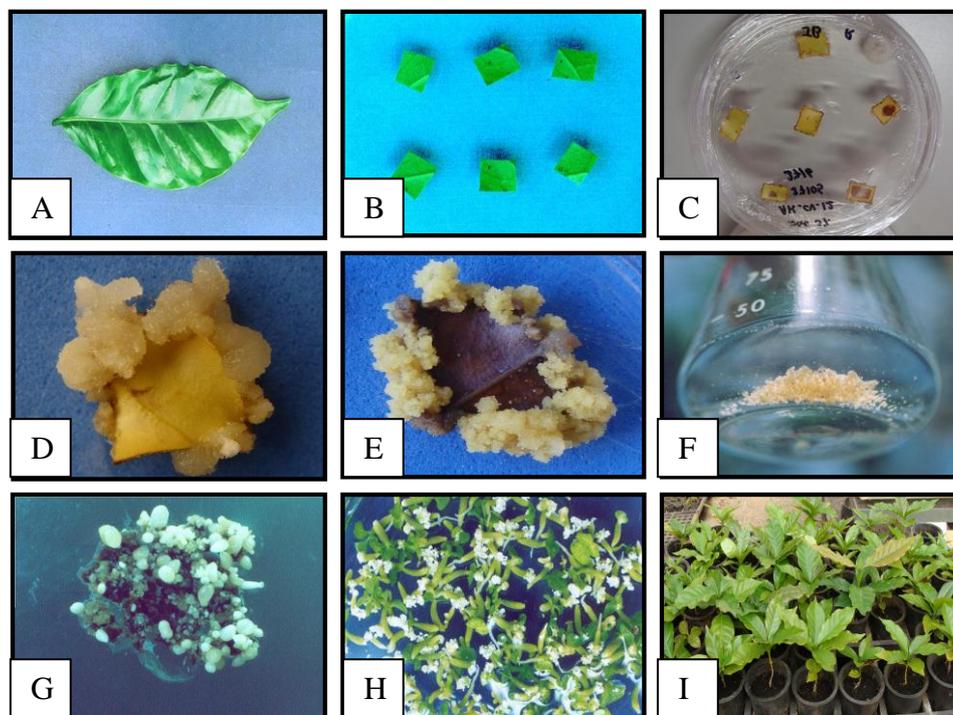


Figura 1. Embriogênese somática indireta de *Coffea arabica* L.. **A)** Folha utilizada na clonagem. **B)** Segmentos de folha prontos para serem inoculados em meio PM (meio primário). **C)** Explante com início de oxidação no centro do segmento de folha. **D)** Explante com um mês de cultivo em meio PM com a formação de calo primário. **E)** Explante de folha com setores embriogênicos após 4 meses no meio secundário. **F)** Agregados celulares embriogênicos em meio de multiplicação líquido. **G)** Setor embriogênico com formação de embriões globulares em meio de regeneração gelificado. **H)** Embriões diferenciados ao final do período de cultivo no meio líquido. **I)** Mudanças após 3 a 4 meses em tubete, em casa de vegetação. Foto: João Batista Teixeira, Brasília, DF, 2004.

A indução da embriogênese somática é o desencadeamento de um processo morfológico pela exposição do explante a um estímulo físico, químico ou biológico, sendo a etapa mais crítica para o estabelecimento das culturas embriogênicas *in vitro* (Guerra & Nodari, 2006). Segundo Merkle *et al.* (1995), a indução da embriogênese somática está relacionada a alterações no padrão de expressão gênica dos explantes, com reprogramação das células que estarão envolvidas no processo embriogênico. Entretanto, o potencial embriogênico não é somente determinado geneticamente, mas também é influenciado pelo meio de cultura e pela qualidade do explante (Loyola-Vargas *et al.* 1999).

Em espécies do gênero *Coffea*, culturas embriogênicas foram relatadas pela primeira vez em 1970, por Staritsky, em *C. canéfora*. Desde então, muitos trabalhos têm demonstrado o alto potencial embriogênico das espécies do gênero, partindo de diferentes fontes de explantes, como fragmentos de entrenós (Dublin, 1980), folhas (Herman & Haas, 1975; Söndahl & Sharp, 1977; Dublin, 1981; Pierson *et al.*, 1983; Noriega & Söndahl, 1993; Berthouly & Michaux-ferriere, 1996), folhas cotiledonares (Söndahl *et al.* 1985), protoplastos (Schopke *et al.*, 1987; Acuña & De Pena, 1991) e suspensões celulares (Spiral *et al.*, 1991; Etienne-Barry *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2000).

Em *C. arabica*, a indução da embriogênese somática é normalmente realizada por meio de segmentos foliares em meios apropriados, onde as auxinas e as citocininas têm um papel determinante (Teixeira *et al.*, 2001). Nessa espécie, duas estratégias têm sido utilizadas para a obtenção de tecidos embriogênicos: a primeira envolve o cultivo do explante sobre um único meio de cultura, suplementado apenas com a citocinina (Yasuda *et al.*, 1985), ou da combinação da auxina com a citocinina (Pierson *et al.*, 1983); a segunda estratégia utiliza o cultivo de explantes em um meio primário (de indução), seguido da transferência dos explantes para o meio secundário, tido como de diferenciação (Dublin, 1984) ou de condicionamento, que difere do primeiro por possuir menor razão auxina/citocinina (Noriega & Söndahl, 1993).

Na embriogênese somática indireta do cafeeiro, diferentes tipos de calos podem ser obtidos, que são os calos primários de crescimento não persistente (tipo 1), os calos primários de crescimento persistente (tipo 2) e os calos embriogênicos. Estes tipos de calos são fenotipicamente diferentes (Figura 19).

O calo primário tipo 1 tem início após duas a três semanas de cultivo no meio primário – PM (Teixeira *et al.*, 2004), forma-se em grânulos nos bordos do segmento de folha e permanece em crescimento ativo por mais algumas semanas no meio secundário – SM (Teixeira *et al.*, 2004). Inicialmente, apresenta coloração clara e crescimento ativo. Entretanto, após aproximadamente 60 dias de cultivo no meio SM, observa-se um escurecimento gradativo e redução do crescimento.

Os calos embriogênicos induzidos nessa espécie podem ser caracterizados como um conjunto de agregados celulares, contendo células pequenas e esféricas (15–20 mm de diâmetro), com citoplasma denso, com o nucléolo proeminente, um núcleo basofílico e de ciclo celular rápido (Söndahl *et al.*, 1985). Outra característica geral destes calos é a semelhança resultante das fases iniciais da cultura: alta razão auxina/citocinina

durante a cultura primária (meio de indução), e baixa razão auxina/citocinina ou ausência de reguladores de crescimento durante a cultura secundária (meio de condicionamento) (Sondahl & Sharp, 1977).

Após a indução de calos embriogênicos, é realizada a multiplicação das culturas embriogênicas, que consiste geralmente da redução nos níveis dos reguladores de crescimento do meio de cultura. Essa redução permite ciclos repetitivos de divisão celular e o controle dos processos de diferenciação (Guerra *et al.*, 1999). É nessa fase que geralmente suspensões celulares são estabelecidas (Gorret *et al.*, 2004).

A multiplicação das culturas embriogênicas é baseada na capacidade dos calos embriogênicos poderem continuar a dar origem a embriões somáticos durante muitas subculturas, por longos períodos de tempo. Segundo Pasqual *et al.* (1997), a produção massal de embriões somáticos está intimamente ligada à proliferação contínua de nódulos pró-embriogênicos em cada subcultura.

Em *C. arabica*, alguns autores têm descrito protocolos visando à otimização da multiplicação de setores embriogênicos (Boxtel & Berthouly, 1996). Estudos para estabelecer melhores protocolos foram realizados utilizando meio gelificado, porém, a taxa de multiplicação mostrou-se muito baixa para seu uso na produção de mudas de café em larga escala (Söndahl & Sharp, 1977). Em vista disso, desde os primeiros trabalhos com café, houve várias tentativas, com diferentes graus de sucesso, para estabelecer protocolos de multiplicação em meio líquido, proporcionando às culturas um aumento da disponibilidade de água e nutrientes e diminuindo assim a resistência à difusão da água e dos nutrientes, quando comparados a meios nutritivos de consistência semi-sólida (Staritsky & Hasselt, 1980).

Após a etapa de multiplicação, é realizada a fase de diferenciação celular, também conhecida como fase de regeneração de embriões somáticos, que consiste em fornecer estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais que interrompam os ciclos repetitivos de divisão celular da fase anterior, para que ocorra o início da diferenciação e obtenção de embriões somáticos. Nessa etapa alguns fatores exercem grande influência no desempenho da regeneração de embriões somáticos, destacando-se principalmente as composições e as concentrações dos reguladores de crescimento utilizados e o aumento da osmolaridade no meio de cultura, sabendo-se que os mesmos podem variar de acordo com a espécie (Guerra *et al.*, 1999).

Segundo Sondahl & Sharp (1977), no processo de embriogênese somática indireta em cafeeiro, os embriões surgem de calos primários não diferenciados, os quais

são de cor marrom, globulares e compactas, ficando situados nos bordos dos explantes e são observados em, no máximo, 20 embriões/explante. Os embriões surgem também de calos secundários embriogênicos friáveis, que originam cerca de 100 a 300 embriões/explante, quando cultivados em meio de cultura semi-sólido. Em cafeeiros, a regeneração de embriões somáticos a partir de calos embriogênicos do tipo HFSE (High frequency somatic embryos) foi bem documentada por Sondahl & Sharp, 1977. Entretanto, a falta de sincronização dos embriões e o surgimento de embriões anormais durante esta etapa têm sido relatados em várias publicações.

Após a fase de regeneração, é realizada a diferenciação ou germinação de embriões somáticos que consiste na formação de plântulas a partir de embriões somáticos maduros. Nos protocolos de embriogênese somática, a germinação dos embriões é usualmente realizada em meios de cultura livre de reguladores de crescimento. Contudo, em algumas espécies, incluindo *C. arabica*, o uso de alguns tipos de citocininas como o BAP (6-benzilaminopurina) e a zeatina melhoram o desenvolvimento e, conseqüentemente, as taxas de germinação dos embriões somáticos (Swati *et al.*, 2002).

A embriogênese somática *in vitro* também é influenciada pelo sistema de cultivo utilizado para os diferentes estádios embriogênicos. Calos embriogênicos de diversas espécies vegetais vêm sendo cultivados com sucesso em vários sistemas de cultivo utilizando meio nutritivo líquido em frascos de *Erlenmeyer* sob agitação (Boxtel & Berthouly, 1996), em biorreatores de imersão contínua (Noriega & Sondahl; 1993) e biorreatores de imersão temporária (Teisson *et al.*, 1995). Essas tecnologias têm sido amplamente testadas na produção massal de mudas, a fim de otimizar protocolos preestabelecidos, solucionar certos problemas enfrentados principalmente nas etapas onde ocorre a formação dos embriões e diminuir os custos de produção, uma vez que gastos com agentes gelificantes são reduzidos.

O processo de aclimatização representa uma etapa importante na cultura de tecidos, sendo um fator limitante no processo de micropropagação (Grattapaglia & Machado, 1990). Este processo consiste na retirada e transferência das plântulas do meio de cultivo *in vitro* para outro tipo de substrato e ambiente, promovendo uma adaptação gradativa (Moreira, 2001).

Segundo Catunda (2004), o processo de aclimatização é crucial para a obtenção de mudas de alta qualidade provenientes da cultura de tecidos. A otimização neste processo envolve o suprimento adequado de nutrientes, o uso de substratos adequados, a

utilização de substâncias reguladoras de crescimento e o controle do ambiente de cultivo, entre outros cuidados.

O estresse hídrico das plântulas é, geralmente, o maior problema encontrado no transplântio. Embora as plântulas sejam aparentemente perfeitas, elas apresentam uma série de deficiências anatômicas, induzidas pela condição *in vitro*, que dificultam o controle da transpiração e ocasionam rápida perda de água. Entre as deficiências podem ser citadas: pequena formação de ceras epicuticulares e baixa funcionalidade dos estômatos sob condição de baixa umidade relativa do ar (Sutter, 1988); aumento na densidade estomática (Wetzstein & Sommer, 1982); localização mais superficial dos estômatos na epiderme da folha (Capellades *et al.*, 1990); reduzida diferenciação dos mesófilos das folhas e alta proporção de espaços intercelulares (Capellades *et al.*, 1990; Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997); deficiente conexão entre o sistema vascular do caule e raízes (Grout & Aston, 1977); raízes são, de modo geral, quebradiças, pouco funcionais na absorção de nutrientes e, freqüentemente, morrem ao serem transferidas para o solo (Grout & Aston, 1977; George, 1996; Zimmerman, 1981). Entretanto, alguns autores comprovam a eficiência do sistema radicular formado *in vitro* e a sobrevivência após a transferência para as condições *ex vitro* (Carvalho, 1997; Díaz-Pérez *et al.*, 1995; Hicks, 1987; Sutter & Luza, 1993).

2.5. Estudos anatômicos

O emprego das técnicas de análise anatômica permite o detalhamento de eventos que ocorrem quando espécies vegetais são cultivadas *in vitro*. Estudos histológicos podem ser realizados para a verificação e confirmação do desenvolvimento das gemas adventícias (organogênese) ou de embriões somáticos (embriogênese somática) e a definição da origem direta ou indireta (Rodrigues *et al.*, 2004).

Caracteres morfológicos e anatômicos tanto vegetativos quanto reprodutivos estão relacionados com determinadas condições ambientais, embora a relação entre esses caracteres adaptativos e as condições ambientais, em muitos casos, seja difícil de estabelecer (Ehrendorfer, 1973). No cultivo *in vitro*, as plantas podem apresentar características peculiares como abundância de espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido, reduzida capacidade de sustentação (esclerênquima e colênquima) e outros tipos de desordens (Campostrini & Otoni, 1996).

Na embriogênese somática, a realização de estudos histológicos possibilita a observação dos tipos celulares a partir dos quais surgem os embriões somáticos, permitindo o aumento da manipulação das respostas embriogênicas (Barbosa, 2003).

O estudo do desenvolvimento de células ou grupos de células por técnicas histológicas tem se mostrado útil para o entendimento da embriogênese em várias espécies vegetais. Em *Hevea brasiliensis*, o tempo adequado de subcultivos foi determinado por meio de análises histológicas (Michaux-Fèrriere & Carron, 1989). Ao se utilizar embriões zigóticos de *Cocos nucifera* como fonte de embriogênese somática, verificou-se que o processo tem origem principalmente na plúmula (Chan *et al.*, 1998), e o cultivo desta estrutura vem potencializando os protocolos de embriogênese dessa espécie (Pérez-Nuñez *et al.*, 2006).

Em *Coffea arabica*, a estrutura fina dos embriões somáticos foi claramente identificada durante os seguintes estádios de desenvolvimento sequencial: célula esférica única, embrião de forma globular e suspensor conspícuo, embrião de forma globular típico, embrião de forma alongada, embrião com forma de coração precoce, embrião com forma típica de coração, a forma de torpedo, e finalmente, embrião em estágio cotiledonar com o suspensor bem desenvolvido (Nakamura *et al.*, 1992).

Posteriormente, Menéndez-Yuffá & Garcia (1997) verificaram que a proliferação celular começa por volta do quarto dia de cultura, principalmente na região da nervura central. Essa proliferação tem início no mesofilo, especificamente no parênquima esponjoso onde ocasionalmente, algumas divisões ocorrem também no parênquima paliçádico. Foi observado também que a divisão das células epidérmicas não ocorreu. E que na nervura principal a proliferação ocorre no parênquima perivascular em ambos os lados da folha. Diante disso, o acompanhamento e a identificação das estruturas presentes nos diferentes estádios durante a embriogênese somática por meio de estudos anatômicos são necessários para melhor entendimento dos processos morfogênicos e a otimização de protocolos de clonagem da espécie.

2.6. Análises bioquímicas

Segundo Barendse & Peeters (1995), em todos os sistemas vegetais, os processos de desenvolvimento são resultado de um complexo controle espacial e temporal, onde vários hormônios atuam na regulação da expressão de múltiplos genes.

Esses hormônios vegetais são denominados reguladores químicos de ocorrência natural que produzem respostas metabólicas e fisiológicas e que são efetivos em pequenas quantidades e são, provavelmente, os mais importantes mediadores na transdução de sinais (Taiz & Zeiger, 2009). No entanto, além dos reguladores de crescimento outros compostos estão envolvidos nos processos de desenvolvimento vegetal, como os carboidratos, os lipídios, os aminoácidos e as proteínas (Guerra *et al.*, 1999).

Os carboidratos constituem um grupo de compostos que inclui açúcares e outras moléculas mais complexas constituídas por subunidades de açúcares mais simples, cuja principal função é o fornecimento de energia química aos processos celulares (Brum *et al.*, 1994). De acordo com Vieira *et al.* (1991), existem outras funções atribuídas aos carboidratos, tais como, os amidos que são fontes de reserva e a celulose e a hemicelulose que possibilitam a sustentação, entre outras mais específicas.

Dentro do desenvolvimento embriogênico, os carboidratos desempenham importante papel no processo de formação do embrião, atuando como fonte de energia, esqueletos carbônicos e/ou como sinalizadores. Na maioria das plantas, no processo de formação do embrião, a glucose e a frutose estão presentes na fase inicial de desenvolvimento embrionário, e diminuem gradualmente, contrariamente à sacarose que aumenta na fase final do desenvolvimento embrionário (Focks & Benning, 1998). Já na fase de maturação dos embriões ocorre à síntese tanto de proteínas quanto de carboidratos, principalmente quando os embriões atuam para torná-lo metabolicamente quiescente e tolerante à dessecação (Baud *et al.*, 2002).

Os aminoácidos são formados através da incorporação do nitrogênio absorvido aos compostos de carbono como amino-grupos e são compostos básicos para a biossíntese de proteínas, ácidos nucleicos e substâncias nitrogenadas do metabolismo secundário, neste caso, atuam como precursores de hormônios vegetais e de compostos envolvidos na defesa vegetal (Malavolta, 1997; Larcher, 2000).

Os aminoácidos também têm se mostrado como reguladores morfogênicos em vários sistemas de cultivo *in vitro* (Tupy *et al.*, 1983, Kobayashi *et al.*, 1999). Por esse motivo, frequentemente os pesquisadores têm suplementado os meios de cultura com aminoácidos ou proteínas hidrolisadas com intuito de favorecer o desenvolvimento das culturas *in vitro*, embora alguns aminoácidos sejam inibitórios (Gamborg, 1970).

A determinação dos teores de aminoácidos a partir de extratos vegetais é muito utilizada na pesquisa fisiológica, pois a reação de uma planta ou de seus órgãos a um

ferimento ou a uma situação de estresse provoca a síntese de proteínas, podendo então ser caracterizada pela composição dos aminoácidos produzidos (Passos, 1996).

A síntese de proteínas é a função essencial das células. Na sua ausência, o crescimento e a manutenção dos órgãos cessam e isso representa um fator limitante à taxa de crescimento das plantas (Porter *et al.*, 1991).

Conforme mencionado anteriormente, as proteínas são polímeros, moléculas complexas compostas por um determinado número de subunidades designadas aminoácidos. Sendo as proteínas moléculas complexas, essas são formadas por várias centenas de aminoácidos. O número das diferentes sequências de aminoácidos e, portanto, a possível variedade de moléculas de proteínas mostra-se enorme (Raven *et al.*, 1996). De acordo com Brum *et al.*, (1994), cada proteína é formada por uma sequência única de aminoácidos, o que determina sua função dentro do ambiente celular.

O metabolismo de proteínas é extremamente ativo e dependente do tipo e idade do órgão. Órgãos e tecidos em crescimento ou de estoque são caracterizados pela síntese intensa de proteínas, entretanto, em folhas senescentes ocorre a degradação das mesmas. A síntese de proteínas é caracterizada pela alta e rápida capacidade de adaptação molecular, funcional e fisiológica, em relação ao meio (Larcher, 2000).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Otimizar o protocolo de embriogênese somática indireta de café para a produção de mudas em larga escala, com o auxílio do estudo da ontogênese e da bioquímica.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a influência do genótipo, da folha, do número de explantes por placa, da concentração de sacarose, da caseína e do extrato de malte e concentração de auxina (2,4-D e Picloram), concentração de 2-iP na resposta embriogênica da variedade ‘Catuaí Vermelho’;
- Avaliar a influência da concentração de auxina (2,4-D e Picloram) na resposta embriogênica da variedade ‘Mundo Novo’;
- Avaliar a influência da densidade, do volume do frasco e reajuste parcial da densidade e da luz e do escuro na multiplicação de células em suspensão da variedade ‘Catuaí Vermelho’;
- Avaliar a influência do número de explantes por placa na regeneração de embriões da variedade ‘Catuaí Vermelho’;
- Avaliar a influência da luz e do tempo de cultivo na regeneração, diferenciação e maturação de embriões da variedade ‘Catuaí Vermelho’;
- Avaliar a influência da luz e da densidade na diferenciação e maturação de embriões da variedade ‘Catuaí Vermelho’;
- Identificar a origem de formação dos calos primários tipo 1 e tipo 2;
- Diferenciar, histológica e bioquimicamente, calos primários tipo 1 e tipo 2 e calo embriogênico;
- Comparar embriões somáticos e zigóticos da variedade ‘Catuaí Vermelho’, por meio das análises histológicas e bioquímicas;
- Quantificar e caracterizar o perfil de açúcares, amido, aminoácidos e proteínas envolvidas nas diferentes etapas da embriogênese somática.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC 2009: <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>. Acesso em: 15 outubro de 2010.

ACUÑA, J. R.; PEÑA, M. Plant regeneration from protoplasts of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. cv. Caturra. **Plant Cell Reports**, Springer Berlin/Heidelberg, v.10, p.345-348, 1991.

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: Instituto FNP Consultoria e Comércio, n.194, 2010.

AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (eds) **Handbook of Plant Cell Culture**, vol 1. Macmillan, New York, p.82-123, 1983.

ANUÁRIO Brasileiro da fruticultura. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, n.129, 2010.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Editora UFV. p.438, 2003.

BARBOSA, N. M. L.; CUNHA, A. P.; REINHARDT, D. H.; BARROS, P. G.; SANTOS, A. N. L. Indução de alterações morfológicas e anatômicas em folhas de abacaxizeiro “pérola” pelo ácido 2-(3-clorofenoxi) propiônico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v.25, n.3, p.386-389, 2003.

BARENDSE, G. W. N.; PEETERS, T. J. M. Multiple hormonal control in plants. **Acta Botanica**, Neerlandica, v.44, p.03-17, 1995.

BAUD, S.; BOUTIN, J. P.; MIQUEL, M.; LEPINIEC, L.; ROCHAT, C. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. **Plant Physiology and Biochemistry**, p.151-160, 2002.

BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. M. High frequency somatic embryogenesis from *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.44, n.2, p.169-176, 1996.

BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation e regeneration in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.44, p.7-17, 1996.

BOXTEL, J. H. J. Studies on genetic transformation of coffee by using electroporation and the biolistic method. **Thesis (Ph.D.)** Wageningen, 1994.

BRIDSON, D. M. Additional notes on *Coffea* (Rubiaceae) from Tropical East Africa. **Kew Bulletin**, v.49, p.331-342, 1994.

BRUM, G.; McKANE, L.; KARP, G. **Biology: exploring life**. 2.ed. New York: John Wiley, p.1030, 1994.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH**, v.2. p.87-132, 1998.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. Aclimatização de plantas: abordagens recentes. Brasília: Embrapa-CNPH, (**ABCTP notícias**, 25), p.12, 1996.

CAPELLADES, R.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-Cultured *Rosa multiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, n.1, p.141–145, 1990.

CARVALHO, A. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie Arábica. **Separata dos boletins da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, p.226-230, 1946.

CARVALHO, A.; KRUG, C. A.; MENDES, J. E. T.; ANTUNES FILHO, H.; MORAIS, H.; ALOISI SOBRINHO, J.; MORAIS, M. V.; ROCHA, T. R. **Melhoramento do cafeeiro: IV. Café Mundo Novo**. Bragantia, Campinas, v.12, p.97-129, 1952.

CARVALHO, A.; MONACO, L. C. **Transferência do fator caturra para o cultivar Mundo Novo de Coffea arabica**. Bragantia, Campinas, v.31, n.2, p.379-399, 1972.

CARVALHO, A.; MEDINA, H. P.; FAZUOLI, L. C.; COSTA, W. M. **Genética de Coffea XXVI. Hereditariedade do porte reduzido do cultivar Caturra**. Bragantia, Campinas, v.43, n.2, p.443-458, 1984.

CARVALHO, A. **Histórico do desenvolvimento da cultura do café no Brasil**. Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, v.9, n.34, p.7, 1993.

CARVALHO, H. S. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília, Embrapa Café, 2008.

CATUNDA, P. H. A. **Aclimatização de plântulas micropropagadas**. Monografia (Especialização em Cultura de Tecidos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2004.

CHAN, J. L., SAÉNZ, L., TALAVERA, C.; HORNING, R., ROBERT, M. and OROPEZA, C. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**. p.515–521, 1998.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M. N.; WILLSON, L. C. Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage. Westport.; USA; **The AVI Publishing Company**, p.13-47, 1985.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Cafés do Brasil**. Safra 2009/2010. Brasília, DF: MAPA- SPC/ CONAB, 2010.

DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALIDIS, A. M. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, In Kiwifruit cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, n.2, p.127-134, 1997.

DÍAZ-PÉREZ, J. C.; SHACKEL, K. A.; SUTTER, E. G. Effects of *in vitro* formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. **Journal of American Society for Horticulture Science**, Alexandria, v.120, n.3, p.435-440, 1995.

DODEMAM, V. L.; DUCREX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v.48, p.1493-1509, 1997.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; CABRAL, J. B.; ALVES, G. D. Embriogênese somática *in vitro* em couve-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.4, p.711-718, 2000.

DUBLIN, P. Embryogénese somatic directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. **Café, cacao, thé**, v.25, n.4, p. 237-242, 1981.

DUBLIN, P. Induction de bourgeons néoformés et embryogénese somatique: deux voies de multiplication vegetative in vitro des caféiers cultivés. **Café, cacao, thé**, v.24, n.2, p.121-130, 1980.

DUBLIN, P. Tequiniques de reproduction vegetative "in vitro" et amelioration genétique chez les caféiers cultives. **Café, cacao, thé**, Paris, v.28, n.4, p.231-244, 1984.

EHRENDORFER, F. Adaptive significance of major taxonomic characters and morphological trends in angiosperms. In: HEYWOOD, V.H. (Ed.). **Taxonomy and ecology**. London: Academic Press, p.317-327, 1973.

ELKONIN, L. A.; PAKHOMOVA, N. V. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. **Plant Cell, and Tissue Organ Culture**, p.115-123; 2000.

EMBRAPA Café. **Consórcio brasileiro de pesquisa e desenvolvimento do café**. Brasília, DF, p.148, 2004.

ETIENNE-BARRY, D.; BERTRAND, B.; VASQUEZ, N.; ETIENNE, H. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. **Plant Cell Reports**, v.19, p.111-117, 1999.

FAZUOLI, L. C.; MEDINA FILHO, H. P.; GONÇALVES, W.; GUEREIRO FILHO, O.; SILVAROLLA, M. B. Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agronômico de Campinas. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa: Editora UFV, Cap.5, p.163-215, 2002.

FERREIRA, M. G. R.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; DAMIÃO-FILHO, C. F. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.3, p.500-503, 2005.

FOCKS, N.; BENNING, C. Wrinkled1: a novel, low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism, **Plant Physiology**, p.91-101, 1998.

GAMBORG, O. L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture **Plant Physiology**, v.45, p.372-375, 1970.

GAJ, M. D.; Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.43, p.27-47, 2004.

GAUTHERET, R. J.; **Plant tissue culture: A history**. Bot. Mag. Tokyo, p.393-410, 1983.

GAUTHERET, R. J.; Culture Du tissu cambial. **Comptes Rendus dès Seances de la Societe de Biologie**, v.198, p.2195-2196, 1934.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part. 2 in practice. 2 ed. Edington: Exegetis, p.1361, 1996.

GORRET, N.; ROSLI, S. K. B.; OPPENHEIM, S. F.; WILLIS, L. B.; LESSARD, P. A.; RHA, C.; SINSKEY, A. J. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculums size, and conditioned medium on biomass production. **Journal of Biotechnology**, v.108, p.253-263, 2004.

GRANER E. A.; GODOY JÚNIOR, C. **Manual do cafeeicultor**. São Paulo: Universidade de São Paulo, p.320, 1967.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, p.99-160, 1990.

GROUT, B. W. W.; ASTON, M. J. Transplantin of cauliflower plants Regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to Changes in leaf wax and to xylem regeneration. **Horticultural Research**, Edingurgh, v.17, n.1, p.1-7, 1977.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Apostila de biotecnologia. Florianópolis,: SC. CCA/UFSC, p.41, 2006.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ads.). Culturas de tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília, **Embrapa-CBAB**. v.2, p.533-568, 1999.

GUERREIRO FILHO, O. Melhoramento do cafeeiro visando resistência às pragas. In: **Simpósio de atualização em genética e melhoramento de plantas**, Lavras, 1999.

HAHNE, G.; MAYER, J. E.; LORZ, H. Embryogenic and callus-specific proteins in somatic embryogenesis of the grass *Dactylis glomerata* L. **Plant Science**, v.55 n.3, p. 267-279, 1988.

HICKS, G. S. Adventitious rooting of apple microcuttings *in vitro*: an anatomical study. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.65, n.9, p.1913- 1920, 1987.

HERMAN, E. B.; HASS, G. J. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. **Horticultural Science**, Alexandria, v.10, n.6, p.588-589, 1975.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v.2, p.519-531, 1999.

KOMAMINE, A.; KAWAHARA, R.; MATSUMOTO, M.; SUMABORE, S.; TOYA, T.; FUJIWARA A.; TSUKAHARA, M.; SMITH, J.; ITO, M.; FUKUDA, H.; NOMURA, K.; FUJIMURA, T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**, v.28 , n.1, p.11-14, 1991.

KRIKORIAN, A. D., BERQUAM, D. L. Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt. **Botanical Review**, v.35, p.59-88, 1969.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RiMa Artes e Textos, 531p., 2000.

LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F.; COMBES, M. C.; CHARRIER, A. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. **Euphytica**, Dordrecht, v.87, n.1, p.59-64, 1996.

LEIFERT, C.; MURPHY, K. P.; LUMSDEN, P. J. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue culture. **Critical Reviews in Plant Sciences**. Boca Raton, v.14, n.2. p.83-109, 1995.

LEITE, C. A. M.; SILVA, M. A demanda de cafés especiais. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Café: produtividade, qualidade e sustentabilidade**. Viçosa, MG: DFT/UFV, p.51-89, 2000.

LELJAK-LEVANIC', D.; BAUER, N.; MIHALJEVIC', S.; JELASKA, S. Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): control of somatic embryo development by nitrogen compounds. **Journal Plant Physiology**. p.229-236; 2004.

LOYOLA-VARGAS V. M.; FUENTES-CERDA C. F. J.; MONFORTE-GONZÁLEZ M.; MÉNDEZ-ZEEL M.; ROJAS-HERRERA R.; MIJANGOS-CORTES J. Coffee tissue culture as a new model for the study of somaclonal variation. In:18 th **International Scientific Colloquium on Coffee**. ASIC, Helsinki. p.302-307, 1999.

MAGALHÃES, J. R.; WILCOX, G. E. Interação entre formas de nitrogênio e reguladores de crescimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, n.22. v.6. p.576-585, 1987.

- MALAVOLTA, E. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Patafós, p.319, 1997.
- MENDES, A. N. G.; Economia cafeeira: o agrubusiness. In: MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, R. J. (Eds) **Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, v.1, p.1-59, 1997.
- MENÉNDEZ-YUFFÁ, A.; GARCIA, E. G. Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee Catimor . **Protoplasma**, Vienna, v. 199, p. 208-214, 1997.
- MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.). In vitro embryogenesis in plants. **Dordrecht: Kluwer Academics**, p.155-203, 1995.
- MICHAUX-FERRIÈRE N.; CARRON M. P. Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: The importance of the timing of subculturing. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.19, p.243-256, 1996.
- MOREIRA, M. A.; CARVALHO, J. B.; PASQUAL, M.; FRÁGUAS, C. B.; SILVA, A. B. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.5, p.875-879, 2001.
- MÜNTZ, K.; BECHER, C.; PANKE, J.; SCHLERETH, A.; FISCHER, J.; HORSTMANN, C.; KIRKIN, V.; NEUBOHN, B.; SENYUK, V.; SHUTOV, A. Protein degradation and nitrogen supply during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.) **Plant Physiology**, v.152, p.683-691, 1998.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.
- NORIEGA, C.; SONDAHL, M. R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, Montpellier. **Annales**. Paris: ASIC, p.73-81, 1993.
- OROZCO, C.; CHALMERS, K. J.; WAUGH, R.; POWELL, W. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.87, n.8, p.934-940, 1994.
- PASQUAL, M. Introdução: fundamentos básicos. In: PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**. Lavras: UFLA/FAEPE, v.1, p.71, 2001.
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos. **Lavras: UFLA/FAEPE**, 1997.
- PASSOS, L. P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: EMBRAPA, CNPGL, p.223, 1996.

PEREIRA, A. R.; CARVALHO, S. P.; PASQUAL, M.; SANTOS, F. C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. acaia cerrado: efeito de citocinina e ácido giberélico. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.31, n.2, p.332-336, 2007.

PEREIRA, A. R.; PASQUAL, M.; CHAGAS, E. A.; FRÁGUAS, C. B.; DUTRA, L. F. Indução de embriões somáticos globulares e cordiformes de cafeeiro por BAP e sacarose. **Scientia Agraria**, v.4, n.1-2, p.77-80, 2003.

PEREIRA, A. A.; SAKIYAMA, N. S. **Cultivares melhoradas de café arábica**. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE, 1., Viçosa: UFV, p.241-257, 1999.

PÉREZ-NUÑEZ, M. T.; CHAN, J. L.; SAÉNZ, L.; GONZALEZ, T.; VERDEIL, J. L.; OROPEZA, C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* L. plumule explants. **In vitro Cellular and Developmental Biology –Plant** v.42, 37-43, 2006.

PIERSON, E. S.; VAN LAMMENRN, A.; SCHEL, J. H.; STARITSKY, G. *In vitro* development of embryoids from punched leaf disc of *Coffea canephora*. **Protoplasma**, Viena, v.115, n.2-3, p.208-216, 1983.

PORTER, J. R.; LAWLOR, D. W. **Plant growth: interactions in nutrition and environment**. Cambridge: University of Cambridge Press, p.284, 1991.

PRIVAT, I.; FOUCRIER, S.; PRINS, A.; EPALLE, T.; EYCHENNE, M.; KANDALAFT, L.; CAILLET, V.; LIN, C.; TANKSLEY, S.; FOYER, C.; MCCARTHY, J. Differential regulation of grain sucrose accumulation and metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta) revealed through gene expression and enzyme activity analysis. **New Phytologist**, v.178, n.4, p.781-797. 2008.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, p.728, 1996.

REIS, P. R.; Cunha, R. L. Café Arábica do plantio à colheita. **U. R. EPAMIG SM**, Lavras, 2010.

RESENDE, M.; MACIEL, M. F.G.; PONCIANO, N.J.; RESENDE, A. A. M. **Novos desafios na metodologia de classificação e padronização da bebida café**. Viçosa, MG: PNP/UFV, 2000.

RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.2, n.3-4, p.159-167, 2004.

RODRÍGUEZ, M., CEVALLOS, A. M., MONTES, S. Proteínas extracelulares marcadoras del potencial embriogénico en suspensiones celulares de *Coffea spp*. **Cultivos Tropicales**, v.21, n.2, p.11-15, 2000.

RUFINO, J. L. S.; ARÊDES, A. F. **Mercados interno e externo do café brasileiro**. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2009.

SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares *Coffea arabica* L., cultivar rubi. **Ciência Agrotécnica**, Lavas, v.27, n.3, p.571-577, 2003.

SCHOPKE, C.; MULLER, L. E.; KOHLENBACH, H. W. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in protoplasts cultures from somatic embryos of coffee (*Coffea canephora* P. ex Fr.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Springer Netherlands, v. 8, p. 243-248, 1987.

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, p.215-232, 1985.

SONDAHL, M. R.; SHARP, W. R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, Zurich, v.81, n.4, p.395-408, 1977.

SOUZA, F. V. D.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; COSTA, M. A. P. C. Micropropagação. In: SOUZA, A.S., JUNGHANS, T.G (Eds.). Introdução a micropropagação de plantas. Bahia, **Embrapa**, p.38-52, 2006.

SPIRAL, J.; PETIARD, V. Protoplast culture and regeneration in *Coffea* species. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, San Francisco. **Annales**. Paris: ASIC, p.383-390, 1991.

STARITSKY, G.; HASSELT, G. A. M. The synchronized mass propagation of *Coffea canephora* *in vitro*. Proc. 9th Int. **Science Colloquium Coffee**, London. ASIC, p.597-602. 1980.

STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Botanica**, Neerl., v.19, p.509-514, 1970.

SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweet gum plants after removal *in vitro* culture. **Journal of the American Society Horticulture Science**, Alexandria, v.113, n.2, p.234-238, 1988.

SUTTER, E. G.; LUZA, J. Developmental anatomy of roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* in *Malus pumila* 'M-26' shoots grown *in vitro*. **International Journal of Plant Botany**, Chicago, v.154, n.1, p.59-67, 1993.

TAIZ, L. Z.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: ARTMED, 4º edição, p.719, 2009.

TEISSON, C.; ALVARAD, D.; BERTHOULY, M. Culture *in vitro* par immersion temporaire: un nouveau recipient. **Plantations Recherche**, Montpellier / France v.2, n.5, p.29-3, 1995.

