

## ASPECTOS CITOLÓGICOS DA DIFERENCIAÇÃO DE TECIDOS DE CAFEIEIRO CULTIVADO “IN VITRO”\*

G. BANDEL\*\*  
F.J.P.C. CARVALHO\*\*\*  
O.J. CROCOMO\*\*\*\*  
W.R. SHARP\*\*\*\*\*  
L.E. GUTIERREZ\*\*\*\*  
P.C.T. CARVALHO\*\*\*\*\*

### RESUMO

O cultivo de explantes de folha de cafeeiro enriquecidos com hormônios mostrou que a partir de tecidos diferenciados ocorre uma desdiferenciação. Essa desdiferenciação alcança diferentes níveis devido, provavelmente, a fatores ambientais, e não genéticos. Observou-se nos calos obtidos uma variação nos padrões de diferenciação celular. Pro-embriões e vascularização (Fig. 1), células gigantes (Fig. 4) e outros padrões de diferenciação (Figs. 2 e 3) foram observados. As células em cultura diferenciaram-se sem perder as potencialidades genéticas iniciais do embrião, do qual derivaram; mudanças ambientais e nos mecanismos de regulação gênica são responsáveis pela variação fenotípica observada. Explantes de caules de café produziram calos que diferenciaram-se em raiz e em parte aérea (Fig. 6) chegando-se a obter uma diferenciação até 3 pares de folhas. Discutem-se neste trabalho, vários aspectos relacionados com morfogênese e interações gênico-ambientais.

### INTRODUÇÃO

O controle da morfogênese em plantas tem sido objeto de muitos estudos, principalmente devido às suas implicações e aplicações. Entretanto, esses estudos, quando realizados sobre plantas inteiras podem apresentar vários inconvenientes, como o tamanho da planta, o qual dificulta o controle de fatores químicos ou físicos, e as limitações fisiológicas causadas pelo fenômeno de correlação entre os diferentes órgãos.

O controle da morfogênese tem sido melhor compreendido ultimamente devido ao avanço nas técnicas de cultura “in vitro”. Células, tecidos e órgãos são isolados do organismo e cultivados em condições de assepsia, em meio de cultura cuja composição física e química é perfeitamente conhecida. Essas culturas são tratadas adequadamente através de um balanço nutricional e hormonal, estabelecendo-se condições ambientais bem controladas.

---

\* Entregue para publicação em 31/12/1975. Este trabalho foi realizado com Auxílio da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN, Rio), Brasil.

\*\* Departamento de Genética, ESALQ.

\*\*\* CENA, ESALQ.

\*\*\*\* Departamento de Química e CENA, ESALQ.

\*\*\*\*\* The Ohio State University, Columbus, Ohio, U.S.A.

\*\*\*\*\* Departamento de Fitopatologia, ESALQ.

A embriogênese induzida em calos ou culturas de células derivadas de órgãos de plantas adultas já foi descrita para várias espécies vegetais. O exemplo clássico é o desenvolvimento de estruturas semelhantes a embriões a partir de culturas de células em suspensão, derivadas de floema novo da raiz de cenoura (HANDRO, 1974; STREET, 1966).

Nódulos de tecido meristemático podem ser notados a olho nu, se tais tecidos forem cultivados em meio contendo leite de coco. Se esses agregados por sua vez são removidos para a superfície de um meio solidificado, desenvolvem-se pequenas colônias de calos friáveis contendo embriões perfeitamente comparáveis aos similares das sementes, originando-se, posteriormente, plantas normais típicas.

Como uma investigação preliminar, no presente trabalho são relatadas e discutidas algumas observações sobre a diferenciação celular em tecidos de café (*Coffea arabica* L.) cultivados "in vitro".

