

WELLINGTON MAROTA BARBOSA

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CAFÉS ARÁBICA E ROBUSTA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2003

“Confia ao Senhor as tuas obras, e os teus desígnios serão estabelecidos”. Provérbios 16:3

A Eveline, minha esposa e amiga, pela presença constante e pela dedicação em momentos importantes de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por minha formação; ao Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade a mim concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Ney Sussumu Sakiyama, pela orientação e, acima de tudo, pela amizade, pela confiança e pelo exemplo de trabalho.

Ao Antônio Teixeira Cordeiro, pelas críticas e sugestões, bem como pelo constante auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Aos Professores Wagner Campos Otoni e Renata Maria Strozi Alves Meira, pelas críticas, sugestões e, principalmente, pela amizade e dedicação demonstradas.

À Waldênia de Melo Moura, pelas sugestões e pela participação durante a defesa da tese.

À amiga Ana Claudia, pela dedicação, amizade e constante ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, Leandro, Maria Rita, Maíra, Marcelo, Higino, Rômulo, Francis, Baião, Fernando, Eveline Caixeta e Eunize, pela convivência, pela amizade, pela ajuda, fatores que tornaram o trabalho sempre mais agradável.

Ao professor Eldo Monteiro da Silva, pela amizade, pelos ensinamentos e pelo incentivo constante.

Aos colegas Fabiano e Anderson, pela imensa ajuda prestada durante o trabalho realizado no laboratório de Anatomia Vegetal.

À Zilda e à Rosane, do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela amizade e pela ajuda.

Aos funcionários do Departamento de Fitotecnia, por todo auxílio concedido durante o curso.

Aos amigos e parentes que, de alguma forma, me apoiaram e incentivaram em todo o tempo, em especial a Henriette e James Griffith pela correção do abstract.

A todos da minha família, que compreenderam a minha ausência em determinados momentos, em especial ao meu pai João Barbosa, pelo incentivo e à minha sogra Raquel, que sempre me ajudou desde meu ingresso no mestrado.

A todos aqueles que, mesmo não tendo seus nomes citados aqui, de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

BIOGRAFIA

WELLINGTON MAROTA BARBOSA, filho de João Nazário Barbosa e Serva Marota Barbosa, nasceu em João Monlevade, Estado de Minas Gerais, em 16 de agosto de 1971.

Graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, em fevereiro de 1997.

Em março de 1999, concluiu seu curso de Mestrado em Botânica na Universidade Federal de Viçosa.

Em abril deste mesmo ano, ingressou no curso de Doutorado em Fitotecnia, nessa mesma instituição, submetendo-se à defesa de tese em agosto de 2003.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL	01
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	07
CAPÍTULO 1	
ANÁLISE ESTRUTURAL COMPARATIVA DA REAÇÃO CALOGÊNICA EM GENÓTIPOS DE <i>Coffea</i>	13
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1. Material vegetal.....	16
2.2. Indução calogênica	17
2.3. Análise estrutural	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
3.1. Análise morfológica	19
3.2. Frequência calogênica	22
3.3. Análise estrutural.....	26
3.3.1. Primeiras modificações estruturais	26
3.3.2. Alterações após 10 dias de cultivo	30
3.3.3. Formação dos embriões	34
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

CAPÍTULO 2

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA EM HÍBRIDOS DE *Coffea* PARA A PROPAGAÇÃO EM GRANDE ESCALA50

1. INTRODUÇÃO.....50

2. MATERIAL E MÉTODOS.....54

2.1. Material vegetal.....54

2.2. Obtenção dos explantes foliares55

2.3. Meios indutivos55

2.4. Estabelecimento e manutenção de culturas líquidas57

2.5. Indução da embriogênese54

2.6. Desenvolvimento dos embriões55

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....59

3.1. Indução calogênica59

3.1.1. Indução calogênica no genótipo UFV 395-141 (Catimor, geração F₃)56

3.1.2. Indução calogênica de H 337-610 (híbrido F₁)64

3.1.3. Indução calogênica de H 447-12 (híbrido F₁)67

3.1.4. Análise da indução calogênica de UFV 395-141, H 337-610 e H 447-1270

3.2. Estabelecimento das culturas líquidas73

3.3. Indução da diferenciação embriogênica74

3.3.1. Diferenciação embriogênica de UFV 395-141 (Catimor, geração F₃)74

3.3.2. Diferenciação embriogênica de H 337-61077

3.3.3. Diferenciação embriogênica de H 447-1279

3.4. Desenvolvimento dos embriões83

3.4.1. Desenvolvimento dos embriões de UFV 395-141 (Catimor, geração F₃)83

3.4.2. Desenvolvimento dos embriões de H 337-610	85
3.4.3. Desenvolvimento dos embriões de H 447-12	86
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	89
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
3. CONCLUSÕES GERAIS	98

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2iP: 2-isopenteniladenina

AIA: ácido indolacético

AIB: ácido indolbutírico

ANA: ácido naftalenoacético

AT: Azul de Toluidina

BAP: 6-benzilaminopurina

CIFC: Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro

FAA: formol:ácido acético:álcool

HFSE: embriogênese somática em alta frequência

KIN: cinetina

LFSE: embriogênese somática em baixa frequência

MF: matéria fresca

MS: Murashige e Skoog

P.A.S.: Periodic Acid Schiff

XP: Xylidine Ponceau

RESUMO

BARBOSA, Wellington Marota, D.S., Universidade Federal de Viçosa, de agosto de 2003. **Embriogênese somática em cafés arábica e robusta.** Orientador: Ney Sussumu Sakiyama. Conselheiros: Antônio Teixeira Cordeiro, Wagner Campos Otoni e Laércio Zambolim.

A indução calogênica em explantes foliares de *C. canephora* cv. Apatã foi induzida utilizando-se cultivo unifásico com BAP como regulador de crescimento. Para o genótipo Catimor utilizou-se o sistema bifásico com citocinina e auxina. Foram confeccionadas lâminas de amostras dos explantes foliares que, após coletados e fixados foram incluídos em metacrilato, cortados em micrótomo rotativo, corados com Azul de Toluidina e submetidos aos testes histoquímicos para detecção de amido (P.A.S. – “Periodic Acid Schiff”) e de proteína (XP – “Xylidine Ponceau”). Calos embriogênicos e calos embriogênicos friáveis foram formados apenas no genótipo Apatã. No genótipo Catimor, cultivado apenas com citocinina, houve a formação de calos embriogênicos, enquanto que naquele cultivado com auxina e citocinina houve a formação de calos mistos. Nos genótipos Catimor UFV 395-141 e Apatã, cultivados apenas com citocininas, observou-se um dimorfismo nas células que formam o calo - o primeiro com células maiores, vacuolizadas e sem reservas (amido e proteína), e outro formando grupos de células com características meristemáticas, menores, isodiamétricas, com pequenos grânulos de amido, núcleo proeminente e citoplasma denso, com grande quantidade de proteína – denominadas células embriogênicas. Tais células são responsáveis pela formação dos pré-embriões. No genótipo arábica, cultivado em meio com 2,4-D e KIN, observou-se que as divisões celulares foram unidirecionais. As células com características meristemáticas, estavam localizadas apenas nas extremidades do calo, e se apresentaram com tamanhos semelhantes às demais células que formam o calo e não formaram estruturas organizadas em grupos de células, advindas de divisões periclinais e anticlinais. Estas diferenças na resposta dos explantes a diferentes

condições indutoras poderiam ser utilizadas como marcadores estruturais para seleção de cepas potencialmente embriogênicas. Foram também testados diferentes meios de cultura para a indução da reação calogênica em explantes foliares dos genótipos Catimor UFV 395-141, H 337-610 e H 447-12, híbridos segregantes oriundos do programa de melhoramento genético da UFV-EPAMIG. Explantes foliares dos híbridos Catimor UFV 395-141 e H 337-610 produziram calos embriogênicos (CE) com o suprimento de 2,4-D e BAP, nos meios primários e secundários, respectivamente; no entanto, com baixa frequência. O híbrido H 447-12 apresentou CE quando os meios continham 2,4-D e BAP no meio primário, e em maiores frequências, em relação aos outros genótipos testados. Calos friáveis embriogênicos foram obtidos nos três genótipos utilizando-se citocinina (BAP) no meio primário, acrescentado de auxina (2,4-D) no meio secundário. Culturas líquidas foram estabelecidas e, depois de realizada a indução embriogênica dos agregados celulares, obtiveram-se rendimentos de 148.000 embriões.g⁻¹ para o genótipo Catimor UFV 395-141, 160.000 embriões.g⁻¹ para o híbrido 337-610 e 90.000 embriões.g⁻¹ para o híbrido 447-12. Amostras de embriões somáticos tipo torpedo dos três genótipos foram tomadas para avaliação do desenvolvimento embriogênico, e apresentaram valores, respectivamente de desenvolvimento e formação de raízes, de 89 e 42%, no genótipo Catimor UFV 395-141. Para o híbrido H 337-610, esses valores foram de 83 e 53% e, 66 e 39,3% para o híbrido H 447-12.

ABSTRACT

BARBOSA, Wellington Marota, D.S., Universidade Federal de Viçosa, August 2003. **Somatic embryogenesis in arabica and robusta coffee tree.** Adviser: Ney Sussumu Sakiyama. Committee members: Antônio Teixeira Cordeiro, Wagner Campos Otoni and Laércio Zambolim.

Callogenesis in leaf explants of *C. canephora* cv. Apoatã was induced by means of a monophasic culture with BAP as growth regulator. A biphasic system with cytokinin and auxin was used for the genotype Catimor. Slides were prepared from leaf explant samples, which were collected, fixed, embedded in historesin glycolmetacrylate (HISTORESIN, LEICA), cut in a rotatory microtome, stained with toluidine blue and submitted to histochemical tests for starch (P.A.S. – “Periodic Acid Schiff”) and protein (XP – “Xylidine Ponceau”) detection. Embryogenic and embryogenic friable calli were formed only from the genotype Apoatã. For the genotype Catimor, embryogenic calli were formed when samples were cultured only with cytokinin, while mixed calli (non-embryogenic) were formed when samples were cultured with auxin and cytokinin. The genotypes Catimor UFV 395-141 and Apoatã cultured only with cytokinins presented a dimorphism in the callus cells: one cell type was constituted by bigger cells with vacuoles and without starch and protein storage, and the other one (called embryogenic cells) was formed by groups of smaller and isodiametric cells with meristematic characteristics with small starch granules, prominent nucleolus and dense protein-rich cytoplasm. In the genotype Catimor, cultured in medium with 2,4-D and KIN, the cell divisions were unidirectional. The embryogenic cells, located only at callus endings, presented sizes similar to the other callus cells and did not form structures organized in groups providing from periclinal and anticlinal divisions. These differences in the response of the explants to diverse inducer conditions could be used as structural

markers to select potentially embryogenic strains. Different culture media were tested for inducing callogenic reaction in leaf explants of the genotypes Catimor UFV 395-141, H 337-610 e H 447-12, hybrids obtained by the genetic improvement program carried out by Universidade Federal de Viçosa (UFV) and Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG). Leaf explants of the hybrids Catimor UFV 395-141 e H 337-610 produced embryogenic calli when supplied by 2,4-D and BAP in the primary and secondary media, respectively, in spite of a low frequency. The hybrid H 447-12 produced embryogenic calli when supplied by 2,4-D and BAP in the primary medium in higher frequencies than for the other genotypes. Embryogenic friable calli were obtained from the three genotypes by using cytokinin (BAP) in the primary medium added by auxin (2,4-D) in the secondary medium. Liquid cultures were established and the embryogenic induction of the cell aggregates resulted in yields of 148,000 embryos.g⁻¹ for the genotype Catimor UFV 395-141, 160,000 embryos.g⁻¹ for the hybrid 337-610 and 90,000 embryos.g⁻¹ for the hybrid 447-12. Samples taken from somatic embryos type torpedo providing from the three genotypes presented the following values for embryogenic development and root formation, respectively: 89% and 42% for the genotype Catimor UFV 395-141; 83% and 53% for the hybrid H 337-610; and 66% and 39% for the hybrid H 447-12.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Na busca de uma cafeicultura mais eficiente, há uma demanda constante de novas variedades com elevadas produções, resistentes a pragas e doenças e adaptadas às diferentes condições de cultivo. Os programas de melhoramento podem levar cerca de 30 anos para obter novas variedades de café arábica, por ser uma espécie com ciclo de seleção longo, e a obtenção de sementes de plantas homozigóticas somente pode ser possível após seis gerações (SÖNDAHL et al., 1999).

O desenvolvimento de técnicas de propagação vegetativa *in vitro* de cafeeiros poderia promover uma alternativa viável para a rápida multiplicação de novas plantas – novos clones, híbridos, variantes somaclonais ou plantas transgênicas, com características desejáveis e representadas por um número pequeno de espécimes. Os métodos de cultura de tecidos permitem a produção de plantas relativamente uniformes em grande escala, em menores períodos de tempo em relação aos métodos convencionais. Usando cultura de tecidos para a propagação do cafeeiro, três diferentes métodos podem ser usados: microestacas, embriogênese somática direta ou embriogênese indireta (SÖNDAHL, 1985).

DUBLIN (1983, 1984) descreveu que a estratégia de microestacas *in vitro* para Arabusta compreende as seguintes fases: obtenção e multiplicação das microestacas; enraizamento e transferência para condições rotineiras de cultivo.

Este autor estimou que, a partir de uma microestaca, poderia proporcionar em um ano cerca de 20.000 plântulas, significando alto rendimento. Este aspecto associado à garantia de conformidade genotípica oferecida por esta técnica, constitui uma boa alternativa para a propagação em grande escala de genótipos de interesse.

Por outro lado, BERTHOULY et al. (1995) afirmaram que, no caso do café (arábica ou robusta), a multiplicação por microestacas em meio semi-sólido apresenta um valor limitado, devido ao baixo crescimento dos ramos. A taxa de multiplicação é de seis ou sete estacas a partir de uma microestaca inicial a cada três meses.

A embriogênese somática tem demonstrado ser o melhor método de multiplicação em grande escala. Trata-se de um processo característico das plantas vasculares, pelo qual células ou tecidos somáticos se desenvolvem até a formação completa de uma planta, através de uma série de estágios embrionários semelhantes àqueles observados na formação de um embrião zigótico (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986; RODRÍGUEZ et al., 2000). Este processo pode se apresentar de forma direta sobre a superfície de um tecido organizado (folha, caule etc) ou por via indireta, através de uma etapa intermediária de formação de calos ou suspensão celular (RODRÍGUEZ et al., 2000). O embrião somático é uma estrutura bipolar originada de uma única célula e não possui conexões vasculares com os tecidos que o originou. Todavia, em relação à embriogênese somática indireta, há uma discordância a respeito da origem uni ou multicelular. De acordo com WILLIAMS e MAHESWARAN (1986), surgem formações de grupos compactos de células embriogênicas, o complexo proembrional, a partir dos quais um ou mais embriões se desenvolvem.