TEIXEIRA, J. B.; JUNQUEIRA, C. S.; PEREIRA, A. J. P. C.; MELLO, R. I. S.; SILVA, A. P. D.; MUNDIM, D. A. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.)**

via embriogênese somática. Brasília: Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, n. 121). p.39, 2004.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. . In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. **Embrapa-SPI/CNPB**, Brasília, v.1, p.11-19, 1998.

UPENSKI, E. E.; UPENSKAIA, W. J. Reinkultur and ungeschlechtliche fortpflanzung des *Volvox minor* and *Volvox globator* in einer synthetischen Nahrlosung. **Zeitschrift fuer Botanik**, v. 17, p. 273-308, 1925

UTINO, S.; CARNEIRO, I. F.; CHAVES, L. J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (*Musa AAB*) *in vitro*: IV. Concentrações de sais, ácidos ascórbicos e frequência de subcultivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.23, n.2, p.409-412, 2001.

VIEIRA, E. C.; GAZZINELLI, G.; MARES-GUIA, M. **Bioquímica celular e biologia molecular**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, p.360, 1991.

VIEIRA, L. G. E.; *et al.* Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, p.95-108, 2006.

WAREING, P. F.; PHILLIPS, I. D. J. Growth and differentiation in plants. **Oxford: Pergamon**, p.343, 1982.

WETHERELL, D. F.; DOUGALL, D. K. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in culture wild carrot tissue. **Physiologia Plantarum**, p.97-103, 1976.

YASUDA, T.; FUJII, Y.; YAMAGUCHI, T. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. **Plant and Cell Physiology**, v.26, p.595-597, 1985.

ZAMBOLIN, L.; **Produção integrada de café**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2003.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of fruit plants. **Acta horticulturae**, Wageningen, n.120, p.217-222, 1981.

WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. **American Journal of Botany**, New York, v.69, n.10, p.1579-1586, 1982.

WHITE, P. R. Influence of some environmental conditions on the growth of excised root tips of wheat seedlings in liquid media. **Plant Physiology**, v.7, p.613-628, 1932.

WHITE, P. R. Concentrations of inorganic ions as related to growth of excised root-tips of wheat seedlings. **Plant Physiology**, v.8, p.489-508, 1933.

WHITE, P. R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiology**, v.9, p. 585-600, 1934.

WHITE, P. R. Accessory salts in the nutrition of excised tomato roots. **Plant Physiology**, v.13, p.391-398, 1938.

CAPÍTULO 1

OTIMIZAÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA DO CAFEIEIRO

(*Coffea arabica* L.) A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES

RESUMO

Existem aproximadamente 100 espécies descritas do gênero *Coffea* e somente duas produzem frutos que têm importância econômica no mercado internacional: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora*. No entanto, *C. arabica* é responsável por cerca de 70% do café comercializado. Nesse mercado, o Brasil tem ocupado historicamente a primeira posição entre os países produtores e exportadores de café no mundo. Diante disso, A micropropagação via embriogênese somática surge como a melhor opção para a propagação clonal em larga escala dessa espécie. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi otimizar as estratégias de clonagem via embriogênese somática indireta a partir de folhas jovens do cafeeiro (*Coffea arabica* L. variedade Catuaí Vermelho). Na fase de indução de calo, foi avaliada a influência de genótipos de *Coffea arabica* (Catuaí Vermelho, Mundo Novo, Híbrido 427-2, Híbrido Clone 12), associados a tipos de folhas fenotipicamente semelhantes; a influência do número de explantes por placa de Petri (4, 6, 8 e 10) e tipos de folhas fenotipicamente semelhantes; o efeito de concentrações de sacarose (1, 2, 3 e 4%); as combinações de caseína hidrolisada (0 e 100 mg.L⁻¹) e extrato de malte (0 e 400 mg.L⁻¹); o efeito de tipos de auxinas (2,4-D e Picloram) e suas concentrações (2,5; 5; 10 e 20 µM) para as variedades Catuaí Vermelho e Mundo Novo, além da citocinina 2-iP (5, 10, 20 e 30 µM). Na fase de multiplicação, foi analisada a influência da densidade inicial de calos embriogênicos (6, 8, 10 e 12 g.L⁻¹); volumes de Erlenmeyers (125 e 250 ml), associados ao ajuste ou não da densidade, bem como a presença e ausência de luz. Experimentos também foram efetuados na fase de regeneração, maturação e germinação de embriões, onde foram testados o número de calos embriogênicos por placa de Petri (4, 6, 8 e 10), o efeito da luz e escuro, associado ao tempo de cultivo (30, 60 e 90 dias), além do efeito da luz e escuro associado a diferentes densidades iniciais de células (1, 5 e 10 g.L⁻¹). Verificou-se que a variedade Catuaí Vermelho é a que melhor responde ao protocolo de indução de calo. A amostragem de folhas e a percentagem de formação de calo primário tipo 2 influenciam a percentagem de formação de calo embriogênico. A utilização de seis explantes por placa, a concentração de 3% de sacarose, a utilização de caseína hidrolisada associada ao extrato de malte e a concentração de 10 µM de 2-iP proporcionam os melhores resultados para a formação de calo embriogênico. Na fase de multiplicação, o tratamento com densidade inicial de 10 g.L⁻¹ de calo embriogênico, o uso do frasco de 250 ml de capacidade, com ajuste parcial da densidade e material cultivado na ausência

de luz responderam com as melhores taxas de multiplicação de calo embriogênico. A etapa de regeneração, maturação e germinação de embriões somáticos foi otimizada com a inoculação de quatro ou seis explantes por placa, cultivados por 90 dias em meio de regeneração e, quando transferidos para o meio de germinação líquido, a densidade inicial de 5 g.L^{-1} proporcionou a maior sincronização na maturação dos embriões.

Palavras-chave: Indução, multiplicação, regeneração, maturação, germinação.

ABSTRACT

There are approximately one hundred described species of the genus *Coffea*, of which only two produce fruits with economic importance to the international market: *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora*. However, *C. arabica* accounts for around 70% of all the coffee sold. In this market, Brazil has historically occupied first position among the world's coffee producing and exporting countries. As a result, micropropagation via somatic embryogenesis has emerged as the best option for large-scale clonal propagation of this species. In this context, this work aimed to optimize strategies for cloning coffee plants (*Coffea arabica* L. variety Catuaí Vermelho) via indirect somatic embryogenesis from the young leaves. In the callus induction phase, we evaluated the influence of genotypes of *Coffea arabica* (Catuaí Vermelho, Mundo Novo, Híbrido 427-2, Híbrido Clone 12), associated with phenotypically similar leaves, the influence of the number of explants per Petri dish (4, 6, 8, and 10) and phenotypically similar types of leaves, the effect of sucrose concentrations (1, 2, 3, and 4 %), combinations of hydrolyzed casein (0 and 100 mg/L) and malt extract (0 and 400 mg/L), the effect of types of auxins (2,4-D and Picloram) and their concentrations (2.5, 5, 10, and 20 μ M) for the Catuaí Vermelho and Mundo Novo varieties, as well as cytokinin 2-iP (5, 10, 20, and 30 μ M). In the multiplication phase, we analyzed the influence of the initial density of the embryogenic calli (6, 8, 10, and 12 g/L), the volumes of the Erlenmeyer flasks (125 and 250 ml), associated with the adjustment or non-adjustment of density, as well as the presence or absence of light. Experiments were also conducted in the regeneration, maturation, and embryo germination phase to test the number of embryogenic calli per Petri dish (4, 6, 8, 10), the effect of light and dark associated with cultivation time (30, 60, and 90 days), and the effect of light and dark associated with the different initial densities of the cells (1, 5, and 10 g/L). It was found that the Catuaí Vermelho variety best responded to the protocol of callus induction. The leaf sample and the percentage of primary callus type 2 influence the formation of embryogenic callus. The use of six explants per dish, a concentration of 3% sucrose, hydrolyzed casein in combination with malt extract, and a concentration of 10 μ M of 2-iP provide the best results for the formation of embryogenic callus. In the multiplication phase, treatment with an initial density of 10 g/L of embryogenic callus, the use of a 250 ml capacity flask, with partial adjustment of density, and material cultivated in the absence

of light, resulted in the highest rates of multiplication of embryonic callus. The regeneration, maturation, and germination phase of somatic embryos was optimized with the inoculation of four or six explants per dish, cultivated for 90 days in regeneration medium and, when transferred to the liquid germination medium, an initial density of 5 g/L yielded the highest synchronization in the maturation of the embryos.

Key-words: Induction, multiplication, regeneration, maturation, germination.

1. INTRODUÇÃO

Existem aproximadamente 100 espécies descritas do gênero *Coffea* e somente duas produzem frutos que têm importância econômica no mercado internacional: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* (Davis *et al.*, 2006). Nesse mercado, o Brasil tem ocupado historicamente a primeira posição entre os países produtores e exportadores de café no mundo, com aproximadamente 70% da produção, proveniente de cultivares da espécie *C. arabica*, responsável por um produto de boa qualidade e maior aceitação no mercado consumidor (Giridhar *et al.*, 2004).

Diante disso, técnicas da biotecnologia, incluindo a cultura de tecidos, têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores. Uma vez estabelecidos protocolos de propagação clonal, foi verificado que a utilização de métodos biotecnológicos para auxiliar os programas de melhoramento genético tem-se mostrado bastante útil, principalmente em culturas perenes, como é o caso do cafeeiro. Um importante método de propagação *in vitro* de plantas de *C. arabica* é a embriogênese somática, que consiste no desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas haplóides ou diplóides, sem que haja fusão de gametas, a qual possibilita propagação vegetativa acelerada e uniformidade genética de clones superiores, apresentando grande potencial a ser explorado.

No cafeeiro, os trabalhos pioneiros em cultura de tecidos foram publicados por Staritsky (1970), que obteve êxito na indução de calos a partir de folhas de várias espécies e produção de embriões somáticos na espécie *C. canephora*. Posteriormente, diversos trabalhos envolvendo a espécie *C. arabica* foram desenvolvidos, no intuito de aumentar a taxa de indução, a multiplicação de calos embriogênicos e a regeneração e desenvolvimento de plântulas (Zamarripa *et al.*, 1991; Neuenschwander & Baumann, 1992; Barry-Etienne *et al.*, 1999; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002).

Segundo Merkle *et al.* (1995), a indução da embriogênese somática está relacionada a alterações no padrão de expressão gênica dos explantes, com reprogramação das células que estarão envolvidas no processo embriogênico. Entretanto, o potencial embriogênico não é somente determinado geneticamente, mas também é influenciado pelo meio de cultura e pela qualidade do explante (Byesse *et al.*, 1993; Loyola-Vargas *et al.*, 1999).

Dessa forma, o grande potencial da embriogênese para multiplicação acelerada de plantas de café foi rapidamente notado desde os primeiros trabalhos (Staritsky, 1970;

Sharp *et al.*, 1973) e numerosas técnicas que simplificam este processo têm sido desenvolvidas com o intuito de permitir a produção em larga escala de plantas e de reduzir o custo de produção das mudas.

Sendo assim, a disponibilidade de um eficiente protocolo de embriogênese somática permite desenvolver a técnica de produção em massa de materiais heterozigotos, tais como híbridos de *C. arabica*. Diante desse contexto, o trabalho objetiva otimizar as estratégias de clonagem via embriogênese somática indireta do cafeeiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Embriogênese somática do cafeeiro (*Coffea arabica*)

2.1.1. Caracterização dos explantes utilizados

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais-II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília - DF. O explantes foram coletados de plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação (Figura 2 A). Como explantes foram utilizadas folhas jovens e bem expandidas correspondentes ao segundo ou terceiro par de folhas de galhos plagiotrópicos do terço médio da planta matriz (Figura 2 B).

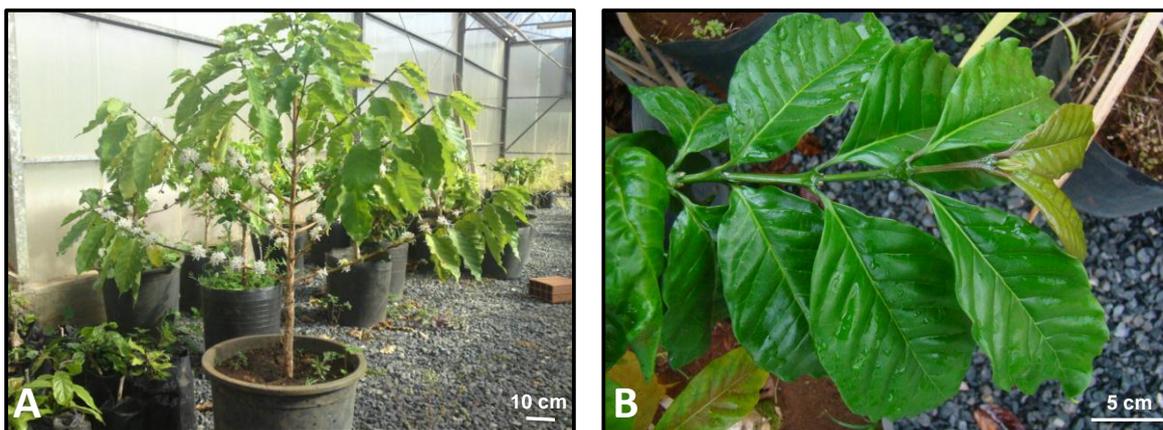


Figura 2. Material utilizado como explante inicial para a indução de calo. **A)** Planta matriz cultivada em casa de vegetação. **B)** Folhas jovens e bem expandidas provenientes do segundo ou terceiro par de folhas de ramos plagiotrópicos.

2.1.2. Coleta, desinfestação e inoculação dos explantes

As folhas foram coletadas ao longo do ano, preferencialmente no início da manhã, quando estão mais hidratadas, e conduzidas ao laboratório em saco plástico, protegidas da desidratação.

A desinfestação superficial das folhas foi realizada em capela de fluxo laminar, em frasco estéril com tampa, por meio da imersão em solução de álcool 50% por 1 minuto, seguido pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) na

concentração de 2,4% de cloro ativo por 20 minutos, finalizando com três lavagens em água destilada, deionizada e autoclavada por 5 minutos cada. Os explantes com tamanho aproximado de 0,7 por 0,7 cm foram retirados dessas folhas com auxílio de bisturi, pinça e uma placa de Petri estéril com papel filtro.

Uma vez obtidos, os explantes foram inoculados em placas de Petri estéreis contendo meio de cultura gelificado, sempre com a face adaxial em contato com os meios de cultura específicos e com distâncias regulares, de aproximadamente 1 cm, para evitar a interferência de um explante sobre o outro (Figura 3). As placas foram vedadas com filme de pvc e armazenadas no escuro, protegidas da luz, em sala de crescimento sob temperatura de 24 - 27°C com o tempo de armazenamento variando de acordo com cada etapa da embriogênese somática.

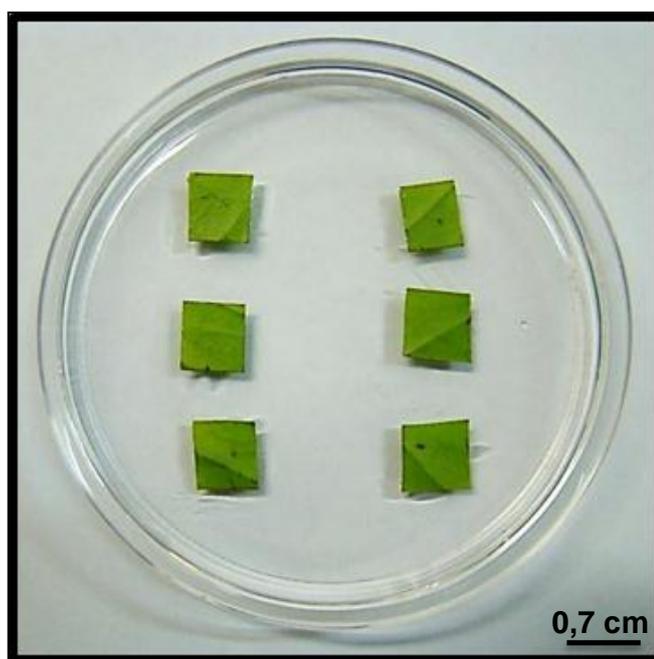


Figura 3. Explantes foliares inoculados em meio de indução.

2.1.3. Indução, proliferação e morfogênese

Para induzir a formação de calos primários foi utilizado o Meio Primário - PM que corresponde ao meio básico de sais de MS (Murashige & Skoog, 1962), reduzido pela metade da concentração original, acrescido de 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 myo-

inositol; 100 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada; 400 mg.L⁻¹ de extrato de malte; 20,0 µM de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D); 9,84 µM de dimetil-alil-amino-purina (2-iP); 4,92 µM de ácido indol butírico (AIB); 20.000 mg.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 2.400 mg.L⁻¹ de Phytigel[®]. Os explantes inoculados em meio primário - PM ou de indução foram armazenados por um período de 30 dias, em sala de crescimento, na ausência de luz e temperatura de 24 a 27°C. Após um período de 30 dias os explantes foram transferidos, em condições estéreis, para o meio secundário – SM (meio utilizado no processo de formação de calos embriogênicos) no qual permaneceram por mais 120 dias nas mesmas condições descritas anteriormente. O meio SM difere apenas na concentração de 2,4-D, que é reduzida pela metade daquela presente em PM.

Os meios de cultura utilizados nas diferentes fases tiveram o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da adição do agente gelificante Phytigel[®], utilizando-se hidróxido de potássio (KOH) 0,1 M, sendo, em seguida, autoclavados por 20 minutos, a 121°C e 1,3 atm de pressão.

Os experimentos de indução passaram por avaliações de calos primários e embriogênicos (Figura 4-6). Após o período de 30 dias de cultivo, foi avaliada a proliferação celular nos bordos dos explantes e a formação de calo primário tipo 1 (Figura 4) por meio da mensuração por notas de zero a três (0 – nenhuma formação; 1 – baixa formação de calo; 2 – média formação de calo e 3 – alta formação de calo) variando de acordo com o grau de formação de calo primário e o calo primário tipo 2 (Figura 5) através da percentagem de formação desse tipo de calo (presença e ausência). Aos 120 dias após a transferência para o meio de indução, foi feita a avaliação da percentagem de calo embriogênico (Figura 6).

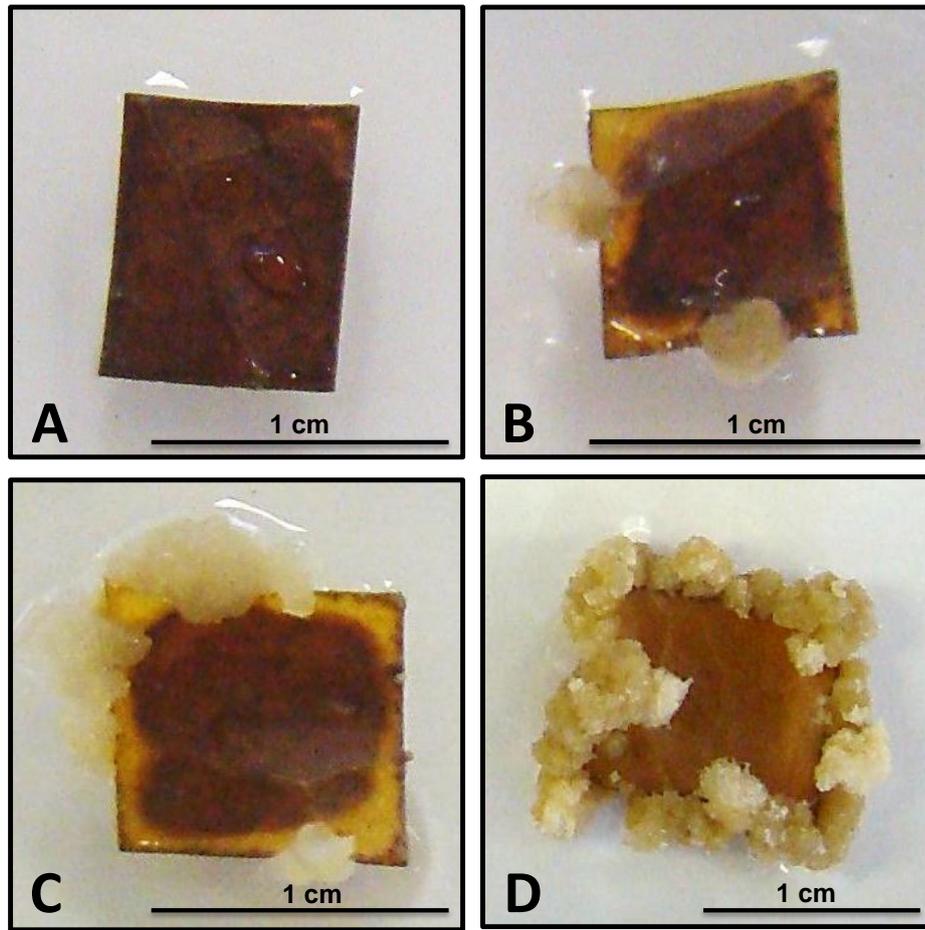


Figura 4. Calo primário tipo 1 avaliado por meio de notas. **A)** Nota 0 para nenhuma formação de calo. **B)** Nota 1 para baixa formação de calo. **C)** Nota 2 para média formação de calo. **D)** Nota 3 para alta formação de calo.

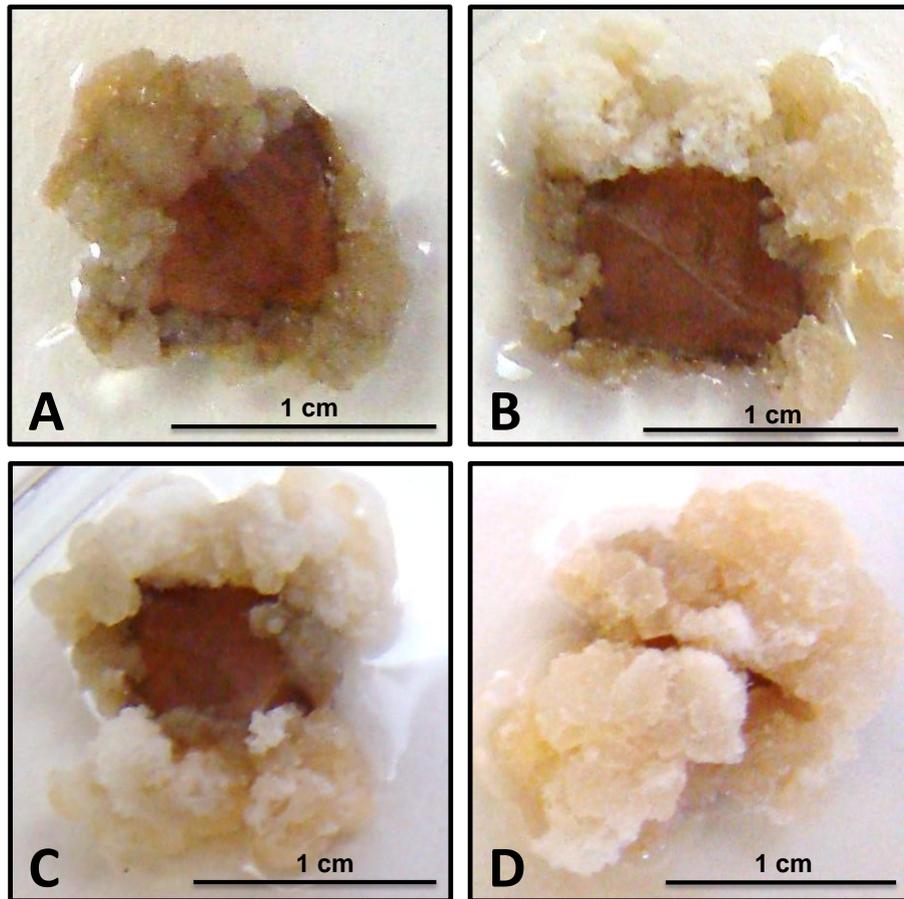


Figura 5. Calo primário tipo 2 avaliado por meio de percentagem. **A)** Ausência de calo primário tipo 2. **B-D)** Presença de calo primário tipo 2 em diferentes níveis de desenvolvimento.

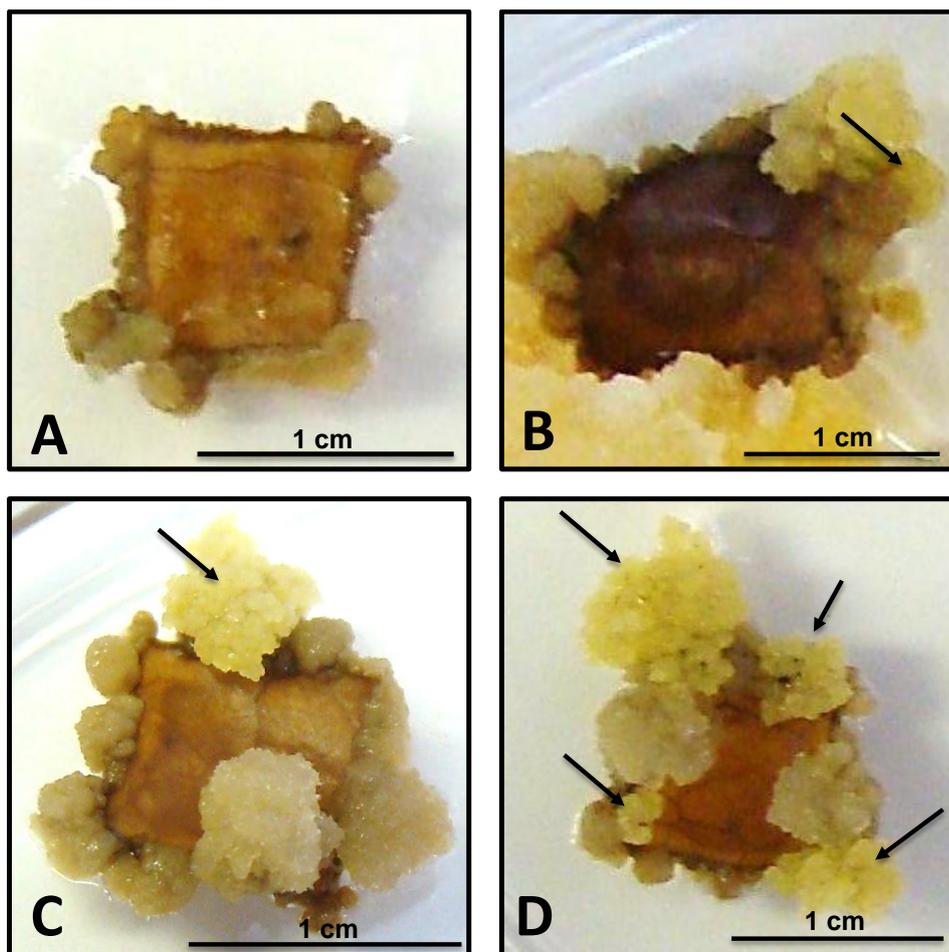


Figura 6. Calo embriogênico avaliado por meio de percentagem. **A)** Ausência de calo embriogênico. **B-D)** Presença de calo embriogênico em diferentes níveis de desenvolvimento.

Em todos os experimentos realizados no Capítulo 1, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, utilizando-se o programa Sisvar 4.0 (Ferreira, 2000). Os tratamentos e as repetições de cada experimento seguem descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Experimentos de indução, proliferação e morfogênese.

Experimento	Genótipo	Fator 1	Fator 2	Repetições⁽¹⁾
1	Catuaí Vermelho (CV), Mundo Novo (MN), Híbrido 427-2 (H427-2), Híbrido Clone 12	4 genótipos (CV, MN, H427-2, Hib. Clone 12)	4 amostragens de folhas (F1, F2, F3 e F4) de cada genótipo	5
2	Catuaí Vermelho	4 números de explantes por placa (4, 6, 8 e 10)	3 amostragens de folhas (F1, F2 e F3)	5
3	Catuaí Vermelho	4 concentrações de sacarose (1, 2, 3 e 4%)	-	10
4	Catuaí Vermelho	Caseína (0 e 100 mg.L ⁻¹) e Ext. de malte (0 e 400 mg.L ⁻¹)	-	10
5	Catuaí Vermelho	2 tipos de auxinas 2,4-D e Picloram	4 concentrações (2,5 - 5 - 10 - 20µM) ⁽²⁾	5
6	Mundo Novo	2 tipos de auxinas 2,4-D e Picloram	4 concentrações (2,5 - 5 - 10 - 20µM) ⁽²⁾	5
7	Catuaí Vermelho	4 concentrações de 2-iP (5, 10, 20 e 30µM)	-	10

(1) Cada repetição corresponde a 6 explantes foliares distribuídos aleatoriamente e inoculados em uma placa de Petri. (2) As concentrações das auxinas 2,4-D e Picloram foram testadas nos meios primário – PM e secundário – SM. Foram testadas as mesmas concentrações dessas auxinas nos dois meios nutritivos e em um dos tratamentos foi testada a utilização de uma concentração mais elevada no meio PM e a redução à metade dessa concentração no meio SM. Para 2,4-D os tratamentos foram: 5,0; 10,0; 20,0 µM nos meios PM e SM e 20,0 µM no meio PM e a redução para 10,0 µM no meio SM. Para o Picloram os tratamentos foram: 2,5; 5,0; 10,0 µM nos meios PM e SM e 10,0 µM no meio PM e a redução para 5,0 µM no meio SM.

2.1.4. Multiplicação de células em suspensão

No processo de multiplicação de células em suspensão foi utilizado o meio de multiplicação - MM que corresponde ao meio básico de sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) reduzido pela metade da concentração original, acrescido de 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 myo-inositol; 100 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada; 400 mg.L⁻¹ de extrato de malte; 250 mg.L⁻¹ de ácido cítrico; 5,0 µM de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D); 9,84 µM de dimetil-alil-amino-purina (2-iP); 4,92 µM de ácido indol butírico (AIB) e 20.000 mg.L⁻¹ de sacarose. Por se tratar de um meio líquido, não houve a adição de Phytigel[®].

Foram utilizados como explantes, calos embriogênicos provenientes do meio SM que foram inoculados em meio MM utilizando-se frascos de Erlenmeyer estéreis. Renovou-se o meio MM a cada 15 dias de cultivo. Com exceção dos experimentos de densidades, os demais experimentos tiveram densidade inicial de 10 g.L⁻¹. Os frascos foram mantidos na ausência de luz em agitadores orbitais a 90-100 rpm. Alguns experimentos foram conduzidos em luz difusa, a 7,5 µmolm⁻²s⁻¹.

As avaliações foram conduzidas após 30, 60 e 90 dias da inoculação, tomando-se a pesagem do conteúdo de calos por frasco. Os tratamentos e as repetições de cada experimento seguem descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Experimentos de multiplicação de células em suspensão.

Exp.	Condições de Cultivo	Fator 1	Fator 2	Avaliações	Repetições ⁽¹⁾
1	Em frascos de Erlenmeyer de 125 ml, com 20 ml do meio	4 densidades iniciais de calo embriogênico (6, 8, 10 e 12 g.L ⁻¹)	---	Aos 30, 60 e 90 dias (através da pesagem dos calos)	6
2	Frascos - 125 e 250 ml Ajuste : 10, 20 e 30 ml e 20, 40 e 60 ml ⁽²⁾	Ajuste parcial ou não da densidade	2 tamanhos de frascos (125 e 250 ml)	Aos 30, 60 e 90 dias (através da pesagem dos calos)	5
3	Em frascos de Erlenmeyer de 125 ml, com 20 ml do meio	Luz e escuro	---	Aos 30, 60 e 90 dias (através da pesagem dos calos)	12

(1) Cada repetição corresponde a frascos de Erlenmeyer. (2) O experimento em que foi testado o ajuste parcial da densidade foi realizado da seguinte forma: No frasco com capacidade de 125 ml foram inoculados 100 mg de calo e 10 ml de meio nutritivo. Na renovação do meio realizada aos 30 dias de cultivo, foram colocados 20 ml de meio e aos 60 dias foram colocados 30 ml de meio. No frasco com capacidade de 250 ml foram inoculados 200 mg de calo e 20 ml de meio nutritivo. Na renovação do meio realizada aos 30 dias de cultivo, foram colocados 40 ml de meio e aos 60 dias foram colocados 60 ml de meio.

2.1.5. Diferenciação, maturação e germinação de embriões somáticos

A regeneração de embriões foi dividida em duas etapas: a primeira consistiu da diferenciação e a segunda na maturação e germinação dos embriões somáticos. Na primeira etapa foi utilizado o meio de regeneração - RM que corresponde ao meio básico de sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) reduzido pela metade da concentração original, acrescido de 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 myo-inositol; 100 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada; 400 mg.L⁻¹ de extrato de malte; 8,88 µM de 6-benzilaminopurina (BAP); 1,34 µM de ácido naftalenoacético (ANA); 30.000 mg.L⁻¹ de

sacarose e solidificado com 2.400 mg.L⁻¹ de Phytigel®. A adição de Phytigel® foi realizada apenas na composição de meios gelificados.

Na segunda etapa foi utilizado o meio de maturação e germinação – MGM que corresponde ao meio básico de MS (Murashige & Skoog, 1962) reduzido pela metade da concentração original, acrescido de 13,9 mg.L⁻¹ de FeSO₄H₂O; 18,65 mg.L⁻¹ de Na₂.EDTA; 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 myo-inositol; 2,57 µM de ácido indolacético (AIA); 1,11 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e 20.000 mg.L⁻¹ de sacarose. Por se tratar de um meio líquido, não foi feita a adição de Phytigel®.

Para a primeira etapa foram utilizados calos embriogênicos provenientes do meio MM inoculados em meio RM gelificado (Figura 7) e para a segunda etapa foi utilizado o material proveniente do meio RM (calos embriogênicos com início de formação de embriões somáticos) que foram inoculados em frascos de Erlenmeyer estéreis contendo meio MGM líquido. Nos experimentos de regeneração de embriões os explantes foram inoculados em placas de Petri estéreis e ficaram armazenados em sala de crescimento, sob temperatura de 24 a 27 °C. E para os experimentos com o meio MGM foi utilizada como densidade inicial, 5 mg/ml e os frascos foram mantidos em sala de crescimento, sob temperatura de 24 a 17 °C em agitadores orbitais a 90-100 rpm. As fases de regeneração e diferenciação dos embriões foram conduzidas no escuro ou em luz difusa, a 7,5 µmolm⁻²s⁻¹, de acordo com o tratamento. Na Tabela 4 estão descritos os experimentos realizados na fase de regeneração, maturação e germinação dos embriões somáticos.

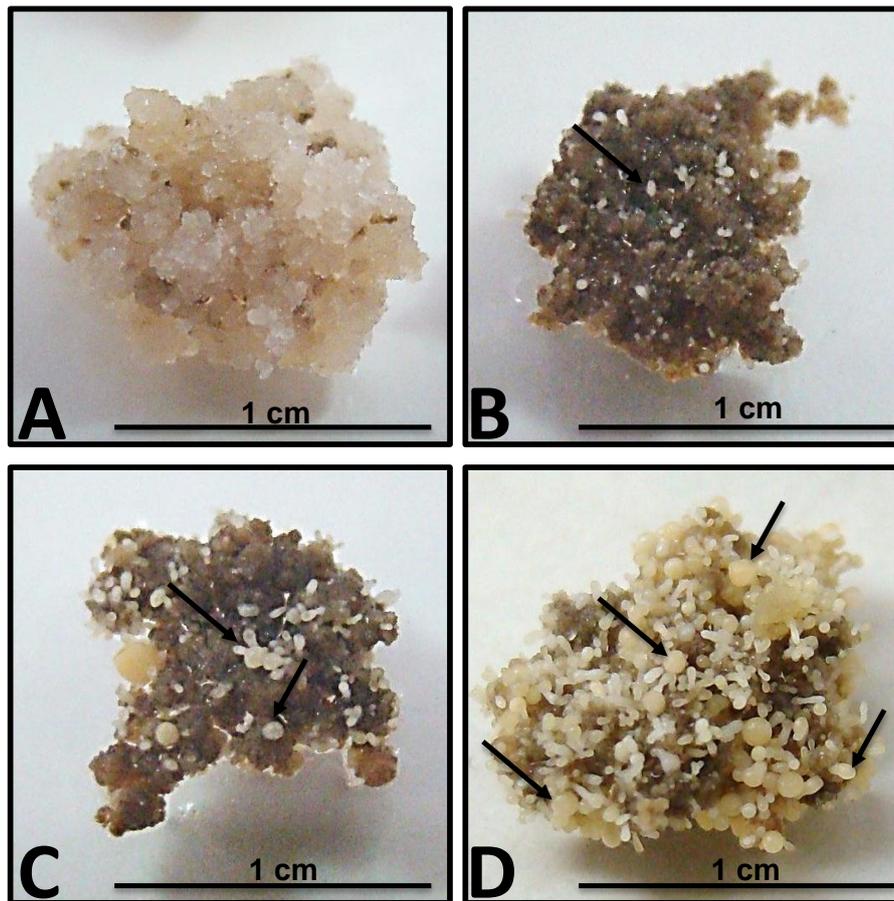


Figura 7. Formação de embriões globulares e torpedos avaliados por meio de notas. **A)** Nota 0: nenhuma. **B)** Nota 1: baixa. **C)** Nota 2: média. **D)** Nota 3: alta.

Os tratamentos e as repetições de cada experimento seguem descritos na tabela abaixo.

Tabela 4. Experimentos de diferenciação, maturação e germinação de embriões.