#### MATERIAL E MÉTODOS

Explantes de folhas de cafeeiro (*C. arabica* L.) foram cultivados em meio de cultura com ágar basal, contendo tiamina, inositol, cisteína, hidrolizado ácido de caseína, minerais de Staritzki (STRARITSKY, 1970) e sacarose a partir desse meio, modificado da literatura (LINSMAIER & SKOOG, 1965; STRARITSKY, 1970); foi instalado um experimento em quadrado latino, usando-se as seguintes dosagens de cinetina e 2,4-D: 0,000; 0,050; 0,075; 0,100; 0,150; 0,200; 0,250 mg/l. Os diferentes tipos de calos formados foram estudados ao microscópio, através da observação de cortes no microtomo de parafina. As microfotografias tiradas dos cortes mostraram detalhes interessantes da diferenciação celular nos calos.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os calos formados nos meios que continham 2,4-D e cinetina apresentaram 5 fenótipos diferentes, assim designados: bolha branca, bolha verde, friável, branco e verrugas. O tecido original da folha de cafeeiro desdiferenciou suas células em direção a um padrão mais primitivo ontogeneticamente, formando-se embrióides e outros tecidos desdiferenciados.

O tecido desdiferenciado apresentou mitoses durante um período bem restrito. As células mais velhas em diferenciação adquiriram formas características com a elongação. Como qualquer órgão em crescimento, o tecido em cultura também deve apresentar como característica uma seqüência ontogênica da diferenciação celular desse tipo: células iniciais → células em trânsito → células maduras.

No entanto, as observações microscópicas não possibilitaram a identificação das células iniciais, como é mostrado nas fotografias apresentadas neste trabalho.

Quando se trata de culturas de tecidos, provavelmente as células readquirem condições embrionárias, ou seja, células diferenciadas tornam-se meristemáticas ou “primitivas”, desdiferenciando-se. Nessas células desdiferenciadas evidentemente é mantida a potencialidade genética, mas os mecanismos regulatórios modificam-se; além dessa modificação, ocorrem também alterações nas interações núcleo-citoplasmáticas, nas estruturas e funções das organelas citoplasmáticas, no nível intercelular, no transporte hormonal, e no nível extracelular. As células que eram inicialmente circundadas por células semelhantes do tecido e do órgão do qual foi explantada, passa agora a ser envolvida por um meio totalmente diferente. Deve-se então determinar a constituição desse meio, física e quimicamente, para que sejam imitadas as condições do meio que envolvem o zigoto ou o embrião.

Observou-se nas culturas de tecido de cafeeiro que a partir do estado meristemático indiferenciado, foi induzida uma rápida divisão nas células causadas pelo fornecimento de fatores nutricionais e agentes estimuladores de crescimento. Essa região meristemática é um pouco diferente daquela das regiões de crescimento organizadas da planta (Fig. 1 e Fig. 2); comparando-se essas fotografias com organização de tecidos de plantas, notam-se certas diferenças morfológicas, pois as células cultivadas não estão em um campo morfogenético que leva à diferenciação de tecido organizado. As células mais velhas em diferenciação adquiriram formas características. As células, inicialmente isodiamétricas, tendem a adquirir um formato paralelepédico e ovalado durante a alongação, sendo que a maior dimensão aumentava com a idade. As células inicialmente justapostas no tecido meristemático tendem a separar-se com a idade na periferia do calo (Fig. 3). Observaram-se vários tipos diferentes nos padrões de diferenciação dos tecidos, conforme pode ser notado nas fotografias. Nessas, observa-se sempre uma região mais escura, que corresponde aos tecidos meristemáticos, dos quais se irradiam tecidos menos organizados morfolologicamente, mas que na realidade são constituídos de células mais diferenciadas, as células maduras. A Fig. 1 mostra um aspecto típico que corresponde a um início de diferenciação de tecidos de folha. Notam-se primórdios de células epidérmicas, células de sustentação e células vasculares. Nessa mesma fotografia notam-se 2 precursores de prováveis embriões em formação. Um embrião típico de uma semente de angiosperma apresenta uma morfologia característica com duas regiões meristemáticas típicas, a caulinar e a radicular. No caso da Fig. 1, não se notam esses meristemas. Nas Figs. 2 e 3 apresentam-se padrões de diferenciação bem diferentes, sendo difícil traçar um paralelismo com a morfologia da planta, e comparar com um tecido diferenciado.