Em cafeeiro, os estudos com cultura de tecidos foram iniciados por STARITSKY (1970), através da indução de embriões somáticos a partir de internódios de *Coffea canephora*. A primeira tentativa bem sucedida de regeneração de plantas em *C. arabica* foi realizada em 1975, a partir de embriogênese somática direta (HERMAN e HAAS, 1975). Posteriormente, SÖNDAHL e SHARP (1977) usaram secções das folhas de *C. arabica* e

obtiveram calos embriogênicos. Desde então vários trabalhos foram desenvolvidos utilizando várias fontes de explantes, como folhas cotiledonares (SÖNDAHL, 1985), folhas (DUBLIN, 1981; YASUDA et al., 1985; GARCÍA e MENÉNDEZ, 1987; NEUENSCHWANDER e BAUMANN, 1992; van BOXTEL e BERTHOULY, 1996; HATANAKA et al., 1995; BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE, 1996; BIEYSSE et al., 1993; NORIEGA e SÖNDAHL, 1993; MENÉNDEZ-YUFFÁ e GARCÍA, 1997; CORDEIRO, 1999; FUENTES et al., 2000; SANTOS, 2002), protoplastos (SCHOPKE et al., 1987; ACUÑA e PEÑA, 1991) e suspensões celulares (SPIRAL e PETIARD, 1991; ETIENNE-BARRY et al., 1999; RODRÍGUEZ et al., 2000).

SÖNDAHL e SHARP (1977) distinguiram dois tipos de embriogênese somática. Estes autores obtiveram calos embriogênicos na forma direta com produção de até 20 embriões por explante e propuseram a nomenclatura de “calos embriogênicos de baixa frequência” (LFSE). O outro tipo corresponde aos “calos embriogênicos de alta frequência” (HFSE), os quais dão origem até 100 embriões por explante, associados a um tecido embriogênico friável.

A propagação clonal de cafeeiros, em grande escala, requer a indução desses calos friáveis embriogênicos para o estabelecimento de culturas líquidas e sua diferenciação embriogênica posterior. Esta indução é normalmente feita através de segmentos foliares em meio apropriado, onde os calos começam a ser formados nas extremidades. O calo embriogênico friável pode ser caracterizado como um conjunto de agregados celulares friáveis, contendo células pequenas e esféricas (15 – 20 μm de diâmetro), com citoplasma denso, com o nucléolo proeminente, um núcleo basofílico e de ciclo celular rápido (SÖNDAHL et al., 1985). Outra característica geral do calo friável embriogênico é a semelhança conseqüente ou resultante utilizada durante as 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) (SÖNDAHL e SHARP, 1977; DUBLIN, 1984; SÖNDAHL et al., 1985; NORIEGA e SÖNDAHL, 1993; BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE, 1996).

Por outro lado, vários autores têm demonstrado que os calos embriogênicos em cafeeiro podem ser obtidos a partir do cultivo dos explantes em um único meio contendo apenas citocinina (DUBLIN, 1981; YASUDA et al., 1985) ou com a associação de uma auxina e uma citocinina (DUBLIN, 1980; PIERSON et al., 1983), sem haver modificações na composição do meio, consistindo o sistema unifásico de cultivo. A composição do meio também afeta a embriogênese somática, sendo que os meios com alta concentração salina têm sido utilizados com sucesso em várias espécies de plantas. Entretanto, vários trabalhos têm mostrado que tecidos embriogênicos de café são obtidos quando a concentração dos sais é reduzida à metade (van BOXTEL, 1994), ou mesmo à quarta parte (YASUDA et al., 1985).

Calos friáveis podem ser multiplicados e transferidos para um meio de diferenciação, desenvolvendo numerosos embriões em cinco a seis semanas. Esses embriões se desenvolvem em plântulas, as quais podem ser aclimatizadas em casas de vegetação; no entanto, alguns autores têm relatado que a taxa de sobrevivência é freqüentemente baixa (SÖNDAHL et al., 1985). O rendimento de embriões por esse método pode ser de cerca de 12.400 (NORIEGA e SÖNDAHL, 1993; van BOXTEL e BERTHOULY, 1996) a 121.000 embriões g^{-1} MF de agregados celulares (CORDEIRO, 1999) para genótipos de *C. arabica*. Para os genótipos de *C. canephora*, esse rendimento tem variado de 120.000 (van BOXTEL e BERTHOULY, 1996) a 400.000 embriões g^{-1} MF de agregados celulares (ZAMARRIPA et al., 1991). Entretanto, este método pode apresentar uma alta taxa de variabilidade genética (3 a 20% dependendo do genótipo). Esta variação pode ser de grande utilidade no desenvolvimento de novas variedades de plantas mediante seleção e testes em variantes somaclonais com características potenciais agrônômicas (SÖNDAHL e BRAGIN, 1991).

A embriogênese somática em café, assim como em outras culturas, depende do estado fisiológico do explante (STARITSKY, 1970) do tipo de folha, do tempo de subcultivo (MICHAUX-FERRIERE et al., 1987), do estado fisiológico das plantas, das condições do ambiente e do genótipo. O efeito do genótipo na embriogênese somática tem sido amplamente verificado em várias

espécies como trigo, melão, milho e citros. Nos gêneros e espécies herbáceas e também em plantas lenhosas, alguns genótipos são recalcitrantes e outros apresentam boa resposta embriogênica (MOLINA et al., 1999).

As diferenças na resposta embriogênica de alguns genótipos dependem da época do ano na qual os explantes foliares foram coletados (KAHIA e OWOUR, 1990). A interação entre o genótipo e a época de coleta das folhas também tem sido significativa, o que explica porque genótipos com alta capacidade embriogênica são menos afetados pela época de coleta dos explantes foliares do que aqueles com capacidade média ou baixa. A associação entre a resposta embriogênica e a genealogia da progênie sugere que, em café, esta característica pode estar sujeita a um forte controle genético. Existem diferenças na resposta embriogênica dos genótipos, dependendo do mês do ano no qual os explantes foliares foram coletados, mas essas diferenças não são relacionadas a causas climáticas (MOLINA et al., 2002).

BIEYSSE et al. (1993) observaram que em genótipos de *C. arabica* alguns desenvolveram alta capacidade embriogênica e outros baixa capacidade. BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE (1996) encontraram diferenças na frequência da embriogênese entre genótipos de *C. canephora*. Ao contrário, van BOXTEL e BERTHOULY (1996) relataram uma baixa resposta embriogênica e poucas variáveis nos genótipos de *C. arabica*, quando comparadas com genótipos de *C. canephora*.

van BOXTEL e BERTHOULY (1996) confirmaram que as diferenças genotípicas relativas ao rendimento embriogênico podem ser devidas à maior reatividade à embriogênese somática de genótipos robustas que em relação aos genótipos arábicas. CORDEIRO (1999), comparando os resultados obtidos com os dados da literatura, sugeriu que parte da maior reatividade do genótipo robusta deve-se a uma melhor adequação das condições experimentais permissivas à máxima expressão do potencial para a embriogênese somática indireta do que para o genótipo arábica. Nesse caso, ambas as espécies poderiam agrupar genótipos possuindo o mesmo potencial de reatividade, cujas máximas expressões requerem diferentes condições experimentais.

A transição de células somáticas para células determinadas capazes de formar embriões, requer a indução da competência embriogênica. Esta transição tem sido descrita como passo crucial para a embriogênese somática. No entanto, esse requerimento ainda não é bem entendido (VERDEIL et al., 2001). A morfogênese pode ser conceituada como a integração entre os processos decorrentes da divisão e diferenciação celular. Por determinação celular, define-se o processo pelo qual o potencial de desenvolvimento de uma célula torna-se limitado a uma rota específica; e por competência celular, a capacidade das células reagirem a sinais específicos de desenvolvimento (GUERRA et al., 1999).

Estudos detalhados do processo embriogênico, tais como: o tipo particular de célula ou tecido que se desenvolve em meristemas embriogênicos ou em que estágio de desenvolvimento o processo paralisa, poderiam fornecer informações para a intensificação ou manipulação das respostas embriogênicas (LEE et al., 1997). Estudos histológicos são importantes para a confirmação das técnicas morfogenéticas adotadas, bem como para a determinação dos tipos celulares a partir dos quais os embriões somáticos são originados (FERNANDO et al., 2001).

Os objetivos deste trabalho foram realizar análises estruturais e histoquímicas em cortes de explantes foliares de café, analisando amostras coletadas ao longo do tempo pós-indução. Pretendeu-se identificar as alterações nos processos de divisão celular, no acúmulo de reservas, nas modificações citoplasmáticas e na relação núcleo/citoplasma ocorridas neste período. A análise estrutural foi feita comparativamente entre os genótipos arábica e robusta, visando identificar marcadores morfológicos para cepas potencialmente embriogênicas. Considerando-se que as condições indutoras para a produção de calos friáveis embriogênicos possuem um caráter de genótipo-especificidade, diferentes combinações de meios de cultura também foram testadas para a indução desta reação calogênica em explantes foliares de três híbridos arábicas, oriundos do programa de melhoramento genético da UFV-EPAMIG.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA, J.R., PEÑA, M. Plant regeneration from protoplasts of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. cv. Caturra. **Plant Cell Rep.**, v.10, p. 345-348, 1991.
- BERTHOULY, M., DUFOUR, M., ALVARD, D., CARASCO, C., ALEMANN, L., TEISSON, C. Coffee micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. **ASIC, 16º Colloque**, Kyoto, p.514-519, 1995.
- BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 44, p. 169-176, 1996.
- BIEYSSE, C., GOFFLOT, A., MICHAUX-FERRIERE, N. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Can. J. Bot.**, v. 71, p. 1496-1502, 1993.
- CORDEIRO, A.T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplastos em Coffea**. Viçosa, Minas Gerais, Universidade federal de Viçosa. Dissertação de Doutorado. 111 p. 1999.

- DUBLIN, P. Induction de bourgeons néoformés et embryogenèse somatique: deux voies de multiplication vegetative *in vitro* des caféiers cultivés. **Café Cacao Thé**, v. 24, n.2, p.121-130, 1980.
- DUBLIN, P. Embryogenèse somatic directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. **Café Cacao Thé**, v.25, n.4, p. 237-242, 1981.
- DUBLIN, P. Techniques de reproduction vegetative *in vitro* et amelioration génétique chez les caféirs cultivés. **IFCC**. Paris, Francia, p.39-45,1983.
- DUBLIN, P. Techniques de reproduction vegetative *in vitro* et amelioration génétique chez lez caféirs cultivés. **Café Cacao Thé**, v.28, n.4, p.231-244, 1984.
- 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 Rep.**, v. 19, p. 111-117, 1999.
- FERNANDO, J.A., MELO, M., SOARES, M.K.M., APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Anatomy of somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.44, n.3, p. 247-255, 2001.
- FUENTES, S.R.L., CALHEIROS, M. B. P., MANETTI-FILHO, J., VIEIRA, L. G. E. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 60, p. 5-13, 2000.
- GARCÍA, E., MENÉNDEZ, A. Embriogenese somatique à partir d'explantas foliares del cafeto Catimor. **Café Cacao Thé**, v.31, p.15-22, 1987.
- GUERRA, M.P., TORRES, A.C., TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v.2, Embrapa, 1999. 354p.

- HATANAKA, T., SAWABE, E. AZUMA, T., UCHIDA, N. YASUDA, T. The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. **Plant Sci.**, v.107, p. 199-204, 1995.
- HERMAN, E., HAAS, G. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. **Hortscience**, v.10, n.6, p. 588-589, 1975.
- KAHIA, J.W., OWOUR, J.B. O. *In vitro* propagation of the disease resistant *Coffea arabica* L. cultivar – Riuru 11. **Kenya Coffee**, v. 55, p. 901 – 905, 1990.
- LEE, K.S., ZAPATA-ARIAS, F.J., BRUNNER, H., AFZA, R. Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.51, p. 1-8, 1997.
- MENÉNDEZ-YUFFÁ, A., GARCÍA, E. G. Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "Catimor". **Protoplasma**, v. 199, p. 208-214, 1997.
- MICHAUX-FERRIERE, N., DUBLIN, P.S., SCHWENDIMAN, J. Etude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explantas foliaires de *Coffea arabica* L. **Café Cacao Thé.**, v. 31, p. 103-111, 1987.
- MOLINA, D.M., APONTE, M.E., CORTINA, H., MORENO, G. Efecto del genótipo y época de recolección del material vegetal en la embriogénesis somática directa de *Coffea arabica* var. Caturra x Híbrido de Timor. In: Seminário Internacional sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira, 3, 1999. Londrina, PR, Brasil. **Anais...**, p. 69-74.
- MOLINA, D.M., APONTE, M.E., CORTINA, H., MORENO, G. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.71, p.117-123, 2002.
- NEUENSCHWANDER, B., BAUMANN, T. W. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Plant Cell Rep.**, v. 10, p. 608-612, 1992.

- NORIEGA, C., SONDAHL, M.R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. **Colloque Scientifique International sur le Café**, 15, Montpellier. ASIC (Paris), p. 73-81, 1993.
- 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.
- 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.
- SANTOS, A.C.P. **Embriogênese Somática Indireta em Genótipos de *Coffea arabica* e de *C. Canephora***. Viçosa, Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Doutorado. 90 p. 2002.
- 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 Tiss. Org. Cult.**, v. 8, p. 243-248, 1987.
- 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. **Annales ...** Paris: ASIC, 1991. p. 701-710.
- SÖNDAHL, M.R., SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explant of *Coffea arabica* L. **Z. Pflanzenphysiol.** (Supplement), v. 81, p. 395-408, 1977.
- SÖNDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W.R. Propagation of coffee. In: HENKE, R.R.; HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, M.P.; HOLLAENDER, A. (Eds.). **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum Press, 1985. p. 215-232.