Exp.	Condições de Cultivo	Fator 1	Fator 2	Avaliações	Repetições
1	Meio RM ⁽¹⁾ gelificado, as placas foram armazenadas por um período de 90 dias	4 números de explante por placa (4, 6, 8 e 10)	---	Após 90 dias de cultivo em RM (Por meio de notas)	10
2	Meio RM gelificado	Luz e escuro	3 tempos de cultivo (30, 60 e 90 dias)	Após 60 dias de cultivo em MGM	6
3	Material retirado do meio RM e inoculado frascos Erlenmeyer com 25 ml de meio MGM ⁽²⁾ líquido	Luz e escuro	3 densidades iniciais (1, 5 e 10 g.L ⁻¹)	Após 60 dias de cultivo em MGM Por meio da determinação do número de embriões	4

(1) RM: meio de regeneração; (2) MGM: meio de germinação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Indução, proliferação e morfogênese

3.1.1. Influência do genótipo e da amostragem de folha sobre a resposta embriogênica da variedade ‘Catuaí Vermelho’

Na Tabela 5 é apresentado o teste de médias após a análise de variância da formação de calo primário tipo 1. Ao final de 30 dias de cultivo em meio PM sob condição de obscuridade, observou-se uma intensa proliferação celular no bordo dos explantes, não havendo diferença significativa entre os genótipos. Por outro lado, houve diferença significativa quanto à folha utilizada, exceto para a variedade Catuaí Vermelho, embora tenham sido utilizadas folhas fenotipicamente semelhantes. Desta forma, foi verificado que o meio PM é eficiente para a indução de calos primários tipo 1, uma vez que a menor nota (2,5) ainda é considerada uma nota com quantidade satisfatória de calos.

Tabela 5. Influência do genótipo e da amostragem de folhas na formação de calo primário tipo 1, após 30 dias de cultivo em meio primário - PM, avaliada por meio de notas.

Formação de Calo Primário Tipo 1 (nota)				
Folha	Genótipo			
	Mundo Novo	Híbrido Clone 12	Híbrido 427-2	Catuaí Vermelho
1	⁽¹⁾ 3,0 aA	2,6 bB	3,0 aA	3,0 aA
2	3,0 aA	2,9 abA	3,0 aA	3,0 aA
3	3,0 aA	3,0 aA	2,5 bB	3,0 aA
4	2,6 bB	3,0 aA	2,9 abA	3,0 aA
Média	2,9 A	2,9 A	2,9 A	3,0 A
C.V.(%)	6,8			

(1) Médias das notas variando entre 0 (nenhuma), 1 (baixa), 2 (média) e 3 (alta) para formação de calo. Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula para comparação horizontal e minúscula para vertical), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 6, é apresentado o teste de médias após a análise de variância da formação de calo primário tipo 2. Durante a avaliação de formação de calo primário tipo 1, foi feita também a avaliação de formação de calo primário tipo 2, um tipo de calo

fenotipicamente diferente do tipo 1, consistindo de setores de crescimento persistente e coloração esbranquiçada. Conforme descrito na Tabela 6, diferentes genótipos influenciaram a formação de calo primário tipo 2. Como pode ser observado, a formação de calo primário tipo 2 variou de 0 a 98%, respectivamente para a variedade ‘Mundo Novo’ e genótipo H427-2. Exceto para o genótipo Híbrido Clone 12, não se observou influência da folha na formação de calo primário tipo 2. Desta forma, ficou evidenciada uma maior influência do genótipo na formação desse tipo de calo.

Tabela 6. Influência do genótipo e da amostragem de folhas na percentagem de formação de calo primário tipo 2, após 30 dias de cultivo em meio primário - PM.

Formação de Calo Primário Tipo 2 (%)				
Folha	Genótipo			
	Mundo Novo	Híbrido Clone 12	Híbrido 427-2	Catuaí Vermelho
1	0,0 aB	37,0 abB	90,0 aA	27,0 aB
2	0,0 aB	57,0 aA	93,0 aA	7,0 aB
3	0,0 aB	0,0 bB	100,0 aA	10,0 aB
4	0,0 aB	73,0 aA	100,0 aA	0,0 aB
Média	0,0 C	42,0 B	98,0 A	11,0 C
C.V.(%)	56,8			

Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula para comparação horizontal e minúscula para vertical), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Após 120 dias de cultivo no meio SM, foi avaliada a percentagem de formação de calo embriogênico. Como pode ser observado na Tabela 7, a formação de calo embriogênico foi altamente influenciada pelo genótipo. Ao contrário das demais variedades, não houve formação de calo embriogênico em ‘Mundo Novo’. Como relatado por Teixeira *et al.* (2004), a formação de calo embriogênico foi maior para a variedade ‘Catuaí Vermelho’. Da mesma forma, foi observada influência da folha na formação de calo embriogênico.

Tabela 7. Influência de genótipo e da amostragem de folhas na percentagem de formação de calo embriogênico, após 120 dias de cultivo em meio SM.

Formação de Calo Embriogênico (%)				
Folha	Genótipo			
	Mundo Novo	Híbrido Clone 12	Híbrido 427-2	Catuaí Vermelho
1	0,0 aB	0,0 bB	33,3 aA	86,6 bA
2	0,0 aB	0,0 bB	19,9 abA	93,3 abA
3	0,0 aC	23,3 aB	0,0 cC	86,6 abA
4	0,0 aB	0,0 bB	6,7 bcB	100,0 aA
Média	0,0 C	5,8 C	15,0 B	72,9 A
C.V.(%)	54,9			

Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula para comparação horizontal e minúscula para vertical), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Comparando-se os resultados apresentados nas Tabelas 6 e 7 verificou-se que existe uma relação inversa entre a formação de calo primário tipo 2 e calo embriogênico. Quanto maior a formação de calo primário tipo 2, menor a formação de calo embriogênico.

Isso se dá provavelmente por características específicas presentes no calo primário tipo 2. Conforme verificado no Capítulo 2 desse trabalho, esse tipo de calo de crescimento persistente apresenta células parenquimáticas alongadas, com amplos espaços intercelulares, parede celular estreita e vacúolo bem desenvolvido (Figura 19 D). Seu aspecto é compacto, aquoso, esbranquiçado, com crescimento desordenado e excessivo. Devido a esse tipo de desenvolvimento, o calo primário tipo 2, pode competir diretamente com o surgimento e estabelecimento do calo embriogênico, essencial para a regeneração de embriões.

Esse resultado corrobora o encontrado por Teixeira *et al.* (2004), que relataram que, ao contrário do esperado, quanto mais vigoroso o calo primário, menor a frequência de formação de setores embriogênicos. Isso parece ser devido a uma competição entre o crescimento de calos primários e a indução da formação de setores embriogênicos.

A variabilidade na formação de calos embriogênicos influenciada pelo genótipo, observada na Tabela 7 corrobora o resultado encontrado por Teixeira *et al.* (2004), os quais afirmam que um dos principais fatores relacionados à embriogênese somática em *Coffea arabica* diz respeito à influência do genótipo. Resultados semelhantes já haviam

sido relatados por Söndahl & Bragin (1991), Byesse *et al.* (1993), Boxtel & Berthouly (1996) e Rezende *et al.* (2011).

Como observado em *Coffea arabica*, *Coffea canephora* também apresenta frequentemente diferenças entre genótipos (Berthouly & Etienne 1999; Fuentes *et al.*, 2000; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002; Santana *et al.*, 2004, Gatica *et al.*, 2007).

Em *Coffea arabica*, Molina *et al.* (2002) relataram diferenças de resposta entre plantas do mesmo genótipo, porém de gerações diferentes. Resultados semelhantes foram observados por Berthouly & Michaux-Ferrière (1996) em café, por Rines & McCoy (1981) em aveia e por Duncan *et al.* (1985) em milho, o que sugere que a capacidade de regeneração dos genótipos depende das condições de crescimento das plantas doadoras assim como da condição do explante utilizado.

3.1.2. Influência do número de explantes por placa e da amostragem de folha sobre a resposta embriogênica da variedade ‘Catuaí Vermelho’

Na Tabela 8 é apresentado o teste de médias após a análise de variância da formação de calo primário tipo 1, ao término de 30 dias de cultivo em meio PM. Verificou-se que independentemente do número de explantes por placa e do tipo de folha utilizada houve alta formação de calo primário tipo 1 com a inoculação em meio PM.

Tabela 8. Influência da amostragem de folhas e diferentes números de explantes por placa na formação de calo primário tipo 1, na variedade ‘Catuaí Vermelho’, após 30 dias em meio PM.

Formação de Calo Primário Tipo 1 (nota)				
Nº Explante	Folha			Média
	1	2	3	
4	⁽¹⁾ 3,0 aA	3,0 aA	3,0 aA	3,0 a
6	3,0 aA	3,0 aA	3,0 aA	3,0 a
8	3,0 aA	3,0 aA	3,0 aA	3,0 a
10	3,0 aA	3,0 aA	3,0 aA	3,0 a
Média	3,0 A	3,0 A	3,0 A	
C.V. (%)	0,0			

(1) Médias das notas variando entre 0 (nenhuma), 1 (baixa), 2 (média) e 3 (alta) para formação de calo. Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula para comparação horizontal e minúscula para vertical), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 9 é apresentado o teste de médias após a análise de variância da formação de calo primário tipo 2, com 30 dias de cultivo em meio PM. Observou-se que o tratamento com 4 explantes por placa apresentou a maior percentagem de formação de calo tipo 2. Em contrapartida, 6 explantes por placa foi a quantidade com menor percentagem de formação desse tipo de calo.

Tabela 9. Influência da amostragem de folhas e diferentes números de explantes por placa na percentagem de formação de calo primário tipo 2, na variedade ‘Catuaí Vermelho’, após 30 dias em meio PM.

Formação de Calo Primário Tipo 2 (%)				
Nº Explante	Folha			Média
	1	2	3	
4	30,0 abA	40,0 bA	27,0 aA	32,0 a
6	0,0 cA	3,0 bA	6,0 bA	3,0 c
8	7,0 bcA	7,0 bA	20,0 aA	11,0 bc
10	37,0 aA	17,0 bA	17,0 aA	24,0 ab
Média	19,0 A	17,0 A	18,0 A	
C.V. (%)	51,4			

Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula para comparação horizontal e minúscula para vertical), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 10 é apresentado o teste de médias após a análise de variância da formação de calo embriogênico com 120 dias de cultivo em meio PM. Foi verificado que a formação de setores embriogênicos variou substancialmente dependendo principalmente do número de explantes inoculados por placa. Os tratamentos com 4 e 10 explantes por placa responderam com as menores taxas de formação de setores embriogênicos indicando pouca formação desse tipo de calo, enquanto que a utilização de 6 explantes por placa apresentou uma intensa formação de setores embriogênicos.

Tabela 10. Influência da amostragem de folhas e diferentes números de explantes por placa na percentagem de formação de calo embriogênico, na variedade ‘Catuaí Vermelho’, após 120 dias em meio SM.

Formação de Calo Embriogênico (%)				
Nº Explante	Folha			Média
	1	2	3	
4	43,3 Ac	20,0 ABb	6,6 Bc	23,3 b
6	100,0 Aa	90,0 Aa	73,3 Aa	87,8 a
8	66,6 Aab	76,6 Aa	46,6 Aab	63,3 a
10	36,0 Ac	36,6 Ab	23,3 Abc	32,0 b
Média	61,5 A	55,8 AB	37,5 B	
C.V.(%)	34,6			

Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula para comparação horizontal e minúscula para vertical), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A formação de setores embriogênicos também foi influenciada pelo tipo de folha utilizada. Conforme verificado na avaliação da percentagem de formação de calo embriogênico, a folha 1 apresentou grande formação de calo e a folha 3 apresentou pouca formação de calo. Segundo Teixeira *et al.* (2004), a influência da amostragem de folha se dá possivelmente, devido a um efeito fisiológico da folha sobre a capacidade de formação de setores embriogênicos.

3.1.3. Influência de diferentes concentrações de sacarose sobre a resposta embriogênica da variedade ‘Catuaí Vermelho’

Na Tabela 11 é apresentado o teste de médias após a realização da análise de variância da formação de calos primários tipo 1 e tipo 2 com 30 dias de cultivo em meio PM e calos embriogênicos após 120 dias de cultivo em meio SM, em função do teor de sacarose. De acordo com essa Tabela foi verificado que diferentes concentrações de sacarose resultaram em diferentes respostas a indução de calo primário tipo 1. Verificou-se também que menores concentrações de sacarose correspondem a menor formação de calo primário tipo 1. No entanto, concentrações de 2 a 4% apresentaram estatisticamente o mesmo resultado, com alta formação desse tipo de calo.

Tabela 11. Influência da concentração de sacarose na formação de calos primários tipo 1 e tipo 2 após 30 dias de cultivo em meio PM e calo embriogênico após 120 dias de cultivo em meio SM na variedade ‘Catuaí Vermelho’.

Indução da Embriogênese Somática			
Sacarose	Calo Tipo 1 (nota)	Calo Tipo 2 (%)	Calo Embriogênico (%)
1%	⁽¹⁾ 2,2 b	⁽²⁾ 0,0 c	⁽³⁾ 2,0 c
2%	2,9 a	3,0 c	5,0 c
3%	3,0 a	32,0 b	92,0 a
4%	3,0 a	63,0 a	30,0 b
C.V.(%)	11,8	47,7	50,8

(1) Médias das notas variando entre 0 (nenhuma), 1 (baixa), 2 (média) e 3 (alta) para formação de calo. (2) Percentagem de formação de calo primário tipo 2. (3) Percentagem de formação de calo embriogênico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao analisar a formação de calo primário tipo 2, observou-se que a concentração de sacarose influencia diretamente a formação desse tipo de calo. Foi verificado que quanto maior a concentração de sacarose, maior a formação de calo primário tipo 2. As concentrações 1 e 2% de sacarose, não diferiram estatisticamente e apresentaram as menores percentagens de formação de calo primário tipo 2. Entretanto, na concentração de 4% de sacarose, a frequência de formação desse tipo de calo foi superior a 60%.

Avaliando-se a formação de calo embriogênico foi verificado que a concentração correspondente a 3% de sacarose apresentou a maior percentagem de formação de calo embriogênico. As concentrações de 1 e 2 % apresentaram as menores percentagens de formação desse tipo de calo e não diferiram estatisticamente entre si.

A presença de uma fonte de carbono no meio de cultura é essencial para o crescimento vegetal, visto que, *in vitro*, a fotossíntese da planta, ou do explante, é limitada. A sacarose é um dos carboidratos mais usados na preparação de meios nutritivos. A concentração de sacarose influencia no processo de indução e desenvolvimento da embriogênese somática e o seu metabolismo é regulado por um grupo de genes cujas respostas são moduladas de acordo com a variação da sua concentração. Devido a sua importância, estudos vem sendo realizados a fim de identificar a concentração ideal para o desenvolvimento *in vitro*. Diante disso, foi verificado que sua concentração usual varia de 2 e 3%, no entanto, essa informação pode varia de acordo com a espécie, onde a sacarose pode ser usada em maiores concentrações (Cid, 2010).

Sendo assim, em *Coffea arabica*, ao longo dos anos, diversos trabalhos apresentaram a utilização de 3% de sacarose como a composição básica dos meios de indução de calos (Staritsky, 1970; Boxtel & Berthouly, 1996; Estevéz *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003; Ayub & Gebieluca, 2003; Rezende *et al.*, 2011). Porém sabe-se que quanto mais vigoroso o calo primário, isso inclui calos primários tipo 1 e tipo 2, menor é a frequência de formação de setores embriogênicos.

Entretanto, segundo Teixeira *et al.* (2001) esse tipo de calo é de pouco interesse para produção em larga escala por inibir a formação de calo embriogênico e, conseqüentemente, de embriões somático. Portanto, o controle da taxa de formação do calo primário tipo 2 é fundamental para a otimização da resposta embriogênica, uma vez que, as células que compõem esse tipo de calo influenciam negativamente o surgimento de setores embriogênicos.

3.1.4. Influência de Caseína e Extrato de Malte sobre a resposta embriogênica da variedade ‘Catuaí Vermelho’

Na Tabela 12 é apresentado o teste de médias após a realização da análise de variância da formação de calos primários tipo 1 e tipo 2 com 30 dias de cultivo em meio PM e calo embriogênico após 120 dias de cultivo em meio SM. Foi verificado que a utilização tanto de caseína hidrolisada quanto de extrato de malte influenciaram a formação de calo primário tipo 1. Foi observado que a suplementação do meio nutritivo com essas duas substâncias apresentou a maior nota de formação de calo primário tipo 1, porém não diferiu estatisticamente dos tratamentos sem caseína e malte ou apenas com caseína hidrolisada. Já o tratamento em que o meio não foi suplementado com extrato de malte apresentou a menor formação de calo primário tipo 1.

Tabela 12. Influência de Caseína e Extrato de Malte na formação de calos primários tipo 1 e tipo 2 após 30 dias de cultivo em meio PM e calo embriogênico após 120 dias de cultivo em meio SM na variedade ‘Catuaí Vermelho’.

Indução da Embriogênese Somática			
Tratamento	Calo Tipo 1 (nota)	Calo Tipo 2 (%)	Calo Embriogênico (%)
Sem Caseína e sem Extrato de Malte	⁽¹⁾ 2,9 a	⁽²⁾ 60,0 a	⁽³⁾ 0,0 c
Com Extrato de Malte	2,3 b	2,0 b	18,0 bc
Com Caseína Hidrolisada	2,8 a	42,0 a	35,0 b
Com Caseína e Extrato de Malte	3,0 a	3,0 b	87,0 a
C.V.(%)	5,9	48,6	58,6

(1) Médias das notas variando entre 0 (nenhuma), 1 (baixa), 2 (média) e 3 (alta) para formação de calo. (2) Percentagem de formação de calo primário tipo 2. (3) Percentagem de formação de calo embriogênico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando avaliada a percentagem de formação de calo primário tipo 2 (Tabela 12), verificou-se que a ausência dos dois componentes e o tratamento com caseína hidrolisada apresentaram as maiores percentagem de formação desse tipo de calo. Os tratamentos com caseína mais extrato de malte e com apenas extrato de malte apresentaram respectivamente 3,0 e 2,0%, sendo conseqüentemente, as menores taxas de formação de calo primário tipo 2. A utilização dos dois componentes simultaneamente reduziu fortemente a formação de calo primário tipo 2.

Ao analisar a percentagem de formação de calo embriogênico verificou-se que todos os tratamentos diferiram estatisticamente e que o tratamento contendo caseína hidrolisada associada ao extrato de malte apresentou a maior percentagem de formação de calo embriogênico. O tratamento com caseína hidrolisada apresentou 35% de formação desse tipo de calo e o tratamento com extrato de malte apresentou 18%. Já o tratamento sem nenhum desses componentes não apresentou formação de calo embriogênico. Esses resultados indicam que há um sinergismo relacionado à presença de ambos os componentes para a formação desse tipo de calo, evidenciando assim, a importância de fontes de nitrogênio orgânico para a indução de calos embriogênicos em cafeeiro.

O metabolismo do nitrogênio está envolvido nos processos fisiológicos e bioquímicos associados ao controle de crescimento, diferenciação e morfogênese. Durante o crescimento celular, a assimilação do nitrogênio contribui para o aumento de macromoléculas e componentes celulares, importantes para a regulação dos processos

metabólicos do crescimento celular, implicando no aumento de tamanho e número de células (Durzan, 1985), sendo um nutriente de grande importância para a maioria das espécies cultivadas *in vitro*. A caseína hidrolisada é uma das principais fontes de suplementação deste elemento no cultivo *in vitro* de cafeeiro (Berthouly & Michaux-ferriere, 1996; Maciel *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2007; Rezende *et al.*, 2008).

Extrato de malte e caseína hidrolisada são misturas complexas, frequentemente utilizadas em cultura de tecidos, pois são formas orgânicas de nitrogênio que estimulam o crescimento de muitas espécies quando cultivadas *in vitro*. Estas misturas fornecem um conjunto de aminoácidos responsáveis por estimular o crescimento de muitas espécies *in vitro*, podendo ser observado um estímulo do crescimento e do desenvolvimento. (Torres *et al.*, 1998).

3.1.5. Influência de diferentes concentrações Picloram e 2,4-D sobre a resposta embriogênica da variedade ‘Catuaí Vermelho’

Na Tabela 13 é apresentado o teste de médias após a realização da análise de variância da formação de calos primários tipo 1 e tipo 2 com 30 dias de cultivo em meio PM e calo embriogênico após 120 dias de cultivo em meio SM. Conforme apresentado na Tabela 13, verificou-se que a taxa de formação de calo primário tipo 1 nos explantes inoculados não diferiu estatisticamente em todos os tratamentos apresentados. Sendo assim, a formação desse tipo de calo não foi influenciada pelo uso de diferentes auxinas (2,4-D e Picloram) e suas concentrações. Com isso, foi verificado que até mesmo as baixas concentrações de auxina são capazes de induzir a formação desse tipo de calo em *Coffea arabica* L..

Tabela 13. Influência de diferentes concentrações de 2,4-D e Picloram na formação de calos primários tipo 1 e tipo 2 após 30 dias de cultivo em meio PM e calo embriogênico após 120 dias de cultivo em meio SM na variedade ‘Catuaí Vermelho’.

Indução da Embriogênese Somática em Catuaí Vermelho				
Auxina	Concentração (μM)	Calo Tipo 1 (nota)	Calo Tipo 2 (%)	Calo Embriogênico (%)
2,4-D	5,0	⁽¹⁾ 3,0 a	⁽²⁾ 0,0 b	⁽³⁾ 27,0 b
	10,0	3,0 a	3,0 b	3,0 c
	20,0	3,0 a	3,0 b	0,0 c
	20,0/10,0	3,0 a	0,0 b	90,0 a
Picloram	2,5	2,9 a	67,0 a	3,0 c
	5,0	3,0 a	50,0 a	0,0 c
	10,0	3,0 a	30,0 ab	3,0 c
	10,0/5,0	3,0 a	27,0 ab	3,0 c
C.V.(%)		2,6	59,1	55,5

(1) Médias das notas variando entre 0 (nenhuma), 1 (baixa), 2 (média) e 3 (alta) para formação de calo. (2) Percentagem de formação de calo primário tipo 2. (3) Percentagem de formação de calo embriogênico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto a formação de calo primário tipo 2 verificou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos estudados, evidenciada pelo teste de Tukey, demonstrando que as concentrações desses reguladores influenciaram na formação desse tipo de calo (Tabela 13). Em todas as concentrações de 2,4-D houve uma baixa percentagem de formação de calo primário tipo 2. No entanto, observou-se que os tratamentos com 2,5 e 5,0 μM de Picloram apresentaram as maiores percentagens de formação de calo primário tipo 2, sendo estatisticamente superiores aos explantes inoculados com 2,4-D.

Ao avaliar a percentagem de formação de calo embriogênico, foi verificado que a utilização de 2,4-D a 20 μM no meio PM e a redução para 10 μM no meio SM foi o melhor resultado com 90% de formação de calo embriogênico. A concentração de 5,0 μM de 2,4-D apresentou 27% de formação desse tipo de calo e os demais tratamentos não diferiram estatisticamente com as menores percentagens de formação de calos embriogênico.

Os resultados apresentados coincidem com os encontrados por Cid *et al.* (2004), os quais relataram a primeira utilização de Picloram para indução de calos em *Coffea arabica*. Segundo esses autores, a utilização de 4 μM foi suficiente para a indução de

calos, embora não tenham sido testadas outras concentrações nesse trabalho. Foi apresentada ainda uma breve descrição fenotípica dos calos primários induzidos, onde foi constatado o surgimento de calos de coloração bege e branco, úmidos, compactos e surgindo na nervura central da face adaxial do explante. Ou seja, pode-se supor que parte dos calos primários encontrados nesse trabalho eram calos primários tipo 2.

Segundo Brunetta *et al.* (2006), a textura e morfologia do calo é influenciada pelas variações nos constituintes do meio nutritivo, que produz calos macios, friáveis e úmidos, em meio com alta concentração de auxina e baixa de citocinina e se a relação é inversa, produz calos de tecido compacto secos e com células pequenas.

No Experimento 1 do presente trabalho, foi verificado que a percentagem de formação de calo primário tipo 2 foi de 11,0% para a concentração 20,0 μ M de 2,4-D. Em contrapartida, no atual Experimento essa percentagem foi de 1,5%. Essa diferença de resposta pode ser atribuída à época de coleta dos explantes. Segundo Pasqual (2001), alterações na temperatura, comprimento do dia, qualidade da luz e estresse hídrico ao longo do ano resultam em plantas com alterações nos níveis de carboidratos, proteínas e reguladores de crescimento armazenados em seus tecidos que influenciam em sua resposta ao meio de cultura.

3.1.6. Influência de diferentes concentrações Picloram e 2,4-D sobre a resposta embriogênica da variedade 'Mundo Novo'

Na Tabela 14 é apresentado o teste de médias após a realização da análise de variância da formação de calos primários tipo 1 e tipo 2 com 30 dias de cultivo em meio PM e calo embriogênico após 120 dias de cultivo em meio SM. A formação de calo primário tipo 1 foi influenciada pelo uso de diferentes auxinas (2,4-D e Picloram) e suas concentrações. Diferentemente dos resultados obtidos no experimento anterior, foi detectada a presença de calo primário tipo 1 em todas as placas contendo Picloram, numa frequência e quantidade maiores do que as observadas em 2,4-D. Comparando-se o atual experimento com o experimento anterior, em que foram testadas a mesmas concentrações e os mesmo reguladores de crescimento, pôde-se perceber que o genótipo influencia ativamente nas respostas à concentrações e auxinas utilizadas.

Tabela 14. Influência de diferentes concentrações de 2,4-D e Picloram na formação de calos primários tipo 1 e tipo 2 após 30 dias de cultivo em meio PM e calo embriogênico após 120 dias de cultivo em meio SM em ‘Mundo Novo’.

Indução da Embriogênese Somática em Mundo Novo				
Auxina	Concentração (µM)	Calo Tipo 1	Calo Tipo 2	Calo Embriogênico
2,4-D	5,0	⁽¹⁾ 3,0 a	⁽²⁾ 0,0 c	⁽³⁾ 3,0 ab
	10,0	1,7 b	0,0 c	7,0 ab
	20,0	2,1 b	0,0 c	0,0 b
	20,0/10,0	2,1 b	0,0 c	0,0 b
	2,5	3,0 a	10,0 bc	13,0 a
Picloram	5,0	3,0 a	33,0 a	0,0 b
	10,0	3,0 a	30,0 ab	0,0 b
	10,0/5,0	3,0 a	53,0 a	3,0 ab
C.V.(%)		10,3	52,7	82,6

(1) Médias das notas variando entre 0 (nenhuma), 1 (baixa), 2 (média) e 3 (alta) para formação de calo. (2) Percentagem de formação de calo primário tipo 2. (3) Percentagem de formação de calo embriogênico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em 2,4-D o tratamento com 5,0 µM promoveu a maior nota para a formação desse tipo de calo. O tratamento com 10,0 µM apresentou a menor nota de formação de calo. Entretanto, assim como no experimento anterior, todas as concentrações de Picloram apresentaram máxima formação desse tipo de calo. Através desses experimentos foi possível verificar que cada genótipo responde de forma diferente a indução de calos por determinados reguladores.

Para a formação de calo primário tipo 2, verificou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos, demonstrando que as concentrações dos reguladores influenciaram a formação desse tipo de calo. Foi verificado que, assim como o resultado apresentado no Experimento 1 do presente trabalho (Tabela 6), não houve formação de calos primários tipo 2 em nenhuma das concentrações testadas com 2,4-D.

Em relação às concentrações de Picloram, o tratamento com 2,5 µM apresentou a menor percentagem de formação de calo primário tipo 2 e a concentração de 10,0 µM apresentou a maior percentagem de formação desse tipo de calo. Sendo assim, em Picloram, quanto maior sua concentração, maior a percentagem de formação de calo primário tipo 2.

Embora a percentagem de formação de calo embriogênico tenha sido baixa de uma forma geral, o tratamento de Picloram a 2,5 µM apresentou a maior percentagem de formação desse tipo de calo com 13%. Os tratamentos de 2,4-D a 5,0 e 10,0 µM e

Picloram a 10,0 µM no meio PM e 5,0 µM no meio SM não diferiram estatisticamente, apresentando de 3 a 7% de formação de calo embriogênico. Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente e não apresentaram nenhuma formação desse tipo de calo.

3.1.7. Influência de diferentes concentrações de 2-iP sobre a resposta embriogênica da variedade ‘Catuaí Vermelho’

Na Tabela 15 são apresentados os resultados encontrados para a formação de calos primários tipo 1 e tipo 2 e calo embriogênico em função de diferentes concentrações de 2-iP. Verificou-se que diferentes concentrações de 2-iP não influenciaram na formação de calo primário 1, uma vez que, em todos os resultados, a nota média de formação desse tipo de calo foi de 2,9. No entanto, a formação de calo primário tipo 2 foi claramente influenciada pela ação dessa citocinina. Verificou-se uma relação inversa entre a concentração de 2-iP e a taxa de formação de calo primário tipo 2. Quanto maior a concentração de 2-iP, menor a taxa de formação de calo primário tipo 2. Analisando a formação de calo embriogênico, foi verificado que a utilização de 10,0 µM de 2-iP apresentou a maior percentagem de formação desse tipo de calo com 87%. As concentrações de 20,0 e 30,0 µM não diferiram estatisticamente e apresentaram as menores percentagens de formação de calo embriogênico.

Tabela 15. Influência de diferentes concentrações de 2-iP na formação de calos primários tipo 1 e tipo 2 após 30 dias de cultivo em meio PM e calo embriogênico após 120 dias de cultivo em meio SM na variedade ‘Catuaí Vermelho’.

Indução da Embriogênese Somática do cafeeiro			
Concentração	Calo Tipo 1 (nota)	Calo Tipo 2 (%)	Calo Embriogênico (%)
5,0 µM	⁽¹⁾ 2,9 a	⁽²⁾ 68 a	⁽³⁾ 13 b
10,0 µM	2,9 a	28 b	87 a
20,0 µM	2,9 a	8 c	3 c
30,0 µM	2,5 a	0 c	0 c
C.V.(%)	10,4	47,7	44,9

(1) Médias das notas variando entre 0 (nenhuma), 1 (baixa), 2 (média) e 3 (alta) para formação de calo. (2) Percentagem de formação de calo primário tipo 2. (3) Percentagem de formação de calo embriogênico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Hatanaka *et al.* (1991) afirmaram que a melhor concentração das citocininas, BAP, cinetina e 2- iP para a embriogênese somática de *Coffea canephora* foi de 5,0 µM.

Segundo o autor, a embriogênese ocorre apenas na face do explante em contato com a citocinina, indicando que, em geral, esta não é absorvida pela epiderme da folha e, quando absorvida ocorre na face excisada do explante, não sendo transportada dentro do tecido foliar.

Essa afirmação sugere que a presença do 2-iP no bordo do explante apresente uma ação inibidora do surgimento e desenvolvimento do calo primário tipo 2. Assim como a formação de calo primário tipo 2, a percentagem de formação de calo embriogênico foi bastante influenciada pelas diferentes concentrações de 2-iP, onde altas concentrações desse regulador inibiram a formação desse tipo de calo. Ao contrário do observado na literatura, a concentração de 5,0 μM apresentou baixa percentagem de formação de calo embriogênico, não sendo o melhor tratamento para a indução da embriogênese somática em *Coffea arabica* var. Catuaí Vermelho.

3.2. Multiplicação de células em suspensão

3.2.1. Influência da densidade na multiplicação de calo embriogênico da variedade 'Catuaí Vermelho'

Na Figura 8 são apresentados os resultados encontrados para a influência da densidade na multiplicação de calo embriogênico. Após 90 dias de cultivo foi verificado que os calos embriogênicos nas concentrações iniciais de 6, 8 e 10 g.L^{-1} permaneceram em multiplicação ascendente durante todo o cultivo, enquanto o tratamento de 12 g.L^{-1} apresentou queda no incremento de matéria fresca por volta de 60 dias de cultivo. Verificou-se que o peso de matéria fresca ao final dos diferentes períodos de cultivo variou de acordo com a densidade inicial de células. O valor máximo de 4.217 mg foi observado para a inoculação inicial de 200 mg por 20 ml de meio, referente à densidade de 10 g.L^{-1} . Por outro lado, o menor acúmulo foi observado no tratamento 6 g.L^{-1} , com média final de 2.431 mg.

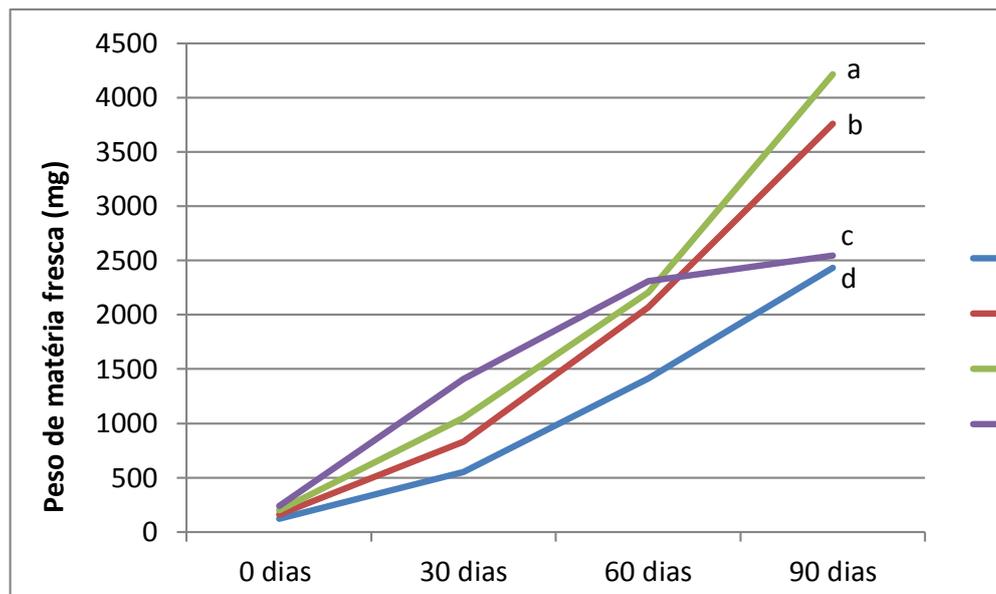


Figura 8. Avaliação da multiplicação de calo embriogênico da variedade ‘Catuaí Vermelho’ cultivadas em frascos de 125 ml de capacidade em função do período de cultivo e diferentes densidades de células por frasco de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 16 são apresentados os valores de densidade após 30, 60 e 90 dias de cultivo. Conforme verificado na Tabela abaixo, pode-se observar que uma alta densidade inicial desfavorece o incremento de matéria fresca ao longo do período de cultivo. Foi observado um aumento da densidade de células próximo de cinco vezes após 30 dias, dez vezes após 60 dias e vinte vezes após 90 dias de cultivo, exceto para a densidade inicial de 12 g.L^{-1} que apresentou um aumento inferior aos demais tratamentos nos últimos 30 dias de cultivo. Teixeira *et al.* (2004) analisando a multiplicação de células de *Coffea arabica* variedade ‘Catuaí Vermelho’ verificaram que, o aumento da densidade foi de cinco vezes após 28 dias, dez vezes após 56 dias e quinze vezes após 86 dias de cultivo.

Tabela 16. Influência de diferentes densidades iniciais (g.L^{-1}) na multiplicação de calo embriogênico na variedade ‘Catuaí Vermelho’ em meio MM líquido em função do tempo.

Multiplicação de calo embriogênico			
Densidades/0 dias	30 dias	60 dias	90 dias
6	⁽¹⁾ 28 dC	71 cB	122 cA
8	42 cC	103 bB	187 bA
10	53 bC	110 abB	211 aA
12	70 aC	115 aB	127 cA
C.V.(%)	5,9		

(1) Densidade de células embriogênicas referente a cada período de cultivo (g.L^{-1}). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Semelhante ao observado por Teixeira *et al.* (2004), verificou-se que, após aproximadamente 90 dias de cultivo, a densidade inicial mais elevada resultou em menor acúmulo de matéria fresca. Esses resultados corroboram com Boxtel & Berthouly (1996), pois segundo os autores a densidade de 10 g.L^{-1} foi a que propiciou as maiores taxas de crescimento.

3.2.2. Influência do volume do frasco e reajuste parcial na multiplicação de calo embriogênico da variedade ‘Catuaí Vermelho’

Na Figura 9 são apresentados os resultados encontrados para a influência de ajuste parcial e do volume do frasco na multiplicação de calo embriogênico após 90 dias de cultivo em meio MM líquido.

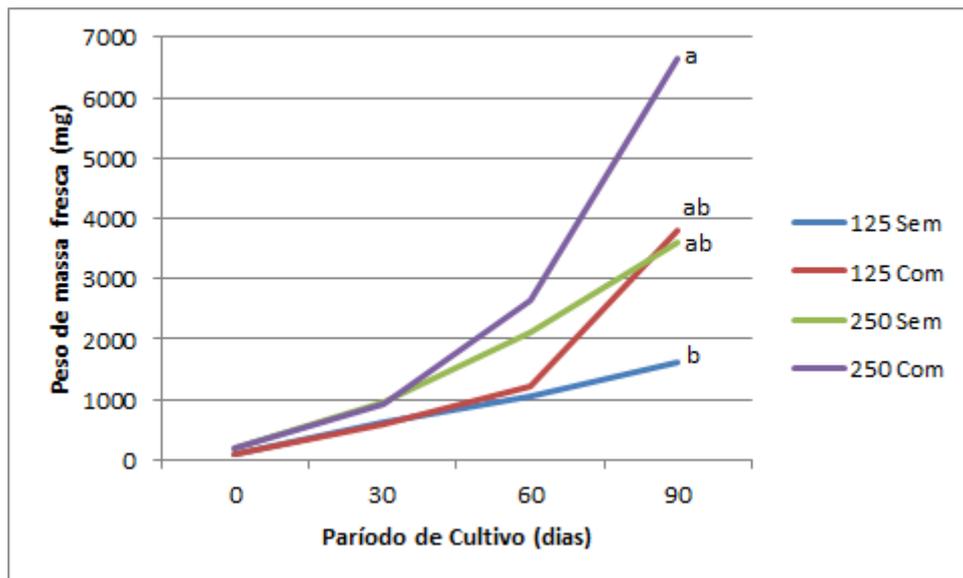


Figura 9. Avaliação da multiplicação de calo embriogênico da variedade ‘Catuaí Vermelho’ cultivadas em diferentes frascos de Erlenmeyer (125 e 250 ml de volume) com reajuste (10, 20 e 30 ml de meio para o frasco de 125 ml de volume e 20, 40 e 60 ml de meio para o frasco de 250 ml de volume) ou sem reajuste da densidade em função do período de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi verificado que em ambos volumes de frasco, os tratamentos com reajuste parcial da densidade apresentaram o maior acúmulo de matéria fresca ao final dos 90 dias de cultivo. O tratamento com o frasco de 250 ml e com reajuste da densidade foi o que apresentou maior incremento de matéria fresca, atingindo 6.645 mg ao final do período de cultivo. Em contrapartida, o tratamento com o frasco de 125 ml sem reajuste da densidade apresentou o menor acúmulo de matéria com 1.628 mg de calo. Já os tratamentos com o frasco de 250 ml sem reajuste e o tratamento com o frasco de 125 ml com reajuste não diferiram estatisticamente.