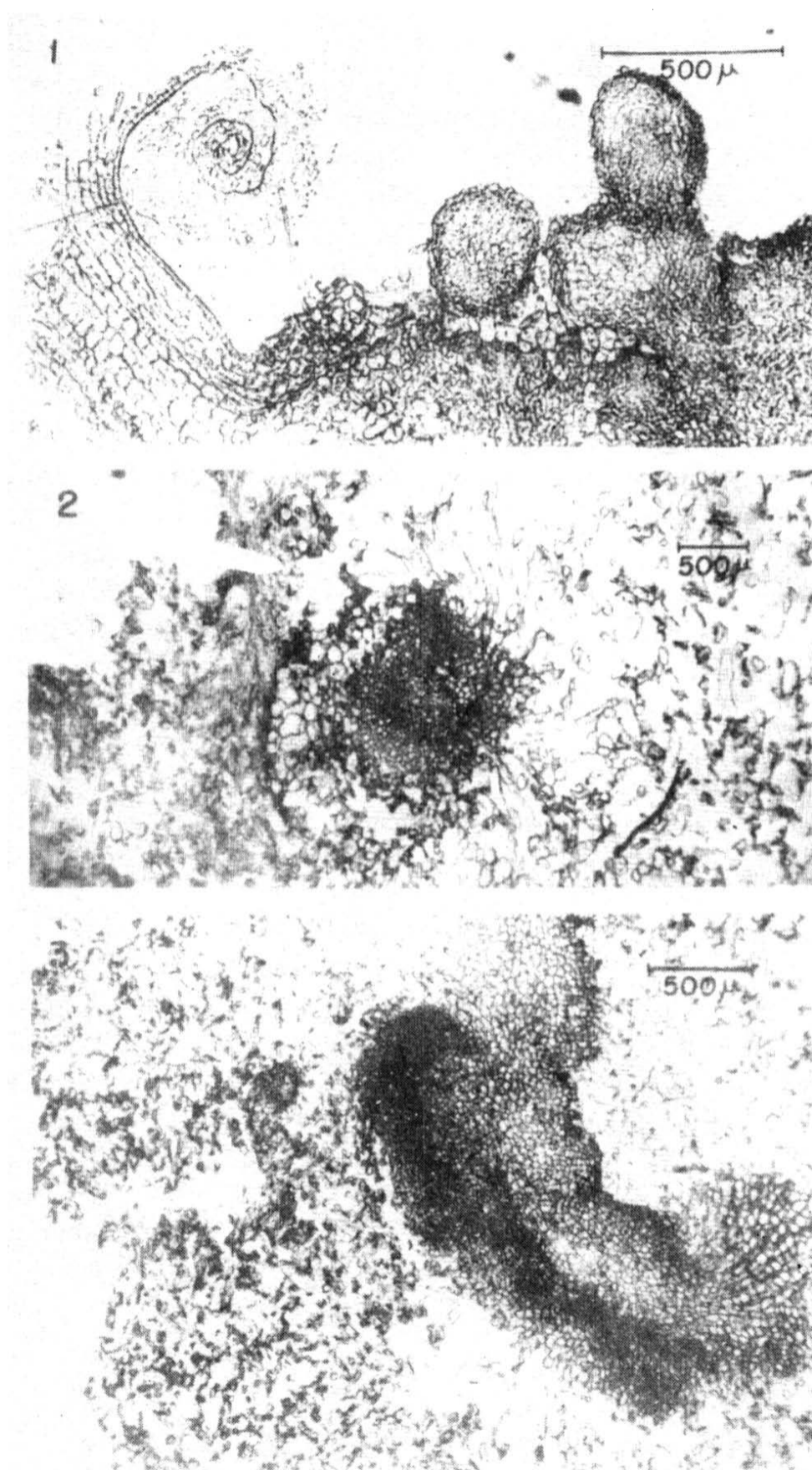


FIG. 1 – Diferenciação celular em cultura de tecidos de cafeeiro apresentando diferentes padrões histológicos.