- SÖNDAHL, M.R., SÖNDAHL, C.N., GONÇALVES, W. Custo comparativo de diferentes técnicas de clonagem. In: Seminário Internacional sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira, 3, 1999. Londrina, PR, Brasil. **Anais...**, p. 59-65.
- SPIRAL, J., PETIARD, V. Protoplast culture and regeneration in *Coffea* species. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 14, 1991. San Francisco. **Annales ...** Paris: ASIC, 1991. p. 383-390.
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Bot. Neerl.**, v.19, p.509-514, 1970.
- van BOXTEL, J.H.J. **Studies on genetic transformation of coffee by using electroporation and the biolistic method.** Wageningen: [s.n.], 1994. 125 f. Thesis (Ph.D.).
- van BOXTEL, J., BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 44, p.7-17, 1996.
- VERDEIL, J.L., HOCHER, V., HUET, C., GROSDÉMANGE, F., ESCOUTE, J., FERRIÈRE, N., NICOLE, M. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Ann. Bot.**, v. 88, p.9-18, 2001.
- WILLIAMS, E.G., MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Ann. Bot.**, v. 57, p.443-462, 1986.
- YASUDA, T., FUJII, Y., YAMAGUCHI, T. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. **Plant Cell Physiol.**, v. 26, p. 595-597, 1985.

ZAMARRIPA, A., DUCOS, J. P., BOLLON, H., DUFOUR, M., PETIARD, V.
Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide: effets densité
d'inoculation et renouvellement du milieu. **Café Cacao Thé**, n. 35, p.233-244,
1991.

CAPÍTULO 1

ANÁLISE ESTRUTURAL COMPARATIVA DA REAÇÃO CALOGÊNICA EM GENÓTIPOS DE *Coffea*

1. INTRODUÇÃO

Estudos detalhados sobre o processo da indução da embriogênese somática em cafeeiro, que enfocam as células ou os tecidos que se desenvolvem em meristemas embriogênicos e que identificam o estágio de desenvolvimento que promove ou inibe a embriogênese, podem fornecer informações relevantes para o aumento ou para a manipulação da resposta embriogênica. A melhor época de coleta, o tipo de explante e a seleção de genótipos mais responsivos poderiam ser monitorados via análise estrutural, selecionando-se cepas com maior potencial embriogênico.

O primeiro estudo histológico da embriogênese somática em calo de *Coffea arabica* utilizando explantes foliares descreveu que a proliferação dos calos é originada das células do mesofilo lacunoso, e que calos embriogênicos de alta e de baixa frequência originam-se de rotas alternativas de desenvolvimento (SÖNDAHL et al., 1979a). A embriogênese de baixa frequência (embriogênese direta) ocorre a partir da diferenciação de algumas células localizadas nas bordas do explante. Já a embriogênese de alta frequência origina-se a partir da redeterminação de células diferenciadas, da proliferação de calos e da indução de células embriogênicas determinadas, dependente da ação de reguladores de crescimento para a retomada da atividade mitótica e para a determinação do estado embriogênico. MICHAUX-FERRIERE et al. (1989) observaram que dois grupos de células embriogênicas aparecem sucessivamente no calo – um com

células maiores, altamente vacuolizadas, e outro com células menores, isodiamétricas, com núcleo proeminente e citoplasma denso. As divisões celulares que resultariam na formação do calo têm início nas células perivasculares (MICHAUX-FERRIERE et al., 1987; BIEYSSE et al., 1993).

Posteriormente, outros trabalhos foram realizados em *Coffea arabica* (NAKAMURA et al., 1992; MENÉNDEZ-YUFFÁ et al., 1994) demonstrando que a seqüência de eventos direcionando para a embriogênese somática em café inicia-se através de uma única célula derivada da célula-mãe do embrião somático. Calos embriogênicos continham células esféricas com citoplasma denso e de tamanho uniforme, enquanto que os não-embriogênicos consistiam de células alongadas ou células entumescidas e translúcidas (TAHARA et al., 1995).

Testes histoquímicos foram realizados somente em *C. arabica* (MICHAUX-FERRIERE, 1989, BIEYSSE et al., 1993), onde foi observado que, aos 10 dias de cultivo, houve formação de grupos de células embriogênicas, com alta razão núcleo/citoplasma, nucléolo altamente corado e presença de amido de reserva. Após este período, as células embriogênicas seguiam duas rotas: tornavam-se homogêneas, vacuolizadas, com amido e proteínas de reserva, perdendo as características meristemáticas, ou se desdiferenciavam e formavam embriões a partir das células da periferia do calo. Em *C. canephora*, BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE (1996), utilizando sistema bifásico de cultivo, relataram que a indução das células embriogênicas correspondia à desdiferenciação celular que ocorreu durante a segunda fase de cultivo. O potencial embriogênico das células mostrou ser expresso por um curto período de tempo, dependendo das condições de cultura e estado fisiológico da célula. A presença de proteínas de reserva também foi relatada como sendo essencial para a formação do tecido embriogênico.

Vários autores (MICHAUX-FERRIERE et al., 1989; ZAMARRIPA, 1991; BIEYSSE et al., 1993; BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE, 1996; van BOXTEL E BERTHOULY, 1996; CORDEIRO, 1999) relataram que a resposta à indução da embriogênese somática no cafeeiro é genótipo-específica, sendo maior para os genótipos da espécie *C. canephora* em relação aos de *C.*

arabica. O estudo estrutural comparativo pode ser útil para auxiliar na obtenção de características distintivas entre as espécies, que indiquem aqueles genótipos mais promissores à indução da embriogênese somática. Em geral, genótipos robustas reagem facilmente à calogênese friável, podendo, então, ser utilizados como modelo na comparação com genótipos recalcitrantes.

A caracterização estrutural de diferentes tipos de calos em *Coffea* sp. foi feita por SANTOS (2002), tendo avaliado diferenças entre cepas embriogênicas e não-embriogênicas do genótipo arábica Catuaí Vermelho e dos robustas Apatã e Clone 100 (Incaper 8131). Através de testes histoquímicos, verificou-se a possibilidade de uso desta técnica para seleção de cepas embriogênicas, observando-se características estruturais marcadoras. As células perivasculares que se dividiram em uma única direção deram origem a células parenquimáticas, que se tornaram vacuolizadas e, posteriormente, degeneraram-se; estas não possuíam amido ou proteína de reserva. As células embriogênicas apresentavam amido ou proteína de reserva e dividiam-se em vários planos, e nas células do calo friável não-embriogênico não foi encontrado amido ou proteína de reserva.

Os objetivos deste trabalho foram descrever as alterações estruturais e histoquímicas nos explantes dos genótipos Catimor UFV 395-141 e robusta Apatã ao longo do tempo pós-indução. A análise comparativa desses genótipos visa identificar marcadores morfológicos que possam ser úteis no reconhecimento de genótipos potencialmente embriogênicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Os genótipos utilizados para o desenvolvimento desse trabalho foram o híbrido UFV 395-141 (Catimor geração F₃) e o cultivar Apoatã, de *C. canephora*.

Estacas foram retiradas de plantas do campo experimental do programa de melhoramento do cafeeiro da Universidade Federal de Viçosa e da EPAMIG/CTZM, e enxertadas por garfagem em porta-enxerto de Catuaí Vermelho, contidos em vasos com capacidade para oito litros. Estas plantas foram mantidas em casa de vegetação da Universidade Federal de Viçosa - MG, em vasos com capacidade de aproximadamente oito litros contendo mistura de terra e esterco bovino, sendo efetuadas regas periódicas e tratos culturais, conforme necessário.

Aproximadamente 24 horas antes da retirada dos explantes, as folhas das plantas foram pulverizadas com solução de Benlate[®] (2 g L⁻¹), Agrimicina[®] (2 g L⁻¹) e Mancozeb[®] (1 g L⁻¹), a fim de se reduzir infestações por fungos e bactérias. Folhas recém expandidas do terceiro ramo plagiotrópico a partir do ápice foram coletadas e lavadas em água corrente por 12 horas. A coleta das folhas utilizadas como fonte de explantes foi feita no mês de janeiro do ano de 2002.

2.2. Indução calogênica

A desinfestação das folhas foi feita utilizando solução de hipoclorito de cálcio 5% contendo Tween 20 0,04% (v/v) por 20 minutos. Após este tratamento, em câmara de fluxo de laminar, as folhas foram lavadas quatro vezes em água deionizada autoclavada. Foram cortados explantes com cerca de 7 x 7 mm, excluindo-se a nervura central e as margens das folhas utilizadas como fonte de explante. Estes explantes foram inoculados com a superfície adaxial em contato com o meio de cultura (SÖNDAHL et al., 1985), que foram previamente vertidos em placas de Petri de poliestireno cristal estéreis, de 60 mm de diâmetro, com 12 mL de meio. Cada placa recebeu, inicialmente, cinco explantes, sendo que para cada tratamento foram introduzidos 400 explantes.

Utilizou-se o meio B (YASUDA et al., 1985) para a indução calogênica no genótipo Apoatã, e as seqüências de meios M3/B4 (CORDEIRO, 1999) e MSI/MSII (NORIEGA e SÖNDAHL, 1993) para Catimor UFV 395-141. Os componentes dos meios utilizados estão apresentados no Quadro 1. A barra (/) indica sucessão de dois meios de cultivo, primário e secundário, sendo M3/B4 feita após quatro semanas de cultivo e MSI/MSII após seis semanas; neste subcultivo o número de explantes por placa foi reduzido para três. As subculturas subseqüentes ocorreram a intervalos variando de 30 a 60 dias. Os meios foram autoclavados por 20 minutos a 121 °C e pressão de 1,1 atm. As placas foram fechadas com filme de PVC e mantidas em condições de obscuridade em câmara de crescimento tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand), a 25± 2 °C.

Quadro 1 – Composição dos meios indutores de calogênese em *Coffea* spp.

COMPONENTES	B	M3	B4	MSI	MSII
Macroelementos	YAS*	MS**	MS/2	MS	MS/2
Microelementos	YAS	MS	MS	MS	MS/2
Na ₂ EDTA (mg L ⁻¹)	37,3	37,3	37,3	37,3	18,65
FeSO ₄ .7H ₂ O (mg L ⁻¹)	27,8	27,8	27,8	27,8	13,9
Pantotenato de Cálcio (mg L ⁻¹)		1	1	-	-
Mio-inositol (mg L ⁻¹)	100	100	100	100	50
Ácido nicotínico (mg L ⁻¹)	1	1	1	1,8	0,9
Piridoxina-HCl (mg L ⁻¹)	1	1	1	3,1	1,55
Tiamina-HCl (mg L ⁻¹)	10	1	1	10,1	5,05
Biotina (mg L ⁻¹)	-	0,01	0,01	-	-
Cisteína (mg L ⁻¹)	20	-	20	33	33
Adenina (mg L ⁻¹)	-	40	-	-	-
Extrato de malte (mg L ⁻¹)	-	400	-	-	-
Sacarose (g L ⁻¹)	30	30	30	40	20
Gelrite (g L ⁻¹)	3	3	3	2,4	2,4
2,4-D (μM)	-	-	-	4,5	-
ANA (μM)	-	-	-	-	0,54
KIN (μM)	-	-	-	18,6	4,6
BAP (μM)	5	22	5	-	-
pH	5,6	5,6	5,6	5,5	5,5

* - YASUDA et al. (1985); ** - MURASHIGE e SKOOG (1962).

2.3. Análise estrutural

Foram coletados três explantes por tratamento, do meio de cultura, num total de 24 coletas realizadas em seqüência nos seguintes dias: 0, 4-10, 15, 30, 45-50, 55, 70, 90, 120, 150, 180, 210 e 240. As amostras foram fixadas em FAA₅₀ por 24 horas em dessecador sob vácuo. O fixador foi descartado e substituído por etanol 70%, sendo mantido em vácuo por mais 24 horas (JOHANSEN, 1940), e estocadas até o momento da inclusão. As amostras foram incluídas em metacrilato (HISTORESINTM, LEICA), sendo os blocos cortados em micrótomo rotativo de avanço automático (Leica RM 2155-UK) com cortes de 5 μm de espessura. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina em pH ácido, com a finalidade de detectar radicais aniônicos e metacromasia (VIDAL, 1977), e submetidos aos testes histoquímicos P.A.S (“Periodic Acid Schiff”) para polissacarídeos neutros (MELLO e VIDAL, 1978; MAIA, 1979) e XP (“Xylidine Ponceau”) para proteínas (VIDAL, 1970). As lâminas foram montadas com resina (Permout[®]). As observações e a documentação fotográfica foram feitas em fotomicroscópio (OLYMPUS AX70) equipado com sistema U-PHOTO.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise morfológica

A reação calogênica induzida em explantes foliares dos genótipos de *Coffea* resultou na formação de calos cicatriciais, calos nodulares, calos mistos, calos embriogênicos e calos friáveis embriogênicos, conforme a Figura 1.

O calo cicatricial (Figura 1A) é aquele que ocorre nos primeiros dias de indução, após reação nas extremidades dos explantes, onde foi feito o corte no tecido foliar. Este tipo de reação é denominado calo de cicatrização por MICHAUX-FERRIERE et al. (1987), sendo que sobre esta formação se desenvolvem outros calos. Ao longo do tempo de cultivo, calos com formações globulares compactas desenvolvem, geralmente nas proximidades da região onde ocorria uma nervura lateral, sendo denominados calos nodulares (Figura 1B). Calos mistos são aqueles nos quais ocorreram formações amorfas de células alongadas, de coloração esbranquiçada, sobrepondo-se aos calos compactos (Figura 1C). Em geral, o surgimento desse tipo de calo é relativamente rápido, em meios contendo como regulador de crescimento citocininas e auxinas, principalmente o 2,4-D, quando comparado com calos induzidos apenas com citocininas (NAKAMURA et al., 1992). Quando ocorria a formação de embriões diretamente dos explantes cultivados em placas de Petri, o calo foi denominado

calo embriogênico (Figura 1D e 1E). Calos friáveis embriogênicos são aqueles formados por agregados de células, com cerca de 1 mm de diâmetro, que se soltam dos tecidos foliares, apresentando coloração amarelo-creme (Figura 1F). A presença de embriões neste tipo de calo também foi verificada. Este tipo de calo possibilita o estabelecimento de culturas líquidas a partir dos agregados celulares, e posterior diferenciação em embriões somáticos. Nesse sistema de cultivo de culturas líquidas, ZAMARRIPA et al. (1991) obtiveram 400.000 embriões.g⁻¹ de matéria fresca de agregados celulares em *Coffea canephora*.