3.2.3. Influência da luz e escuro na multiplicação de calo embriogênico da variedade ‘Catuaí Vermelho’

Na Figura 10 são apresentados os resultados encontrados para a influência da luz na multiplicação de calos embriogênicos cultivados em meio MM líquido por 90 dias. Diante disso, conforme observado na Figura 8, a multiplicação de células embriogênicas é diretamente influenciada pelas condições de cultivo, especificamente pela presença de luz. Foi verificado que o maior acúmulo de matéria fresca foi observado na ausência de luz atingindo 4.259 mg de calo. A multiplicação realizada na presença de luz apresentou

resultado inferior com 3.730 mg. Os frascos cultivados na luz apresentaram um escurecimento de suas células. Os resultados apresentados corroboram com Gatica-Arias *et al.* (2008), que verificaram que a multiplicação de células em suspensão da variedade ‘Catuaí Vermelho’ e ‘Caturra’ apresentaram um escurecimento após 4 semanas de cultivo na presença de luz.

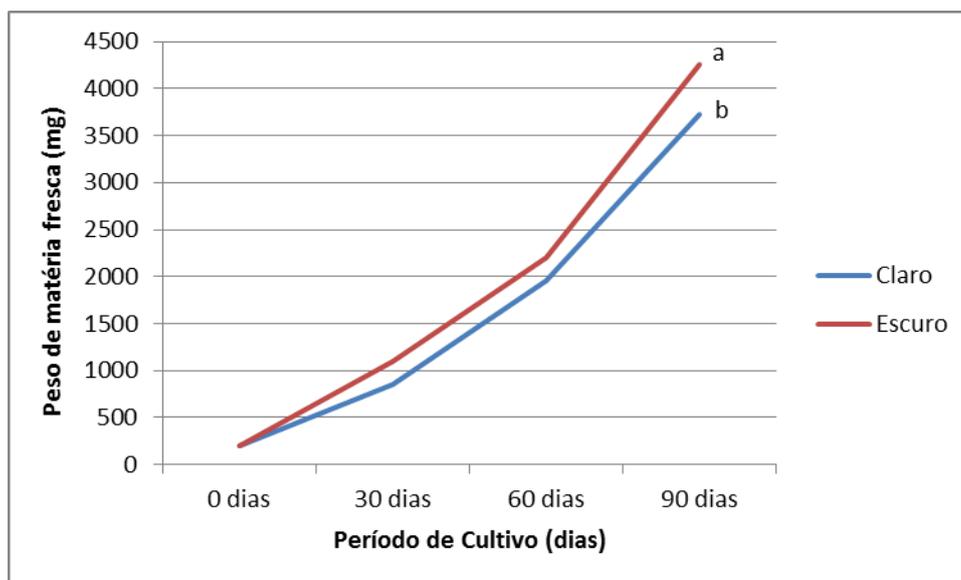


Figura 10. Avaliação da multiplicação de calo embriogênico da variedade ‘Catuaí Vermelho’ cultivadas em frascos de 125 mL de capacidade em função do período e das condições de cultivo (luz e escuro). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Além dos reguladores de crescimento, a luz também influencia a taxa de multiplicação e o crescimento dos explantes *in vitro*. Uma provável explicação para o efeito da luminosidade na taxa de multiplicação seria que a alta intensidade luminosa poderia estar reduzindo as concentrações de auxinas endógenas pela fotoxidação, provocando um desbalanceamento hormonal que agiria diretamente na multiplicação celular (Radmann *et al.*, 2001; Soontouchainaksaeng *et al.*, 2001). Note na Figura 11 o escurecimento dos calos cultivados na presença de luz devido a fotoxidação.

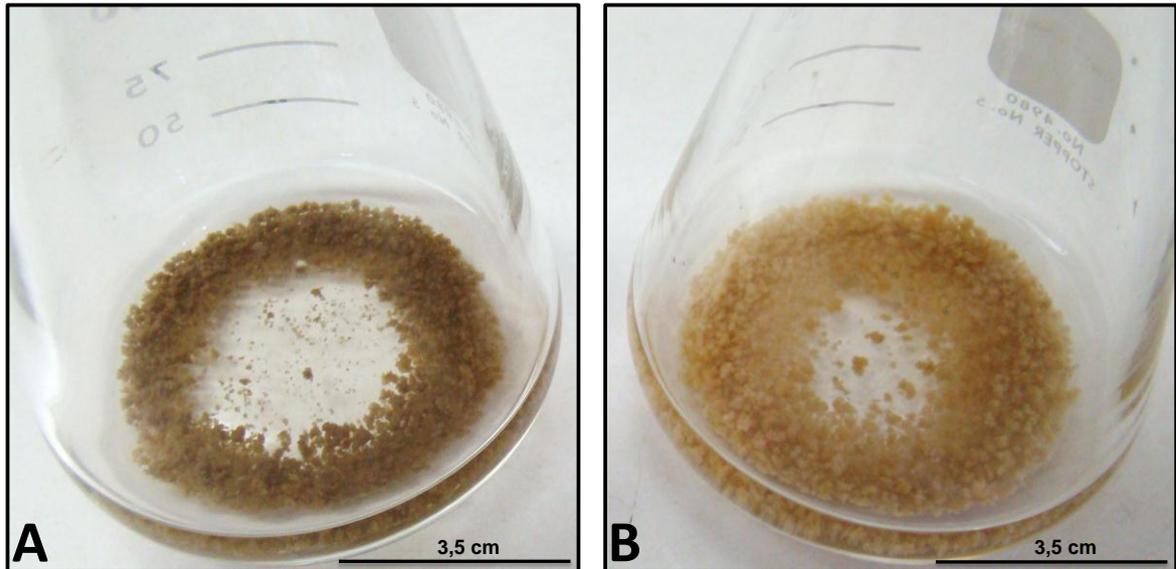


Figura 11. Multiplicação de células embriogênicas em meio líquido. Calos embriogênicos cultivados em frascos de Erlenmeyer de 125 ml na presença de luz (A) e na ausência de luz (B).

3.3. Diferenciação, maturação e germinação de embriões somáticos

3.3.1. Influência do número de explantes por placa na regeneração de embriões da variedade ‘Catuaí Vermelho’ cultivados em RM gelificado

Na Tabela 17 estão apresentados os resultados obtidos para a influência do número de explantes por placa na regeneração de embriões somáticos cultivados por 60 dias em meio RM gelificado. Foi verificado que o número de explantes por placa influenciou inversamente a regeneração de embriões somáticos. Sendo assim, o tratamento com 4 e 6 explantes por placa não diferiram estatisticamente e obtiveram as maiores notas de regeneração de embriões globulares. Por outro lado, o tratamento com 10 explantes apresentou a menor nota de regeneração de embriões. Quanto ao peso por explante, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 17. Influência do número de explantes por placa sobre a regeneração de embriões globulares da variedade ‘Catuaí Vermelho’ após 60 dias em meio RM gelificado.

Regeneração de embriões somáticos		
Nº Explantes	Nota⁽¹⁾	Peso/Explante (g)
4	2,7 a	0,19 a
6	2,6 a	0,20 a
8	1,6 ab	0,17 a
10	1,2 b	0,25 a
C.V.(%)		51,1

(1) Médias das notas variando entre 0 (nenhuma), 1 (baixa), 2 (média) e 3 (alta) para formação de embriões globulares. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Outro fator que influenciou a regeneração de embriões somáticos foi o tipo de linhagem inoculada. Sendo assim, cada frasco da fase de multiplicação constituiu uma linhagem. E cada linhagem foi distribuída em todos os tratamentos da fase de regeneração. Foi verificado que diferentes linhagens resultaram em diferentes respostas, quando submetidos aos tratamentos de números de explantes por placa (Figura 12). Como pode ser observado na Figura 12 A-D, uma linhagem com alto potencial regenerativo apresentou formação de embriões em todos os tratamentos. Embora essas linhagens sejam fenotipicamente iguais, a linhagem com baixo potencial regenerativo obteve regeneração apenas nos tratamentos com 4 e 6 explantes por placa. Nos demais tratamentos foi observada uma multiplicação celular resultando no aumento do tamanho do explante (Figura 12 E-H).

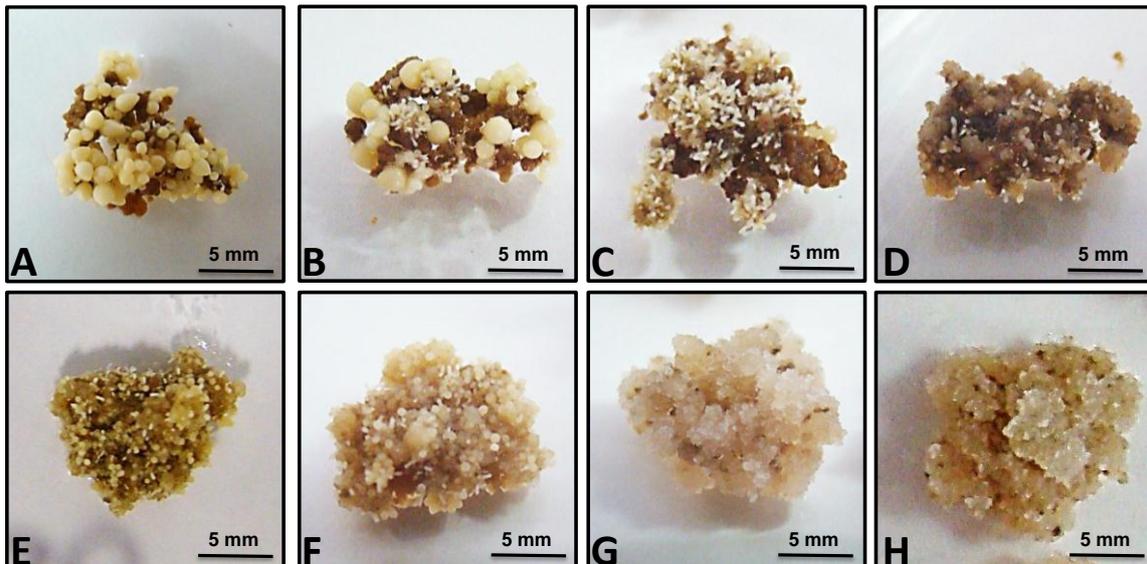


Figura 12. Regeneração de embriões da variedade ‘Catuaí Vermelho’ em meio RM gelificado. Explantes nas densidades de 4, 6, 8 e 10 explantes por placa, respectivamente. **A-D)** Linhagem com alto potencial regenerativo. **E-H)** Linhagem com baixo potencial regenerativo.

Portanto, foi verificado que os fragmentos de calos formaram diferentes quantidades de embriões e também que esse número dependeu tanto do número de explantes por placa como da linhagem inoculada. Sendo assim, os resultados corroboram os resultados obtidos por Sondhal & Sharp (1977), segundo esses autores, células da camada superficial dos calos passam para a etapa de diferenciação, mas somente algumas são responsivas à formação dos embriões, pois a diferenciação celular se deve à competência, determinação e ativação celular.



Figura 13. Regeneração de embriões somáticos da variedade ‘Catuaí Vermelho’ em meio RM gelificado. Explantes de diferentes linhagens inoculados na mesma placa.

3.3.2. Influência da luz e do tempo de cultivo na regeneração de embriões da variedade ‘Catuaí Vermelho’ cultivados em RM gelificado

Na Tabela 18 são apresentados os resultados obtidos para a influência da luz e de diferentes tempos de cultivo na diferenciação de embriões somáticos cultivados por 30, 60 ou 90 dias, no escuro ou no claro em meio RM e transferidos para frascos de Erlenmeyer de 125 ml de capacidade contendo meio MGM por 60 dias de cultivo. Foi verificado que tanto a luz e quanto o tempo de permanência no meio RM influenciaram no peso médio dos embriões por frasco. Os tratamentos com 90 dias de cultivo no claro e com 30 e 60 dias no escuro não diferiram estatisticamente e apresentaram o menor peso médio e o tratamento com 90 dias de cultivo no escuro apresentou o maior peso ao final do cultivo. Por outro lado, verificou-se que os tratamentos com 30 dias de cultivo, tanto no escuro como no claro, não diferiram estatisticamente e apresentaram os menores números de embriões por frasco. Assim como observado anteriormente, o tratamento com 90 dias de cultivo no escuro apresentou o maior número de embriões por frasco. Ao analisar o número de embriões por grama de calo embriogênico inoculado, o tratamento com 90 dias de cultivo no escuro apresentou o melhor resultado, com isso foi verificado que é necessário o cultivo por 90 dias em meio RM antes da transferência para o meio MGM e que a presença de luz influenciou

negativamente a regeneração dos embriões. Através de uma análise visual dos explantes durante o experimento, foi verificado que a presença de luz degradaram alguns componentes presentes no meio de cultura, isso foi visualizado uma vez que o meio apresentou uma consistência semi-líquida, perdendo o seu aspecto inicial gelificado. Sabe-se também que diferentes componentes do meio de cultura são fotossensíveis. Outra característica observada no material cultivado na presença de luz foi que em 100% dos explantes havia uma intensa oxidação que prejudicou a regeneração dos embriões.

Tabela 18. Efeito da luz e do tempo de cultivo sobre a diferenciação de embriões somáticos da variedade ‘Catuaí Vermelho’ cultivados por 60 dias em meio MGM líquido.

Diferenciação de embriões somáticos				
Cultivo	Tempo (dias)	Peso/frasco (g)	Embriões/frasco (n°)	Embriões/grama (n°)
Luz	30	0,75 b	128 c	⁽¹⁾ 2.140 c
	60	1,14 b	774 bc	12.827 bc
	90	1,73 ab	1.879 ab	31.310 ab
Escuro	30	1,32 ab	213 c	3.543 c
	60	1,66 ab	1.427 b	23.784 b
	90	2,18 a	3.227 a	45.181 a
C.V.(%)		39,8	55,4	55,4

(1) Número de embriões por grama de calo inoculado. Médias seguidas pela mesma não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Conforme verificado no presente trabalho, Doderman *et al.*, (1997) afirmam que fatores endógenos e do ambiente podem influenciar o controle da divisão, alongação, polaridade e diferenciação celular, influenciando assim, a regeneração de embriões somáticos.

Analisando o aspecto morfológico dos calos durante o processo de regeneração de embriões, foi verificado que após cerca de 30 dias de cultivo em meio RM houve um escurecimento intenso nos explantes cultivados na presença de luz e quanto maior o tempo de cultivo, maior o escurecimento e menor o desenvolvimento do calo, já os explantes cultivados no escuro os calos sofreram uma oxidação mais lenta e gradativa diferindo do observado na presença de luz (dados não apresentados). Sendo assim, Monaco *et al.*, (1977) verificaram que na embriogênese somática de *Coffea*, observa-se que, de modo geral, a formação de embriões ocorre após o início da oxidação dos calos.

A coloração escura em calos de *Coffea* está associada ao metabolismo de fenóis, que é característico dessa espécie, e que se encontra em concentração elevada (Monaco *et al.*, 1977). Embora a literatura informe que essa oxidação seja favorável à regeneração de embriões, foi verificado no presente trabalho que o escurecimento dos explantes ocorreu tanto na presença de luz como na ausência, no entanto, àqueles explantes cultivados com intensidade luminosa apresentaram alta oxidação e formação de embriões em quantidades reduzidas se comparadas aos explantes cultivados na ausência de luz.

3.3.3. Influência da luz e da densidade na diferenciação de embriões somáticos da variedade ‘Catuaí Vermelho’ cultivados em MGM líquido

Na Tabela 19 são apresentados os resultados obtidos para a influência da luz e de diferentes densidades na diferenciação de embriões somáticos cultivados por 60 dias em frascos de Erlenmeyer de 125 ml de capacidade contendo meio MGM. Foi verificado que tanto a luz e quanto a densidade influenciaram no peso médio dos embriões por frasco. O tratamento com a densidade de 1 g.L^{-1} no escuro apresentou o menor peso médio e o tratamento com a densidade de 10 g.L^{-1} na luz apresentou o maior peso ao final do período de cultivo. Por outro lado, verificou-se que o tratamentos com 1 e 5 g.L^{-1} no claro e 1 g.L^{-1} no escuro não diferiram estatisticamente e apresentaram os menores números de embriões por frasco. O tratamento com a densidade de 10 g.L^{-1} no escuro apresentou o maior número de embriões por frasco. Ao verificar o número de embriões por grama de calo embriogênico inoculado, observou-se que não houve diferença estatística entre nenhum dos tratamentos.

Tabela 19. Efeito da luz e da densidade sobre a diferenciação de embriões somáticos da variedade ‘Catuaí Vermelho’ cultivados por 60 dias em meio MGM líquido.

Diferenciação de embriões somáticos				
Cultivo	Densidade (g.L ⁻¹)	Peso/frasco (g)	Embriões/frasco (nº)	Embriões/grama (nº)
Luz	1	0,81 bc	759 b	⁽¹⁾ 30.360 a
	5	1,53 abc	1.669 b	13.350 a
	10	2,55 a	2.519 ab	10.076 a
Escuro	1	0,61 c	1.095 b	33.454 a
	5	2,04 ab	2.854 ab	22.834 a
	10	1,50 abc	4.127 a	16.508 a
C.V.(%)		41,2	50,0	52,2

(1) Número de embriões por grama de calo inoculado. Médias seguidas pela mesma não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em *Coffea arabica*, a regeneração de embriões somáticos a partir de calos embriogênicos do tipo HFSE (High frequency somatic embryos) foi bem documentada por Sondahl & Sharp (1977). No entanto, diversos trabalhos relatam a falta de sincronização dos embriões e o surgimento de embriões anormais durante esta etapa (Sondahl & Sharp, 1977; Boxtel & Berthouly, 1996; Berthouly & Michaux-Ferriere, 1996).

Segundo Zamarripa *et al.* (1991) e Teixeira *et al.* (2004), em *C. arabica*, densidades inferiores a 1 g.L⁻¹ podem levar a germinação precoce dos embriões formados enquanto que densidades superiores impedem o bom desenvolvimento dos mesmos. Entretanto, no presente trabalho foi observado que a densidade de 5 g.L⁻¹ no escuro apresentou um desenvolvimento adequado e sincronizado dos embriões quando comparado com a densidade de 1 g.L⁻¹ que apresentou germinação precoce na presença de luz (Figura 14).

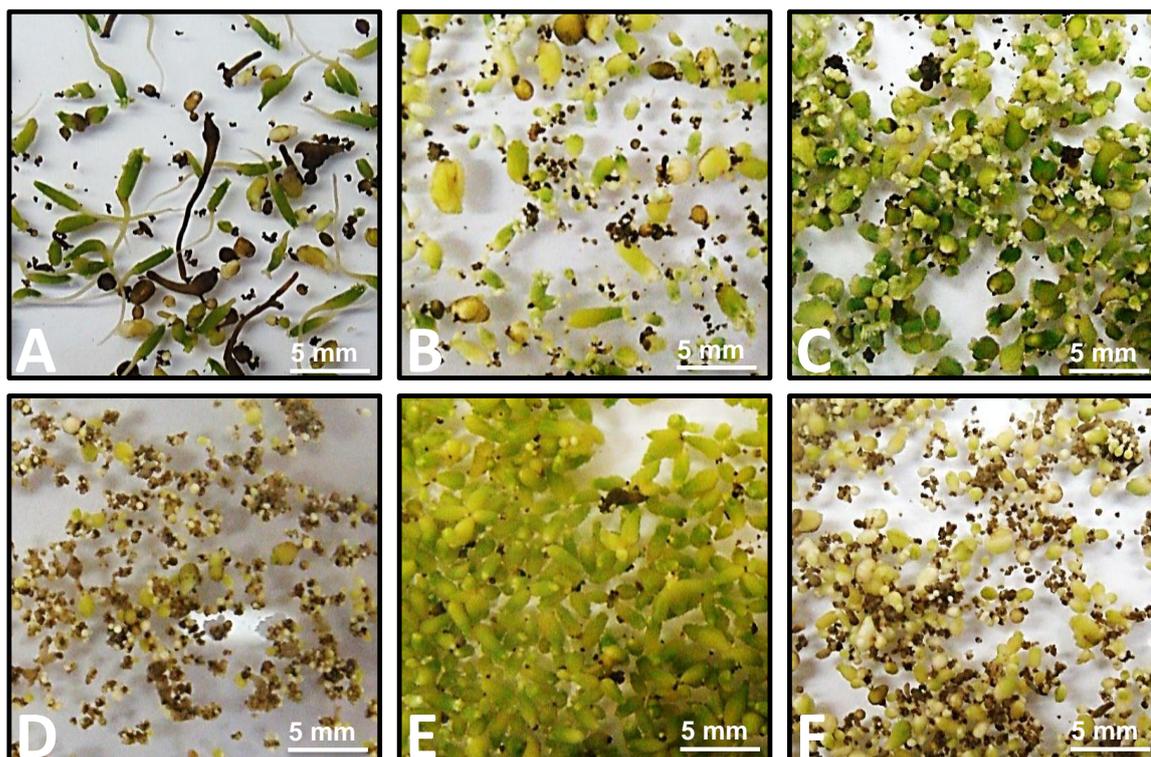


Figura 14. Diferenciação de embriões somáticos da variedade ‘Catuaí Vermelho’ em meio MGM líquido. Embriões cultivados nas densidades de 1, 5 e 10 g.L⁻¹, respectivamente, **A-C)** na luz e **D-F)** no escuro.

Na Figura 15 são apresentadas a regeneração e a aclimatização de mudas provenientes da embriogênese somática de *Coffea arabica* variedade Catuaí Vermelho.

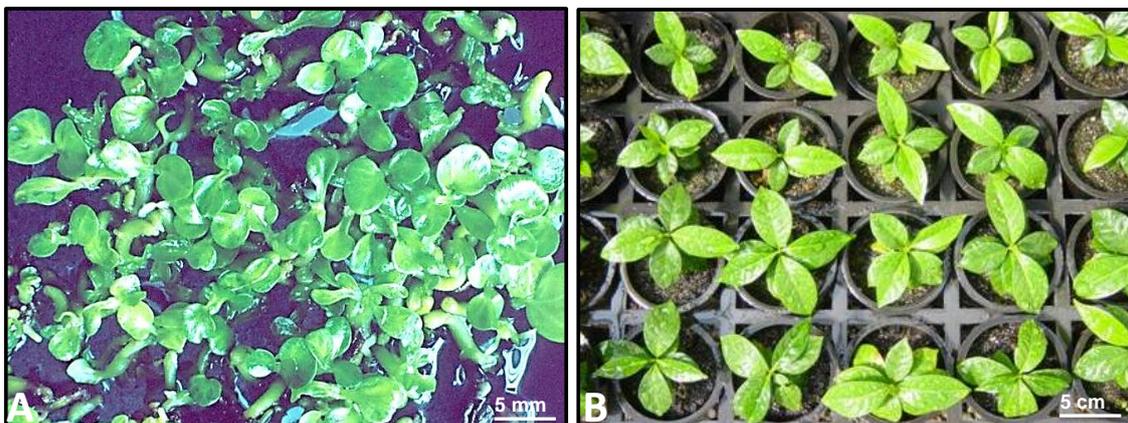


Figura 15. Regeneração e aclimatização de mudas da variedade ‘Catuaí Vermelho’ clonadas por embriogênese somática indireta. **A)** regeneração e **B)** mudas após 60 dias de aclimatização.



Figura 16. Esquema apresentando os melhores tratamentos obtidos para a embriogênese somática de *Coffea arabica*.

4. CONCLUSÕES

- Catuaí Vermelho é a variedade que melhor responde à indução de calo embriogênico com protocolo testado;
- A amostragem de folha inoculada influencia a percentagem de formação de calo embriogênico;
- Quanto maior a percentagem de formação de calo primário tipo 2 menor a percentagem de formação de calo embriogênico;
- A utilização de seis explantes por placa proporciona os melhores resultados para a formação de calo embriogênico;
- A concentração de 3% de sacarose apresenta a melhor taxa de formação de calo embriogênico;
- Quanto maior a concentração de sacarose, maior a percentagem de calo primário tipo 2;
- Caseína hidrolisada e extrato de malte influenciam positivamente a formação de calo embriogênico, ou seja, a associação desses dois componentes no meio nutritivo proporciona a maior percentagem de formação de calo embriogênico;
- A combinação de caseína hidrolisada e extrato de malte reduzem a percentagem de formação de calo primário tipo 2;
- Na variedade Catuaí Vermelho, o tratamento contendo 20 μM de 2,4-D no meio PM e sua redução para 10 μM no meio SM corresponde ao melhor resultado de formação de calo embriogênico;
- Picloram não favorece a formação de calo embriogênico, em contrapartida aumenta consideravelmente a percentagem de formação do calo primário tipo 2 na variedade Catuaí Vermelho;
- Para a variedade Mundo Novo, a concentração de 2,5 μM de Picloram nos meios PM e SM apresenta a maior percentagem de formação de calo embriogênico;
- Quanto maior a concentração de 2-iP maior a percentagem de formação de calo primário tipo 2;
- A concentração de 10 μM de 2-iP corresponde à melhor percentagem de formação de calo embriogênico;

- Após 90 dias de multiplicação de calos embriogênicos em meio de multiplicação - MM, verifica-se que a densidade inicial de 8 g.L⁻¹ corresponde ao maior acúmulo de massa fresca. No entanto, a densidade inicial de 10 g.L⁻¹ apresenta a maior densidade ao final do período de cultivo;
- Para a multiplicação de calos embriogênicos, a utilização de frascos de 250 ml de volume com ajuste parcial (20, 40 e 60 ml) da densidade representa o maior acúmulo de massa fresca;
- Ao final do período de cultivo, a multiplicação em frascos de 125 ml de volume com ajuste parcial da densidade (10, 20 e 30 ml) equivale à utilização de frascos de 250 ml de volume sem o ajuste parcial, em se tratando de acúmulo de massa fresca;
- A presença da luz na multiplicação de células embriogênicas influencia negativamente por meio da redução do acúmulo de massa fresca;
- A intensidade luminosa confere um escurecimento das células embriogênicas durante a etapa de multiplicação, devido ao aumento da oxidação fenólica;
- Durante a regeneração de embriões somáticos, a utilização de quatro e seis explantes (de calos embriogênicos) por placa proporciona à melhor formação de embriões;
- A etapa de regeneração é altamente influenciada pelas linhagens embriogênicas. Quando a linhagem é boa, a regeneração independe do número de explante por placa, mas quando a linhagem é ruim a utilização de mais de seis explantes por placa confere uma maior multiplicação do calo, o que atrapalha a regeneração dos embriões;
- É necessário o cultivo por 90 dias em meio de regeneração - RM antes da transferência para o meio de germinação - MGM;
- A transferência dos explantes para o meio de germinação - MGM antes dos 90 dias de cultivo em meio de regeneração - RM reduz consideravelmente o número de embriões regenerados e atrasa a maturação dos mesmos;
- A luz durante a regeneração de embriões em meio de regeneração - RM diminui o número de embriões formados;

- A maturação dos embriões apresenta maior sincronização com a densidade inicial de calos embriogênicos com embriões globulares a 5 g.L^{-1} no escuro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMIDA, J. A. S.; SILVAROLLA, M. M.; FAZUOLI, L. C.; STANCATO, G. C. Embriogênese somática em genótipos de *Coffea arabica* L. **Coffee Science**, Lavras, v.3, n.2, p.143-151, 2008.

AYUB, R. A.; GEBIELUCA, A. N. Embriogênese somática em genótipos de café (*Coffea arabica*) é citocinina dependente. **Ciências exatas e da Terra, agrárias e engenharias**, Ponta Grossa, p.25-30, 2003.

BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B.; VASQUEZ, N.; ETIENNE, H. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass produced in a bioreactor and regeneration of plants. **Plant Cell Reports**, v.19, p.111-117, 1999.

BERTHOULY, M.; ETIENNE, H. Somatic embryogenesis of coffee. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA DA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/UFPR/IRD, 1999. p.23-26.

BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. M. High frequency somatic embryogenesis from *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.44, n.2, p.169-176, 1996.

BIANCHI, S.; FLAMENT, P.; DATTEE, Y. Embryogene somatique et organogenese in vitro chez la Luzerne: evaluation des potentialities des divers genotypes. **Agronomie**, v.8, p.121-126, 1988.

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

BROWN, C. W.; ATAMASSOV, A. Role of genetic background in somatic embryogenesis in Medicago. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.4, p.111-122, 1985.

BRUNETTA, J. M. F. C.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. de P. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia Macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido α -naftalenoacético. **Scienti Florestalis**, n.71, p.19-24, 2006.

BYESSE, D.; GOFFLOT, A., MICHAUX-FERRIERE, N. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Canadian Journal Botany**, v.71, p.1496-1502, 1993.

CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p.25-28, 2010.

CID, L. P. B.; CRUZ, A. R. R.; CASTRO, L. H. R. Somatic embriogenesis from three coffee cultivars: 'Rubi', Catuaí Vermelho 81 and 'IAPAR59'. **Horticultural Science**, Alexandria, v.39, n.1, p.130-131, 2004.

CHEN, T.H.H.; MAROWITCH, J.; THOMPSON, B.G. Genotypic effects on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of alfafa. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.8, p.73-81, 1987.

CLOSE, K. R.; LUDEMAN, L. A. The effect of auxin-like plant growth regulators and osmotic regulation of induction of somatic embryogenesis from elite maize inbreds. **Plant Science**, v.52, p.81-89, 1987.

DAVIS, A. P.; GOVERTS, R.; BRIDSON, D. M.; STAFFLEN, P. An annotated taxonomic conspectus of genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botany Journal Linnean Society**, v.152, p.465–512, 2006.

DODEMAM, V. L.; DUCREX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v.48, p.1493-1509, 1997.

DUNCAN D. R.; WILLIAMS M. E.; ZEHR B. E.; WIDHOLM J. M. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. **Planta** v.165 p.322–332, 1985.

ESTÉVEZ, M. M.; SÁNCHEZ, J. A. M.; Vargas, V. M. L.; SOTOMAYOR, S. M. T. H. Modification of the culture medium to produce aluminum toxicity in cell suspensions of coffee (*Coffea arabica* L.). **Plant Cell Reports**, v.20 p. 469–474, 2001.

FAHEY, J.W.; REED, J.N.; READY, T.L.; PACE, G.M. Somatic embryogenesis from three commercially important inbreds of *Zea mays*. **Plant Cell Reports**, v.5, p.35-38, 1986.

FERREIRA, D. F. **Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0**. Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria, São Carlos, v.45, p.255-258, 2000.

FUENTES, S.R.L.; CALHEIROS, M.B.P.; MANETTI-FILHO, L.; VIEIRA, L.G.E. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *C. canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, n.60, p.5-13, 2000.

GATICA-ARIAS, A. M.; ARRIETA-ESPINOZA, G.; ESPINOZA, A. M. E. Comparison of three in vitro protocols for direct somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. cvs. Caturra e Catuaí. **Agronomia Costarricense**, v.31, n.1, p.85-94, 2007.

GATICA-ARIAS, A. M.; ARRIETA-ESPINOZA, G.; ESPINOZA, A. M. E. Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.11 n.1, 2008.

GIRIDHAR, P.; KUMAR, V.; INDU, E. P.; RAVISHANKAR, G. A.; CHANDRASEKAR, A. Thidiazuron induced somatic embryogenesis in *Coffea arabica* and *C. canephora*. **Acta Botanica Croatica**, v.63, n.1, p.25–33, 2004.

GMITTER, F.G.; MOORE, G. A. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of Citrus: embryo production, germination and plant survival. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.6, p.139-147, 1986.

HANZEL, J. J.; MILLER, J. P.; BRINKMAN, M. A.; FENDOS, E. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. **Crop Science**, n.25, p.27-31, 1985.

HATANAKA, T.; ARAKAWA, O.; YASUDA, T.; UCHIDA, N.; YAMAGUCHI, T. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. **Plant Cell Reports**, v.10, p.179-182, 1991.

HODGES, T. K.; KAMO, K. K.; IMBRIE, C. W.; BECWAR, M. R. Genotypic specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. **Biotechnology**, v.4, p.219-223, 1986.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; FUENTES C.; MONFORTE-GONZALES, M.; MENDEZ ZEEL M.; ROJAS R., MIJANGOS-CORTES J. Coffee tissue culture as a new model for the study of somaclonal variation. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 18., 1999, Helsinki. **Proceedings...** Paris: ASIC, p.302-307, 1999.

MACIEL, A. L. R.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C.; SILVA, A. B.; DUTRA, L. F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v.27, n.1, p.107-116, 2003.

MAES, O. C.; CHIBBAR, R. N.; CASWELL K.; LEUNG, N.; KARTHA, K. K. Somatic embryogenesis from isolated scutella of wheat: effects of physical, physiological and genetic factors. **Plant Science**, v.121, p.75-84, 1996.

MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.). *In vitro* embryogenesis in plants. **Dordrecht: Kluwer Academic**, p.155-203, 1995.

MOLINA, D.; APONTE, M.; CORTINA, H.; MORENO G. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.71, p.117-123, 2002.

MONACO, L. C.; SONDHAL, M. R.; CARVALHO, A.; CROCOMO, O. J.; SHARP, W. Applications of tissue culture in the improvement of Coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. (Eds.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, cap.6 , p.109-248, 1977.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.

NEUENSCHWANDER, B.; BAUMANN, T.W. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v.10, n.608-612, 1992.

- PASQUAL, M. **Introdução:** fundamentos básicos. Lavras: UFLA/FAEPE, p.97, 2001.
- PEREIRA, A. R.; CARVALHO, S. P.; PASQUAL, M.; SANTOS, F. C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. acaia cerrado: efeito de citocinina e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.2, p.332-336, 2007.
- QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; FUENTES-CERDA, C. F. J.; ROJASHERRERA, R.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v.20, p.1141-1149, 2002.
- RADMANN, E. B.; BRAGA, E. J. B.; KARAN, M. A. L.; POSADA, M. A. C.; PETERS, J. A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, n.3, p.171-175, 2001.
- REZENDE, J. C.; CARVALHO, C. H. S.; PASQUAL, M.; SANTOS, A. C. R.; CARVALHO, S. M. Calli induction in leaf explants of coffee elite genotypes. **Ciência Rural**, v.41, n.3, p.384-389, 2011.
- REZENDE, J. C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, S. P.; PEREIRA, A. R.; VILLA, F. Influência do meio de cultura e concentração de agar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n.1, p.21-26, 2008.
- RINES H.W.; McCOY T. J. Tissue culture initiation and plant regeneration in hexaploid species of oats. **Crop Science**, v.21, p.837-842, 1981.
- SANTANA, N.; GONZALES, M. E.; VALCARCEL, M.; CANTO-FLICK, A.; HERNANDEZ M.; FUENTES CERDA, C. F. J.; BARAHONA, F.; MIJANGOS-CORTES, J.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Somatic embryogenesis: a valuable alternative for propagating selected robusta coffee (*Coffea canephora*) clones. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.40, p.95-101, 2004.
- 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.
- SHARP, W.R.; CALDAS, L.S.; CROCOMO, O.J.; MONACO, L.C.; CARVALHO, A. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. **Phyton**, v.31, p.67-74, 1973.
- SÖNDAHL, M. R.; BRAGIN, A. Somaclonal variation as a breeding tool for coffee improvement. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 14., 1991, San Francisco. **Proceedings...** Paris: ASIC, p.701-710, 1991.
- SÖNDAHL, M. R.; SHARP, W. R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Zeitung Pflanzenzüchtung**, v.81, p.395-408, 1977.

SOONTORNCHAINAKSAENG, P.; CHAICHAROEN, S.; SIRIJUNTARUT, M.; KRUATRACHUE, M. *In vitro* studies on the effect of light intensity on plant growth of *Phaius tankervilleae* (Banks ex L' Herit) Bl. And *Vanda coerulea* Giff. **Science Asia**, v.27, p.233-237, 2001.

STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Botanica Neerl.**, v.19, p.509-514, 1970.

TEIXEIRA, J. B.; ARIMURA, C. T.; JUNQUEIRA, C. S. Influência dos níveis de 2-iP e 2,4-D na embriogênese somática de folhas de plantas de *Coffea canephora* e *Coffea arabica*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Vitória, ES: Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café, p.386-392, 2001.

TEIXEIRA, J. B.; JUNQUEIRA, C. S.; PEREIRA, A. J. P. D. A. C.; MELLO, R. I. S.; SILVA, A. P. D.; MUNDIM, D. A. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L) via embriogênese somática**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p.39, 2004.

ZAMARRIPA, A.; DUCOS, J. P.; TESSERAU, H.; BOLLON, H.; ESKES, A.; PÉTIARD, V. Développement d' un procédé de multiplication en masse du caféier par embryogénese somatique en milieu liquide. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 14., 1991, San Francisco. **Proceedings...** Paris: ASIC, p.392-402, 1991.