FIG. 2 – Células diferenciadas de cafeeiro irradiando-se a partir de um provável núcleo de células meristemáticas.

FIG. 3 – Grupo de células mostrando outro padrão bem típico de diferenciação em cultura de tecidos de cafeeiro.

A estrutura interna das células também se modifica com o processo de diferenciação. As células iniciais, com um núcleo bem diferenciado tendem a apresentar um aumento no volume citoplasmático, que é acompanhado por um aumento no número de grânulos, provavelmente armazenados no nível de vacúolos (Fig. 5). O acúmulo de grânulos foi mais acentuadamente observado nos fenótipos friável e branco, principalmente nesse. Associa-se a esse acúmulo de grânulos citoplasmáticos, a exudação de óleos, cuja análise determinou a presença de 71% de saturados e 29% de insaturados. Outro fato interessante observado foi a presença de células gigantes (Fig. 4) com um padrão bem característico.

Os resultados obtidos indicam que o processo de diferenciação dos tecidos de cafeeiro a partir de explantes de folha é complexo. No presente caso, um único genótipo originou vários fenótipos (calos), os quais apresentavam diferenças histológicas bem acentuadas, como mostram as fotos. As variações fenotípicas observadas ao microscópio são provavelmente devidas a modificações ambientais. Essas referem-se a diferentes situações: em primeiro lugar, os mecanismos de regulação gênica foram totalmente alterados, sendo que muitos genes foram desativados e outros foram ativados, quando da formação dos calos. O meio ambiente que circunda a célula e o tecido na folha, é totalmente diferente do meio ambiente que cerca a célula na cultura. Uma consequência desse fato é uma modificação que ocorre ao nível do citoplasma; de uma maneira geral, essa alteração citoplasmática é ao nível morfológico e fisiológico. Uma consequência posterior é a alteração ao nível da interação núcleo-citoplasma. O material nuclear não será alterado na sua morfologia, isto é, os genes e os cromossomos serão os mesmos; mas, haverá uma alteração na atividade gênica, pois os mecanismos regulatórios em sua maioria são de origem citoplasmática. Na presente pesquisa não foi estudado o grau de ploidia das células em cultura. A produção de calos de cafeeiro com três níveis de ploidia e a sua morfogênese já foram descritas anteriormente (SHARP, CALDAS, CROCOMO, MONACO & CARVALHO, 1974). Um outro fator ambiental que atua sobre o fenótipo é a qualidade e a quantidade de hormônios que enriquecem o meio de cultura. O hormônio age no mecanismo de regulação gênica ativando genes que atuam principalmente na síntese de proteínas relacionadas com divisão e crescimento celular. O hormônio atua sobre um mesmo "back-ground" genético e sobre citoplasmas diferentes, existentes nas várias células diferentes no meio de cultura. Havendo citoplasmas diferentes, haverá diferentes interações núcleo-citoplasma, sendo essa uma das causas da variação na atividade gênica. Essa é uma das formas pelas quais pode-se explicar os diferentes fenótipos observados nos calos e as diferenciações citológicas citadas.

O processo de desdiferenciação provavelmente não é o mesmo em todas as células estudadas, sendo provável que diferentes graus de desdiferenciações foram atingidos nas diferentes células nos vários experimentos realizados. Evidentemente o nível de atividade gênica de uma célula depende de seu grau de desdiferenciação (PARTANEN, 1963). A diferenciação citológica variável observada nas fotografias apresentadas neste trabalho é devida também a diferentes graus de desdiferenciação.