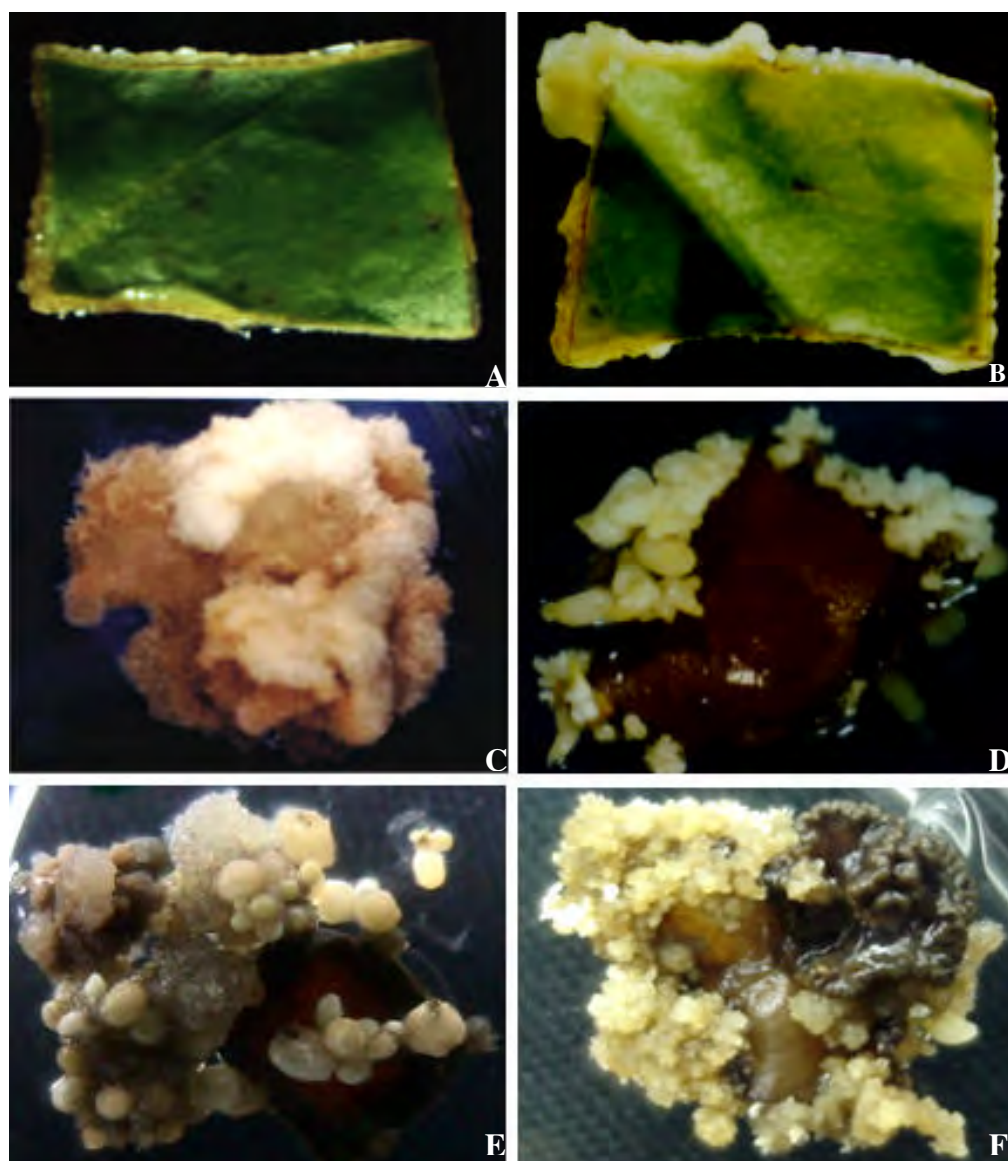


Figura 1 – Reação calogênica induzida em explantes foliares de genótipos de *Coffea*: **A**, calo cicatricial aos 28 dias de cultivo no genótipo Catimor UFV 395-141; **B**, calo nodular aos 45 dias de cultivo no genótipo Catimor UFV 395-141; **C**, calo misto aos 56 dias de cultivo no genótipo Catimor UFV 395-141; **D**, embriogênese direta aos 56 dias na cultivar Apoatã; **E**, calo embriogênico aos 56 dias no genótipo Catimor UFV 395-141; **F**, calo friável embriogênico aos 112 dias na cultivar Apoatã. Barra equivale a 50 mm.

3.2. Freqüência calogênica

Após 28 dias de cultivo, houve apenas a formação de calos cicatriciais na maioria dos explantes dos dois genótipos quando cultivados em meios apenas com BAP como regulador de crescimento. Nos explantes do genótipo Catimor UFV 395-141 houve maior desenvolvimento dos calos, sendo nesta mesma época foi observada a formação de calos nodulares e de calos mistos, em aproximadamente 50% dos explantes para cada tipo de calo (Figura 2A). CORDEIRO (1999) relatou que no mesmo período de cultivo para o genótipo robusta as maiores freqüências de calos induzidos foram de calos nodulares, quando cultivados apenas com citocininas. No entanto, SANTOS (2002) observou que aos 30 dias de cultivo, mais de 80% dos explantes do cultivar Apatã apresentaram calos cicatriciais. Em Catimor UFV 395-141, SANTOS (2002) relatou a presença de explantes sem reação ou com a formação de calos cicatriciais nos meios contendo apenas citocinina aos 30 dias de cultivo. As freqüências de 75% de explantes com calos nodulares e 25% com calos brancos não-embriogênicos (calos mistos) foram obtidos nos meios de indução contendo citocinina mais auxina. As diferenças verificadas pelos autores utilizando-se condições indutoras semelhantes, no que se refere ao regulador de crescimento, podem ser devido às diferenças nos explantes em função da posição na planta em que se retirou os mesmos, da idade fisiológica e da época do ano, como sugerido por (MOLINA et al., 2002).

Aos 56 dias de cultivo observou-se a formação de embriões nos explantes de ambos genótipos, quando cultivados apenas com citocinina como regulador de crescimento. No cultivar Apatã a maior freqüência de calos foi a do tipo nodular (acima de 50% dos explantes) e a freqüência de calos com embriões foi de aproximadamente 17%, com cerca de 21 embriões por explante (Figura 3A). DUBLIN (1981) estudando o genótipo Arabusta e HATANAKA et al. (1991) o genótipo robusta, obtiveram embriogênese direta utilizando apenas citocininas, sendo que as auxinas promoveram um efeito inibidor neste tipo de reação. Nesse mesmo período de avaliação (56 dias de cultivo), no genótipo Catimor UFV 395-

141, a maior frequência foi do calo do tipo cicatricial (mais de 80% dos explantes) e a de calos embriogênicos foi de aproximadamente 14%, com média de aproximadamente sete embriões por explante. A indução direta de embriões somáticos, utilizando somente citocininas como regulador de crescimento, tem sido observada em muitas espécies pertencentes a diferentes famílias botânicas, como *Abies alba* (SCHULLER et al., 1989), *Solanum tuberosum* (PETROVA e DEDIKOVA, 1992), *Lycopersicon esculentum* (GILL et al., 1998) e *Vitis vinifera* (FAURE et al., 1996).

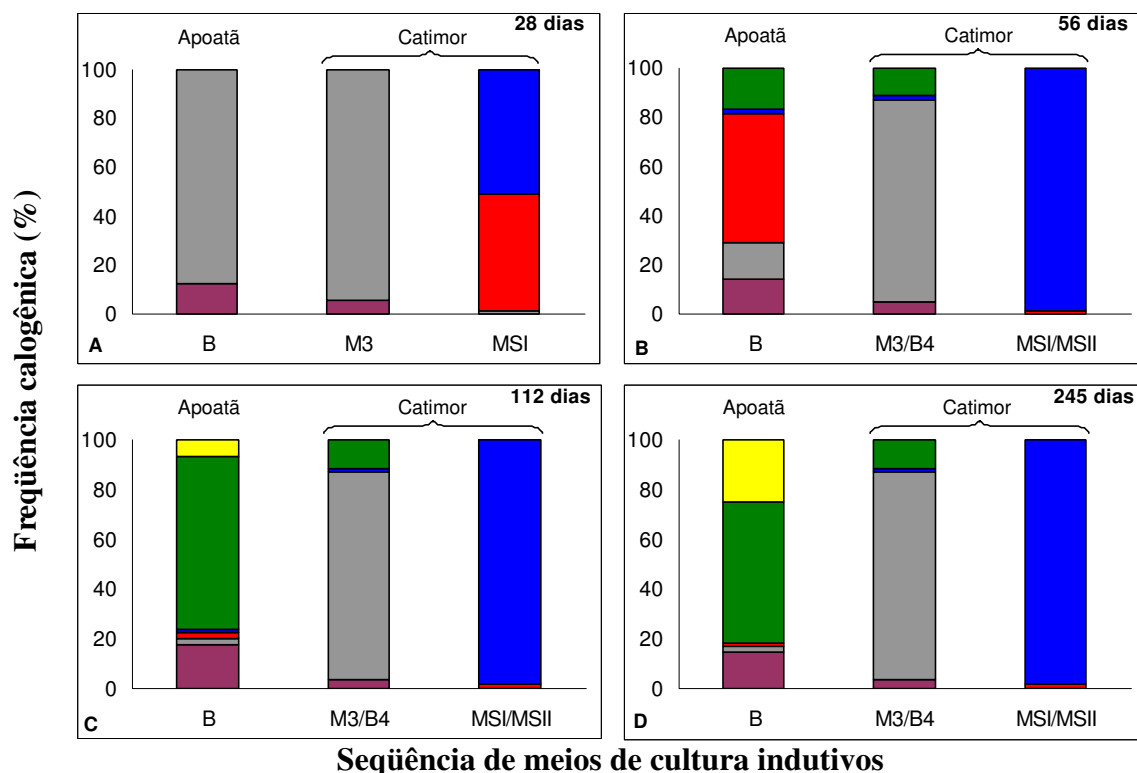


Figura 2 – Caracterização temporal da reação calogênica de explantes foliares dos genótipos Apoatã e Catimor UFV 395-141 submetidos a diferentes seqüências de meios de indução (■ sem reação, ■ calo cicatricial, ■ calo nodular, ■ calo misto, ■ calo embriogênico, ■ calo friável embriogênico).

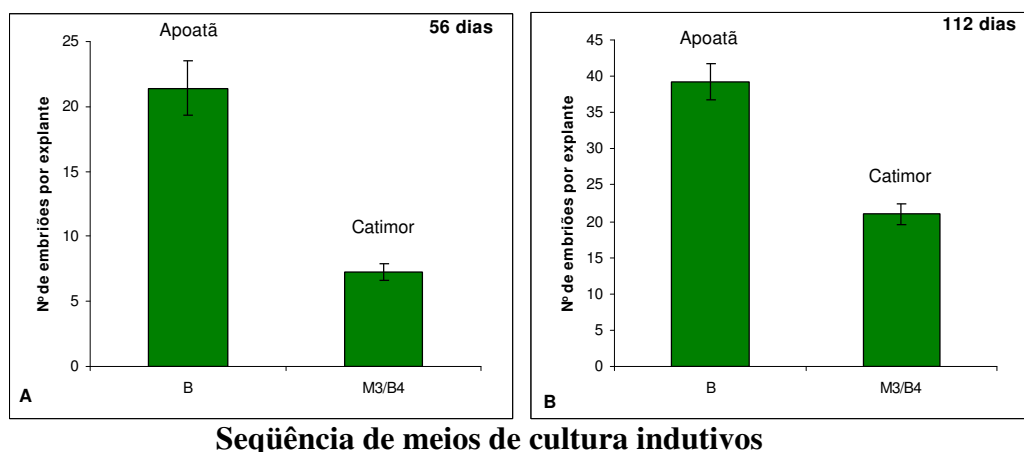


Figura 3 – Número total de embriões nos calos embriogênicos dos genótipos Apoatã e Catimor UFV 395-141 aos 56 e 112 dias de pós-indução em resposta aos respectivos meios de cultura B e M3/B4. As barras indicam o erro padrão da média.

Quanto ao genótipo Catimor UFV 395-141, aos 56 dias sendo cultivado na seqüência de meios MSI/MSII (NORIEGA e SÖNDAHL, 1993) com auxina e citocinina, verificou-se que quase a totalidade dos explantes formou calos mistos, permanecendo inalterado até o 245º dia de cultivo. Culturas embriogênicas friáveis foram isoladas por NORIEGA e SÖNDAHL (1993) a partir de explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho nesta seqüência de meios. BIEYSSE et al. (1993) obtiveram melhor resposta na indução da embriogênese somática em oito genótipos de *Coffea arabica* quando utilizaram meio de YASUDA (1985), contendo apenas 5 µM BAP como regulador de crescimento e ¼ sais MS. Estes autores relataram, ainda, que a presença de auxina (2,4-D ou AIA) no meio não foi essencial para a indução das células embriogênicas.

Calos friáveis embriogênicos foram induzidos apenas em explantes do robusta Apatã, iniciando a partir do 62º dia de cultivo. A avaliação da freqüência de calos friáveis embriogênicos realizada no 112º dia de pós-indução mostrou que a porcentagem desse tipo de calo foi de 10% aproximadamente, e cerca de 75% dos explantes produziu calos embriogênicos (Figura 2C), com produtividade média de 38 embriões explante⁻¹ (Figura 3B). Aos 245 dias do início do cultivo, a freqüência de calos friáveis embriogênicos foi de aproximadamente 25% (Figura 2D). SANTOS (2002) obteve resultados semelhantes no cultivar Apatã quando utilizou apenas citocininas como regulador de crescimento. No entanto as freqüências de produção de calos friáveis embriogênicos foram duplicadas, para cerca de 55%, em resposta à ação combinada da auxina AIB e da citocinina 2iP no meio secundário. As concentrações dos reguladores de crescimento utilizadas por SANTOS (2002) foram de 1,5 µM de 2,4-D e 7,5 µM de BAP, e 25 µM de 2iP e 5 µM de AIB, respectivamente nos meios primário e secundário. A ação do AIB, na presença de citocinina, pode favorecer mais a multiplicação do que a diferenciação de células meristemáticas em explantes foliares de *Coffea canephora* cv. Robusta (BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE, 1996).