WOODWARD, A. D.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action and interaction. **Annals of Botany**, London, v.95, p.707-735, 2005.

YAVAD, R. C.; SALEH, M. T.; GRUMET, R. High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, p.207-214, 1990.

CAPÍTULO 2

HISTOLOGIA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DO CAFEIRO (*Coffea arabica* L. variedade Catuaí Vermelho) E ONTOGÊNESE DE CALOS

RESUMO

Desde a sua chegada ao Brasil, o cafeeiro sempre teve grande importância para a economia brasileira. O Brasil se tornou o maior produtor mundial de café com a exportação de 26 milhões de sacas ao ano, rendendo ao país cerca de 2 bilhões de dólares ao ano. A micropropagação via embriogênese somática é a melhor opção para a propagação clonal em larga escala dessa espécie. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi compreender as principais etapas da embriogênese somática de *Coffea arabica* variedade ‘Catuaí Vermelho’, por meio de cortes anatômicos e da ontogênese do calo. Para tanto, cortes anatômicos seriados foram realizados em explantes foliares com diferentes períodos de cultivo nos meios primário e secundário (0, 4, 7, 15, 30 dias), calo primário tipo 1, calo primário tipo 2, calo embriogênico, embriões globulares, embriões torpedo, embriões cotiledonares e embriões zigóticos. Verificou-se que a formação de calo primário acontece aos 7 dias de cultivo e esse calo se originou a partir de divisões sucessivas de células do procâmbio. Calos primários tipo 1 e tipo 2 apresentaram morfologia e tipos celulares distintos e o calo embriogênico é originado do calo primário tipo 1.

Palavras-chave: Anatomia vegetal, calo primário tipo 1, calo primário tipo 2, calo embriogênico, ontogênese.

ABSTRACT

Since its introduction to Brazil, the coffee has always been of great importance to the Brazilian economy. Brazil has become the world's largest producer of coffee, currently exporting twenty-six million sacks per year, earning the country an estimated two billion dollars annually. Micropropagation via somatic embryogenesis is the best option for large scale clonal propagation of this species. In this context, this work aimed to understand the key phases in the somatic embryogenesis of the *Coffea arabica* variety 'Catuaí Vermelho', by means of anatomical sections and ontogenesis of the callus. To this end, series of anatomical sections were performed on foliar explants at different stages of growth in primary and secondary media (0, 4, 7, 15, and 30 days): primary callus type 1, primary callus type 2, embryogenic callus, globular embryos, torpedo embryos, cotyledonary embryos, and zygotic embryos. It was found that the formation of primary callus occurs at seven days of cultivation, and that these calli originate from the successive division of the procambium cells. Primary calli type 1 and type 2 have distinct morphology and distinct cell types and the embryogenic callus originates from primary callus type 1.

Key-words: Plant anatomy, primary callus type 1, secundar callus type 2, embryogenic callus, ontogenesis.

1. INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma atividade de grande expressão no cenário agroindustrial brasileiro, colocando o Brasil como o maior produtor e maior exportador de café do mundo (Agrianual, 2011). *Coffea arabica* L. (Rubiaceae) é responsável por 70% de todo o café produzido e comercializado no mundo. Esta espécie é uma planta perene de porte arbustivo, produtora de frutos do tipo drupa, contendo normalmente duas sementes que constituem seu produto econômico (Santos *et al.*, 2003).

O sucesso dos programas de melhoramento genético do cafeeiro tem colocado à disposição dos cafeicultores variedades mais adaptadas, produtivas e resistentes. Elas têm sido produzidas visando atender às demandas dos consumidores, entretanto o melhoramento genético do cafeeiro por métodos convencionais é um processo demorado, podendo levar mais de trinta anos para se obter uma nova cultivar. Dessa forma, a propagação clonal da espécie é fundamental para possibilitar uma rápida difusão de novos genótipos de interesse (Pereira *et al.*, 2003).

A embriogênese somática é definida como o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios, dando origem a uma planta sem que ocorra a fusão de gametas, possibilitando a propagação acelerada de híbridos superiores (Pereira *et al.*, 2007).

Segundo Donato *et al.* (2000), a embriogênese somática *in vitro* apresenta dois padrões básicos de desenvolvimento de embriões: direto, no qual os embriões somáticos originam-se diretamente dos tecidos matrizes, sem a passagem por estádios intermediários de calos; e indireto, no qual os embriões somáticos se formam a partir de calos primários, que são constituídos por uma massa de células com crescimento desorganizado. Na embriogênese somática indireta do cafeeiro, diferentes tipos de calos podem ser obtidos, ocorrendo o calo primário de crescimento não persistente (tipo 1), o calo primário de crescimento persistente (tipo 2) e o calo embriogênico. Estes tipos de calos são fenotipicamente diferentes.

O calo primário tipo 1 tem início após 15 a 20 dias de cultivo no meio primário – PM (Teixeira *et al.*, 2004), forma-se em grânulos nos bordos do segmento de folha e permanece em crescimento ativo por mais algumas semanas no meio secundário – SM (Teixeira *et al.*, 2004). Inicialmente, apresenta coloração clara e crescimento ativo. Entretanto, após aproximadamente 60 dias de cultivo no meio SM, observa-se um escurecimento gradativo e redução do crescimento.

Por sua vez, o calo primário tipo 2, embora tenha origem parecida ao calo primário tipo 1, apresenta coloração clara e crescimento persistente, mesmo após 120 dias de cultivo no meio SM.

O calo embriogênico tem origem basicamente a partir do calo primário tipo 1, após aproximadamente 120 dias de cultivo do segmento de folha no meio SM, apresenta coloração amarela intensa e constituição friável.

A anatomia vegetal é o ramo da botânica que estuda as estruturas internas do corpo das plantas, permitindo a descrição de células, tecidos e órgãos quanto a sua ontogênese, constituição e função. Diante disso, a anatomia vegetal pode auxiliar na compreensão de diversos fenômenos relacionados aos organismos vegetais, dentre os quais a embriogênese somática (Rodrigues *et al.*, 2004).

Diante desse contexto, o objetivo do trabalho foi identificar através da ontogênese, a origem de formação de calos, bem como comparar, por análises anatômicas, calos primários tipo 1, tipo 2 e calo embriogênico e analisar histologicamente explantes foliares, embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento e embriões zigóticos de *Coffea arabica*, variedade Catuaí Vermelho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Análise histológica de neo-formações vegetativas e reprodutivas

Os experimentos de análise histológica foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília – DF e no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade de Brasília.

Após 0, 4, 7, 15 e 30 dias de cultivo nos meios primário - PM e secundário - SM, foram coletadas 9 amostras de cada período, 9 amostras de cada tipo de calo (calo primário tipo 1 e tipo 2 e calo embriogênico), bem como 9 amostras de cada um dos embriões somáticos em vários estádios de desenvolvimento, abrangendo os embriões globulares com 90 dias de cultivo em meio de regeneração - RM, embriões torpedo com 30 dias de cultivo em meio MGM, embriões cotiledonares com 60 dias de cultivo em meio de germinação - MGM e embriões zigóticos retirados de sementes de plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação. As condições de cultivos e a composição dos meios nutritivos seguem àquelas descritas no Capítulo 1 do presente trabalho.

As amostras foram fixadas por um período mínimo de 24 h em FAA 50 (formaldeído 37-40%, ácido acético glacial e álcool etílico 50% 1:1:18, v/v) sob vácuo (Johansen, 1940), lavadas duas vezes e estocadas em etanol 50%. As amostras foram desidratadas em série etílica crescente. As amostras de calos foram infiltradas em historresina (Leica®). Secções com 5 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo manual Leica®, distendidas sobre água em uma lâmina de vidro, sobre placa aquecedora a 40°C. Os cortes foram corados com azul de toluidina 0,5% e analisados sob fotomicroscópio óptico com sistema de captura de imagens (Zeiss Axioskop).

As demais amostras foram infiltradas em parafina para a realização de cortes seriados. Para a infiltração em parafina, os espécimes foram desidratados em série etanólica, diafanizados em soluções de etanol e xilol nas proporções 3:1, 1:1 e 1:3 e duas passagens em xilol puro e colocados em frascos contendo 3 partes de parafina para uma de xilol. Os frascos foram tampados e colocados em estufa a 60°C por 1 hora, depois foram destampados e permaneceram por 24 h na mesma temperatura para a evaporação completa do xilol. A parafina foi trocada 24 e 48 h depois, para que o material não mantivesse resíduos de xilol.

O material foi emblocado e foram obtidas secções transversais da folha e longitudinais dos embriões com 7 µm de espessura foram obtidas em micrótomo

rotativo manual Leica[®]. Aplicou-se a solução Haupt A (adesivo) na lâmina, que foi seca em placa aquecedora a 60°C, depois foram acrescentadas 2-3 gotas de Haupt B (solução de formalina diluída), onde os cortes foram distendidos. A coloração foi feita com safranina e "fast green".

As lâminas foram analisadas sob microscópio óptico e o registro dos resultados foi feito em fotomicroscópio Zeiss Axioskop acoplado a sistema de captura de imagens LAS EZ.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Folha Adulta

A Figura 17 caracteriza a morfologia e os aspectos anatômicos da folha de *Coffea arabica* L. var. Catuaí Vermelho cultivada em casa de vegetação e utilizada como explante inicial na indução da embriogênese somática.

A epiderme é unisseriada, com células comuns mais altas na face adaxial do que na abaxial (Figura 17 B, G-H). A folha é hipoestomática, com estômatos nivelados com o restante da epiderme e câmara subestomática ampla (Figura 17 H). Segundo Metcalfe & Chalk (1965), essa característica da distribuição dos estômatos apenas na face abaxial é amplamente conhecida na família Rubiaceae. Esse padrão também foi observado por Nakamura *et al.* (1992) em *Coffea arabica* variedades Typica e Catuaí Amarelo.

O mesofilo é dorsiventral, com uma só camada de parênquima paliádico, com células cerca de 2,5-3 vezes mais altas que largas e com numerosos cloroplastos (Figura 17 G). O parênquima lacunoso apresenta 8-12 camadas de células isodiamétricas e amplos espaços intercelulares.

A nervura mediana é proeminente nas duas faces, sendo que a saliência adaxial possui cerca de um terço da largura da saliência abaxial. A região cortical é ocupada por colênquima e parênquima. O colênquima constitui uma calota com 1-3 camadas de células na região subepidérmica da saliência da face adaxial (Figura 17 B-C) e 1-4 camadas ao longo de toda a região subepidérmica abaxial (Figura 17 B, D). Na face adaxial, cerca de um terço da largura de cada lado da nervura mediana é ocupado por parênquima paliádico e lacunoso. A bainha endodérmica e o periciclo são pouco conspícuos; a primeira é constituída pela última camada cortical, enquanto o segundo é formado por 1-2 camadas internas à primeira (Figura 17 B-D, setas), mas estes tecidos tornam-se descontínuos em algumas regiões (Figura 17 F).

A vascularização é composta por um grande cilindro central e 2-3 traços vasculares voltados para a face adaxial, todos fechados, onde se identificam raios parenquimáticos e o câmbio contínuo, caracterizando um típico crescimento secundário nesta nervura. A medula parenquimática é desenvolvida apenas no grande cilindro central (Figura 17 B-C).

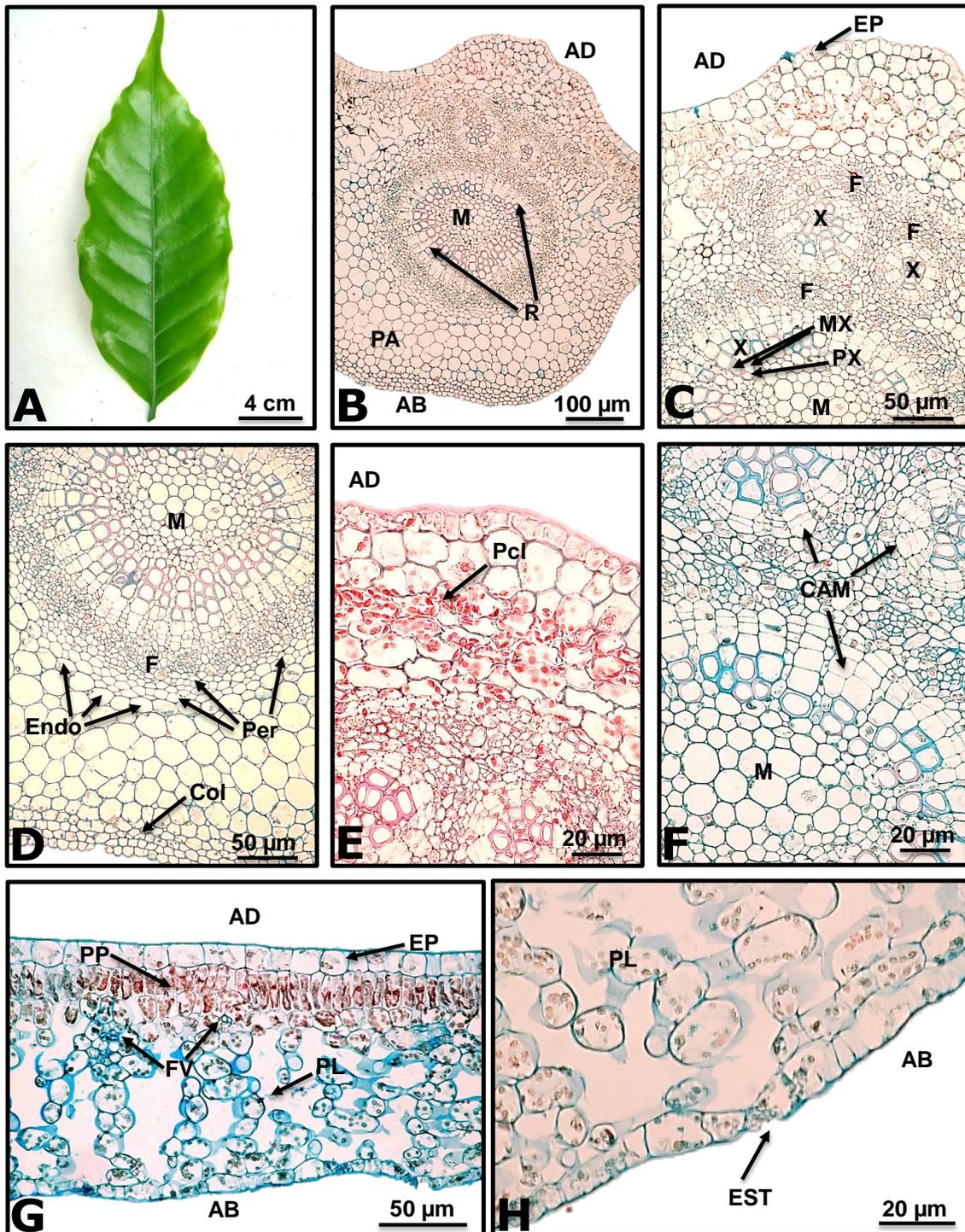


Figura 17. Folha de *Coffea arabica* var. Catuaí Vermelho cultivada em casa de vegetação e utilizada como explante inicial da embriogênese somática. **A.** Morfologia externa. **B-F.** Secções transversais da nervura mediana: notar sistema vascular fechado no centro, com raio parenquimático típico de crescimento secundário. **G-H.** Secções transversais da ala foliar. Abreviações: AB = face abaxial; AD = face adaxial; CAM = câmbio; Col = colênquima; Endo = endoderme; EP = epiderme; EST = estômato; F = floema; FV = feixe vascular; M = medula; MX = metaxilema; PA = parênquima; Pcl = parênquima clorofiliano; Per = periciclo; PL = parênquima lacunoso; PP = parênquima paliádico; PX = protoxilema; R = raio; X= xilema.

Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram os de Menéndez-Yuffá & Garcia (1997) que, analisando a lâmina foliar da variedade ‘Catimor’ (*Coffea arabica* var. ‘Caturra Vermelho’ x ‘Híbrido de Tymor’) como explante inicial para a indução de calos, verificaram que a folha tem uma estrutura bifacial. Em corte transversal, eles observaram que a epiderme nas duas faces é unisseriada, o parênquima paliçádico possui uma única camada de células, o parênquima lacunoso apresenta uma altura cinco vezes maior que o paliçádico e é composto por nove camadas de células frouxamente arranjadas, entre outras características. Resultados semelhantes também foram observados por Nakamura *et al.* (1992) em *Coffea arabica*. Mesmo sob diferentes regimes de luminosidade, as folhas do cafeeiro permanecem com uma só camada de parênquima paliçádico, variando a altura de suas células e parâmetros do parênquima lacunoso (Voltan *et al.*, 1992).

Domácias foram constatadas no ângulo interno formado entre a nervura mediana e a secundária (Figura 18 A). Elas são constituídas por uma invaginação abaxial foliar, formando uma cavidade com uma abertura circular, que é totalmente revestida pela epiderme. Na face adaxial foliar pode ocorrer uma leve saliência correspondente à localização da domácia. Dentro da cavidade, não foram constatados tricomas, nem estômatos.

Nakamura *et al.* (1992) apresentaram uma descrição das domácias bastante similar à encontrada no presente trabalho, exceto pela presença de tricomas recobrendo as domácias. Segundo Brouwer & Clifford (1990), estas estruturas são encontradas em mais de 2000 espécies e aparecem como um aglomerado de tricomas ou cavidades de diferentes tipos (indumentadas ou glabras), localizadas nas junções entre as nervuras principal e secundárias, na face abaxial das folhas.

Assim como as domácias, outras estruturas são amplamente encontradas em diversas plantas (pêlos, nectários), fornecendo abrigo e/ou alimento a diferentes espécies de artrópodes predadores, dos quais muitos são eficazes no controle de diversas pragas (Marquis & Whelan, 1996; Walter, 1996; Heil *et al.*, 1997; Agrawal *et al.*, 2000). Essas estruturas podem ser de grande importância para esses organismos, servindo como agentes de controle biológico, uma vez que favorecem a presença de predadores de fitófagos na planta, ao disponibilizarem alimento alternativo e refúgio contra seus próprios predadores. Uma vez na planta, esses organismos passam realmente a ser benéficos às mesmas ao se alimentarem de herbívoros, podendo desta

forma contribuir para a redução de seu ataque, assim como de patógenos (Marquis & Whelan, 1996).

Essas estruturas estão associadas a diferentes espécies de ácaros predadores e fungívoros, dos quais muitos são importantes agentes de controle de ácaros fitófagos e fungos fitopatogênicos, que ocasionam danos consideráveis às plantas (Pemberton & Turner, 1989; Turner & Pemberton, 1989; Rozario, 1995; Walter, 1996; O'Dowd & Pemberton, 1998). As domácias encontradas no cafeeiro são do tipo cavidade, que são utilizadas por ácaros predadores, inclusive fitoseídeos, cuja família engloba as espécies mais importantes no controle de ácaros fitófagos (Tanigoshi, 1982; Lorenzato, 1987; Moraes, 1992).

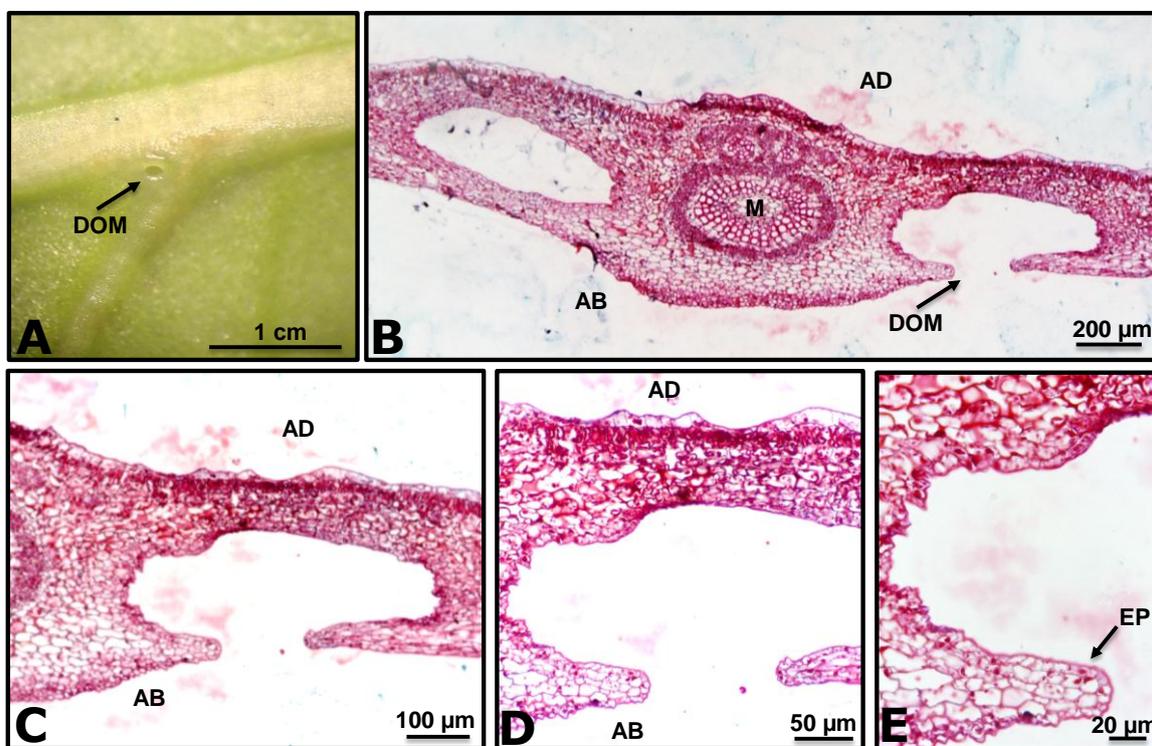


Figura 18. Folha de *Coffea arabica* var. Catuaí Vermelho cultivada em casa de vegetação e utilizada como explante inicial da embriogênese somática - detalhes das domácias. **A.** Morfologia externa. **B-E.** Secções transversais: notar ausência de tricomas. Abreviações: AD = adaxial; AB = abaxial; M = medula; DOM = domácia; EP = epiderme.

No cafeeiro, o principal ácaro predador é *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma (Acari: Phytoseiidae), que tem como uma de suas presas *Oligonychus ilicis* McGregor (Acari: Tetranychidae), espécie conhecida como ácaro vermelho do cafeeiro e que é uma praga de grande importância na cultura. Esse predador também se alimenta

de presas alternativas, como ácaros Tydeidae, comumente encontrados no interior das domácias e na face inferior das folhas (Pallini Filho, 1992). Diante disso, a presença de domácias no cafeeiro torna-se de grande importância para a defesa da espécie contra pragas economicamente importantes.

3.2. Ontogênese dos calos

Não foi verificada a formação de calos aos 0, 2 e 4 dias de cultivo, mas eles foram constatados em explantes aos 7, 15 e 30 dias de cultivo em meio PM (Figura 19). Diversos autores mostram que a formação de calo se inicia por volta dos 7 dias de cultivo de explantes foliares oriundos de diferentes espécies de *Coffea*, incluindo *Coffea arabica* (Michaux-Ferriere *et al.*, 1987; Michaux-Ferriere *et al.*, 1989; Bieysse *et al.*, 1993; Berthouly & Michaux-Ferriere, 1996; Menéndez-Yuffá & García, 1997), mas Sondhal *et al.* (1979) observaram isto somente a partir do 25º dia de cultivo.

Verificou-se que o desenvolvimento do calo estava associado ao feixe vascular em 100% dos calos analisados, sendo que eles se formam principalmente nas regiões próximas ao bordo dos explantes excisados, onde existe maior contato entre as células da região vascular e os componentes do meio nutritivo. Esta análise foi possibilitada pela metodologia utilizada no presente trabalho, pois os cortes seriados permitem examinar ao longo de todo o calo. Secções tangenciais dos calos podem não mostrar o feixe vascular associado, resultando em equívocos na interpretação dos resultados, o que não ocorre quando toda a série de cortes é analisada.

Ao longo do desenvolvimento do calo, as células do parênquima paliçádico adjacente apresentam aumento da largura e diminuição da altura (Figura 19 A-D), evidenciando o achatamento devido à compressão das mesmas contra a epiderme. O parênquima lacunoso contíguo ao calo se mantém com as células isodiamétricas. Não há sinais de divisão celular nestes tecidos no início do desenvolvimento do calo (Figura 19 A). No início do desenvolvimento do calo, não há evidências de desdiferenciação celular, tais como células vacuoladas alinhadas, separadas por paredes retas (Figura 19 A).

As divisões celulares começam próximo ao feixe vascular, onde se observam células de tamanho reduzido, citoplasma denso e núcleo evidente (Figura 19 A). A proliferação celular resulta no aumento da espessura da folha (Figura 19 A-E), onde há inicialmente um predomínio de divisões periclinais, resultando em células enfileiradas

(Figura 19 C), de modo semelhante ao procâmbio. As células de menor tamanho se mantêm no centro inicial do calo, caracterizando uma região promeristemática que ali se mantém ao longo do desenvolvimento do mesmo (Figura 19 F).

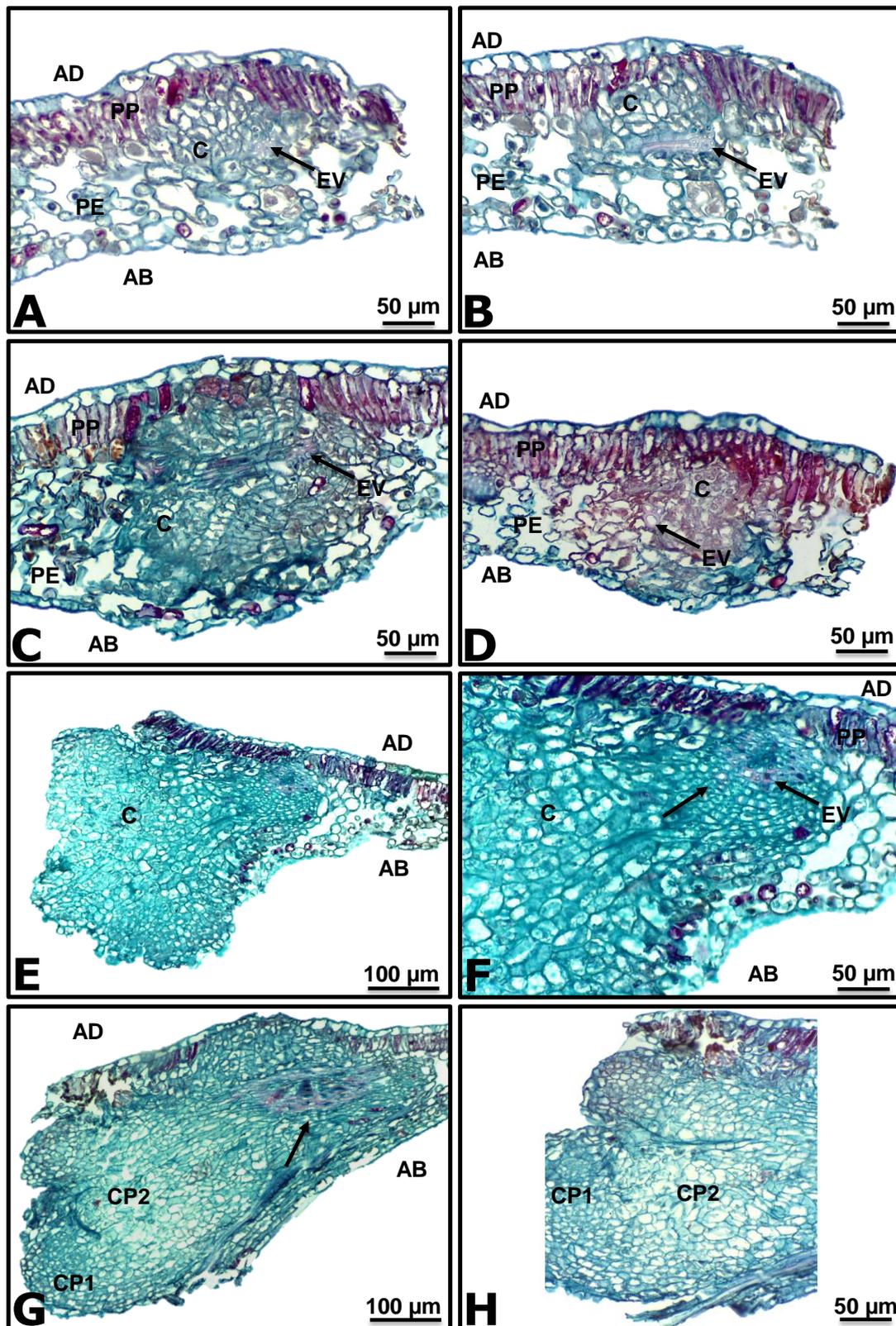


Figura 19. Aspectos anatômicos (A-H) da formação de calo primário em folha da variedade Catuaí Vermelho. **A e B)** Explante com 7 dias de cultivo em meio PM. **C e D)** Explante com 15 dias de cultivo em meio PM. **E-H)** Explante com 30 dias de cultivo em meio PM. AD = adaxial; AB = abaxial; PP = parênquima paliçádico; PE = parênquima lacunoso; EV = elemento de vaso; C = calo; CP1 = calo primário tipo 1; CP2 = calo primário tipo 2.

As células do calo desenvolvido apresentam tamanho maior, quanto mais afastadas da região promeristemática que, de acordo com as análises realizadas, está sempre associada à região do procâmbio. Esse padrão de origem de formação de calo não só foi verificado aos 7 dias de cultivo como também nos demais períodos de cultivo analisados (Figura 19 G).

Células perivasculares de explantes foliares de *Coffea arabica* foram apontadas como a origem da proliferação de calos primários por diversos autores (Michaux-Ferriere *et al.* 1987; Bieysse *et al.*, 1993), o mesmo ocorrendo em *C. canephora* (Michaux-Ferriere *et al.*, 1989).

A origem múltipla é apontada por alguns autores. Segundo Berthouly & Michaux-Ferriere (1996), células perivasculares do feixe vascular e muitas células do mesofilo próximo ao bordo do explante foram as primeiras a se dividir em *C. canephora*. Menéndez-Yuffá & García (1997) observaram que a divisão celular ocorreu no parênquima lacunoso e no tecido perivascular da nervura em explantes de "Catimor" (*C. arabica* cv. Caturra Vermelho x Híbrido do Timor).

Já Sondhal *et al.* (1979) apresentaram que a formação de calo iniciou-se a partir de células do mesofilo, mais especificamente do parênquima lacunoso em *C. arabica*, o que também foi descrito para *C. canephora* por Pierson *et al.* (1983). Analisando a literatura referente a origem de formação de calo, em nenhum dos trabalhos citados foi informada a realização de cortes seriados na análise da ontogênese dos calos.

A identificação do início da formação do calo pode ser uma informação importante para a otimização do protocolo de obtenção de embriões somáticos. Sabendo disso, o estudo da ontogênese foi meticuloso no presente trabalho. Foram analisadas amostras de cada estágio de explantes foliares com formação de calo em diferentes períodos de cultivo, onde os cortes seriados possibilitaram uma análise tridimensional da formação dos calos. Dessa forma, foi possível a identificação minuciosa da origem de formação dos calos induzidos durante o processo de embriogênese somática. A associação dos calos ao sistema vascular ficou solidamente comprovada (Figura 19 A - H).

São evidências que sustentam a origem dos calos a partir da proliferação das células do procâmbio: proliferação inicial perto do feixe vascular (Figura 19 A); células enfileiradas oriundas de divisão periclinal (Figura 19 C); potencial mitótico já se encontra presente nas células procambiais, devido à sua natureza meristemática;

ausência de sinais de desdiferenciação nas células parenquimáticas nos primeiros estádios ontogenéticos dos calos.

O procâmbio é um tecido meristemático responsável pela formação de tecidos vasculares e do câmbio (Apezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2006). Baseado no conceito de procâmbio, acredita-se que a formação de calo esteja intimamente relacionada a este meristema, uma vez que essa região apresenta células com maior potencial mitótico. O procâmbio também está próximo ao floema, que carrega em seu interior fitorreguladores. Estes fitorreguladores promoveriam mais facilmente uma resposta das células procambiais aos estímulos gerados pelos componentes do meio nutritivo.

Algumas hipóteses podem explicar a controvérsia na literatura sobre a origem dos calos, entre elas: 1) efetivamente calos podem ter origens múltiplas e genótipos diferentes de espécies de *Coffea* podem apresentar calos com origens diferentes, inclusive com predomínio a partir de células perivasculares, ou a partir da desdiferenciação de células parenquimáticas; 2) as conclusões de outros autores estão equivocadas, devido à ausência de estudo ontogenético (Pierson *et al.*, 1983; Bieyesse *et al.*, 1993; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002), ou por inadequação metodológica, como a falta de cortes seriados (Sondahl *et al.*, 1979; Michaux-Ferrière *et al.*, 1987; Michaux-Ferrière *et al.*, 1989; Berthouly & Michaux-Ferrière, 1996; Menéndez-Yuffá & García, 1997).

Acredita-se que eventualmente possa ocorrer desdiferenciação parenquimática, mas a origem dos calos ocorre predominantemente a partir de células procambiais. Desta forma, o bordo foliar deve ser eliminado por ocasião da obtenção dos explantes a serem cultivados, a fim de otimizar o protocolo de embriogênese somática *in vitro* e o seccionamento ao longo das nervuras deve ser testado, em contraposição aos cortes transversal para a otimização da indução de calos.

3.3. Calos primários tipo 1, tipo 2 e embriogênico

A Figura 20 mostra as diferenças na morfologia externa e na histologia dos três tipos de calos estudados.

O calo primário tipo 1 (Figura 20 A) é compacto, de cor levemente amarelada a creme, aquoso, com crescimento regular, podendo ou não dar origem ao calo embriogênico. Nos cortes histológicos (Figura 20 B), foram observadas células

parenquimáticas grandes, com 39 a 48 μm de diâmetro, vacuoladas, algumas das quais estavam em processo de desdiferenciação com indícios de mitose. Os espaços intercelulares são reduzidos e a parede celular é mais espessa do que nas células dos demais tipos de calos, tendo cerca de 3,1 μm de espessura nas paredes de duas células contíguas.

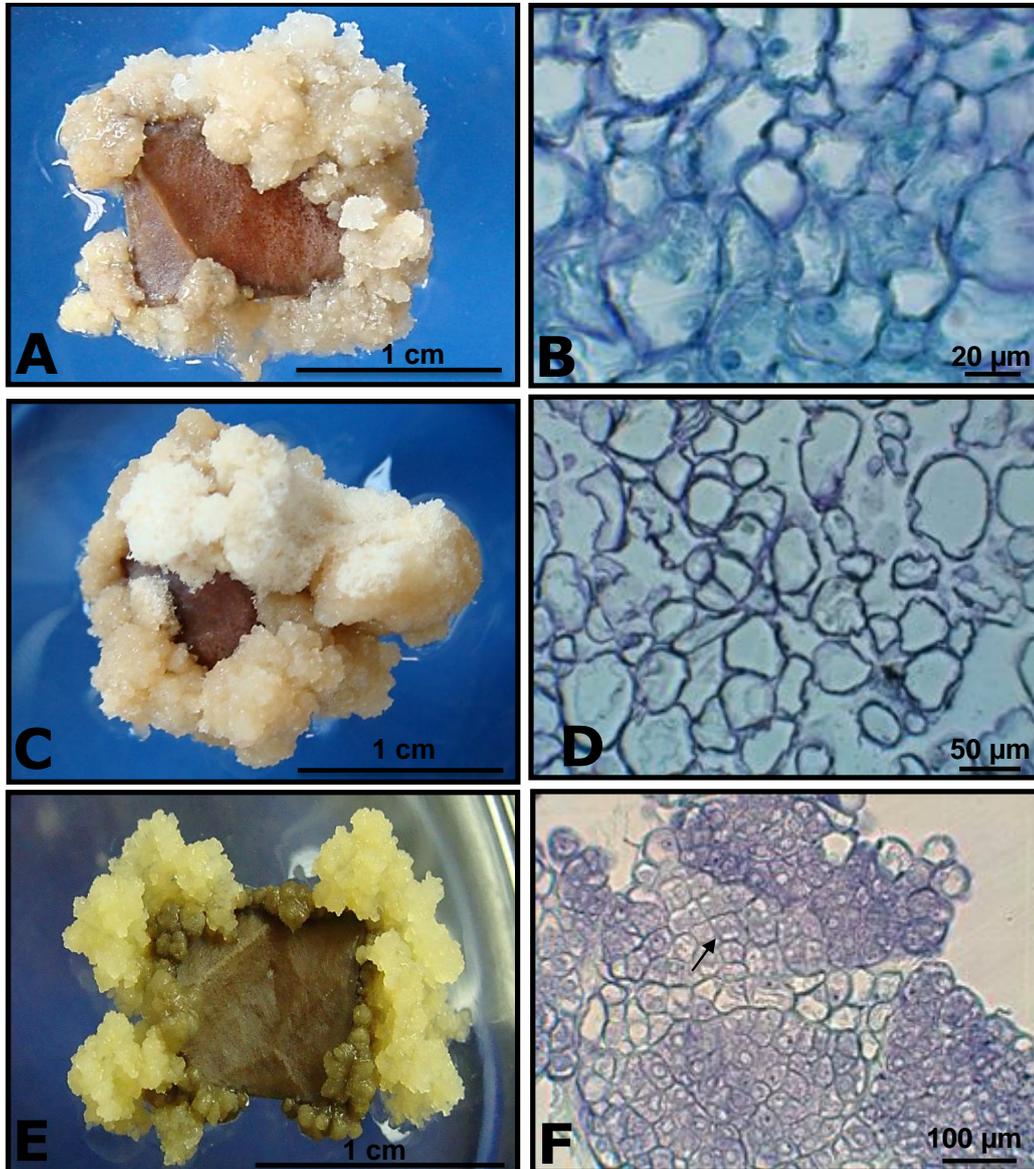


Figura 20. Aspectos morfológicos (A, C, E) e anatômicos (B, D, F) dos calos primários tipo 1 (A, B) e tipo 2 (C, D) e dos calos embriogênicos (E, F): variação na cor dos calos e nas características de suas células constituintes; notar região com linearização das células (F, seta).