A polaridade e o gradiente apresentados nos meios de cultura nas várias repetições do experimento variaram. Da mesma forma como o caso anterior, essa deve ser outra fonte para variação da diferenciação citológica observada em café, pois a polaridade e o gradiente afetam os mecanismos de controle genético e a atividade gênica. De acordo com STREET & OPIK (1974), as razões para a origem dos embriões na superfície, ou próximo dela, de agregados celulares em cultura, podem ser devidos não apenas porque essa localização promove o estabelecimento de polaridade, mas também porque a célula inicial é alimentada pela massa multicelular associada, em crescimento. Zigotos e células somáticas capazes de iniciarem a embriogênese podem não ser particularmente limitados em suas atividades biossintéticas, porém como células isoladas, com uma alta relação entre superfície e volume, eles podem requerer imersão em um fluido nutritivo complexo, caso devam estabelecer os níveis intracelulares dos metabólitos e reguladores de crescimento, necessários para a divisão celular. Uma grande população de células isoladas pode ter condições de crescer em um meio incapaz de suportar o crescimento de uma célula isolada, porque a população pode, de modo apropriado e suficientemente rápido, "condicionar" e enriquecer o meio externo. Quando esse equilíbrio entre as células e seu meio é alcançado, cada célula pode acumular aquelas substâncias até o nível crítico para a sua divisão e crescimento.

Observou-se no presente trabalho que a partir de explantes de caule de cafeeiro foram produzidos calos que se diferenciaram em raiz e em parte aérea, chegando-se a obter plantinhas com 3 pares de folhas (Fig. 6).