No genótipo Catimor UFV 395-141, cultivado apenas com citocinina e avaliado aos 112 dias de cultivo, não se verificou aumento na freqüência de calos

embriogênicos; no entanto, houve um acréscimo no número de embriões por explante, em relação à avaliação anterior. Nestas mesmas condições de cultivo (meios M3/B4), CORDEIRO (1999) obteve cerca de 40% de calos embriogênicos friáveis, o que não foi observado neste trabalho. Esse fato pode ter ocorrido devido às diferenças genéticas que são peculiares quando se faz referência a genótipos Catimor. CORDEIRO (1999) utilizou o genótipo Catimor CRN 8661. Além do fator genético, as condições das plantas matrizes, fonte dos explantes, também foram diferentes das utilizadas neste trabalho e, conseqüentemente, a idade, a época do ano em que se realizou a coleta e as condições fisiológicas não foram as mesmas. Diferenças na resposta embriogênica em função do genótipo e da época do ano em que os explantes são retirados das plantas matrizes foram relatadas por MOLINA et al. (2002).

As avaliações das freqüências calogênicas no genótipo Catimor UFV 395-141 realizadas aos 112 dias pós-indução, permaneceram inalteradas até o 245º dia de cultivo (Figura 2D).

3.3. Análise estrutural

3.3.1. Primeiras modificações estruturais

A folha do cafeeiro é hipoestomática e dorsiventral. O mesofilo é constituído por uma camada de parênquima paliçádico e por cerca de nove camadas de células de parênquima lacunoso. A epiderme da face abaxial e da adaxial é uniestratificada e os estômatos apresentam células retangulares alongadas na direção da superfície da folha (Figura 4). Os feixes vasculares são colaterais e a nervura central tem um cilindro vascular contínuo circundado por tecido parenquimático. Externamente ao cilindro vascular, voltado para a face adaxial, existem vários feixes vasculares complementares; onde o floema fica voltado para o cilindro vascular e o xilema para a epiderme da face superior. Ao lado dos feixes vasculares complementares (voltados para a superfície da face

adaxial) ocorrem fibras esclerenquimáticas, que algumas vezes assumem a forma de um arco. As outras células que circundam o tecido vascular são parenquimáticas. Os caracteres anatômicos observados são idênticos aos já citados na literatura (METCALFE e CHALK, 1957; MENÉNDEZ-YUFFÁ e GARCÍA, 1997).

A primeira modificação estrutural observada após quatro dias da indução calogênica nos explantes dos dois genótipos foi um aumento no volume das células do parênquima lacunoso, as quais apresentavam núcleo volumoso e nucléolo evidente e ocuparam os espaços intercelulares característicos deste tecido (Figura 5). Este aumento não foi observado nas células do parênquima paliçádico nem da epiderme. Tal fato pode ser atribuído à organização destes tecidos que apresentam espaços intercelulares insuficientes ao aumento celular (Figuras 5, 6 e 7). A proliferação do calo a partir de células do parênquima lacunoso parece ser comum. SÖNDAHL et al. (1979b) e MENÉNDEZ-YUFFÁ e GARCÍA (1997) relataram que a proliferação do calo se origina a partir destas células.

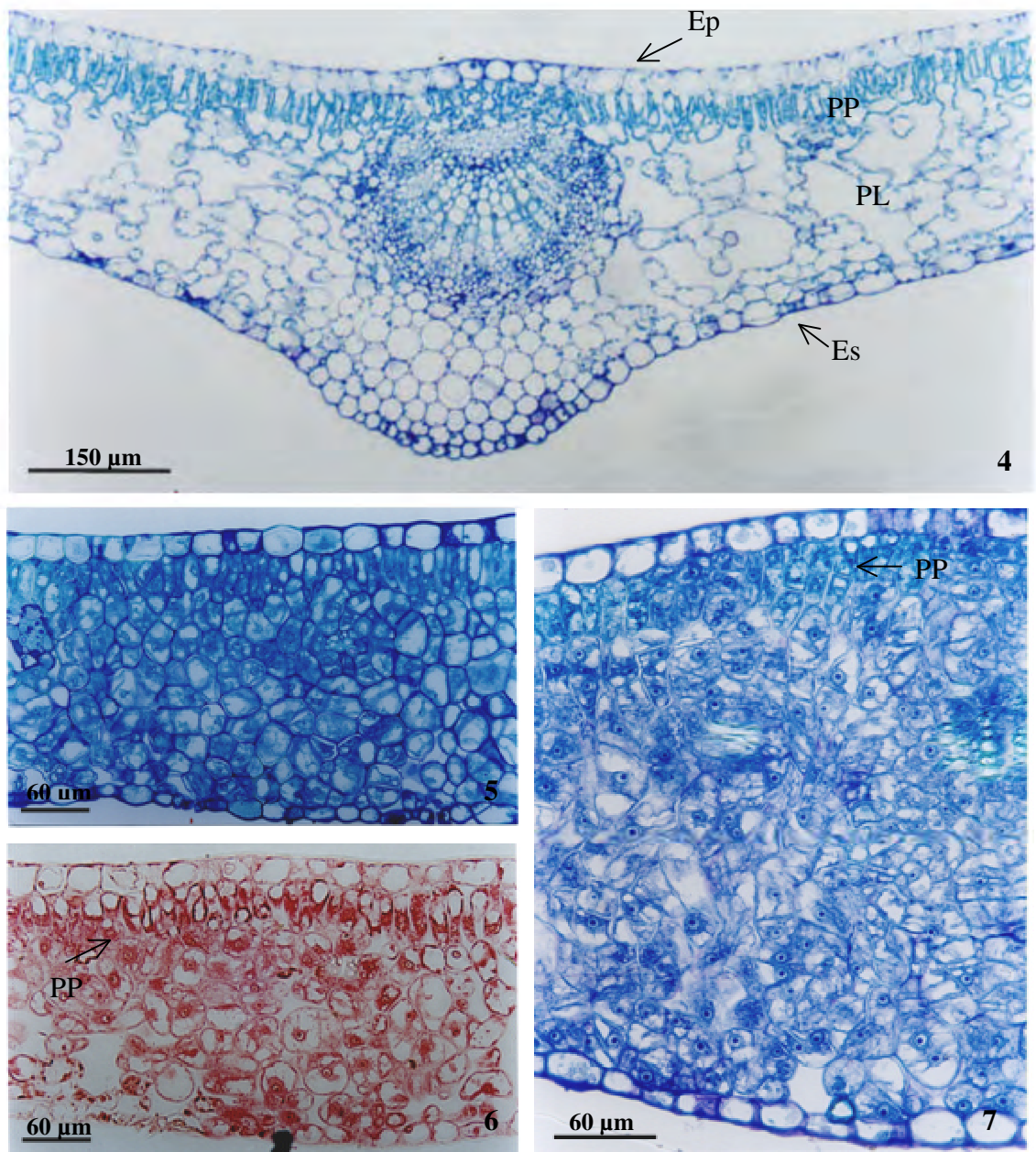
O processo de divisão celular de ambos genótipos, cultivados apenas com BAP como regulador de crescimento, tiveram início nas células próximas aos feixes vasculares (células perivasculares), seguindo dois padrões – divisões unidirecionais e em diferentes planos formando aglomerados. Nestas células, pequenos grânulos de amido, às vezes circundando o núcleo, e grande quantidade de proteína no citoplasma foram observadas (Figuras 5 e 6). O início de divisão celular nas células perivasculares já foi relatado por vários autores (MICHAUX-FERRIERE et al., 1987, 1989; BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE, 1996; BIEYSSE et al., 1993). Como as células perivasculares são menos diferenciadas a reação ocorre mais rapidamente em função da indução pelos reguladores de crescimento.

Nos explantes foliares do genótipo Catimor UFV 395-141, cultivado em meio com auxina e citocinina, a partir do sexto dia de cultivo, foram observadas divisões celulares unidirecionais nas células do parênquima paliçádico (Figura 7). Tal fato não foi evidente neste mesmo genótipo quando o cultivo ocorreu apenas

com a citocinina (meio M3), bem como no genótipo robusta. Entretanto, divisões celulares no tecido do parênquima paliçádico foram verificadas a partir do décimo dia de cultivo do robusta. Algumas células da epiderme também se dividiram apenas neste genótipo (Figura 8). Divisões ocasionais no parênquima paliçádico no genótipo Catimor foram relatadas por MENÉNDEZ-YUFFÁ e GARCÍA (1997), utilizando 4,5 μ M de 2,4-D e 35,5 μ M de BAP como reguladores de crescimento. Nestas condições, não foram observadas divisões na epiderme.

A intensidade de divisão celular (preferencialmente unidirecional, em direção à periferia) e a desorganização do mesofilo foram mais intensas nos explantes de Catimor UFV 395-141 cultivados em meio MS1 (2,4-D + KIN), em relação ao mesmo genótipo cultivado apenas com BAP, bem como em relação ao cultivar robusta. Tal fato também foi relatado por NAKAMURA et al. (1992), que verificaram um crescimento mais lento do calo cultivado apenas com citocinina, em relação ao cultivado com auxina e citocinina.

No cultivo do genótipo Catimor UFV 395-141, na seqüência de meios MSI/MSII, não houve formação de calos embriogênicos nem de calos embriogênicos friáveis, observando-se calos mistos na maioria dos explantes. As características citadas quanto às divisões em um mesmo plano e em maior intensidade, observadas no cultivo do genótipo Catimor UFV 395-141 em meio MSI, pode ser útil na seleção de meios indutores para cepas não embriogênicas, devendo ser confirmada em estudos posteriores. A utilização de marcadores para selecionar condições potencialmente indutoras de embriões no início do cultivo seria de grande importância, principalmente para a indução de genótipos arábicas. Nesta espécie, a indução de calos embriogênicos e friáveis, do tipo alta frequência, pode levar de quatro (SÖNDAHL et al., 1979b; van BOXTEL, 1994) a oito meses de cultivo (CORDEIRO, 1999). A eliminação de condições que não levariam à indução destes calos poderia resultar em economia de reagentes e de tempo, uma vez que essa alta intensidade de divisão celular unidirecional pode ser observada após duas semanas de cultivo.



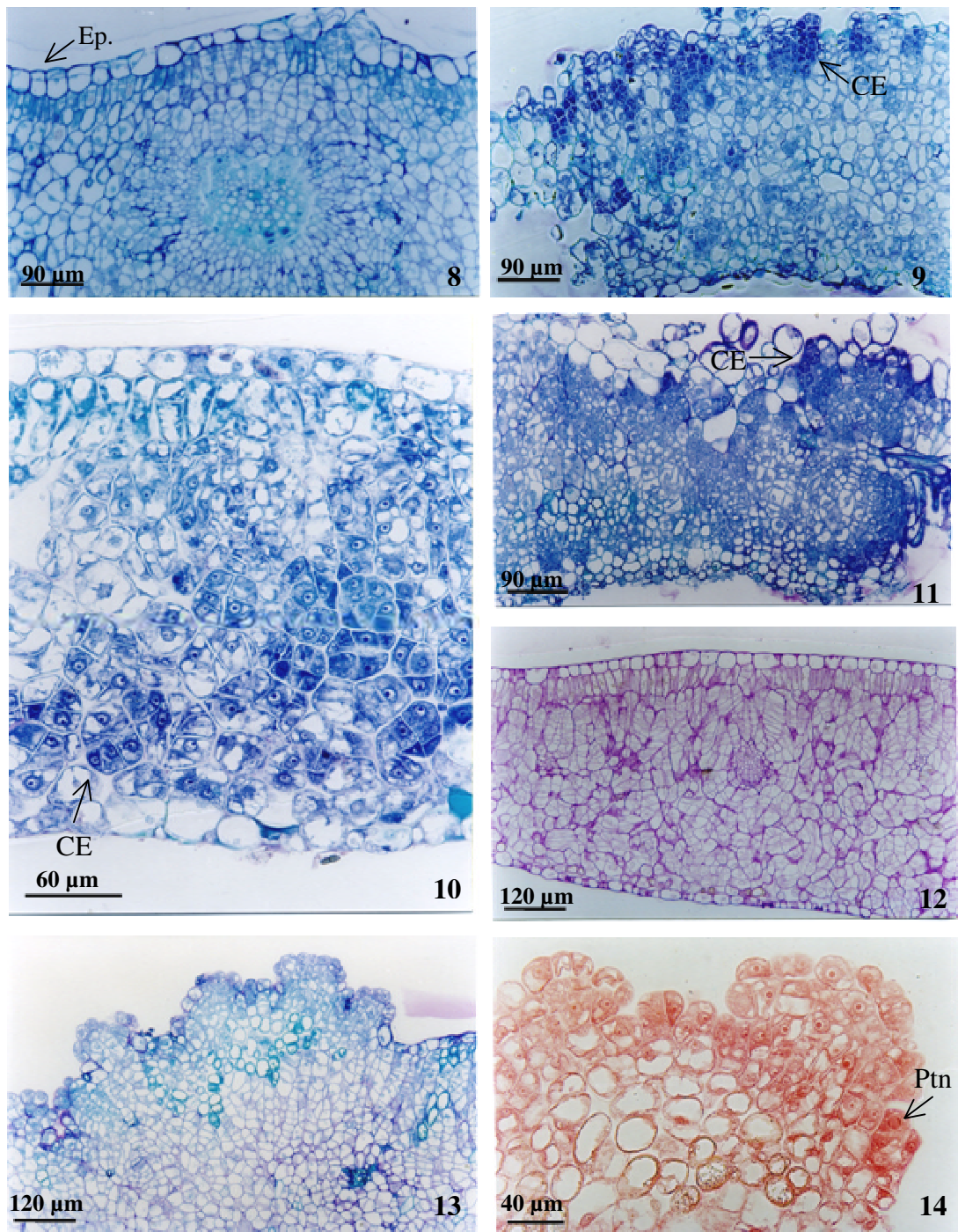
Figuras 4 a 7 – Secções transversais de folhas cultivadas *in vitro* do genótipo Catimor UFV 395-141 e do *C. canephora* cv. Apoatã. **4:** Catimor UFV 395-141 sem indução, corado com Azul de Toluidina. Ep: epiderme; PP: parênquima paliçádico; PL: parênquima lacunoso; Es: estômato. **5:** Apoatã no 7º dia de cultivo no meio B, corado com Azul de Toluidina. **6:** Catimor UFV 396-141 no 7º dia de cultivo em meio M3, submetido ao teste histoquímico XP. PP: parênquima paliçádico. **7:** Catimor UFV 396-141 no 7º dia de cultivo em meio MSI, corado com Azul de Toluidina. PP: parênquima paliçádico.