O calo primário tipo 2 (Figura 20 C) tem aspecto compacto, aquoso, esbranquiçado, com crescimento desordenado e intenso. Devido a esse tipo de desenvolvimento, o mesmo pode competir diretamente com o surgimento e estabelecimento de calos embriogênicos, essenciais para a regeneração de embriões.

Anatomicamente, este calo possui células parenquimáticas alongadas, com 101-165 μm de diâmetro, com amplos espaços intercelulares, 1,9 μm de espessura nas paredes de duas células contíguas e vacúolos bem desenvolvidos (Figura 20 D). Apresenta processo de multiplicação intenso, o que explica seu crescimento demasiado. Foi observado por Pádua *et al.* (2010), em análise ultraestrutural de calo primário tipo 2 de *Coffea arabica* variedade Catiguá, a presença de vacúolo autofágico ocupando toda a célula, presença de vesículas, espaço intercelular marcante e a ausência de outras organelas citoplasmáticas.

No bordo do calo primário do tipo 1 (Figura 20 A-B), as células são menores, apresentam divisão celular, parede celular espessa, núcleo evidente e citoplasma denso, semelhantes às células observadas no calo primário tipo 1. Já as células do interior do calo apresentaram um padrão muito similar ao desenvolvido pelo calo primário tipo 2, com células maiores, paredes celulares delgadas, núcleo bastante reduzido e vacúolo extremamente desenvolvido.

Já o calo embriogênico é friável, de coloração amarelo intenso, com crescimento reduzido (Figura 20 E). Nas secções anatômicas, foram observadas regiões meristemáticas com células pequenas, com 15 a 25 μm de diâmetro, isodiamétricas, com citoplasma denso, paredes celulares mais estreitas, com aproximadamente 0,9 μm e núcleo evidente. Várias células apresentaram dois núcleos num mesmo citoplasma, evidenciando a citocinese ainda não concluída no processo de divisão celular. Em algumas regiões, constatou-se o início da linearização das células, o que sugere a organização celular envolvida no processo de formação de embriões (Figura 20 F, seta). O mesmo foi observado por Menéndez-Yuffá & Garcia (1997) em *Coffea arabica* ‘Catimor’, por Pádua *et al.* (2010), com calo embriogênico de *Coffea arabica* variedade ‘Catiguá’ e por Nogueira *et al.* (2007), na análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de *Byrsonima intermedia* A. Juss.. Utilizando ANA (ácido naftaleno acético) para a indução dos calos embriogênicos de *Carya illinoensis*, Tomes (1985) também verificou nestes calos uma morfologia celular isodiamétrica. Segundo Appezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro (2006), tal formato é característico de células meristemáticas.

3.4. Embrião globular

A Figura 21 ilustra a estrutura morfológica e anatômica de embriões globulares cultivados por 90 dias em meio RM gelificado. Nas secções longitudinais dos embriões globulares, a protoderme pode ser identificada por ser unisseriada, constituindo a camada mais externa de células, que se mostram com núcleo evidente e já se apresentam mais achatadas e menores do que as células do interior do embrião.

Internamente, o embrião globular apresenta uma massa de células com diâmetros variados, com núcleos evidentes, algumas das quais possuem dois núcleos evidenciando a divisão celular. Elas constituem típicas células de meristema fundamental, pois são poliédricas devido a divisões periclinais e anticlinais. As células mais próximas da protoderme são menores e com núcleo mais evidente, enquanto as células centrais possuem muitas faces e parede delgada (Figura 21 B).

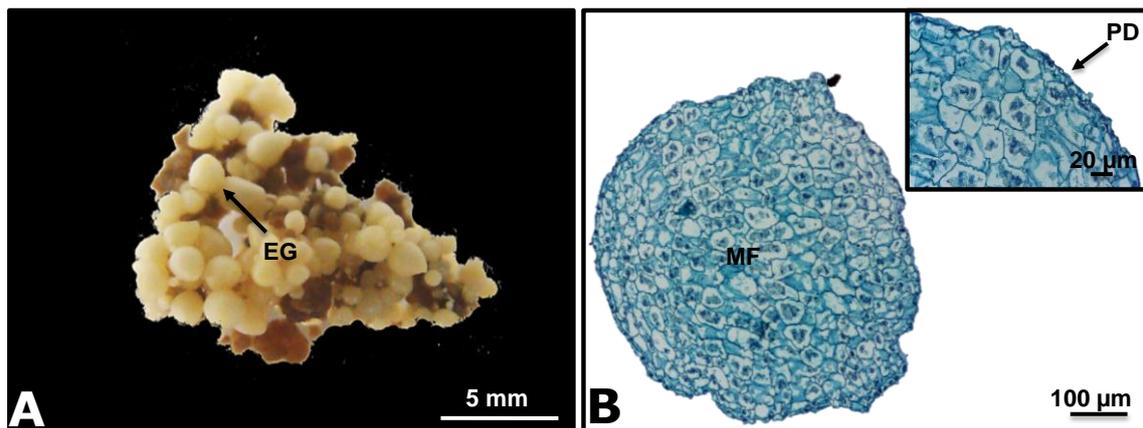


Figura 21. Aspectos morfológicos (A) e anatômicos (B) do embrião globular formado através da embriogênese somática de *Coffea arabica* var. ‘Catuaí Vermelho’. A) Explante contendo vários embriões globulares (seta) após 90 dias em meio de regeneração gelificado. B) Corte longitudinal do embrião globular. EG = embrião globular; MF = meristema fundamental; PD= protoderme.

O resultados aqui obtidos corroboram os de Quiroz-Figueroa *et al.* (2002), que verificaram a presença de uma camada bem desenvolvida de protoderme, contendo células com núcleo evidente no embrião globular de *Coffea arabica*. Segundo os autores, essa característica da protoderme seria resultado de uma alta atividade mitótica. Ao contrário do observado no presente trabalho, esses autores encontraram condões procambiais bem definidos no embrião em estágio globular.

Pierson *et al.* (1983) e Berthouly & Michaux-Ferriere (1996), analisando embriões globulares de *Coffea canephora*, apresentaram resultados semelhantes aos aqui verificados, onde os embriões nesse estágio não apresentaram células de procâmbio.

A análise da origem do embrião somático de *Coffea arabica* não figura entre os objetivos do presente trabalho, mas foi analisada a literatura a este respeito. Segundo Zimmerman (1993), embriões somáticos podem ter uma origem uni ou multicelular. Já outros autores afirmam que o embrião somático origina-se a partir de divisões sucessivas de uma única célula (Sondahl *et al.*, 1979; Michaux-Ferriere *et al.*, 1987; Menéndez-Yuffá & Garcia, 1997; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002).

Pierson *et al.* (1983) verificaram que o padrão de desenvolvimento encontrado em *Coffea arabica* é o mesmo de *C. canephora*, ou seja, ocorre a partir de repetidas divisões de uma única célula. Segundo os autores, os embriões somáticos são formados a partir de pequenas células (células meristemáticas) situadas na superfície do calo. Durante o seu desenvolvimento, esse embrião apresenta uma conexão com a massa celular do calo através de um suspensor, que possui a largura de uma ou duas células. Esse padrão de formação dos embriões somáticos na periferia do calo também foi claramente visualizado no Capítulo 1 do presente trabalho.

Segundo Appezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro (2006), o embrião em estágio globular é uma massa esférica de células reconhecida como proembrião, que estão em intensa divisão, onde as células da camada mais externa (protoderme) sofrem apenas e predominantemente divisões anticlinais, ao passo que as células mais internas (meristema fundamental) se dividem em vários planos (divisões periclinais e anticlinais), aumentando o volume do embrião.

3.5. Embrião torpedo

Na Figura 22, estão representados embriões torpedo obtidos mediante cultivo de explantes por 30 dias em meio líquido de germinação (MGM).

O embrião torpedo é revestido por uma protoderme semelhante à do embrião globular, não apresentando cutícula evidente. Em secção longitudinal, o embrião torpedo mostra polarização tissular, com duas extremidades promeristemáticas, constituídas de células menores, com citoplasma mais denso. Entre os dois extremos, as células são poliédricas e de tamanhos diferentes; seus diâmetros são maiores no centro

do embrião do que perto da protoderme e apresentam citoplasma pouco denso, constituindo o meristema fundamental (Figura 22 C). O procâmbio apresenta-se como um grupo de células estreitas, com formato bastante alongado, que acompanha o comprimento do embrião e possuem núcleo evidente (Figura 22 D).

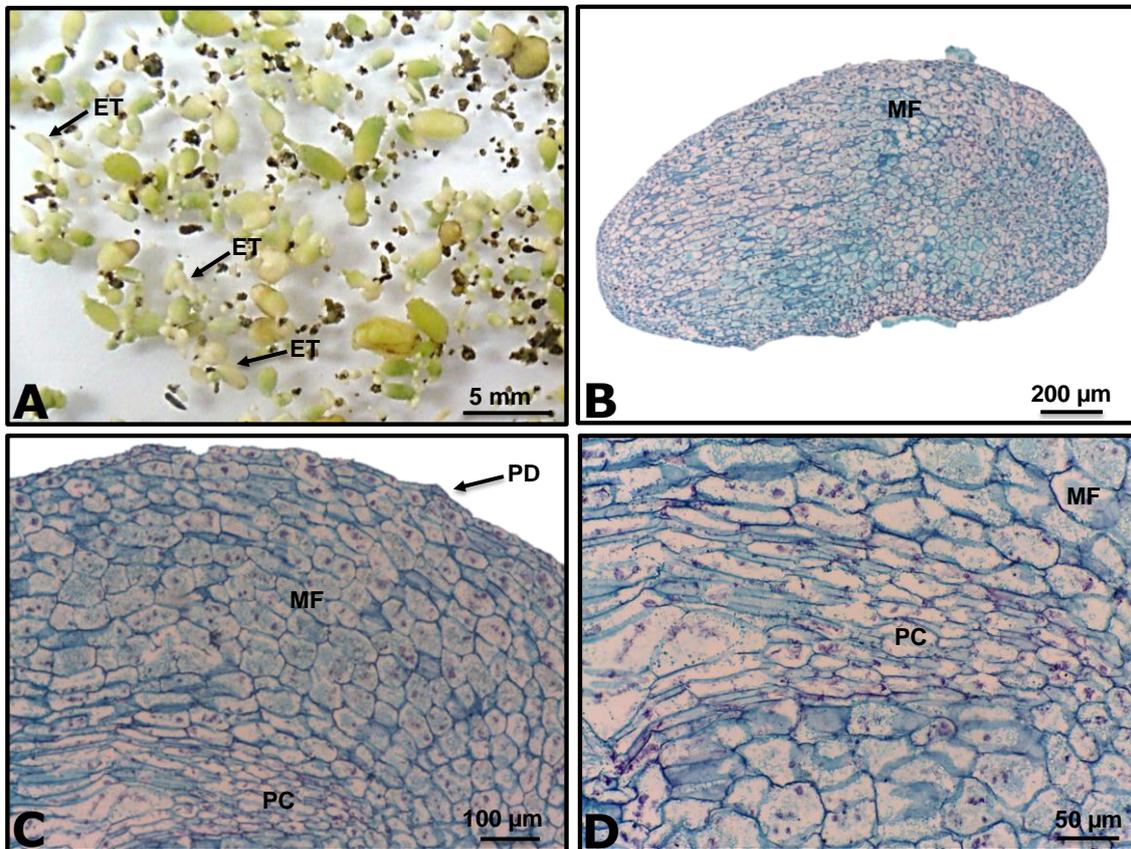


Figura 22. Aspectos morfológicos (A) e anatômicos (B-D) do embrião em estágio de torpedo durante o processo de maturação após 30 dias em meio de germinação líquido. A) Amostra contendo vários embriões torpedo (seta). B) Corte longitudinal do embrião torpedo. ET = embrião torpedo; MF = meristema fundamental; PC = procâmbio; PD = protoderme.

Os embriões torpedo aqui analisados são semelhantes aos relatados por Quiroz-Figueroa *et al.* (2002), que examinaram secções longitudinais deste tipo de embrião de *Coffea arabica*, tendo verificado a presença de uma camada bem desenvolvida de protoderme, contendo células com núcleo evidente. Internamente, descreveram a presença do procâmbio no centro.

As características do embrião torpedo aqui descritas coadunam com as do café Catimor (Menéndez-Yuffá & Garcia, 1997) e *Coffea canephora* (Michaux-Ferrière *et al.*, 1989).

3.6. Embrião cotiledonar

A Figura 23 ilustra morfológica e anatomicamente embriões cotiledonares após 60 dias de cultivo em meio MGM líquido.

Na Figura 23 B, compondo a epiderme, foram identificadas células externas, justapostas, com núcleo evidente, apresentando formato tabular. Abaixo destas, foram observadas algumas camadas com núcleo evidente e células com diâmetro maior, que caracterizam um meristema fundamental (Figura 23 C-D). No centro há uma região vascular com células alongadas e núcleo evidente, que compõem o procâmbio, algumas mais internas têm parede corada de vermelho e constituem os elementos de vaso. Internamente ao procâmbio existe uma região formada por meristema fundamental. Em toda a extensão do embrião, foi encontrada uma grande quantidade de plastídeos (Figura 23 D, seta).

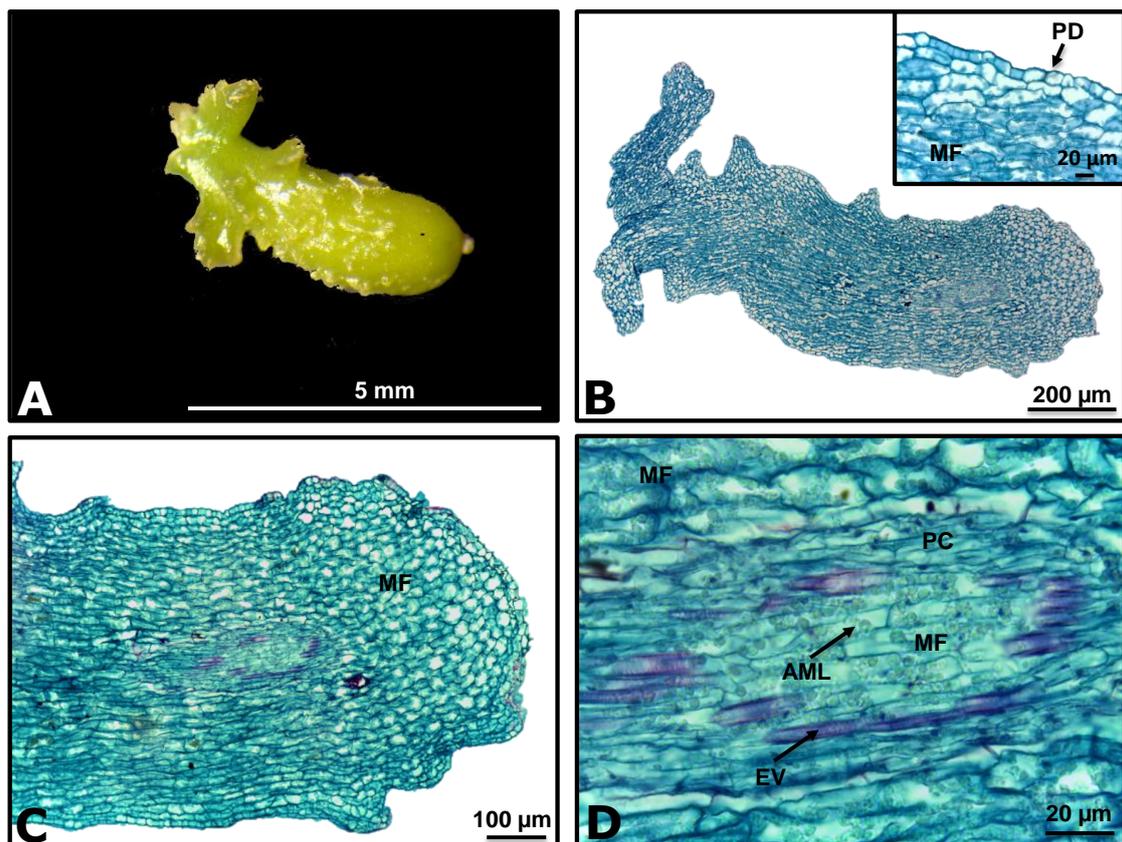


Figura 23. Aspectos morfológicos (A) e anatômicos (B-D) do embrião em estágio de cotiledonar durante o processo de maturação após 60 dias em meio de germinação líquido. A) Embrião cotiledonar. B) Corte longitudinal do embrião cotiledonar. AML = amiloplastos; EV = elemento de vaso; MF = meristema fundamenta; PC = procâmbio; PD = protoderme.

O resultados encontrados no presente trabalho corrobora os resultados obtidos por Quiroz-Figueroa *et al.* (2002), onde foram analisados cortes longitudinais do embrião cotiledonar de *Coffea arabica*. Esses autores verificaram a presença de uma camada bem desenvolvida de protoderme, contendo células com núcleo evidente. Internamente, foi constatada a presença de células parenquimáticas e no centro a presença do procâmbio. Segundo esses autores, as células do procâmbio presentes na porção central do embrião são mais alongadas e definidas se comparadas às células do procâmbio presentes nos estádios anteriores.

O presente trabalho comprova os resultados encontrados em que foram analisados embriões cotiledonares de *Coffea arabica* (Michaux-Ferrière *et al.*, 1987), café Catimor (Menéndez-Yuffá & Garcia, 1997) e *Coffea canephora* (Berthouly & Michaux-Ferriere 1996).

Conforme verificado no Capítulo 3 do presente trabalho, Lai & McKersie (1994) verificaram que a maior deposição de amido em embriões somáticos de *Medicago sativa* L. ocorreu após a fase de torpedo.

Ao analisar a morfologia do embrião somático em estágio cotiledonar pode-se perceber uma grande diferença quanto a sua coloração se comparado ao embrião zigótico identificado a seguir. Diante disso, a principal hipótese para a coloração esverdeada apresentada pelo embrião cotiledonar é verificada em sua anatomia que, como pode ser observado na Figura 23 D, apresenta uma grande quantidade de amiloplastos presentes nas células desse embrião. Segundo Muraja-Fras *et al.* (1994)., a exposição dos amiloplastos à luz induz a transformação dessas estruturas em cloroplastos, que uma vez presentes no tecido promovem o seu esverdeamento através da síntese e acúmulo de clorofila.

Brune & Melo (2001), afirmam que os amiloplastos presentes na película dos tubérculos iluminados se transformam em cloroplastos, podendo ser percebido pelo aumento dos teores de clorofila resultantes das atividades fotossintéticas ali presentes.

Sendo assim, é provável que os amiloplastos observados no embrião somático em estágio cotiledonar, devido à exposição desses embriões a luz, tenham se modificado para a formação de cloroplastos conferindo ao tecido essa coloração esverdeada. Em uma análise comparativa com o embrião zigótico, pode-se evidenciar que esse fenômeno não ocorra no embrião zigótico, pois o mesmo está completamente protegido da luz.

3.7. Embrião zigótico

Na Figura 24, foram caracterizados, morfológica e anatomicamente, embriões zigóticos coletados de frutos maduros de plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação.

Foi verificada uma camada protodérmica contendo células mais externas, justapostas, muito coradas, com núcleo evidente (Figura 24 B). Internamente, constituindo a região cortical, o meristema fundamental contém células com diâmetro maior e núcleo evidente. Posteriormente uma região com células alongadas, estreitas e núcleo visível, denominada procâmbio. Na região medular, há meristema fundamental, com células semelhantes à região cortical (Figura 24 C-D).

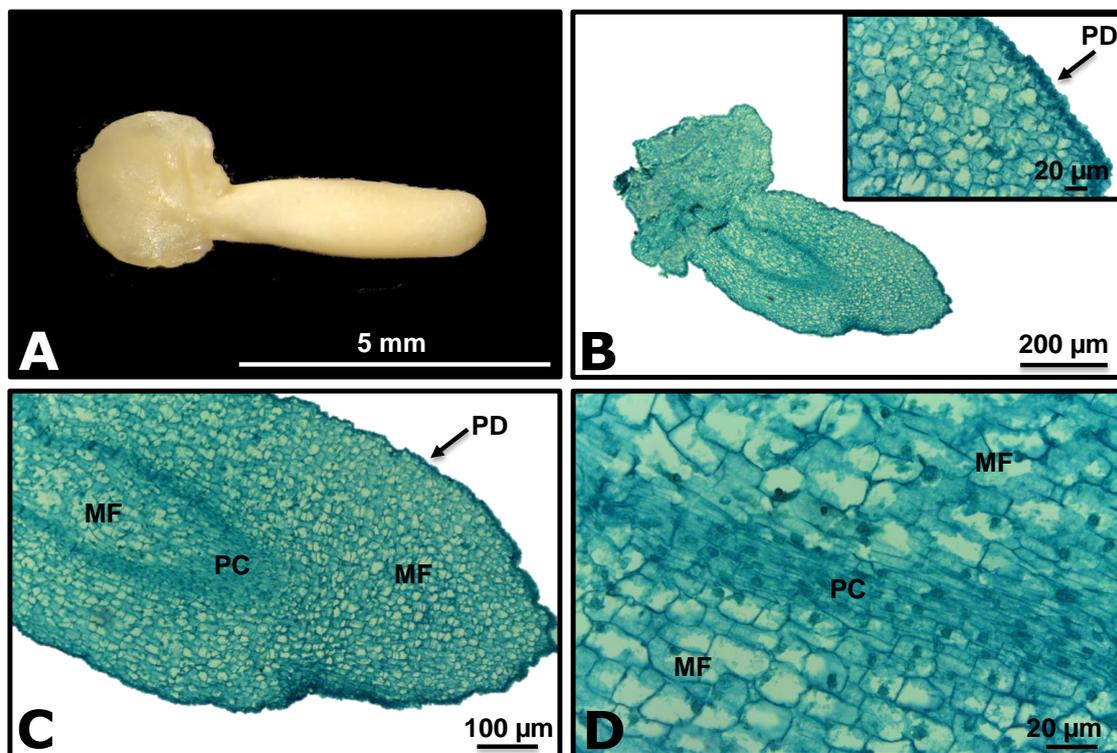


Figura 24. Aspectos morfológicos (A) e anatômicos (B-D) do embrião zigótico retirado de frutos maduros de plantas matrizes de *Coffea arabica* var. ‘Catuaí vermelho’ cultivadas em casa de vegetação. A) Embrião zigótico. B) Corte longitudinal do embrião zigótico. MF = meristema fundamental; PC = procâmbio; PD = protoderme.

Menéndez-Yuffá & Garcia (1997), analisando embriões somáticos do café ‘Catimor’ em diferentes estádios, apresentaram resultados semelhantes aos verificados no presente trabalho. Segundo os autores, os estádios globular, torpeda e cotiledonar são

morfológica e anatomicamente semelhantes aos estádios correspondentes de embrião zigótico apresentados por Moens (1965).

Segundo Titon *et al.* (2007), o conhecimento dos aspectos morfológicos e anatômicos dos embriões somáticos é importante para a diferenciação de embriões normais ou com algum tipo de anormalidade. A formação de embriões anormais, a falta de sincronia no desenvolvimento, a não-conversão desses embriões em plantas e não-repetibilidade dos resultados são grandes barreiras na obtenção de um protocolo eficiente de embriogênese somática.

No Capítulo 1 do presente trabalho, foi verificada a sincronia e conversão dos embriões somáticos obtidos, evidenciando a eficiência do protocolo utilizado. A morfologia do embrião somático em estágio cotiledonar foi diferente daquela observada no embrião zigótico, o qual é adotado como modelo de desenvolvimento. Apesar disto, conforme verificado no Capítulo 1 do presente trabalho, esses embriões se desenvolveram e originaram plantas normais e isto ocorreu de forma bastante competente.

4. CONCLUSÕES

- O início da formação de calos ocorre aos 7 dias de cultivo em meio PM.
- A ontogenia dos calos primários revelou que eles se originam a partir de divisões sucessivas de células do procâmbio associado ao feixe vascular.
- Calos primários tipo 1 e tipo 2 apresentam morfologia e tipos celulares distintos;
- Um mesmo calo pode apresentar simultaneamente células semelhantes às do calo primário tipo 1 e tipo 2 ;
- Existe uma grande quantidade de plastídeos no embrião somático em estágio cotiledonar;
- O protocolo usado é eficiente para produzir embriões somáticos viáveis e semelhantes aos zigóticos;

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, A. A. Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. **Current Opinion Plant Biology**, v.3, p.329-335, 2000.
- AGRIBUS 2011. **Anuário da agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, p.497, 2011.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa - Editora UFV, p.438, 2006.
- BERTHOULY, M & MICHAUX-FERRIÈRE, N. M. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.44, p.169-176, 1996.
- BIEYSSE, D.; GOFFLOT, A.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Canadian Journal of Botany** v.71, p.1496-1502, 1993.
- BROUWER, Y. M.; CLIFFORD, H. T. **An annotated list of domatia-bearing species**. Royal Botanic Gardens, Kew. v.12, p.1-33. 1990.
- BRUNE, S. & MELO, P. E. Método rápido de avaliação do esverdeamento em tubérculos de batata. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.809-814, 2001.
- CONOVER, J. C.; PRYKE, J. A. Plastid and nuclear DNA in potato tuber tissue during greening. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.38, n.192, p.1219-1227, 1987.
- DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; CABRAL, J. B.; ALVES, G. D. Embriogênese somática *in vitro* em couve-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.4, p.711-718, 2000.
- HEIL, M.; FIALA, B.; LINSÉNMAIR, K. E.; ZOTZ, G.; MENKE, P.; MASCHWITZ, U. Food body production in *Macaranga triloba* (Euphorbiaceae): a plant investment in antherbivore defense via symbiotic ant partners. **Journal of Ecology**, v.85, p.847-861, 1997.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill, New York, 1940.
- LAI, F-M.; MCKERSEI, B. D. Regulation of starch and protein accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. **Plant Science**, v. 100, p. 211-219, 1994.
- LORENZATO, D. Controle biológico de ácaros fitófagos na cultura da macieira no município de Farroupilha, RS. **Agronomia Sulriograndense**, v.2, p.167-183, 1987.
- MARQUIS, R. J. & WHELAN, C. Plant morphology and recruitment of third trophic level: subtle and little recognized defenses? **Oikos** v.75, p.330-334, 1996.
- MENÉNDEZ-YUFFÁ, A.; GARCIA, E. G. Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee “Catimor”. **Protoplasma**. v.199, p.208-214, 1997.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Rubiaceae. Anatomy of the dicotyledons.** Clarendon Press, Oxford. v.2, p.759-776, 1965.

MICHAUX-FERRIÈRE, N.; DUBLIN, P.; SCHWENDIMAN, J. Étude histologique de l'embryogenese somatique à partir d'explants foliaires de *Coffea arabica* L.. **Café Cacao Thé**, v.31, p.103-111, 1987.

MICHAUX-FERRIÈRE, N.; BIEYSSE, D.; ALVARD, D.; DUBLIN, P. Étude histologique de l'embryogenese somatique chez *Coffea arabica*, induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de génotypes différents. **Café Cacao Thé**, v.33, p.207-213, 1989.

MORAES, G. J. Perspectivas para o uso de predadores no controle de ácaros fitófagos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p.263,270, 1992.

MURAJA-FRAS, J.; KRSNIK-RASOL, M.; WRISCHER, M. Plastid transformation in greening potato tuber tissue. **Journal of Plant Physiology**, v.144, n.1, p.58-63, 1994.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NAKAMURA, T.; TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Leaf anatomy of *Coffea Arabica* L. with reference to domatia. **Japanese Journal Crop Science**, v.61, p.642-650, 1992.

NAKAMURA, T.; TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Cyto-histological studies on somatic embryos of Coffee: Ultrastructural Aspects. **Japanese Journal of Crop Science**, v. 63, n. 1, p. 144-157, 1994.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; PORTO, J. M. P.; NICIOLI, P. M.; STEIN, V. C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, n.2, p.48-50, 2007.

O'DOWD, D. J. & PEMBERTON, R.W. Leaf domatia and foliar mite abundance in broadleaf deciduous forest of north Asia. **American Journal of Botany**, v.85, p.70-78, 1998.

PÁDUA, M. S.; LIVRAMENTO, K. G.; PAIVA, L. V.; CASTRO, A. H. F.; ALVES, E. Comparação de características embriogênicas e não embriogênicas de calos de *Coffea arabica* cv. Catiguá. **CONGRESSO BRASILEIRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA**, Lavras, 2010.

PALLINI-FILHO, A.; MORAES, G. J.; BUENO, V. H. P. Ácaros associados ao cafeeiro (*Coffea arabica* L.) no Sul de Minas Gerais. **Ciência e Prática (Brasil)**, v.16, p.303-307, 1992.

PEMBERTON, R. W. & TURNER, C. E. Occurrence of predatory and fungivorous mites in leaf domatia. **American Journal of Botany**, v.76, p.105-112, 1989.

PEREIRA, A. R.; CARVALHO, S. P.; PASQUAL, M.; SANTOS, F. C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaí Cerrado: efeito de citocinina e ácido giberélico. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.31, n.2, p.332-336, 2007.

PEREIRA, A. R.; PASQUAL, M.; CHAGAS, E. A.; FRÁGUAS, C. B.; DUTRA, L. F. Indução de embriões somáticos globulares e cordiformes de cafeeiro por BAP e sacarose. **Scientia Agraria**, v.4, n.1-2, p.77-80, 2003.

PIERSON, E. S.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; SCHEL, J. H. N.; STARITSKY, G. *In vitro* development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora*. **Protoplasma**. v.115, p.208-216, 1983.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; FUENTES-CERDA, C. F. J.; ROJAS-HERRERA, R.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis system of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v.20, p.1141-1149, 2002.

RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.2, n.3-4, p.159-167, 2004.

ROZARIO, S. A. Association between mites and leaf domatia - Evidence from Bangladesh, South-Asia. **Journal of Tropical Ecology**, v.11, p.99-108, 1995.

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 Agrotécnica**, Lavras, v.27, n.3, p.571-577, 2003.

SONDAHL, M. R.; SPAHLINGER, D. A.; SHARP, W. R. A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L.. **Z. Pflanzenphysiol.** v.94, p.101-108, 1979.

TANIGOSHI, L. K. Advances in knowledge of the Phytoseiidae. p.1-222. In M.A. Hoy (ed.), Recent advances in knowledge of the Phytoseiidae. California, **Division of Agriculture Sciences**, p.92, 1982.

TEIXEIRA, J. B.; JUNQUEIRA, C. S.; PEREIRA, A. J. P. C.; MELLO, R. I. S.; SILVA, A. P. D.; MUNDIM, D. A. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática**. Brasília: Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, n. 121), p. 39, 2004.

TITON, M.; XAVIER, W. C. O.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e Picloram na embriogênese somática de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**. v. 31, p 417-426, 2007.

TOMES, D. T. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. In: BRIGHT, S. W.; JONES, M. G. K. (Ed.) **Advances in agricultural biotechnology, cereal tissue and cell culture**. Boston, p.175-203, 1985.

TURNER, C. E. & PEMBERTON, R. W. Leaf domatia and mites: a plant protection-mutualism hypothesis, p.341- 359. In J.H. Bock & Y.B. Linhart (eds.), The evolutionary ecology of plants. Colorado, **Westview Press**, p.600, 1989.

VOLTAN, R. B. Q.; FAHL, J. I.; CARELLI, M. L. C. Variação na anatomia foliar de cafeeiros submetidos a diferentes intensidades luminosas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.4, p.99-105, 1992.

WALTER, D. E. Living on leaves: Mites, tomenta, and leaf domatia. **Annual Review of Entomology**, v.8, p.307-344, 1996.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v.5, p.1411-1423, 1993.

CAPÍTULO 3

**BIOQUÍMICA DAS ETAPAS ENVOLVIDAS NA EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA INDIRETA DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L. variedade Catuaí
Vermelho) A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES**

RESUMO

O cafeeiro (*Coffea arabica* L.) é uma espécie pertencente à família Rubiaceae. Seu cultivo é uma atividade de grande expressão no cenário do agronegócio mundial. O Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador de café do mundo. A cultura de tecidos de plantas, mais especificamente a embriogênese somática, surge como uma alternativa eficiente para uma rápida propagação de plantas de cafeeiro. Embora a embriogênese somática seja uma técnica bastante antiga e, há muito tempo, eficientemente aplicada a essa espécie, ainda estão em fase inicial de exploração as possíveis mudanças no tecido vegetal capaz de induzir a formação de calos e embriões somático. Diante disso, o estudo dos compostos presentes nas diferentes etapas da embriogênese somática é fundamental para o entendimento da fisiologia da planta cultivada *in vitro*. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi compreender as principais etapas da embriogênese somática de *Coffea arabica* variedade Catuaí Vermelho, com o auxílio das análises bioquímicas. Para tanto, foram extraídos e quantificados os açúcares solúveis totais, a identificação dos açúcares solúveis, o amido, os aminoácidos totais solúveis, a identificação dos aminoácidos essenciais e as proteínas totais das diversas fases do desenvolvimento embriogênico. Verificou-se que o metabolismo dos carboidratos, aminoácidos e proteínas auxiliam para uma melhor interpretação e entendimento sobre os processos de indução da embriogênese somática, assim como a regeneração, maturação e germinação dos embriões somáticos.

Palavras-chave: Bioquímica vegetal, carboidratos, aminoácidos, proteínas.

ABSTRACT

Coffee (*Coffea arabica* L.) is a species belonging to the Rubiaceae family. Its cultivation is an activity of great importance for global agribusiness. Brazil is the largest producer, consumer, and exporter of coffee in the world. Plant tissue culture methods, more specifically, somatic embryogenesis, has become an efficient alternative for the rapid propagation of coffee plants. Although somatic embryogenesis is a relatively old technique and has been effectively used with this species for a long time, the exploration of possible changes in plant tissue capable of inducing the formation of calli and somatic embryos is still in the initial phase. Thus, the study of the compounds present in the different stages of somatic embryogenesis is fundamental to an understanding of the physiology of plants cultivated in vitro. In this context, this study aimed to understand the key phases in the somatic embryogenesis of *Coffea arabica* variety Catuaí Vermelho, with the help of biochemical analyses. To this end, total soluble sugars were extracted and quantified, and soluble sugars, starch, total soluble amino acids, essential amino acids, and total proteins in the different phases of embryogenic development were identified. It was found that the metabolism of carbohydrates, amino acids, and proteins helps in the interpretation and understanding of processes of induction in somatic embryogenesis, as well as the regeneration, maturation, and germination of somatic embryos.

Key-words: Plant biochemistry, carbohydrates, amino acids, proteins.

1. INTRODUÇÃO

O cafeeiro (*Coffea arabica* L.) é uma espécie pertencente à família Rubiaceae e originária da Etiópia (Bridson, 1994). Seu cultivo é uma atividade de grande expressão no cenário do agronegócio mundial. Sendo o Brasil o maior produtor, consumidor e exportador de café do mundo (Agrianual, 2011). Por ser uma espécie que possui grande importância social e econômica, *Coffea arabica* L. vem sendo estudada a fim de agregar características de interesse comercial, como resistência a pragas, qualidade da bebida, etc. Desta forma, métodos biotecnológicos são amplamente utilizados nos programas de melhoramento genético, auxiliando nas dificuldades encontradas em culturas perenes (Rezende, 2008).

Sendo assim, a cultura de tecidos de plantas surge como uma alternativa eficiente para uma rápida propagação de plantas de cafeeiro, podendo ser realizada em diferentes épocas do ano, aumentando a taxa de multiplicação e a difusão acelerada de novas variedades de café (Ducos *et al.*, 2007). Dentre as várias técnicas da cultura de tecidos vegetais destaca-se a embriogênese somática. Esta técnica é uma das opções mais adequadas para a propagação *in vitro* de plantas lenhosas, como o café, permitindo alta taxa de multiplicação, quando comparada a qualquer outro processo de propagação (Pereira *et al.*, 2007).

Atualmente, a embriogênese somática tem sido utilizada com sucesso na multiplicação de espécies que apresentam dificuldade de propagação sexuada. A indução de calos tem permitido o estabelecimento *in vitro*, o que, conseqüentemente, proporciona a propagação em larga escala de diversas espécies. No entanto, ainda estão em fase inicial de exploração as possíveis mudanças no tecido vegetal capaz de induzir a formação de calos e embriões somáticos (Priyono *et al.*, 2010). Diante disso, o estudo dos compostos presentes nas diferentes etapas da embriogênese somática é fundamental para o entendimento da fisiologia da planta cultivada *in vitro*.

Sob um enfoque fitotecnológico, tem sido proposto que o potencial prático da embriogênese somática estaria vinculado à obtenção de plantas vigorosas, característica que só poderia ser analisada pela bioquímica, fisiologia e similaridade morfológica com os embriões zigóticos (Flinn *et al.*, 1993).

Diante desse cenário, o crescimento otimizado e plântulas vigorosas é o que se espera encontrar em embriões somáticos que apresentem altos teores de amido, proteína e carboidratos solúveis (Attree *et al.*, 1992). Nesse contexto, o acúmulo adequado de

reservas como carboidratos solúveis, amido e proteínas afeta de forma especial a embriogênese somática, sendo crucial para a retomada do desenvolvimento após a obtenção de embriões cotiledonares (Attree *et al.* 1992, Flinn *et al.* 1993, Chanprame *et al.* 1998).