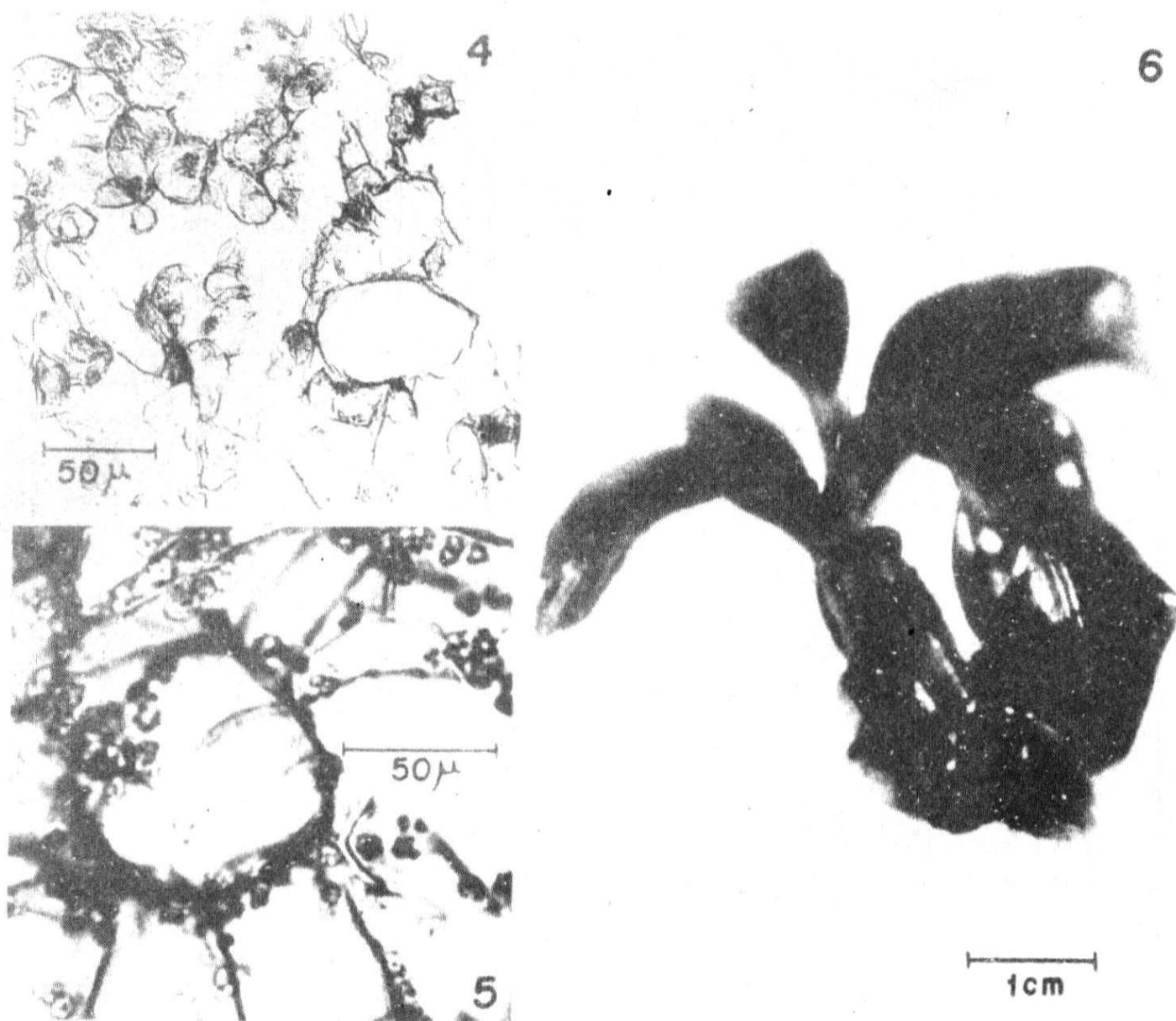


FIG. 4 – Células gigantes apresentando dimensões bem grandes em relação às células normais de tecidos em cultura.

FIG. 5 – Células diferenciadas de cafeeiro em cultura apresentando acúmulo de grânulos. Associa-se a esses grânulos, a provável exudação de óleos.

FIG. 6 – “Seedling” de cafeeiro obtido “in vitro” apresentando 3 pares de folhas.

Os resultados aqui apresentados deixam antever inúmeras perspectivas na utilização do cafeeiro para a explicação de certos fenômenos de morfogênese e o seu controle, especialmente em nível ultraestrutural e molecular. Controlando-se a morfogênese “in vitro” haverá a possibilidade de se elucidar as relações entre reguladores de crescimento e ácido nucléico.

**SUMMARY****CYTOLOGICAL ASPECTS OF THE DIFFERENTIATION OF COFFEE TISSUES  
IN CULTURE**

Callus was established from leaves and shoots of *Coffea arabica* L. on nutrient medium with various levels of auxins and kinetin. Morphogenesis is controllable in such callus tissues by manipulation of the growth factor levels in the media. The study shows that callus culture obtained from leaves are in different states of differentiation, i.e., although the calluses were similar in appearance, their morphogenetical potential was different. The cells in culture show a great range of growth and form, and that form and behaviour of such cells do not correspond with recognized cell types in normal plant tissues or meristems. Proembryoids and vascularization (Fig. 1), giant cells (Fig. 4) and other patterns of cell differentiation (Figs. 2 and 3) were observed. The initiation of an organized system is probably dependent upon some rather specific environmental conditions. The extent to which certain specific types of differentiation are concomitant would seem to be a reflection of the extent to which common factors are involved. Thus, in this type of change, causality of the nuclear change to the other changes would be unlikely.

**LITERATURA CITADA**

- CLOWES, F.A.L. & JUNIPER, B.E., 1968. Plant Cells. Blackwell Oxford.
- HANDRO, W., 1974. Ciência e Cultura, 26:340-346.
- LINSMAIER, E.M. & SKOOG, F., 1965. Physiologia Plant, 18:100-127.
- PARTANEN, C.R., 1963. International Review of Cytology, 15:215-241.
- SHARP, W.R., CALDAS, L.S., CROCOMO, O.J., MONACO, L.C. & CARVALHO, A., 1973. Phytion, 31:67-74.
- STRARITSKY, G., 1970. Acta Bot. Neerl., 19:509-514.
- STREET, H.E., 1966. Cells and Tissue in Culture. E.N. Willner, Ed., vol. 3:534-681, Academic Press, N.Y.
- STREET, H.E. & OPIK, H., 1974. Fisiologia das Angiospermas. Ed. USP e Ed. Polígono, São Paulo.