3.3.2. Alterações após 10 dias de cultivo

No décimo dia de cultivo observou-se que células do parênquima subepidérmico do cultivar robusta tenderam a se dividir unidirecionalmente no plano periclinal e as células do parênquima lacunoso se dividiam em planos periclinais e anticlinais (Figura 8), enquanto que no genótipo Catimor UFV 395-141 as divisões ocorreram em vários planos e ao longo de todo mesofilo (Figura 12). Nesta época não foram observados grãos de amido nas células em divisão nos dois genótipos, no entanto, a presença de proteínas no citoplasma foi confirmada pelo teste histoquímico XP (Figura 14). Os núcleos e nucléolos permanecem bem evidentes, entretanto algumas células são vacuolizadas, pouco coradas e outras apresentam citoplasma denso, são menores e muito coradas. Estas células parenquimáticas vacuolizadas são responsáveis pelo crescimento do calo, e não estão associadas à formação direta dos embriões (Figuras 9, 10 e 13).

Nos cultivares Apoatã e Catimor UFV 395-141, aos quinze dias de cultivo apenas com citocinina, observou-se que ocorreram divisões celulares desiguais nas células da periferia do explante e verificou-se a presença de agregados embriogênicos de quatro a oito células. Nesta mesma época de cultivo observaram-se dois tipos distintos de células - o primeiro com células maiores, vacuolizadas e sem reservas (amido e proteína), e outro formando grupos de células com características meristemáticas, menores, isodiamétricas, com pequenos grânulos de amido, núcleo proeminente e citoplasma denso, com grande quantidade de proteína – células embriogênicas (Figuras 9, 10 e 11). Estas células são formadas a partir da desdiferenciação das células parenquimáticas, e se posicionam na superfície do calo. No entanto, o mecanismo e as condições que iniciam este fenômeno ainda não estão bem definidos. Este dimorfismo de células que formam o calo – um com células menores e com características meristemáticas e outro com células maiores e vacuolizadas, foi relatado por

SÖNDAHL et al. (1985) e por BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE (1996) aos 12 dias de cultivo de *Coffea canephora* cv. Robusta. Estes autores relataram a presença de células alongadas e vacuolizadas, denominadas parenquimáticas, e de grupos de células pequenas, pouco vacuolizadas, com presença de amido, citoplasma denso, rico em RNA, alta razão núcleo/citoplasma, com um grande nucléolo fortemente corado e de paredes finas, as quais denominam-se células embriogênicas. No entanto, segundo estes autores, estas células podem perder tais características e se tornarem altamente vacuolizadas (MICHAUX-FERRIERE et al., 1987, 1989). Caracterização semelhante das células embriogênicas também foi feita por BIEYSSE et al. (1993) e por CARASCO et al. (1994) em *Coffea arabica*.



Figuras 8 a 14 – Secções transversais de folhas cultivadas *in vitro* do genótipo Catimor UFV 395-141 e do *C. canephora* cv. Apatã. **8**: Apatã no 10º dia de cultivo no meio B, corado com Azul de Toluidina. Ep: epiderme. **9**: Apatã no 15º dia de cultivo no meio B, corado com Azul de Toluidina. CE: células embriogênicas. **10 e 11**: Catimor UFV 396-141, respectivamente no 10º e 15º dia de cultivo em meio M3, corado com Azul de Toluidina. CE: células embriogênicas. **12**: Catimor UFV 395-141 no 10º dia de cultivo no meio MSI, submetido ao teste histoquímico P.A.S. **13**: Catimor UFV 395-141 no 15º dia de cultivo no meio MSI, corado com Azul de Toluidina. **14**: Catimor UFV 395-141 no 15º dia de cultivo no meio MSI, submetido ao teste histoquímico XP. Ptn: proteína.

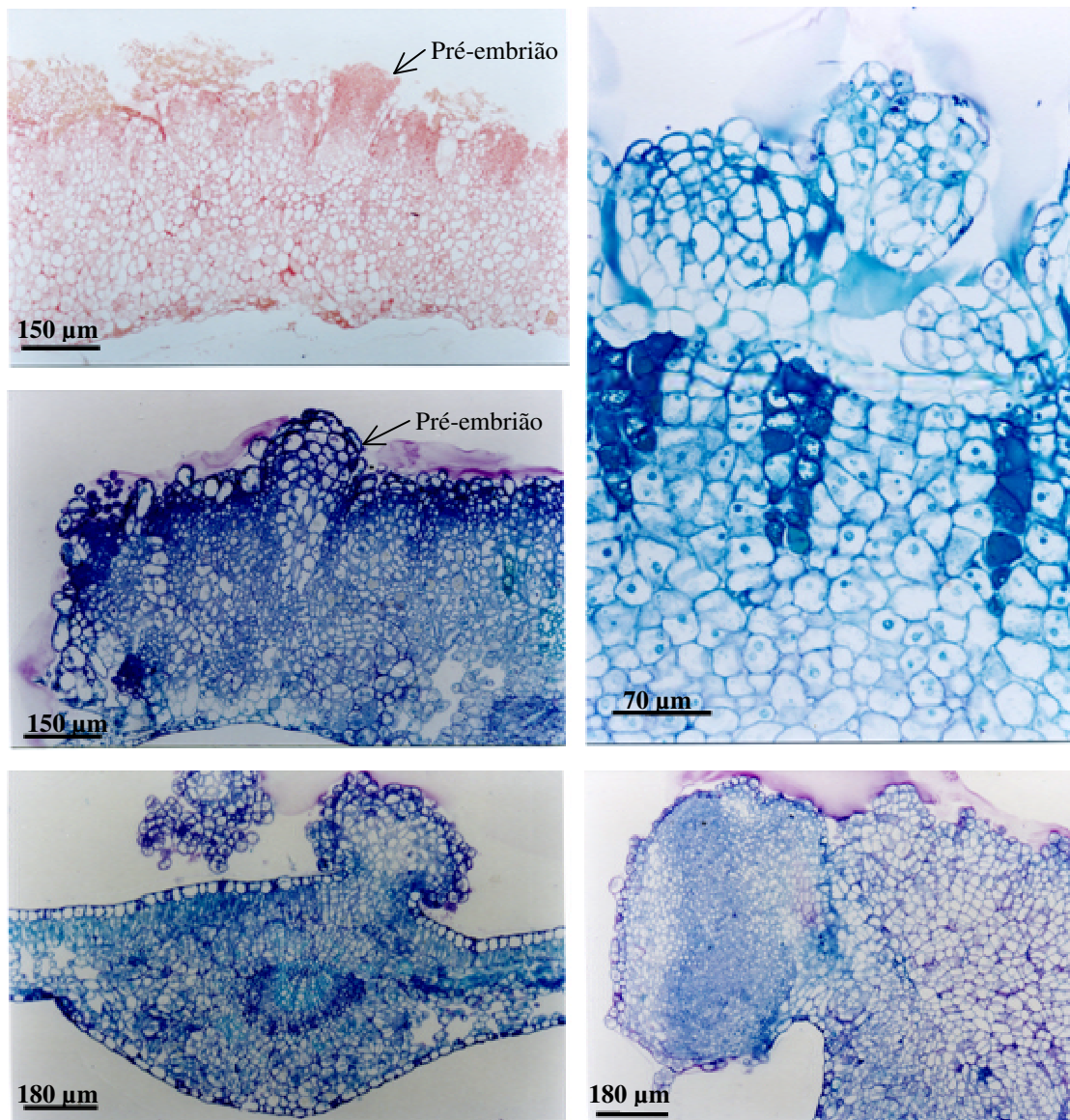
Na indução de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de mamão (*Carica papaya*), utilizando-se 2,4-D, FERNANDO et al. (2001) também observaram que calos formados após 14 dias de cultivo consistiram de dois setores distintos: um com células vacuolizadas alongadas e grandes, conferindo aparência friável ao tecido sob a epiderme do explante, e outra ocorrendo internamente e apresentando células meristemáticas pequenas, compactamente organizadas, com citoplasma denso.

Através de estudos com microscopia eletrônica de varredura, NAKAMURA et al. (1992) demonstraram que os eventos que conduzem à formação de embriões somáticos em café originam-se através de uma via unicelular derivada a partir das células-mãe do embrião, com cerca de 15 µm de diâmetro. Outros autores relataram a formação de pró-embriões na superfície do calo embriogênico. Os pró-embriões são formados por agregados de pequenas células isodiamétricas, com citoplasma denso, núcleo grande e nucléolo proeminente (MICHAUX-FERRIERE et al, 1989; MENÉNDEZ-YUFFÁ et al., 1994; MENÉNDEZ-YUFFÁ e GARCÍA, 1997). Estes agregados pré-embriogênicos deram origem aos embriões somáticos.

No genótipo arábica, cultivado em meio com 2,4-D e KIN, observou-se que as divisões celulares unidirecionais, resultaram em células com características meristemáticas que se localizavam na periferia do calo e apresentavam tamanhos semelhantes às demais células que formam o calo. Estruturas organizadas em grupos de células advindas de divisões periclinais e anticlinais, como as que formam os pré-embriões, não foram observadas neste tratamento (Figuras 13 e 14). A presença de amido é menor, limitando-se apenas às células da periferia do calo. Neste mesmo genótipo, cultivado em meio M3 (BAP 22 µM), observaram-se grupos de células organizadas, formando pré-embriões. Esta diferença na resposta dos explantes a diferentes condições indutoras poderia ser utilizada como marcador estrutural para cepas potencialmente embriogênicas. A formação de agregados celulares derivados da divisão organizada das células embriogênicas, formando pré-embriões, também foi verificada no genótipo Apoatã.

3.3.3. Formação dos embriões

Pré-embriões foram visualizados aos trinta dias de cultivo nos dois genótipos cultivados apenas com citocinina (Figuras 15 e 17). Estes pré-embriões são formados por células pequenas, com diminutos grãos de amido e paredes finas. As divisões celulares que resultaram na formação desta organização, ocorreram em vários planos. Os pré-embriões são provenientes de células internas do tecido que forma o calo (Figuras 15, 16 e 17). À medida que se diferenciavam, as células aumentaram seu volume e não foi observada a presença de amido. O amido de reserva é rapidamente utilizado durante a formação das regiões embriogênicas, e sua ausência, ou presença em grânulos muito pequenos, tem sido observada durante as diferentes fases do crescimento do embrião (Figura 20). A ausência de amido na formação do embrião também foi verificada por QUIROZ-FIGUEROA et al. (2002) e por CARASCO et al. (1994). Algumas células maiores, vacuolizadas, foram formadas na extremidade do calo e se desprenderam do mesmo. Células menores com citoplasma altamente denso apresentaram-se coradas com tonalidade verde pelo Azul de Toluidina, indicando acúmulo de compostos fenólicos possivelmente pela oxidação do tecido. SÖNDAHL et al. (1979b) relataram que as células do parênquima paliçádico do mesófilo tornam-se mais basofílicas com o passar do tempo de cultivo. Isto se deve ao acúmulo de compostos fenólicos formados após a oxidação de substâncias produzidas no metabolismo secundário das células, formando novos compostos, como as quinonas. A substâncias produzidas são responsáveis pelo escurecimento (assumindo uma coloração amarronzada) dos explantes cultivados em meios semi-sólidos (MICHAUX-FERRIERE et al., 1987). Em Catimor UFV 395-141 cultivado no meio MSI, surgem formações semelhantes aos pré-embriões (Figuras 18 e 19), no entanto não ocorreu a formação completa do embrião. Tal fato pode ter ocorrido devido à perda da capacidade embriogênica, como relatado por MICHAUX-FERRIERE et al. (1987, 1989).



Figuras 15 a 19 – Secções transversais de folhas cultivadas *in vitro* do genótipo Catimor UFV 395-141 e do *C. canephora* cv. Apoatã. **15:** Apoatã no 30º dia de cultivo no meio B, submetido ao teste histoquímico XP. **16:** Apoatã no 30º dia de cultivo no meio B, corado com Azul de Toluidina. **17:** Catimor UFV 396-141 no 30º e 15º dia de cultivo no meio M3, corado com Azul de Toluidina. **18 e 19:** Catimor UFV 395-141 no 30º dia de cultivo no meio MSI, corado com Azul de Toluidina.

Segundo QUIROZ-FIGUEROA et al. (2002) a diferenciação dos embriões somáticos inicia-se a partir de células pequenas e de paredes finas, com citoplasma denso e núcleos proeminentes, sugerindo-se que a célula inicia o ciclo de divisão (que forma um pró-embrião) de duas células. Esta observação tem levado vários autores a relatar que a origem dos embriões somáticos em café é unicelular (MENÉNDEZ-YUFFÁ e GARCÍA, 1997; QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002). A embriogênese direta poderia ser resultante de uma reprogramação da célula causada pela interação de auxinas e citocininas endógenas e exógenas das células do explante, ou o pré-condicionamento das células poderia estimular a proliferação e subsequente embriogênese após a liberação de um aparente bloqueio da mitose, como citado por SÖNDAHL et al. (1979a). QUIROZ-FIGUEROA et al. (2002) relataram que a embriogênese indireta também possui origem unicelular, a partir de células embriogênicas relativamente pequenas, com núcleo grande, citoplasma denso, com cerca de 15 a 20 μm de diâmetro e que apresentam sinais de polarização. No entanto, ZIMMERMAN (1993) relata que a origem dos embriões somáticos pode ser uni ou multicelular. Neste trabalho, a confirmação da origem uni ou multicelular da embriogênese não pode ser conclusiva, uma vez que as coletas de amostras em espaços menores de tempo deveriam ter sido feitas entre o 20º e 40º dia de cultivo, a fim de obter uma melhor identificação do processo de diferenciação.