Devido às múltiplas funções que os açúcares desempenham nas células, incluindo transporte, fornecimento de energia e de esqueletos carbônicos e regulação do potencial osmótico e da expressão gênica, o metabolismo dos carboidratos solúveis representa um dos mais importantes processos no ciclo celular (Carrier *et al.* 1999). Eles são importantes na formação do embrião, atuando como sinalizadores do processo morfogênético (Verma *et al.* 1977, Lou *et al.* 1996). Em particular, esses compostos parecem agir na proteção das células embrionárias durante a dessecação, substituindo a água na manutenção de estruturas hidrofílicas, evitando a formação de cristais intra e intercelulares (Hoekstra & Golovina 1999). A presença de carboidratos torna-se essencial nessa fase, porque provavelmente as proteínas de proteção do embrião contra a desidratação (LEAs - late embryogenesis abundant) presentes em embriões zigóticos, não se acumulem nos embriões somáticos na fase de dessecação (Wise & Tunnacliffe, 2004; Sghaier-Hammami 2009).

Morfologicamente, a embriogênese somática parece refazer os estádios da embriogênese zigótica. Ambos os processos são considerados complexos e influenciados por fatores genéticos e ambientais. O nitrogênio parece ser um dos fatores mais importantes na morfogênese, sendo os aminoácidos considerados reguladores importantes em várias espécies (Sen *et al.*, 2002). Os aminoácidos são importantes no metabolismo do nitrogênio, representando o produto inicial da assimilação primária desse elemento químico. Além da síntese de proteínas, os aminoácidos estão relacionados com o metabolismo primário e secundário. Neste último caso, são precursores de hormônios vegetais e também de compostos envolvidos na defesa das plantas. A síntese de aminoácidos pode controlar direta e/ou indiretamente vários aspectos ligados ao crescimento e ao desenvolvimento das plantas (Ortiz-Lopez *et al.*, 2000).

Diante disso, o presente trabalho objetiva descrever aspectos bioquímicos das diferentes fases do desenvolvimento embriogênico *in vitro* de *Coffea arabica* variedade Catuaí Vermelho. A análise bioquímica da folha, de calos primários e embriogênicos, regeneração e diferenciação de embriões foi realizada com o objetivo de contribuir para

a melhor compreensão do papel dos compostos envolvidos nas diferentes fases de desenvolvimento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização bioquímica da embriogênese somática

Os experimentos de caracterização bioquímica foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) e no Laboratório de Bioquímica Vegetal da Universidade de Brasília – DF.

Para a caracterização bioquímica da embriogênese somática de cafeeiro, foram extraídos e quantificados os açúcares totais solúveis, o amido, as proteínas totais e os aminoácidos totais livres de cultivos de diversas fases da embriogênese somática indireta de *Coffea arabica* variedade Catuaí Vermelho. Foram coletadas 2 folhas do terceiro par de folhas de ramos plagiotrópicos de plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação, 200 amostras de calos primários tipo 1 (aos 30 dias de cultivo em meio PM), 200 amostras de calos primários tipo 2 (aos 30 dias de cultivo em meio PM), 200 amostras de calos embriogênicos (aos 120 dias de cultivo em meio SM), 200 embriões globulares (aos 90 dias de cultivo em meio RM gelificado), 200 embriões torpedo (aos 30 dias de cultivo em MGM líquido), 200 embriões cotiledonares com início de germinação (aos 60 dias de cultivo em MGM líquido) e 200 embriões zigóticos coletados de sementes de frutos maduros.

Para tanto, as amostras coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em câmaras -80°C. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 48 horas e maceradas em almofariz. Os experimentos foram compostos por 3 repetições de cada tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, utilizando-se o programa Sisvar 4.0 (Ferreira, 2000).

2.2 Açúcares solúveis totais

A extração dos açúcares totais solúveis foi realizada segundo a metodologia modificada de Carvalho *et al.* (1998). Para isto, 10 mg de massa seca das amostras foram inoculadas em tubos plásticos de 2 mL de capacidade, e submetidas à extração em 0,5 mL de metanol 80% a 70°C por 20 minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm (microcentrífuga modelo Eppendorf) por 10 minutos, os sobrenadantes foram coletados e os resíduos foram re-extraídos mais três vezes e

novamente centrifugados, com os sobrenadantes das quatro extrações metanólicas reunidos em novos tubos plásticos, totalizando 2 mL de sobrenadante.

Após a extração, os tubos contendo os sobrenadantes foram submetidos à secagem em 'Speed Vac' com temperatura ambiente e o produto da secagem ressuspendido em 1 mL de água milli-Q. Em seguida, o extrato foi submetido à purificação em colunas de troca iônica, utilizando-se as resinas catiônica Dowex 50x8 (100-200 mesh), para remoção dos aminoácidos e outros cátions, aniônica Dowex 1x8 (52-100 mesh), para remoção de ácidos orgânicos e outros ânions, e água milli-Q para eluição dos extratos.

Os carboidratos purificados foram quantificados de acordo com o método fenol-sulfúrico, descrito por Dubois (1956). Foram pipetados 75 µL das amostras em tubos de ensaio, onde foram adicionados 425 µL de água milli-Q, 500 µL de solução de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após 5 minutos de repouso em temperatura ambiente, foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 490 nm. Como branco foi utilizado uma solução com 0,5 mL de água milli-Q, 0,5 mL de solução de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Todas as análises foram realizadas em duplicata com base na curva padrão da glicose, de concentrações crescentes de 0,0; 5,0; 10; 20; 40 e 80 µg.mL⁻¹.

Após a dosagem dos totais, as amostras foram liofilizadas por 48 horas e ressuspendidas em 2 mL de água milli-Q. A composição dos açúcares totais solúveis foi determinada por cromatografia de troca iônica de alto desempenho com detector de pulso amperométrico (HPAEC-IPAD modelo ICS3000, marca Dionex Sunnyvale, Califórnia) com coluna CarboPacTM PA10 (2 X 250 mm) (Dionex Corp, Sunnyvale, CA, USA), usando-se um gradiente de eluição com 200 mM NaOH em água (30 minutos). As respostas do detector foram comparadas com os padrões de glucose, frutose e sacarose a 10; 20; 40; 80; 160 µM. A curva-padrão para cada açúcar foi usada para calcular os conteúdos de carboidratos nas amostras no Chromeleon Software.

2.3 Amido

A extração do amido foi realizada segundo o método enzimático de Amaral *et al.* (2007). Para tanto, 10 mg de massa seca das amostras foram colocadas em tubos plásticos de 2 mL de capacidade, e submetidas à remoção dos açúcares em 0,5 mL de etanol 80% a 80°C por 20 minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a

13.000 rpm em microcentrífuga modelo Eppendorf por 10 minutos, os sobrenadantes foram descartados e os resíduos foram submetidos à remoção dos açúcares por mais três vezes. Em seguida, o resíduo foi lavado três vezes em água milli-Q e congelados a -20 °C e liofilizados.

Às amostras liofilizadas foram adicionados 0,5 mL (120 U mL⁻¹) de alfa-amilase termoestável do *Bacillus licheniformis* (Megazyme[®]), diluída em tampão MOPS (ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico) 10 mM pH 6,5. Em seguida, as amostras foram incubadas a 75°C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 120 unidades de enzima. Posteriormente, as amostras foram resfriadas até 50°C (em banho-maria), sendo então adicionada uma solução contendo 0,5 mL (30 U mL⁻¹) de amiloglicosidase (AMG) de *Aspergillus niger* (Megazyme[®]), em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5, seguido pela incubação das amostras a 50°C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 15 unidades de enzima.

Após as quatro incubações, foram acrescentados 100 µL de ácido perclórico 0,8M para interromper a reação e precipitar proteínas. Após rápida centrifugação, alíquotas de 50 µL das amostras, foram pipetadas em cubetas plásticas e incubadas por 15 minutos a 37°C com 750 µL de solução de GODPOD (Glicose PAP Liquiform/Centerlab[®]). Após a incubação, o teor de amido foi determinado em espectrofotômetro a 505 nm. Todas as análises foram realizadas em duplicata com base na curva padrão da glucose de concentrações crescentes de 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 e 20 µg.mL⁻¹.

2.4 Aminoácidos totais livres

A extração dos aminoácidos foi realizada utilizando-se 10 mg de massa seca das amostras em tubos plásticos de 2 mL de capacidade, submetidos à imersão em 0,5 mL de metanol 80% e incubação em banho-maria a 70°C por 20 minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos, os sobrenadantes foram coletados e os resíduos foram re-extraídos mais três vezes e novamente centrifugados, com os sobrenadantes das quatro extrações metanólicas reunidos em novos tubos plásticos, totalizando 2 mL de sobrenadante.

Após a extração, os tubos contendo os sobrenadantes foram submetidos à secagem em “Speed Vac” com temperatura ambiente e o produto da secagem ressuspendido em 1 mL de água milli-Q. Em seguida, o extrato foi submetido à

purificação em coluna de troca catiônica Dowex 50x8 (100-200 mesh), para a retenção dos aminoácidos. Para retirada dos aminoácidos a coluna foi lavada com tampão trisodiocitrato 33 mM, contendo 145 mM de NaOH e 200 mM de H₃BO₃ (≈ pH 10).

A quantificação dos aminoácidos totais livres foi realizada segundo a metodologia modificada descrita por Yemm & Cocking (1955). Para tanto, em 50 µL de amostra foi adicionado 50 µL de tampão citrato 0,02 M e 100 µL de ninhidrina 1%. Posteriormente, os tubos foram agitados, vedados e mantidos em banho a temperatura de 95 °C, durante 20 minutos. Após o resfriamento dos tubos realizou-se a leitura da absorbância em leitor de microplacas ELISA a 570 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata com base na curva padrão da leucina, com concentrações crescentes de 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 e 20 µg.mL⁻¹.

Para a identificação dos aminoácidos foi utilizada a metodologia descrita em Bruijn & Bout (2000). Após a dosagem dos aminoácidos totais livres, as amostras foram liofilizadas por 48 horas e ressuspensas em 0,5 mL de água milli-Q. Para tanto, as amostras foram filtradas e analisadas em Cromatografia de Troca Iônica de Alto Desempenho com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) modelo ICS 3000, em coluna analítica AminoPAC - PA10 com dimensão de 2x 250 mm (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) e coluna guarda AminoPac - PA10 com dimensão de 2 x 50 mm (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA), eluição em gradiente de água; hidróxido de sódio 250 mM e acetato de sódio 1M, com fluxo 0,2 mL/minuto. As respostas do detector foram comparadas com os padrões de arginina, lisina, histidina, asparagina, glutamina, serina, treonina, cisteína, tirosina, aspartato, glutamato, glicina, alanina, valina, leucina, prolina, isoleucina, metionina, fenilalanina e triptofano nas concentrações 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 µM. A curva-padrão para cada aminoácido foi usada para calcular os conteúdos de aminoácidos nas amostras no Chromeleon Software.

2.5 Proteínas totais

A extração das proteínas totais foi realizada utilizando-se 10 mg de massa seca das amostras em tubos plásticos de 2 mL de capacidade, submetidos à três lavagens em hexano e três lavagens em acetona, para a despigmentação das amostras. Após as lavagens, as amostras foram imersas em 0,5 mL de NaOH e incubação a 4 °C por 12

horas. Em seguida, foram adicionadas mais duas alíquotas de 0,25 mL e foram incubadas por mais uma hora cada.

Após as incubações, foi adicionado às amostras, 1 mL de ácido tricloroacético 10% (TCA), seguido da centrifugação dos tubos a 13.000 rpm por 10 minutos, para precipitação das proteínas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as proteínas ressuspensas em 0,5 mL de NaOH 0,1 N.

A quantificação foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Foram pipetados 10 μ L das amostras em tubos eppendorf, onde foram adicionados 790 μ L de água milli-Q e 200 μ L de solução Bradford 20%. Após 5 minutos de repouso no escuro, foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 595 nm. Como branco foi utilizado uma solução com 800 μ L de água milli-Q e 200 μ L de Bradford. Todas as análises foram realizadas em duplicata com base na curva padrão da albumina de soro bovino (BSA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a realização das análises bioquímicas foram analisadas folhas de plantas matrizes (Figura 25 A), calos primários tipo 1 (Figura 25 B) e tipo 2 (Figura 25 C) aos 30 dias de cultivo em meio PM. Após 120 dias de cultivo em meio SM foram coletados calos embriogênicos (Figura 25 D). Foram analisados também embriões globulares, torpedos, cotiledonares e zigóticos (Figura 25 E-H respectivamente).

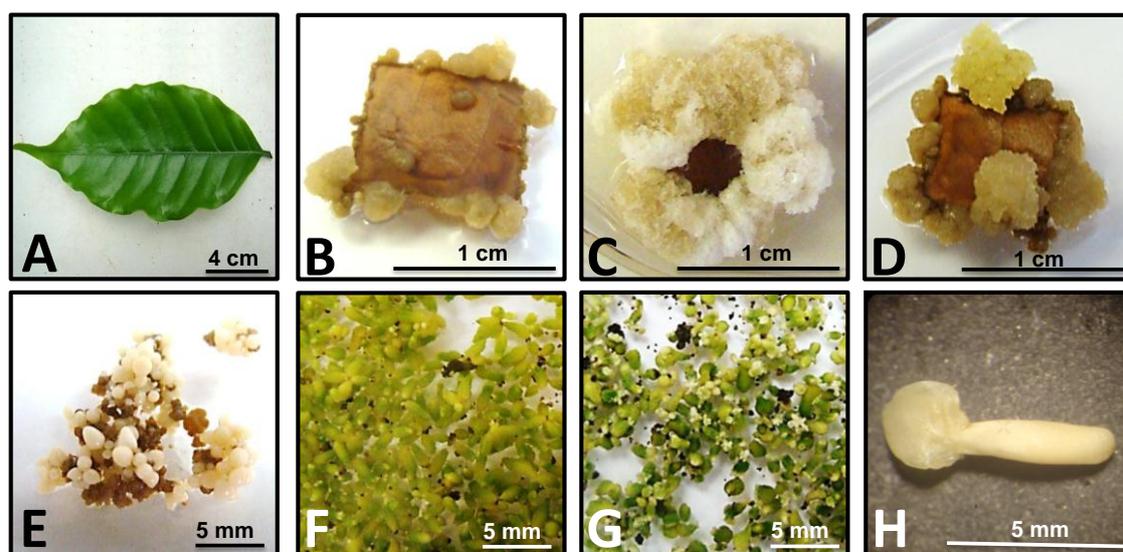


Figura 25. Estádios da embriogênese somática de *Coffea arabica* variedade 'Catuaí Vermelho'. **A)** Folha jovem e bem expandida. **B)** Calo primário tipo 1. **C)** Calo primário tipo 2. **D)** Calo embriogênico. **E)** Embriões globulares após 90 dias de cultivo em meio RM gelificado. **F)** Embriões torpedos após 30 dias de cultivo em meio MGM líquido. **G)** Embriões cotiledonares após 60 dias de cultivo em meio MGM líquido. **H)** Embrião zigótico de frutos maduros.

3.1 Açúcares solúveis totais

Na Figura 26 é apresentado o teste de médias após análise de variância das concentrações de açúcares solúveis totais (AST) nos diferentes estádios de desenvolvimento da embriogênese somática de *Coffea arabica* variedade 'Catuaí Vermelho'. O conteúdo de açúcares solúveis variou em todos os estádios apresentados na Figura 26, exceto pelos resultados encontrados na Folha e no Calo primário tipo 2 que apresentaram os menores resultados e não diferiram estatisticamente entre si. Na fase de indução de calos primários houve diferença significativa entre o teor de açúcar do calo primário tipo 1 e o calo primário tipo 2. O calo primário tipo 2 apresentou um

teor de açúcar bastante inferior ao encontrado no calo primário tipo 1. As concentrações de carboidratos observadas no calo primário tipo 1, embrião globular e torpedado não diferiram estatisticamente entre si. Foi verificado que o embrião zigótico apresentou a maior concentração de açúcares totais, aproximadamente duas vezes o resultado encontrado no embrião somático em estágio cotiledonar.

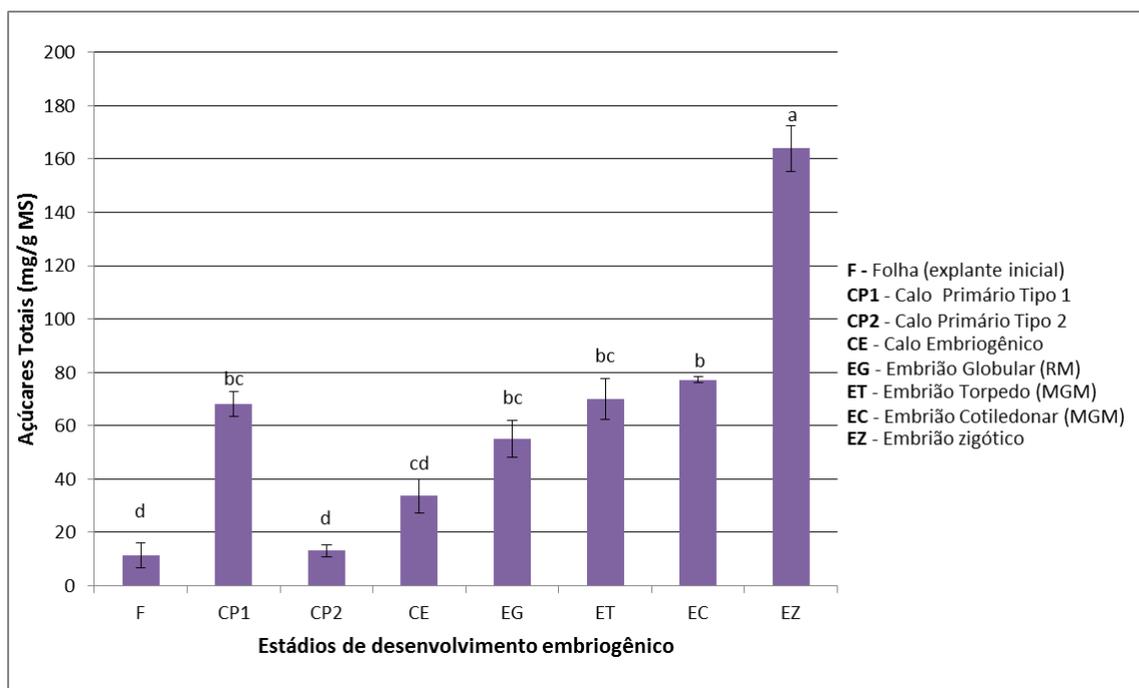


Figura 26. Concentrações de açúcares totais solúveis nos diferentes estádios da embriogênese somática de *Coffea arabica* variedade ‘Catuaí Vermelho’.

A concentração de açúcares solúveis totais encontrada nas folhas é influenciada pelo período do ano e estado fisiológico da planta em que a coleta é realizada. Segundo Laviola *et al.* (2007), a concentração de AST nos 3º e 4º pares de folhas de *Coffea arabica* L. é bastante reduzido no início do período reprodutivo. É provável que a maior parte do açúcar sintetizado neste período seja mobilizado para o crescimento vegetativo e para a frutificação. A queda na concentração de carboidratos nas folhas nessa época está relacionada, principalmente, às demandas por fotoassimilados nos frutos, bem como às exigências para o crescimento vegetativo (Amaral *et al.*, 2001).

Segundo Pescador *et al.* (2008), foi verificado em *Feijoa sellowiana* Berg. que essa elevação inicial no teor de açúcares solúveis em calos primários parece decorrer da presença de sacarose no meio de cultura. A sacarose é considerada, há bastante tempo, como a principal forma de açúcar usada como fonte de esqueleto carbônico e energia

pelas células durante o crescimento e desenvolvimento *in vitro* (Tremblay & Lalonde, 1984; Tremblay *et al.*, 1984; Barghchi, 1988; George, 1993). A afirmação apresentada por Pescador *et al.* (2008) parece bastante coerente com o resultado observado no presente trabalho, uma vez que foi verificado que o explante inicial (fragmentos de folha) não seria o responsável pela alta concentração de açúcares solúveis no calo, pois a quantidade de açúcares solúveis totais encontrados na folha é inferior ao observado no calo após 30 dias de cultivo em meio PM. Então, pode-se supor que esse acúmulo de açúcares solúveis totais no calo primário tipo 1 é decorrente da alta disponibilidade de sacarose encontrada no meio nutritivo de indução.

Com o surgimento do calo primário tipo 2 o conteúdo de carboidrato decresceu cerca de 5 vezes quando comparado ao calo primário tipo 1. Segundo Pescador *et al.* (2008), esse aparente catabolismo do açúcar parece estar associado à ocorrência de proliferação celular, evidenciada durante a fase de indução. No presente trabalho, essa proliferação celular associada à redução de carboidratos quantificados pôde ser observada tanto na formação do calo primário tipo 2, quanto no calo embriogênico. Esses resultados corroboram os resultados encontrados por Santos *et al.* (2003), que ao analisar explantes foliares de *C. arabica* variedade Rubi observaram essa redução nos teores de açúcares após um período de 30 dias de cultivo. Resultados semelhantes também foram encontrados por Serra *et al.* (2000), em calos originados de segmentos foliares de *Bertholletia excelsa* HBK e Paiva Neto (1996) em segmentos foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria* L. Gaudichand).

A sensibilidade aos açúcares endógenos, bem como a concentração deles no apoplasto das células e o seu transporte, podem afetar a morfogênese pelo controle da divisão celular no nível de transcrição, tradução e pós tradução (Delrot, 2000). Ensaio com bioluminescência indicaram a existência de gradientes de açúcares em cotilédones de feijão, os quais, segundo Weber *et al.* (1997) estariam envolvidos no controle morfogênico, influenciando a divisão e a diferenciação celular. Segundo os mesmos autores, os açúcares transportados também estariam interferindo na regulação do ciclo celular.

Diferente do observado no presente trabalho, os embriões de *F. sellowiana*, na fase inicial de desenvolvimento apresentaram quantidades maiores de açúcares solúveis totais quando comparados aos embriões na fase cotiledonar da embriogênese somática (Pescador *et al.*, 2008).

Cangahuala-Inocente *et al.* (2009) mostraram que a concentração de açúcares solúveis totais encontrada no embrião cotiledonar de *Acca sellowiana* era maior do que os açúcares presentes no embrião zigóticos, sugerindo que a quantidade de carboidratos presentes no meio de cultura pode aumentar os níveis de açúcares internos do embrião cotiledonar. Já no presente trabalho, esse padrão não aconteceu e sugere-se que, conforme verificado na Figura 26, os açúcares absorvidos pelo embrião cotiledonar estão sendo estocados na forma de amido. E o embrião zigótico apresenta uma alta concentração de açúcares solúveis totais e uma baixa concentração de amido.

Embora a quantificação dos açúcares solúveis totais seja importante para o entendimento das diferentes fases da embriogênese somática do cafeeiro, a identificação dos diferentes açúcares envolvidos nessas fases pode contribuir com informações ainda mais interessantes quanto ao metabolismo dos açúcares durante a embriogênese somática.

Na Figura 27 estão descritas as concentrações de monossacarídeos (frutose e glucose) e dissacarídeos (sacarose) nos diferentes estádios de desenvolvimento da embriogênese somática de *Coffea arabica* var. 'Catuaí Vermelho'. Foi verificado que a folha apresentou as menores concentrações desses três açúcares solúveis. No calo primário tipo 1 foram observadas as maiores concentrações de frutose e glucose, porém a concentração de sacarose nesse estágio é bastante reduzida. O calo primário tipo 2 apresentou baixas concentrações dos três açúcares, no entanto, a concentração de frutose foi maior que os outros dois açúcares encontrados nesse calo. No calo embriogênico as concentrações de frutose e sacarose foram semelhantes e menores que a quantidade de sacarose. Já no embrião globular, a concentração de sacarose foi superior às concentrações de frutose e glucose. O embrião torpedo apresentou o mesmo padrão do embrião globular, com uma concentração de sacarose bastante elevada, porém nesse tipo de embrião as concentrações de frutose e sacarose reduziram ainda mais, se comparadas ao estágio anterior. No embrião cotiledonar, as concentrações dos três açúcares voltaram a se igualar. Nesse estágio, havia ainda uma maior concentração de sacarose, porém as concentrações desses três açúcares estavam bastante similares. O embrião zigótico apresentou um padrão semelhante ao encontrado no embrião cotiledonar. Embora as concentrações encontradas no embrião zigótico terem sido superiores as encontradas no embrião cotiledonar, o embrião zigótico apresentou uma concentração de sacarose levemente superior aos demais açúcares.

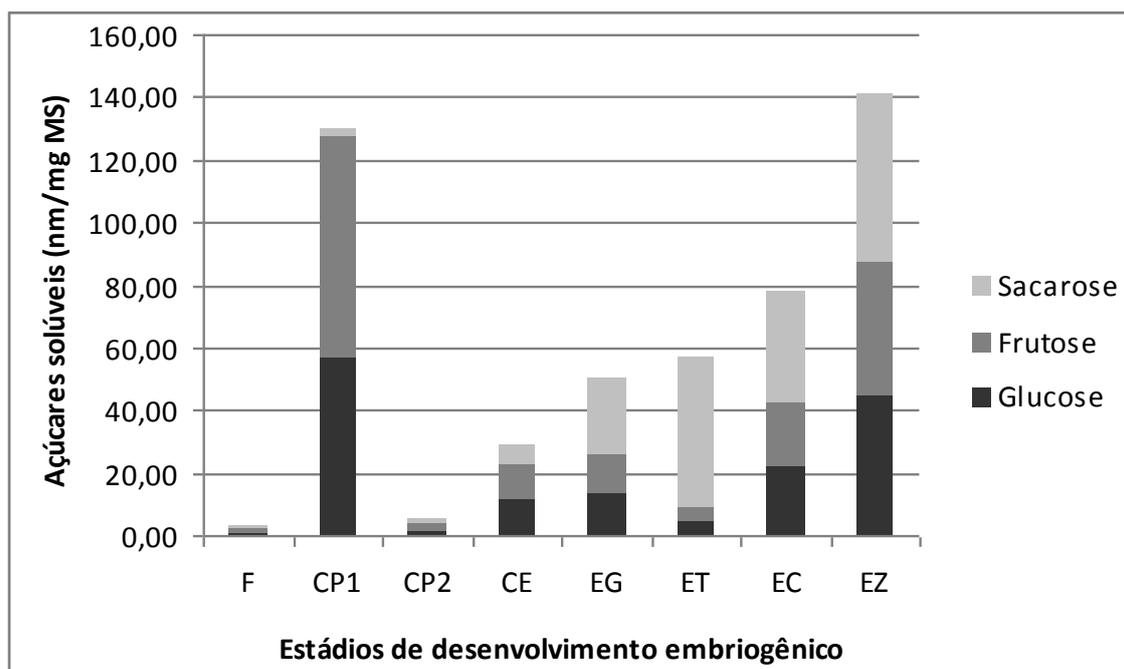


Figura 27. Concentrações de açúcares sacarose, frutose e glucose nos diferentes estádios da embriogênese somática de *Coffea arabica* variedade 'Catuaí Vermelho'. F = folha; CP1 = calo primário tipo 1; CP2 = Calo primário tipo 2; CE = calo embriogênico; EG = embrião globular; ET = embrião torpedado; EC = embrião cotiledonar; EZ = embrião zigótico.

Os principais carboidratos, não-estruturais, acumulados em folhas e frutos de cafeeiro são o amido e os açúcares solúveis redutores e não-redutores. Entre os açúcares redutores, os principais são a glicose e frutose, enquanto o principal açúcar não-redutor é a sacarose, mobilizado nos processos de transporte na direção fonte/dreno (Taiz & Zeiger, 2007).

Diferente do observado no presente trabalho, Paiva Neto (1996) observaram uma redução nos teores de açúcares redutores após a inoculação, verificada em segmentos foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria* L. Gaudichaud) cultivados em meio MS acrescido de 2,4-D. Os resultados desse estudo indicaram uma redução nos teores de açúcares redutores, no período que sucedeu a inoculação, seguido de um aumento até 12 dias após a inoculação, e posterior redução até o 30 dia de cultivo. Serra *et al.* (2000), estudando calos originados de segmentos foliares de castanha-do-Brasil, também verificaram redução nos teores de açúcares redutores, após a inoculação dos explantes.

Em embriões somáticos da conífera *Picea abies*, observou-se a presença de glucose, frutose e sacarose (Konrádová *et al.*, 2002), açúcares estes detectados também nos embriões zigóticos de abacateiro (Sánchez-Romero *et al.*, 2002). Na embriogênese

de soja, por outro lado, Chanprame *et al.* (1998) detectaram a presença de frutose, galactose, galactinol, glucose, mio-inositol, pinitol, rafinose, estaquiase e sacarose.

Os resultados analisados relativos aos teores de sacarose, glucose e frutose apontam para uma coordenação do catabolismo e do anabolismo desses açúcares solúveis. No período em que se observaram teores baixos de sacarose, verificaram-se concomitantemente, concentrações elevadas de glucose e frutose. Por outro lado, quando aumentaram os teores de sacarose, ambas as hexoses mostraram-se com teores diminutos. Esses resultados concordam com os verificados em sementes de *Vicia sp*, nas quais, antes do acúmulo dos carboidratos de reserva no embrião, o endosperma continha altos teores de hexoses derivadas do desdobramento da sacarose pela ação da invertase ligada à parede celular (Hill *et al.*, 2003). Os teores de sacarose, glucose e frutose, detectados no presente trabalho, indicaram a mesma tendência de partição da sacarose com acúmulo de glucose e frutose ou ocorrendo o contrário onde há um acúmulo de sacarose e a redução dos teores de frutose e glucose simultaneamente.

Foi verificado no presente trabalho que as hexoses e a sacrose estão intimamente relacionadas às diferentes fases do desenvolvimento embriogênico. Weber *et al.* (1997) observaram essa mesma tendência ao analisarem o desenvolvimento de sementes de leguminosas. Segundo esses autores a sacarose desempenha um papel de regulação da diferenciação celular e de armazenamento de substâncias de reserva, enquanto as hexoses controlariam o crescimento e o metabolismo celular. Analisando a embriogênese somática do cafeeiro, foi possível verificar a predominância da sacarose durante o processo de maturação e germinação dos embriões somáticos, e a presença das hexoses intensamente relacionadas à fase de indução da embriogênese somática.

Odnevall & Bjork (1989), verificaram que as enzimas para a degradação da sacarose e da maltose estavam presentes nas frações da parede celular e que a glicose e frutose foram simultaneamente usadas pelas culturas de raízes, porém, as culturas menos diferenciadas usaram toda glicose disponível antes da utilização da frutose.

Segundo Hew & Mah, (1989), a preferência pela frutose em relação à sacarose, como fonte de carbono, por algumas espécies e tecidos, pode estar relacionada à necessidade de as células excretarem a enzima invertase ao meio de cultivo, visando à hidrólise da sacarose antes da absorção da fonte de carbono.

De acordo com o que foi mencionado anteriormente, verificou-se uma mudança na proporção dos açúcares, favorecendo a sacarose em relação às hexoses, glucose e frutose, nas fases embrionárias. Resultados semelhantes foram encontrados por

Pescador *et al.* (2008) onde foram analisadas a três vias de obtenção de embriões de *F. sellowiana* (a embriogênese somática direta, indireta e a zigótica). Resultados similares também foram observados por Sánchez-Romero *et al.*, (2002) quanto aos carboidratos solúveis de embriões zigóticos de abacateiro, sendo atribuído o decréscimo das hexoses à síntese de sacarose.

Semelhante o verificado no presente trabalho, Pescador *et al.* (2008) ao analisar a embriogêneses zigótica e somática de *Feijoa sellowiana*, verificaram que a glucose e a frutose tiveram suas concentrações alteradas durante as etapas desses processos. Segundo, Hill *et al.*, (2003), teores elevados de hexoses manteriam os processos de divisão e alongamento celular em embriões na fase cordiforme. Entretanto, teores variáveis também foram evidenciados nos embriões nas fases globular e cotiledonar e em menor quantidade na fase torpedo (Figura 26).

Diferentemente do observado no presente trabalho, Gosslová *et al.* (2001) analisando sementes e embriões somáticos de *Picea abies*, verificaram que os carboidratos totais tiveram seus teores reduzidos em embriões na fase cotiledonar.

No presente trabalho, na fase cotiledonar das três vias de embriogênese foram observados teores mais altos de sacarose. Esse açúcar poderia estar sendo utilizado como base no metabolismo do carbono ou como fonte de carboidratos (Taiz & Zeiger, 2007). Conforme foi sugerido, a sacarose poderia também ser sinalizadora da rota de síntese de substâncias de reserva (Weber *et al.*, 1997). Em *Picea abies*, Iraqui & Tremblay (2001) observaram que esse açúcar atuava como fator regulatório na maturação de embriões somáticos através da sinalização para a síntese de proteínas de reserva. Na embriogênese zigótica de abacateiro, Sánchez-Romero *et al.* (2002), observaram aumentos nos teores de sacarose, os quais eram coincidentes com as fases de maturação, ocorriam simultaneamente a um declínio no conteúdo de água e a um acúmulo de amido.

3.2 Amido

Na Figura 28 é apresentado o teste de médias após análise de variância das concentrações de amido nos diferentes estádios de desenvolvimento da embriogênese somática de *Coffea arabica* variedade 'Catuaí Vermelho'. A folha apresentou maior teor de amido que os calos primários. Na fase de indução de calos primários tipo 1 e tipo 2 foram verificados teores reduzidos de amido (1,88 e 2,04 % de hidrólise,

respectivamente). Os calos primários tipo 1 e tipo 2, não diferiram estatisticamente. Os teores de amido aumentaram gradativamente nas etapas que compõem a embriogênese somática, atingindo a maior percentagem nos embriões cotiledonares que apresentaram 24,06 % de hidrólise de amido. Os embriões zigóticos apresentaram os menores teores de amido, com 0,71 % de hidrólise.

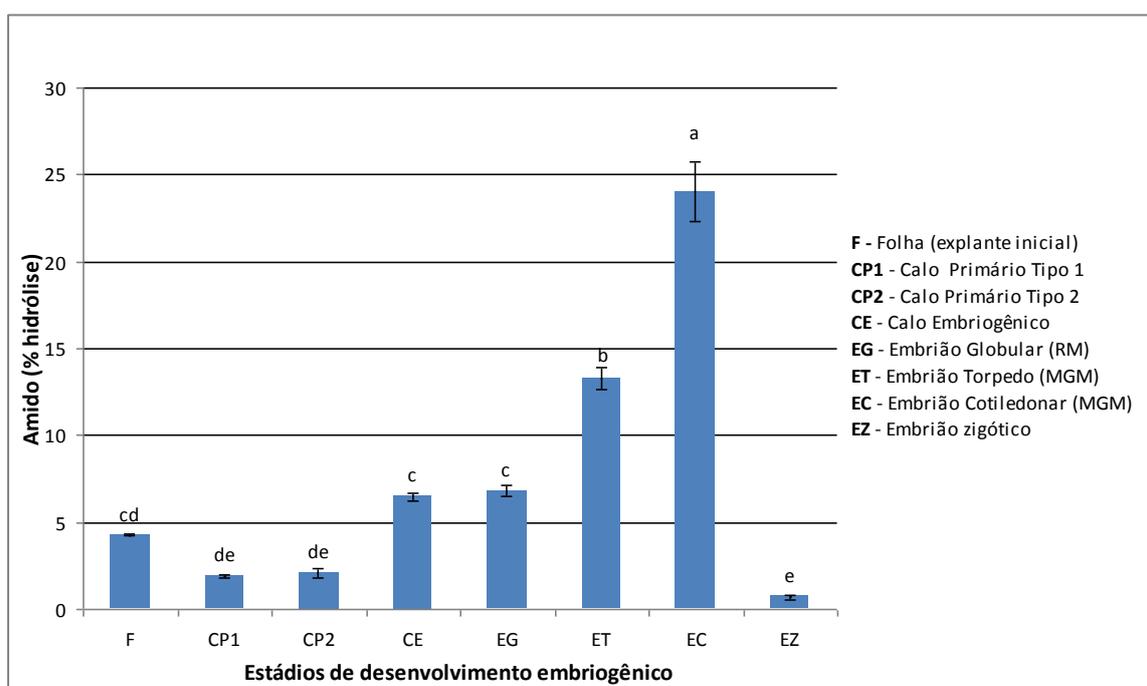


Figura 28. Concentrações de amido nos diferentes estádios da embriogênese somática de *Coffea arabica* variedade 'Catuaí Vermelho'.

Segundo Martin *et al.* (2000) a embriogênese somática é um processo morfológico que requer uma quantidade elevada de energia, e, por conseguinte o catabolismo do amido resulta em compostos intermediários de glicose que fornecem o ATP necessário para o metabolismo da célula.

Segundo Priestley (1962), as conversões de amido para açúcar ocorrem em ocasiões de crescimento vegetativo intenso, quando as reservas são usadas para dar suporte a atividade meristemática de ápices caulinares e também ao crescimento de frutos. Verificou-se que a concentração de amido em folhas apresentou uma pequena tendência de aumento no final do ciclo reprodutivo. É possível que a maior concentração de amido em folhas, esteja relacionada à menor produção de frutos. Uma menor produção de frutos pode ter resultado em menor força de dreno (Taiz & Zeiger, 2007) ocorrendo, com isto, balanço positivo de fotoassimilados nas folhas, que podem

ter sido armazenados na forma de amido (Marenco & Lopes, 2005). Apesar disso, Janardhan *et al.* (1971) encontraram níveis elevados de amido, em ramos com carga elevada, sendo improvável que as concentrações de amido nas folhas e ramos esteja apenas relacionada à formação dos frutos.

Foi verificada uma baixa concentração de açúcares solúveis totais na folha, no entanto o teor de amido nesse explante foi relativamente elevado. Sendo assim, pode-se dizer que devido à folha ser um órgão de fonte, não há a necessidade de grande estocagem de açúcares no tecido, pois os carboidratos são ali gerados através da fotossíntese. E como foi verificada a baixa concentração de açúcares solúveis e o alto teor de amido, pode-se dizer que, a maior parte do açúcar gerado no tecido foliar de *Coffea arabica*, é estocado na forma de amido, pois a maior parte da forma livre acaba sendo transportada para outros tecidos.