A presença de proteínas na formação de calos de *Coffea arabica* cv. Catimor foi investigada por MENÉNDEZ-YUFFÁ et al. (1994). Estes autores relataram que os calos embriogênicos ($232,2 \mu\text{g g}^{-1}$) possuem cerca de 1,67 vezes mais proteínas do que os calos não-embriogênicos ($141,9 \mu\text{g g}^{-1}$) representando 0,024% do peso fresco do tecido. Resultados semelhantes foram obtidos por TAHARA et al. (1995), que verificaram maior conteúdo protéico nos calos embriogênicos em relação aos não-embriogênicos. Estes resultados mostram que testes histoquímicos são relevantes para seleção de tecidos potencialmente embriogênicos. Esta observação também foi relatada por SANTOS (2002) após verificar que nas células do calo friável não-embriogênico, que também apresentavam células meristemáticas, não ocorria a presença de reservas de

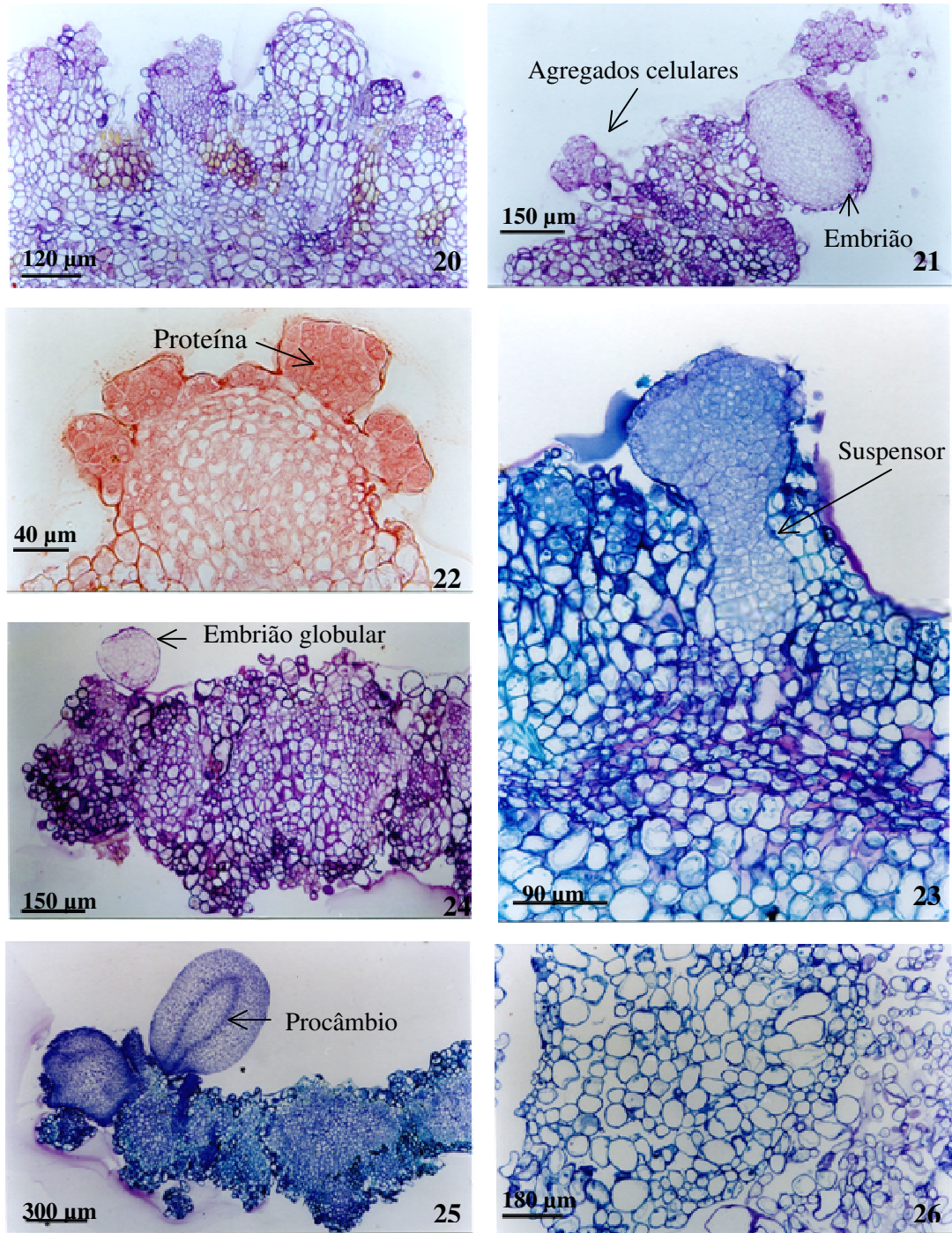
amido nem de proteínas.

Nos explantes do genótipo Catimor UFV 395-141, cultivado com auxina e citocinina, não foram observados pré-embriões. As células meristemáticas responsáveis pelo crescimento do calo se apresentaram, em geral, do mesmo tamanho das demais, sem a presença de amido. Ao longo do tempo de cultivo nesta condição, verificou-se que as células da extremidade aumentaram de volume, tornaram-se altamente vacuolizadas, algumas se alongaram e se soltaram do calo (Figuras 26 e 28). Tais células correspondem às células com aspecto de algodão, que caracterizam os calos mistos. Nessa condição de cultivo observou-se a formação de fibrilas nas superfícies externas das células. Estas fibrilas têm constituição protéica, evidenciada pelo teste histoquímico XP. Tais estruturas também foram observadas por NAKAMURA et al. (1992) e por SANTOS (2002), que sugerem a função de promover uma ligação entre células vizinhas.

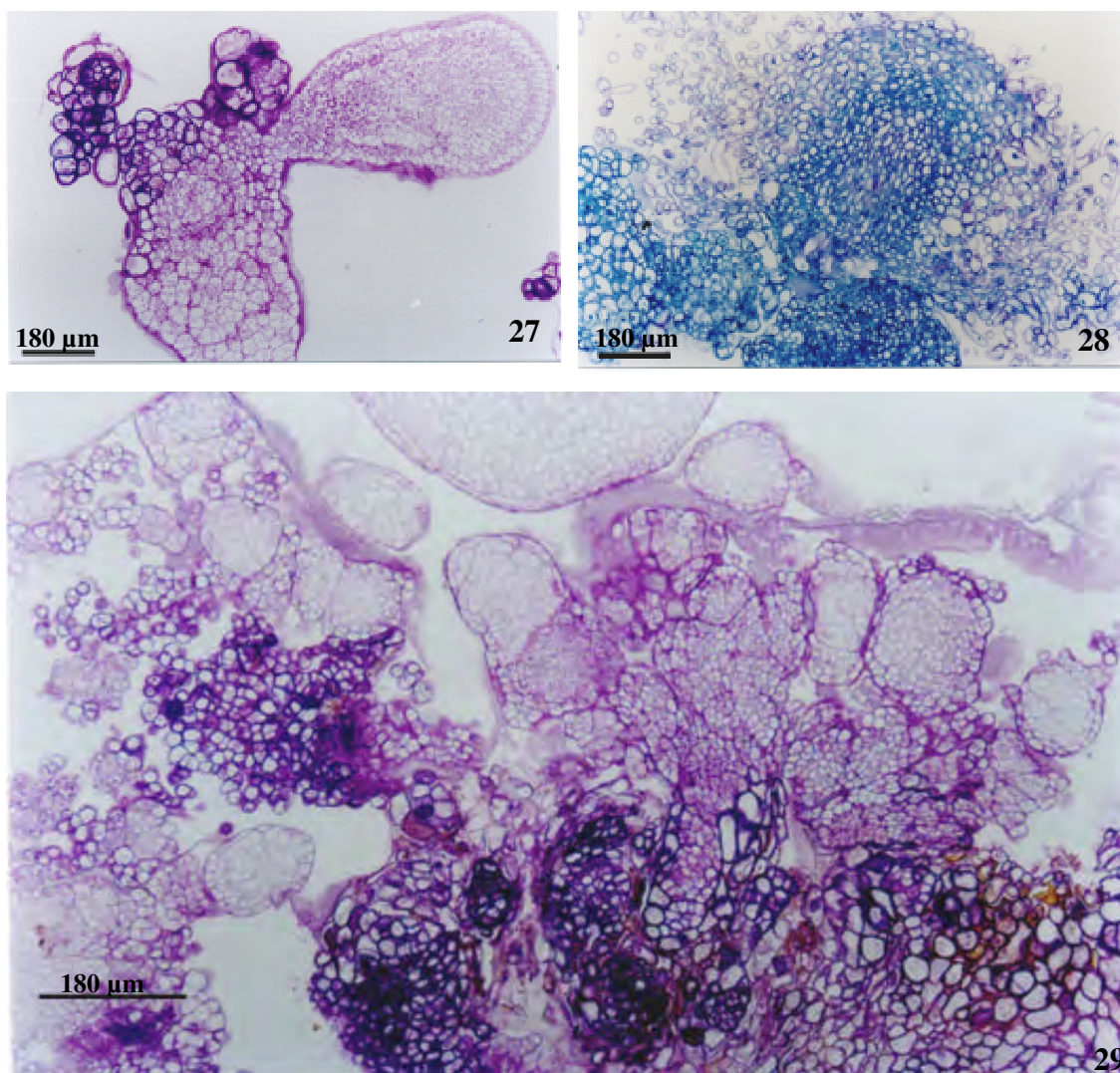
No cultivar Apoatã, aos 46 dias de cultivo, observou-se grande quantidade de embriões. Verificaram-se estruturas semelhantes ao suspensor na região basal dos pré-embriões (Figura 23). Esta interpretação também foi feita por outros autores (SÖNDAHL et al., 1979b; NAKAMURA, 1992; SANTOS, 2002). No entanto, a presença de um suspensor em embriões somáticos não é consenso entre autores, sendo, junto com a ausência do endosperma, diferenças básicas entre embriões somáticos e zigóticos (ZIMMERMAN, 1993). Outras células também foram evidenciadas, arranjas em grupos, com presença de amido, o que não foi verificado nas células que formaram os embriões. Esses grupos de células formados se soltaram do tecido do calo a partir do 50º dia, na forma de agregados celulares. Tais células correspondem aos calos embriogênicos friáveis, verificado neste genótipo (Figura 21). Estes agregados são formados por células que se organizam de quatro em quatro. Este arranjo celular não foi observado no genótipo Catimor UFV 395-141 cultivado na seqüência de meios M3/B4, verificando-se apenas embriões oblongos, bem definidos, evidenciando a região do procâmbio e protoderme (Figuras 24, 25 e 27). Do 50º dia de cultivo em diante, não foram observadas mudanças estruturais significativas nos tecidos formadores do calo nesse cultivar (Figura 28).

LEE et al. (1997), em estudos histológicos de embriogênese somática a partir de explantes de rizoma de banana (*Musa sp.*), observaram em secções longitudinais que, os embriões globulares apresentavam estruturas suspensoras ou semelhantes a esta. Após um período de 21 a 28 dias de cultivo, os embriões globulares, em diferentes estágios, foram observados na superfície dos explantes. As observações histológicas revelaram que a massa embriogênica e os embriões somáticos se desenvolveram, na maioria das vezes, de várias células adjacentes morfológicamente competentes, enquanto que a origem a partir de uma única célula em tecidos vasculares dos explantes de rizoma de *Musa* foi menos freqüente. Em geral, a origem unicelular é mais provável quando os embriões são ligados por um órgão suspensor (WILLIAMS e MAHESWAREN, 1986).

Na cultivar Apatã, a partir do 62º dia de cultivo, os agregados celulares foram formados por grupos com maior número de células, sendo observada a presença de reservas. A partir do 70º dia observou-se a proliferação dos agregados celulares que se soltavam do calo, sem se diferenciar em embriões propriamente ditos. Vários embriões desenvolvidos também puderam ser visualizados. Neste mesmo período verificou-se, ainda, que novos agregados celulares, com células pequenas e com grande quantidade de conteúdo protéico no citoplasma se formavam na superfície de um embrião globular. Este fato pode ser interpretado como início de embriogênese secundária, em função da indução do regulador de crescimento que ainda era mantido no meio de cultivo (Figura 22). Aos 120 dias de cultivo o genótipo Apatã apresentava vários embriões somáticos em diferentes fases de desenvolvimento (Figura 29).



Figuras 20 a 26 – Seções transversais de folhas cultivadas *in vitro* do genótipo Catimor UFV 395-141 e do *C. canephora* cv. Apoatã. **20**: Apoatã no 46º dia de cultivo no meio B, submetido ao teste histoquímico P.A.S. **21**: Apoatã no 50º dia de cultivo no meio B, submetido ao teste histoquímico P.A.S. **22**: Apoatã no 70º dia de cultivo no meio B, submetido ao teste histoquímico XP. **23**: Apoatã no 70º dia de cultivo no meio B, corado com Azul de Toluidina. **24**: Catimor UFV 395-141 no 49º dia de cultivo na seqüência de meios M3/B4, submetido ao teste histoquímico P.A.S. **25**: Corte longitudinal de embrião somático no genótipo Catimor UFV 395-141 no 49º dia de cultivo na seqüência de meios M3/B4, corado com Azul de Toluidina. **26**: Catimor UFV 395-141 no 70º dia de cultivo na seqüência de meios MSI/MSII, corado com Azul de Toluidina.



Figuras 27 a 29 – Secções transversais de folhas cultivadas *in vitro* do genótipo Catimor UFV 395-141 e do *C. canephora* cv. Apotã. **27**: Catimor UFV 395-141 no 120º dia de cultivo nos meios M3/B4, submetido ao teste histoquímico P.A.S. **28**: Catimor UFV 395-141 no 240º dia de cultivo nos meios MSI/MSII, corado com Azul de Toluidina. **29**: Apotã no 120º dia de cultivo no meio B, submetido ao teste histoquímico P.A.S.

A partir de vários estudos histológicos da indução da embriogênese somática, tem-se observado que as características das células embriogênicas com tamanho reduzido, pouco vacuolizadas, citoplasma denso, alta razão núcleo/citoplasma, e com reservas de amido e/ou de proteínas são comuns em várias espécies, como côco (VERDEIL et al., 2001), cevada (NONOHAY et al., 1999), *Tilia cordata* (KÄRKÖNEN, 2000), erva-doce (ANZIDEI et al., 2000), amendoim (CHENGALRAYAN et al., 2001), mamão (FERNANDO et al., 2001) e eucalipto (ARRUDA et al., 2000). No entanto, a origem uni ou multicelular dos pró-embriões tem sido diversificada entre estas espécies.