Nakamura (1994) e Bobák *et al.* (2004), estudando embriões somáticos de *Coffea arabica* variedades 'Mundo Novo' e 'Catuaí Amarelo', respectivamente, e células de calos de *Drosera spathulata*, por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura, encontraram plastídios cheios de amido. Numerosos grãos de amido também foram observados em células embriogênicas de calos de *Gentiana punctata* por Mikula *et al.* (2004), relacionando este padrão bioquímico como fonte primária de energia necessária para a intensa divisão celular e para o desenvolvimento dos embriões (Cangahuala-Inocente *et al.*, 2007). Segundo Martin *et al.* (2000), o consumo dos grãos de amido promove energia para o desenvolvimento do embrião somático, sugerindo uma ativa regulação do acúmulo de grãos de amido em calos embriogênicos.

Em muitos casos, as células com grãos de amido estão localizadas próximas a regiões com intensa atividade meristemática. O acúmulo de amido em células embriogênicas ou em células adjacentes do explante parece ser um fenômeno ligado à aquisição de competência embriogênica (Lai & McKersie, 1994). Altas quantidades de amido foram observadas durante o processo de formação de embriões somáticos em algumas espécies (Profumo & Gastaldo, 1995; Rodriguez & Wetzstein, 1998). Esse acúmulo de amido na formações de embriões somáticos pode estar associada a alta disponibilidade de carboidratos presentes no meio nutritivo.

Crescimento ótimo e plântulas vigorosas é o que se espera encontrar em embriões somáticos que apresentem altos teores de amido, proteína e carboidratos solúveis (Attree *et al.*, 1992). A acumulação, portanto, de reservas adequadas, é vital

para a embriogênese somática de plantas, assim como para a retomada de desenvolvimento após a formação de embriões cotiledonares (Flinn *et al.*, 1993).

Estudos têm sido realizados visando estabelecer uma associação entre o acúmulo de amido e o desenvolvimento de embriões somáticos. Alguns destes estudos evidenciaram aumento no conteúdo de amido durante a maturação de embriões somáticos, os quais apresentam teores mais elevados desta substância do que os embriões zigóticos. Estes resultados sugerem que os embriões somáticos são metabolicamente diferentes dos embriões zigóticos e incapazes de converter eficientemente carboidratos em lipídios e proteínas de reserva (Merkle *et al.*, 1995).

Segundo Bewley & Black (1994), os açúcares não são utilizados diretamente para o metabolismo de energia, e sim transformados em amido, como substância de reserva nos cotilédones dos embriões zigóticos, sendo a sacarose a principal fonte para a síntese de amido. Mostrou-se também que durante a fase de maturação das sementes ocorre acúmulo de substâncias de reserva tais como o amido. A deposição de substâncias de reserva é o processo chave para desenvolvimento da semente, uma vez que fornece os compostos que são usados desde os estádios iniciais do desenvolvimento até a autotrofia (Merkle *et al.*, 1995).

Conforme verificado no presente trabalho, a concentração de amido estocada nos embriões zigóticos é reduzida ou, em algumas espécies, chegando a ser nula. Faria *et al.* (2008) analisaram quimicamente a semente de *Butia capitata* e constataram um alto teor de lipídios. Panza *et al.* (2004) afirmaram que o cotilédone do embrião das palmeiras desempenha, ao lado da função de absorção das reservas do endosperma, papel de acumular reservas. Os autores constataram existência de corpos proteicos, depósitos proteicos no vacúolo e pequenos grãos de amido em células do embrião da palmeira *Euterpe edulis*. Demanson (1988) concluiu que 68% do tecido embrionário da palmeira *Washingtonia filifera* é composto por estruturas de reservas, como corpos lipídicos e proteicos, embora amido não seja encontrado.

3.3 Aminoácidos totais livres

Na Figura 29 é apresentado o teste de médias após análise de variância das concentrações de aminoácidos totais livres (ATL) nos diferentes estádios de desenvolvimento da embriogênese somática de *Coffea arabica* variedade 'Catuaí Vermelho'. A folha apresentou a menor concentração de aminoácidos totais. Os calos

primário tipo 1 e tipo 2, calo embriogênico, embriões globulares e torpedo não difeririam estatisticamente entre si e apresentaram altas concentrações de aminoácidos totais. O embrião cotiledonar apresentou uma queda na concentração de aminoácidos e o embrião zigótico apresentou a maior concentração de aminoácidos totais encontrada em todos os estádios analisados.

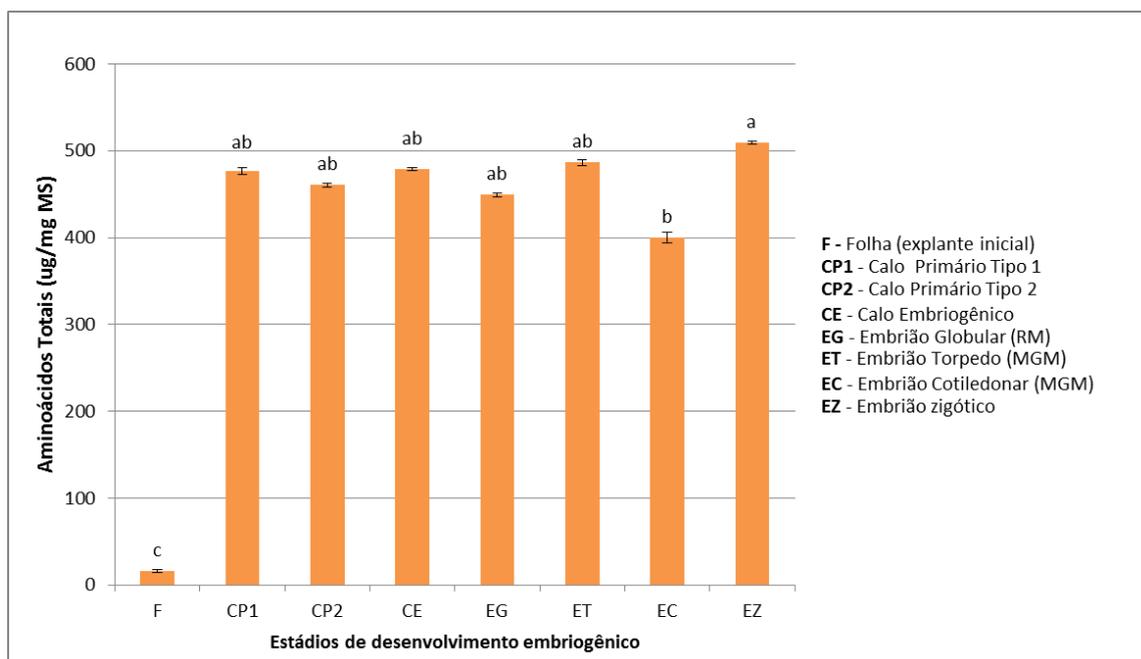


Figura 29. Concentrações de aminoácidos totais livres nos diferentes estádios da embriogênese somática de *Coffea arabica* variedade ‘Catuaí Vermelho’.

Ao analisar a dosagem de aminoácidos totais livres no tecido foliar, foi verificada uma concentração bastante reduzida. Shan *et al.* (2012), estudando o comportamento de plântulas de seringueira cultivadas *in vitro* também verificaram concentrações diminutas de aminoácidos presentes no tecido foliar dessa espécie. Segundo os autores, os aminoácidos que chegam aos tecidos foliares são rapidamente utilizados, principalmente de plantas cultivadas *in vivo* pois eles afirmam que a manipulação de componentes do meio nutritivo, especificamente a adição de nitrato, acarreta no aumento da concentração dos aminoácidos nas folhas das plantas cultivadas *in vitro*.

Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram os resultados apresentados por Pescador (2008) e Kumar & Kumari (2011), que analisando a formação de calos embriogênicos de feijoa e cártamo, respectivamente, verificaram uma elevação acelerada dos teores de aminoácidos livres. Segundo Fehér *et al.* (2003), esse

aumento repentino das concentrações de aminoácidos totais nos tecidos em desenvolvimento, pode ter ocorrido devido ao aumento da atividade metabólica das culturas estimulada pela presença de auxina no meio nutritivo, acarretando alterações bioquímicas e fisiológicas nas células vegetais em cultivo. A alta concentração de aminoácidos também pode ser explicada pela alta concentração de nitrogênio presente no meio nutritivo.

Ao contrário do presente trabalho, Pescador (2008) e Booz *et al.* (2009), ao estudar a bioquímica dos processos de maturação e regeneração de embriões somáticos de feijoa e goiabeira serrana, respectivamente, observaram uma redução contínua dos níveis de aminoácidos totais livres ao longo dos diferentes estádios de desenvolvimento. Segundo os autores, essa diminuição no conteúdo de aminoácidos totais ao longo das fases tardias da embriogênese somática, está relacionada, provavelmente, com o aumento da síntese de proteínas. No presente trabalho verificou-se que os níveis de aminoácidos foram reduzidos principalmente no embrião somático em estágio cotiledonar, devido a diminuição esporádica dos aminoácidos apenas nesse estágio da embriogênese somática, especula-se que a troca tardia do meio nutritivo e o esgotamento dos nutrientes disponíveis influenciaram negativamente a síntese de aminoácidos. Sugere-se então um controle mais apurado e uma realização de trocas do meio nutritivo em períodos menores do que os propostos no presente trabalho.

A Tabela 20 ilustra a quantificação dos aminoácidos relevantes nos diferentes estádios do desenvolvimento embriogênico de *Coffea arabica* variedade 'Catuaí Vermelho'. Foi verificado que a arginina apresentou uma maior concentração no calo primário tipo 1 e a menor concentração no embrião zigótico, já os demais estádios não diferiram estatisticamente entre si. A lisina também está em maior quantidade no calo primário tipo 1. Foi observada uma grande quantidade de glutamina no calo primário tipo 1 e novamente a menor concentração foi verificada no embrião zigótico. O calo primário tipo 1 apresentou as maiores concentrações de todos os aminoácidos, exceto serina e prolina que foram bastante inferiores aos demais estádios embriogênicos. Foi identificada uma alta concentração de serina no calo primário tipo 2 e embrião torpedo apresentou a maior quantidade de prolina. A leucina foi observada em alta concentração em quase todos os estádios embriogênicos, exceto no calo embriogênico e no embrião globular que apresentaram quantidades reduzidas desse aminoácido. Já a histidina foi encontrada em quantidades reduzidas na maioria dos estádios da embriogênese somática

exceto pelo calo primário tipo 1 e o embrião zigótico. E a metionina foi verificada em grande quantidade no calo primário tipo 1, mas esteve ausente nos demais estádios.

Tabela 20. Quantificação dos aminoácidos de maior relevância nos diferentes estádios de desenvolvimento da embriogênese somática de *Coffea arabica* variedade Catuaí Vermelho expressos em nmol/mg de Massa Seca.

Aminoácidos	Estádios de desenvolvimento embriogênico							
	F	CP1	CP2	CE	EG	ET	EC	EZ
Arginina	2,72 AB	11,66 A	4,47 AB	6,75 AB	5,34 AB	8,84 AB	5,05 AB	2,38 B
Lisina	0,49 AB	0,75 A	0,02 C	0,20 BC	0,06 C	0,06 C	0,03 C	0,26 BC
Glutamina	0,15 C	12,15 A	1,81 BC	4,64 B	2,59 BC	2,32 BC	0,51 BC	0,01 C
Asparagina	0,00 B	32,56 A	0,33 B	0,01 B	0,00 B	0,32 B	0,13 B	0,15 B
Treonina	3,01 BC	9,52 A	4,37 B	3,60 BC	4,11 BC	1,63 CD	2,67 BCD	0,41 D
Glicina	2,75 B	8,50 A	2,41 B	1,23 CD	2,74 B	0,93 DE	1,63 C	0,46 E
Serina	0,00 H	0,32 F	3,78 A	1,51 C	1,09 D	1,69 B	0,99 E	0,23 G
Prolina	0,00 C	0,19 C	0,47 C	2,18 B	2,22 B	5,53 A	0,96 BC	1,28 BC
Leucina	4,00 AB	6,25 A	6,37 A	1,41 B	1,45 B	3,67 AB	5,41 A	4,14 AB
Histidina	0,00 C	1,32 A	0,04 C	0,05 C	0,00 C	0,67 B	0,00 C	0,84 AB
Metionina	0,00 B	11,23 A	0,00 B	0,00 B				

Médias seguidas pela mesma não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. F = folha; CP1 = calo primário tipo 1; CP2 = Calo primário tipo 2; CE = calo embriogênico; EG = embrião globular; ET = embrião torpedado; EC = embrião cotiledonar; EZ = embrião zigótico.

A arginina é um dos principais precursores na biossíntese de poliaminas. Segundo Silveira (2006), o metabolismo das poliaminas está diretamente relacionado com a aquisição de competência embriogênica em culturas embriogênicas. Dessa forma, é provável que o aumento da arginina no calo primário tipo 1 esteja relacionado a indução de competência embriogênica desse calo que dará origem ao calo embriogênico, propriamente dito.

Conforme verificado no presente trabalho, Percador *et al.* (2008), também verificaram um incremento de glutamina por volta do 30° dia de cultivo de *Feijoa sellowiana*. Há evidências na literatura de que a glutamina estaria provavelmente relacionada à indução do processo embriogênico somático. Segundo Dal Vesco & Guerra (2001), a glutamina seria uma forma de nitrogênio orgânico prontamente assimilável e incorporado aos esqueletos carbônicos durante o metabolismo e na síntese de proteínas, quando comparadas as fontes inorgânicas de nitrogênio. A importância de

aminoácidos no meio de cultura varia com a espécie considerada, tipo de explante ou resposta morfogênica desejada (George, 1993). A adição de aminoácidos no meio de cultura pode inibir ou promover o desenvolvimento da embriogênese somática, como também, a continuidade de desenvolvimento após a fase cotiledonar em alfafa (Merkle *et al.*, 1995).

Ao analisar a presença da asparagina nas diferentes fases do desenvolvimento da embriogênese somática Pescador (2008), afirmaram que devido a sua grande solubilidade, a asparagina representa uma das principais formas de transporte e armazenamento de nitrogênio das plantas superiores. No entanto, no presente trabalho esse aminoácido foi encontrado em concentrações extremamente reduzidas exceto pelo calo primário tipo 1 que apresentou uma alta concentração desse componente. Isso pode estar relacionado a alta disponibilidade de compostos nitrogenados presentes no meio nutritivo.

O incremento do conteúdo endógeno de prolina, também foi verificado na indução da embriogênese somática de amendoim (Murch *et al.*, 1999). Segundo Satya-Narayan & Nair (1990), o acúmulo desse aminoácido nos tecidos vegetais, de forma geral, está relacionado a condições de estresse. Sendo assim, o acúmulo de prolina na indução da embriogênese somática, está possivelmente associado ao estresse inerente à desprogramação e reprogramação celular induzida pelas altas concentrações de auxina no meio nutritivo.

A leucina foi verificada em alta concentração em ambos calos não embriogênicos e a histidina apenas foi encontrada no calo primário tipo 1 e no embrião zigótico. Kamada Harada, 1979 analisando, a embriogênese somática de cenoura, verificou a síntese de leucina e histidina, no entanto, a formação desses compostos proporcionou um aumento na indução de calos não embriogênicos e uma forte inibição na embriogênese somática, respectivamente. Esses resultados corroboram Miflin & Lea (1976), que afirmam que a leucina e a histidina além de não serem metabolizadas pelos organismos, ainda apresentam a característica de não serem convertidas em outros aminoácidos, dificultando sua redução nos tecidos em cultivo e prejudicando o desenvolvimento embriogênico, uma vez que energia e recursos são gastos para sua síntese.

Conforme verificado no presente trabalho, Astarita *et al.* (2003) evidenciaram o acúmulo de altos teores de alanina, glutamina e serina em embriões zigóticos de *Araucaria angustifolia*.

3.4 Proteínas totais

Na Figura 30 é apresentado o teste de médias após análise de variância das concentrações de proteínas totais nos diferentes estádios de desenvolvimento da embriogênese somática de *Coffea arabica* variedade ‘Catuaí Vermelho’. A folha apresentou a menor concentração de proteínas totais. Calos primários tipo 1 e tipo dois apresentaram concentrações maiores que as encontradas na folha e não diferiram estatisticamente entre si. O calo embriogênico apresentou a maior concentração de proteínas totais. Na maturação dos embriões, o embrião globular apresentou uma redução da concentração de proteínas quando comparado com o calo embriogênico que deu origem ao mesmo. O embrião torpedo apresentou um aumento seguido de uma queda da concentração de proteínas observadas nos embriões cotiledonares e zigóticos que não diferiram estatisticamente entre si.

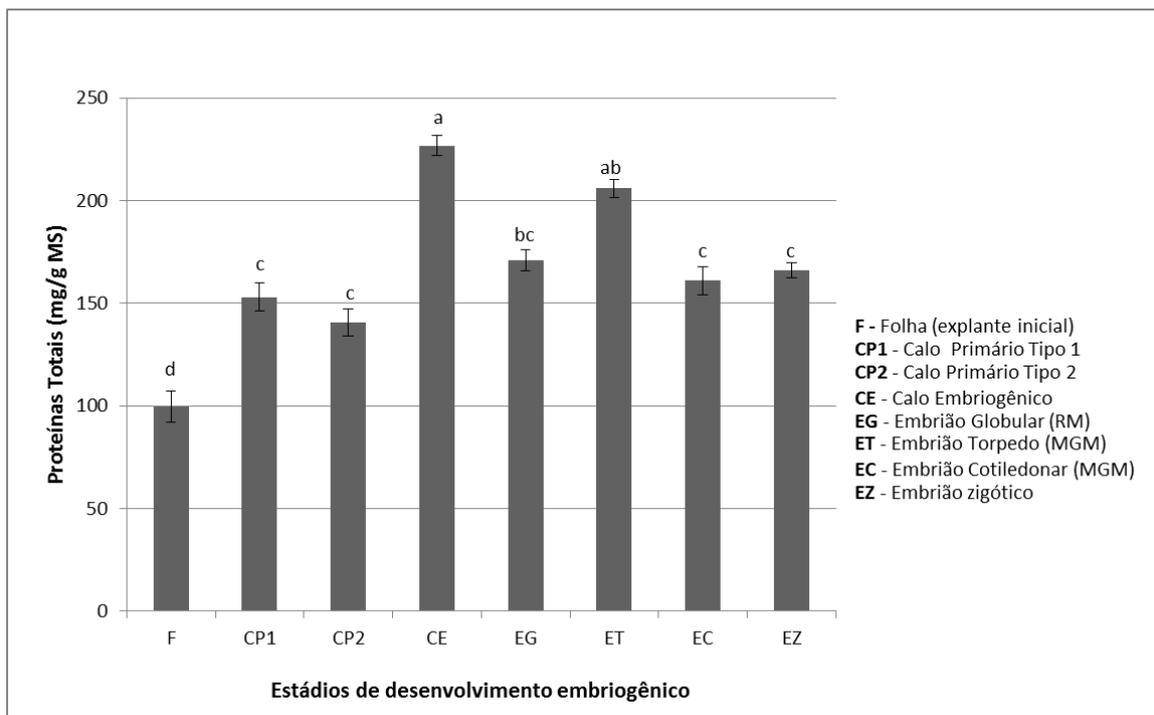


Figura 30. Concentrações de proteínas totais nos diferentes estádios da embriogênese somática de *Coffea arabica* variedade ‘Catuaí Vermelho’.

Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram os resultados apresentados por Caixeta *et al.* (2004) que ao analisarem folhas de *Coffea arabica* variedade ‘Catuaí Vermelho’ verificaram alta concentração de proteínas nesse tecido. Segundo esses autores, esse acúmulo de proteínas no tecido foliar ocorre provavelmente

devido à partição de fotoassimilados participando, preferencialmente da síntese de proteínas.

Conforme verificado no presente trabalho, Steinmacher (2007), também não observou, na embriogênese somática de pupunheira, diferenças significativas nos teores de proteínas totais de calos primários com características embriogênicas e calos primários que não apresentavam competência embriogênica. Segundo esses autores, embora a dosagem de proteínas totais de calos embriogênicos e não embriogênicos não tenha apresentado diferenças, foram verificadas duas bandas de proteína de alta massa molecular associadas aos calos embriogênicos que, conforme foi verificado pelos autores, poderiam ser consideradas proteínas específicas do embrião somático.

Na formação do calo embriogênico, foi verificado nos tecidos desse explante, um aumento nas concentrações de proteínas totais se comparados com os calos primários. Santos *et al.* (2003) também observaram na formação de calos embriogênicos de *Coffea arabica* variedade 'Rubi', induzidos a partir de segmentos foliares, um acúmulo de proteínas totais nos tecidos em cultivo. Segundo os autores, esse aumento nas taxas de proteínas totais, se deve à síntese de polipeptídeos.

No processo de maturação dos embriões somáticos, detectou-se um aumento seguido de uma diminuição nos índices de proteínas totais nos explantes. Cangahuala-Inocente *et al.* (2009), também observaram na maturação dos embriões somáticos de *Acca sellowiana*, variações nas taxas de proteínas totais. No entanto, foi verificado pelos autores, apenas o aumento dos índices de proteínas totais nos tecidos dos embriões.

Na formação do embrião cotiledonar, ou seja, no início do processo de diferenciação, foi verificado que os níveis de proteínas totais decaíram de 210 para 160 mg/g de massa seca, aproximadamente. Segundo Wise & Tunnacliffe (2004), no processo germinativo ou no processo de diferenciação, no caso do embrião somático, as proteínas de reserva armazenadas durante o processo embriogênico são então degradadas, e os aminoácidos que as compõem são hidrolisados, liberando grandes quantidades de compostos a serem utilizados no crescimento da plântula.

Na embriogênese zigótica, ocorre a formação de um eixo portador de meristemas caulinar e radicular, acompanhada pela formação dos cotilédones, esses

últimos mais de perto associados à síntese e estocagem de substâncias de reserva, como as proteínas e os lipídios (Dodeman *et al.*, 1997).

De acordo com Thomas (1993), a maior mudança no desenvolvimento do embrião ocorre com a expansão e maturação dos seus órgãos. Neste período, há uma mudança do desenvolvimento originando um programa de síntese e armazenagem de compostos, que prepara o esporófito jovem para o período de dormência e de seu desenvolvimento pós-embriônico. O cotilédone e o eixo caulinar-radicular aumentam consideravelmente de tamanho, e as células do meristema fundamental em todos os órgãos apresentam como característica o acúmulo de substanciais quantidades de proteínas e lipídios, que serão utilizados como fonte energética durante a germinação.

4. CONCLUSÕES

- O metabolismo dos carboidratos, aminoácidos e proteínas desempenham um importante papel nas diferentes etapas da embriogênese somática;
- A folha é um órgão denominado fonte que não realiza a estocagem de grandes quantidades de carboidratos;
- Comparativamente, o calo primário tipo 1 retém maior quantidade de carboidratos que o calo primário tipo 2 que, devido ao seu crescimento desordenado, grandes quantidades de carboidratos são utilizados na promoção desse desenvolvimento;
- A partir da formação do calo embriogênico até a completa maturação dos embriões somáticos, a concentração de carboidratos aumentou gradativamente desempenhando importantes funções na formação e maturação dos embriões somáticos;
- Embriões somáticos estocam grandes quantidades de carboidratos na forma de amido, diferentemente dos embriões zigóticos em que a reserva de amido é mínima;
- Os aminoácidos estão presentes em todas as etapas da embriogênese somática e do embrião zigóticos, desempenhando as mais variadas funções.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL 2011. **Anuário da agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, p.497, 2011.
- AMARAL, J. A. T.; MATTA, F. M. da; RENA, A. B. Effects of fruiting on the growth of Arabica coffee trees as related to carbohydrate and nitrogen status and to nitrate reductase activity. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p.66-74, 2001.
- AMARAL, L. I. V.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P. M.; GASPAR, M. BUCKERIDGE, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v.34, p.425-431, 2007.
- ASTARITA, L. V.; GUERRA, M. P.; Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* – induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, p.113-118, 1998.
- ATTREE, S. M., POMEROY, M. K.; FOWKE, L. C. Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. **Planta**, v.187, p.395-404, 1992.
- BARGHCHI M. Micropropagation of *Alnus cordata* (Loisel.) Loisel. **Plant Cell, Tissue Organ and Culture**, v.15, p.233-244, 1988.
- BEWLEY, J. D.; BLACK., M. **Seeds: Physiology of development and germination**. 2 ed. New York: Plenum Press, p.445, 1994.
- BOBÁK, M.; SAMAJ, J.; PRETOVÁ, A.; BLEHOVÁ, A.; HLINKOVÁ, E.; OVECKA, M.; HLAVACKA, A.; KUTARNOVÁ, Z. The histological analysis of indirect somatic embryogenesis on *Drosera spathulata* Labill. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.26, n.3, p.353-361, 2004.
- BOOZ, M. R.; KERBAUY, G. B.; GUERRA, M. P.; PESCADOR, R. The role of γ -aminobutyric acid (Gaba) in somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* Berg. (Myrtaceae). **Brazilian society of plant physiology**, v.21, n.4, p.271-280, 2009.
- BORISJUK, L.; ROLLETSCHKE, H.; RADCHUK, R.; WESCHKE, W.; WOBUS, U.; WEBER, H. Seed Development and Differentiation: A Role for Metabolic Regulation. **Plant Biology**, v.6, p.375–386, 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1956.
- BRIDSON, D. M. Additional notes on *Coffea* (Rubiaceae) from Tropical East Africa. **Kew Bulletin**, v.49, p.331-342, 1994.

BRUIJN, J. M.; BOUT, M. **Analysis of aminoacids in sugarbeet samples: Method development and application.** 7th. Symposium of Association Andrew Van Hook for the advancement of knowledge on sugars, Reims, FR, 2000.

CAIXETA, S. L.; MARTINEZ, H. E. P.; PIKANÇO, M. C.; CECON, P. R.; ESPOSTI, M. D. D.; AMARAL, J. F. T. Nutrição e vigor de mudas de cafeeiro e infestação por bicho mineiro. **Ciência Rural**, v. 34, p.1429-1435, 2004.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CAPRESTANO, C. A.; DUCROQUET, J. P.; GUERRA, M. P. Competência embriogenética em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p.87-89, 2007.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; MALDONADO, S. B.; GUERRA, M. P. Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.3, p.217-224, 2009.

CANHOTO, J. M.; MESQUITA, J. F.; CRUZ, G. S. Ultrastructural Changes in Cotyledons of Pineapple Guava (Myrtaceae) During Somatic Embryogenesis. **Annals of Botany**, v.78, p.513-521, 1996.

CARRIER, D. J.; KENDALL, E. J.; BOCK, C. A.; CUNNINGHAM, J. E.; DUNSTAN, D. I. Water content, lipid deposition, and abscisic acid content in developing white spruce seeds. **Journal of Experimental Botany**, v.50 p.1359-1364, 1999.

CARVALHO, M. A. M.; PINTO, M. M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. **Revista Brasileira de botânica**, v.21, p.275-280, 1998.

CHANPRAME, S.; KUO, T. M.; WIDHOLM, J. M. Soluble carbohydrate content of soybean (*Glycine max* L.) Merr.: somatic and zygotic embryos during development. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.34, p.64-68, 1998.

CORUZZI, G. & LAST, R. Amino acids. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Eds.) **Biochemistry and molecular biology of plants**, Rockville: American Society of Plants Physiologists. p.358-410, 2000.

DELROT, S.; ATANASSOVA, R.; MAUROUSSET, L. Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporter. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p.281-306, 2000.

DEMANSON, D. A. Embryo structure and storage reserve histochemistry in the palm *Washingtonia filifera*. **American Journal of Botany**, v.75, p.330-337, 1988.

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. The effectiveness of nitrogen sources in *Feijoa* somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.64, p.19-25, 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

DUCOS, J. P.; LAMBOT, C.; PÉTIARD, V. Bioreactor for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. **International Journal of Plant Developmental Biology**, v.1, p.1-12, 2007.

FARIA, J. P.; ARELLANO, D. B.; GRIMALDI, R.; SILVA, L. C. R.; VIEIRA, R. F.; SILVA, D. B.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Caracterização química da amêndoa de coquinho-azedo (*Butia capitata* var. *capitata*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p.549-552, 2008.

FEHÉR, A., PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201-228, 2003.

FERREIRA, D. F. **Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0**. Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria, São Carlos, v.45, p.255-258, 2000.

FLINN, B. S.; ROBERTS, D. R.; NEWTON, C. H.; CYR, D.R.; WEBSTER, F. B.; TAYLOR, I. E. P. Storage protein gene expression in zygotic and somatic embryos of interior spruce. **Physiologia Plantarum**, v.89 p.719-730, 1993.

GEORGE, E. F.; STITT, M. Plant Propagation by tissue culture. **The technology**. Edington: Exegetics Ltda. p.523, 1993.

GOSSLOVÁ, M.; SVOBODOVÁ, H.; LIPAVAVSKÁ, H.; ALBRECHTOVÁ, J.; VREUGDENHIL, D. Comparing Carbohydrate status during Norway spruce Seed Development and somatic Embryo Formation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.37, p.24-28, 2001.

HEW, C. X.; MAH, T. C. Sugar uptake and invertase activity in *Dendrobium* tissues. **New Phytologist**, v.111, n.2, p.167-171, 1989.

HILL, L. M.; MORLEY-SMITH, E. R.; RAWSTHORNE, S. Metabolism of sugar in the endosperm of developing seeds of oilseed rape. **Plant Physiology**, v.131, p.228-236, 2003.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A. Membrane behavior during dehydration: implication for desiccation tolerance. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.46, p.295-306, 1999.

IRAQUI, D.; TREMBLAY, F. M. Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.2301-2311, 2001.

JANARDHAN, K. V.; GOPAL N. H.; RAMAIAH, P. K. Carbohydrate reserves in relation to vegetative growth, flower bud formation and crop levels in arabica coffee. **Indian Coffee**, p.145- 148, 1971.

KAMADA, H.; HARADA, H. Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures. I. Effects of growth regulators on somatic embryogenesis and root formation. **Zeitschrift fuer Pflanzen-Physiologie**, v.91, p.453-463, 1979.

KONRÁDOVÁ, H.; LIPAVSKÁ, H.; ALBRECHTOVÁ, J.; VREUGDENHIL; D. Sucrose metabolism during somatic and zygotic embryogeneses in Norway spruce: content of soluble saccharides and localisation of key enzyme activities. **Journal of Plant Physiology**, v.159 p.387-396, 2002.

KUMAR, S. P.; KUMARI, B. D. R. Factors Affecting on Somatic Embryogenesis of Safflower (*Carthamus tinctorius* L) at Morphological and Biochemical Levels. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.7, n.2, p.197-205, 2011.

LAI, F-M.; MCKERSEI, B. D. Regulation of starch and protein accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. **Plant Science**, v. 100, p. 211-219, 1994.

LAVIOLA, B. G.; MARTINEZ, H. E. P.; SALOMÃO, L. C. C.; CRUZ, C. D.; MENDONÇA, S. M.; NETO, A. P. Alocação de fotoassimilados em folhas e frutos de cafeeiro cultivado em duas altitudes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.11, p. 1521-1530, 2007.

LOU, H.; OBARAOKEYO, P.; TAMAKI, M.; KAKO, S. Influence of sucrose concentration on *in vitro* morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explants. **Journal of Horticultural Science**, v.71, p.497-502, 1996.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Viçosa: UFV, p.451, 2005.

MARTIN, A. B.; CUADRADO, Y.; GUERRA, H.; GALLEGO, P.; HITA, O.; MARTIN, L.; DORADO, A.; VILLALOBOS, N. Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. **Plant Science**, v.154, p.143-151, 2000.

MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; FLINN, B. S. **Morphogenic aspects of somatic embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, Cap. 5, p. 155 – 203, 1995.

MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, v.15, p.873-885, 1976.

MIKULA, A.; TYKARSKA, T.; SKA, M. Z.; KURAS, M., SKI, J. J. R. Ultrastructural changes in zygotic embryos of gentiana punctata l. during callus formation and somatic embryogenesis. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, Cracow, v.46, p.109-120, 2004.

MURCH, S. J.; VICTOR, J. M. R.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P. K. The role of proline in Thiazuron-induced somatic embryogenesis of Peanut. ***In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***, v.35, p.102-105, 1999.

NAKAMURA, T.; TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Cyto-histological studies on somatic embryos of Coffee: Ultrastructural Aspects. ***Japanese Journal of Crop Science***, Nagoya, Japan v.63, n.1, p.144-157, 1994.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; PORTO, J. M. P.; NICIOLI, P. M.; STEIN, V. C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). ***Revista Brasileira de Biociências***, v.5, p.48-50, 2007.

ODNEVALL, A.; BJORK, L. Differentiated tissue cultures of *Panax ginseng* and their response to various carbon sources. ***Biochemie und Physiologie der Pflanzen***, v.185, p.403-413, 1989.

ORTIZ-LOPES, A.; CHANG, H. C.; BUSH, D. R. Amino acid transporters in plants. ***Biochimica et Biophysica Acta***, v.465, p.275-280, 2000.

PAIVA NETO, V. B.; PAIVA, R.; GOMES, G. A. C.; PÓVOA, J. S. R. Comportamento *in vitro* de segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud). ***Arquivos de Biologia e Tecnologia***, v.40, n.1, p.135-141, 1997.

PANZA, V.; LÁINEZ, V.; MALDONADO, S.; Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. ***Botanical Journal of the Linnean Society***, v.145, p.445-453, 2004.

PEREIRA, A. R.; CARVALHO, S. P.; PASQUAL, M.; SANTOS, F. C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaiá Cerrado: efeito de citocinina e ácido giberélico. ***Ciência Agrotécnica***, v.31, n.2, p.332-336, 2007.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; KRAUS, J. E.; FERREIRA, W. M.; GUERRA, M. P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). ***In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***, v.44, p.289-299, 2008.

PRIESTLEY, C. A. **Carbohydrate resources within the perennial plant**. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, v.27, p.116, 1962.

PRIYONO; FLORIN, B.; RIGOREAU, M.; DUCOS, J. P.; SUMIRAT, U.; MAWARDI, S.; LAMBOT, C.; BROUN, P.; PÉTIARD, V.; WAHYUDI, T.; CROUZILLAT, D. Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in *Coffea canephora* Pierre. ***Plant Cell Reports***. v.4, p.343-357, 2010.

PROFUMO, P.; GASTALDO, P. Somatic embryogenesis in horse chesnut (*Aesculus hippocastanum* L.) In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry* v.30 Somatic embryogenesis and synthetic seed I, **Springer-Verlag**, p.233-245, 1995.

- REZENDE, J. C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, S. P.; PEREIRA, A. R.; VILLA, F. Influência do meio de cultura e concentração de agar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, v.9, n.1, p.21-26, 2008.
- RODRIGUEZ, A. P. M.; WETZSTEIN, H. Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illionensis*) somatic embryogenesis culture induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, **Protoplasma**, v.204, p.71-83, 1998.
- SÁNCHEZ-ROMERO, C.; PERÁN-QUESADA, R.; BARCELÓ-MUNOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Variations in storage protein and carbohydrate levels during development of avocado zygotic embryos. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.1043-1049, 2002.
- SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares *Coffea arabica* L., cultivar rubi. **Ciência Agrotécnica**, v.27, n.3, p.571-577, 2003.
- SATYA-NARAYAN, V; NAIR, P. M. Metabolism, enzyaology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. **Phytochemistry**, v.29, p.367-375, 1990.
- SAUTER, J. J.; VAN CLEEVE, B. Biochemical and ultrastructural results during starch-sugar conversion in ray parenchyma cells of *Populus* during cold adaptation. **J. Plant Physiology**, v.139, p.19-26, 1991.
- SEN, J.; KALIA, S.; GUHA-MUKHERJEE, S. Level of endogenous free amino acids during various stages of culture of *Vigna mungo* (L.) Hepper-somatics embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. **Current Science**, v.82, p.429-433, 2002.
- 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**, v.24, n.40, p.833-840, 2000.
- SGHAIER-HAMMAMI, B.; VALLEDOR, L.; DRIRA, N.; JORRIN-NOVO, J. V. Proteomic analysis of the development and germination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) zygotic embryos. **Proteomics**, v.9, p.2543-2554, 2009.
- SHAN, A. Y. K. V.; OLIVEIRA, L. E. M.; BONOME, L. T. S.; MESQUITA, A. C. Assimilação metabólica de nitrogênio em plântulas de seringueira cultivadas com nitrato ou amônio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.6, p.754-762, 2012.
- SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; TUN, N. N.; SCHERER, G. F. E.; HANDRO, W.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. S. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Plant Science**, v.171, p.91-98, 2006.
- STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.43, p.124-132, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3rd ed. Sinauer associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts. 2007.

THOMAS, T. L. Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. **The Plant Cell**, v.5, p.1401-1410, 1993.

TREMBLAY, F. M.; LALONDE, M. Requirements for *in vitro* propagation of seven nitrogenfixing *Alnus* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.3 p.189-199, 1984.

TREMBLAY, F. M.; NESME, X.; LALONDE, M. Selection and micropropagation of nodulating and non-nodulating clones of *Alnus crispa* (Ait.)Pursh. **Plant & Soil**, v.78, p.171-179, 1984.

VERMA, D. C.; DOUGALL, D. K. Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. **Plant Physiology**, v.59, p.81-85, 1977.

WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Sugar import and metabolism during seed development. **Trends in Plant Science**, v.2, p.169-174, 1997.

WISE, J. M.; TUNNACLIFFE, A. POPP the quest: what do LEA proteins do ? **Trends in Plant Science**, v.9, p.13-17, 2004.

YEMM, E. W.; COOCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, v.80, p.209-214, 1955.