Estes estudos têm mostrado a importância da análise estrutural, associada a estudos histoquímicos, de padrões eletroforéticos, através da análise de atividade de enzimas, dentre outros, para elucidar a indução e a ontogênese da embriogênese somática em várias espécies de plantas.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A indução calogênica de *C. canephora* cv. Apoatã foi feita utilizando cultivo unifásico apenas com 5 μM de BAP. Para o genótipo Catimor UFV 395-141 foram realizadas duas seqüências de meios no sistema bifásico de cultivo, utilizando-se apenas BAP (22 e 5 μM) para a primeira e 4,5 μM de 2,4-D + 18,6 μM de KIN e 0,54 μM de ANA + 4,6 μM de KIN para a segunda seqüência de meios. Os explantes foram coletados ao longo do tempo de indução, fixados em FAA₅₀ e armazenadas em etanol 70%. Amostras foram incluídas em metacrilato e cortadas com 5 μm de espessura em micrótomo rotativo. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina e submetidos aos testes histoquímicos para detecção de amido (P.A.S. – “Periodic Acid Schiff”) e de proteína (XP – “Xylidine Ponceau”). Calos embriogênicos e calos embriogênicos friáveis foram formados apenas no genótipo Apoatã. No genótipo Catimor UFV 395-141, cultivado apenas com citocinina, houve a formação de calos embriogênicos, enquanto que aquele cultivado com auxina e citocinina houve a formação de calos mistos. A primeira modificação estrutural visualizada nas células dos explantes em cultivo foi o aumento do volume celular do parênquima paliçádico. Já as células perivasculares são as primeiras que iniciam o processo de divisão celular. A presença de amidos e de proteínas foi verificada nestas células em divisão. No 6º dia de cultivo, divisões unidirecionais nas células do parênquima

paliádico foram verificadas apenas no genótipo Catimor UFV 395-141 cultivado com auxina e citocinina. Nestas condições de cultivo, a intensidade de divisão celular e a desorganização do mesofilo são maiores. Nos genótipos Catimor UFV 395-141 e Apatã, cultivados apenas com citocininas, observou-se um dimorfismo nas células que formam o calo - o primeiro com células maiores, vacuolizadas e sem reservas (amido e proteína), e outro formando grupos de células com características meristemáticas, menores, isodiamétricas, com pequenos grânulos de amido, núcleo proeminente e citoplasma denso, com grande quantidade de proteína – as quais são denominadas células embriogênicas. Estas células são responsáveis pela formação dos pré-embriões. No genótipo arábica, cultivado em meio com 2,4-D e KIN, observou-se que as divisões celulares foram unidirecionais, sendo que as células apresentaram características meristemáticas, limitadas apenas nas extremidades do calo. Também se apresentaram com tamanhos semelhantes às demais células que formam o calo e não formaram estruturas organizadas em grupos de células, advindas de divisões periclinais e anticlinais.

Três das características observadas na formação de embriões podem ser utilizadas como marcadores estruturais, evidenciando potencial embriogênico: (a) uma menor intensidade inicial de divisão celular, (b) divisões em planos periclinais e anticlinais e (c) formação de dois grupos celulares distintos, um com células menores e caracteristicamente meristemática, e outro com células maiores e vacuolizadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANZIDEI, M., BENNICI, A., SCHIFF, S., TANI, C., MORI, B. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare*: histological observations of developing embryogenic callus. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 61, p. 69-79, 2000.
- ARRUDA, S.C.C., SOUZA, G.M., ALMEIDA, M., GONÇALVES, A.N. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 63, p. 143-154, 2000.
- BERTHOULY, M., MICHAUX-FERRIERE, N. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 44, p. 169-176, 1996.
- BIEYSSE, C., GOFFLOT, A., MICHAUX-FERRIERE, N. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Can. J. Bot.**, v. 71, p. 1496-1502, 1993.
- CARASCO, C., DUFOUR, M., BERTHOULY, M., MICHAUX-FERRIERE, N. Ontogénese comparative de l'embryogénese zygotique et somatique chez *Coffea* sp. **Café Cacao Thé**, v. 38, n. 1, 1994.

- CHENGALRAYAN, K., HAZRA, S., GALLO-MEAGHER, M. Histological análisis of somatic embryogenesis and organogenesis induced from mature zygotic embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Science**, v.161, p. 415- 421, 2001.
- CORDEIRO, A. T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplastos em *Coffea***. Viçosa, Minas Gerais, Universidade federal de Viçosa. Dissertação de Doutorado. 111 p. 1999.
- DUBLIN, P. Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. **Café Cacao Thé**, v. 25, n. 4, p. 237 – 242, 1981.
- FAURE, O., AARROUF, J., NOUGAREDE, A. Ontogenesis, differentiation and precocious germination in anther-derived somatic embryos of grapevine (*Vitis vinifera* L.): proembryogenesis. **Ann Bot.**, v. 78, p. 23 –28, 1996.
- FERNANDO, J.A., MELO, M., SOARES, M.K.M., APPEZZATO-DAGLÓRIA, B. Anatomy of somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 3, p. 247-255, 2001.
- GILL, R., MALIK, K. A., SANAGO, M. H. M., SAXENA, P. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from seedling cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **J. Plant Physiol.**, v. 147, p. 273 – 276, 1998.
- HATANAKA, T., ARAKAWA, D., YASUDA, T., UCHIDA, N., YAMAGUCHI, T. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. **Plant Cell Rep.**, v. 10, p. 179 – 182, 1991.
- JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York: McGRAW-Book, 1940. 523 p.

- KÄRKÖNEN, A. Anatomical study of zygotic and somatic embryos of *Tilia cordata*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 61, p. 205-214, 2000.
- LEE, K.S., ZAPATA-ARIAS, F.J., BRUNNER, H., AFZA, R. Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 51, p. 1-8, 1997.
- MAIA, V. **Técnica histológica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1979. 246 p.
- MELLO, M.L.S., VIDAL, B.C. Reação de Feulgen. **Ciênc. Cult.**, v. 30, p. 665-676, 1978.
- MENÉNDEZ-YUFFÁ, A., GARCÍA, E. G., NIETO, M. S. Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv. Catimor. **Plant Cell Rep.**, v. 13, p.197-202, 1994.
- MENÉNDEZ-YUFFÁ, A., GARCÍA, E. G. Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee “Catimor”. **Protoplasma**, v. 199, p. 208-214, 1997.
- METCALFE, C.R., CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**, v. 2 Oxford, At the Clarendon Press, 1500 p., 1957.
- MICHAUX-FERRIERE, N., DUBLIN, P.S., SCHWENDIMAN, J. Etude histologique de l’embryogenèse somatique à partir d’explantas foliaires de *Coffea arabica* L. **Café Cacao Thé.**, v. 31, p. 103-111, 1987.
- MICHAUX-FERRIERE, N., BIEYSSE, D., ALVARD, D., DUBLIN, P. Étude histologique de l’embryogenèse somatique chez *Coffea arabica*, induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de génotypes différents. **Café Cacao Thé.**, v. 33, p. 207-217, 1989.
- MOLINA, D. M., APONTE, M. E., CORTINA, H., MORENO, G. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 71, p. 117 – 123, 2002.

- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAKAMURA, T., TANIGUCHI, T., MAEDA, E. Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. **Jpn. J. Crop Sci.**, v. 61, n. 3, p. 476-486, 1992.
- NONOHAY, J.S., MARIATH, J.E.A., WINGE, H. Histological analysis of somatic embryogenesis in Brazilian cultivars of barley, *Hordeum vulgare vulgare*, Poaceae. **Plant Cell Rep.**, v. 18, p. 929-934, 1999.
- NORIEGA, C., SONDAHL, M. R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. **Colloque Scientifique International sur le Café**, 15, Montpellier. ASIC (Paris), p. 73-81, 1993.
- PETROVA, A., DEDIKOVA, B. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. Cv. Désirée from unripe zygotic embryos. **J. Plant Physiol.**, v. 139, p. 539-542, 1992.
- 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 systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Rep.**, v. 20, p. 1141-1149, 2002.
- SANTOS, A. C. P. **Embriogênese somática indireta em genótipos de *Coffea arabica* e de *C. canephora***. Viçosa, Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Doutorado. 90 p. 2002.
- SCHULLER, A., REUTER, G., GEIER, T. Somatic embryogenesis from seeds explants of *Abies alba*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 17, p. 53 – 58, 1989.

- SÖNDAHL, M.R.; SALISBURY, J.L.; SHARP, W.R. SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 94, p. 185-188, 1979a.
- SÖNDAHL, 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, 1979b.
- SÖNDAHL, M. R., NAKAMURA, T., SHARP, W. R. Propagation of coffee. In: HENKE, R. R., HUGHES, K. W., CONSTANTIN, M. P., HOLLAENDER, A. **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. Plenum Press, New York, p. 215-232, 1985.
- TAHARA, M., NAKANISHI, T., YASUDA, T., YAMAGUCHI, T. Histological and biological aspects in somatic embryogenesis of *Coffea arabica*. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 16, 1995. **Annales...** Kyoto: ASIC, 1995. p.860-867.
- van BOXTEL, J.H.J. **Studies on genetic transformation of coffee by using electroporation and the biolistic method**. Wageningen: [s.n.], 1994. 125 f. Thesis (Ph.D.).
- van BOXTEL, J., BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 44, p. 7-17, 1996.
- VERDEIL, J.L., HOCHER, V., HUET, C., GROSDÉMANGE, F., ESCOUTE, J., FERRIÈRE, N., NICOLE, M. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Ann. Bot.**, v. 88, p. 9-18, 2001.

VIDAL, B.C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. **Ann. Histochem.**, v. 15, p. 289-296, 1970.

VIDAL, B.C. Acid glycosaminoglucans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell Mol. Biol.**, v. 22, p. 45-64, 1977.

WILLIAMS, E.G., MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Ann. Bot.**, v. 57, p. 443-462, 1986.

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

ZAMARRIPA, A., DUCOS, J. P., BOLLON, H., DUFOUR, M., PETIARD, V. Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. **Café Cacao Thé**, v. 35, p. 233-244, 1991.

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

CAPÍTULO 2

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA EM HÍBRIDOS DE *Coffea* PARA A PROPAGAÇÃO EM GRANDE ESCALA

1. INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa é utilizada para a multiplicação clonal de genótipos de várias espécies, quando a reprodução por sementes não é possível ou não se permite a produção comercial de sementes híbridas (SÖNDAHL et al., 1999).

A multiplicação vegetativa desempenha um papel importante na seleção do cafeeiro, pois propicia a propagação e a exploração das plantas heterozigóticas, na multiplicação de clones selecionados dos híbridos inter e intraespecíficos, ou ainda a multiplicação de plantas obtidas pela variação somaclonal ou transformação genética (BERTHOULY, 1999).

O cafeeiro pode ser propagado vegetativamente por meio de estacas ou enxertos. A propagação por estacas é a técnica mais empregada em *Coffea canephora*, espécie alógama, devido à impossibilidade de reprodução uniforme por via sexual dos genótipos selecionados. No entanto, para genótipos arábicos, há pouca disponibilidade de material básico, devido ao dimorfismo dos ramos do cafeeiro, e a grande superfície necessária para a propagação em grande escala limita a utilização deste método para esta espécie (SÖNDAHL et al., 1985). A aplicação de técnicas de cultivo *in vitro* tem auxiliado na multiplicação de genótipos elite na cultura do café.

A micropropagação, a partir de microestacas ou cultura de gemas, é um método simples, porém muito pouco eficiente, em se tratando de propagação em

grande escala, devido ao baixo rendimento e ao elevado custo unitário por muda (SÖNDAHL et al., 1999).

A embriogênese somática tem mostrado ser uma técnica com importantes aplicações, não só para a propagação vegetativa de diferentes cultivares, mas também para a conservação de recursos genéticos e para a disseminação de indivíduos selecionados provenientes de cruzamentos intervarietais ou interespecíficos (DUBLIN, 1984). Neste método de propagação, pode-se obter uma alta taxa de multiplicação, iniciando-se culturas a partir de explantes foliares prontamente disponíveis (BIEYSSE et al., 1993).

Desde o primeiro trabalho publicado por STARITSKY (1970), em que embriões somáticos foram obtidos de *C. canephora*, muitos trabalhos têm demonstrado o alto potencial embriogênico das espécies deste gênero, utilizando-se diferentes fontes de explantes como fragmentos de entrenós (DUBLIN, 1980), folhas (HERMAN e HAAS, 1975; SÖNDAHL e SHARP, 1977; DUBLIN, 1981; de PENA, 1983; PIERSON et al., 1983; MICHAUX-FERRIERE et al., 1989; BIEYSSE et al., 1993; NORIEGA e SÖNDAHL, 1993; van BOXTEL, 1994; BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE, 1996; CORDEIRO, 1999; SANTOS, 2002), folhas cotiledonares (SÖNDAHL, 1985), protoplastos (SCHOPKE et al., 1987; ACUÑA e de PENA, 1991) e suspensões celulares (SPIRAL e PETIARD, 1991; ETIENNE-BARRY et al., 1999; RODRÍGUEZ et al., 2000).

A produção de embriões somáticos em café a partir de explantes foliares pode ocorrer da forma direta e indireta. SÖNDAHL e SHARP (1977) propuseram a nomenclatura de “calos embriogênicos de baixa frequência” (LFSE) para a forma direta, onde se observa a produção de até 20 embriões por explante e, “calos embriogênicos de alta frequência” (HFSE), os quais dão origem até 100 embriões por explante associados a um tecido embriogênico friável. Estes tipos de calos têm sido obtidos a partir do cultivo dos explantes em um único meio contendo apenas citocinina (DUBLIN, 1981; YASUDA et al., 1985) ou com a associação de uma auxina e uma citocinina (DUBLIN, 1980; PIERSON et al., 1983), consistindo o sistema unifásico de cultivo. Em outro sistema, o bifásico, os explantes são cultivados em um meio primário com alta

razão auxina/citocinina, onde se inicia a proliferação dos calos, sendo transferidos para um segundo meio, onde a razão auxina/citocinina é reduzida, para o desenvolvimento das células embriogênicas em embriões (SÖNDAHL e SHARP, 1977; DUBLIN, 1984; NORIEGA e SÖNDAHL, 1993; BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE, 1996).

A partir dos agregados celulares contidos no calo embriogênico friável pode-se produzir embriões somáticos após o estabelecimento em meio líquido (cultura em suspensão), e posterior diferenciação em frascos Erlenmeyers ou em biorreatores. O rendimento embriogênico neste tipo de cultivo tem sido de 120.000 (van BOXTEL e BERTHOULY, 1996) a 400.000 (ZAMARRIPA et al., 1991) embriões por grama de matéria fresca de agregados celulares para genótipos robustas, e de 665 (NEUENSCHWANDER e BAUMANN, 1992) a 121.760 (CORDEIRO, 1999) embriões por grama de matéria fresca para genótipos da espécie arábica. Todavia, a embriogênese somática não pode ser induzida em explantes de alguns genótipos, e em outros o potencial embriogênico é expresso irregularmente, verificando-se ainda a não repetitividade de protocolos publicados. O efeito do genótipo na embriogênese somática tem sido relatado em outras espécies, como trigo (MAES et al., 1996), melão (YAVAD et al., 1996), alfafa (CHEN et al., 1987), milho (CLOSE e LUDEMAN, 1987) e em citros (GMITTER e MOORE, 1986).

SANTOS (2002) relatou que para o cultivar Catuaí (*Coffea arabica*) é necessário um período de cultivo maior em relação aos genótipos robustas para responder favoravelmente a calogênese, confirmando a maior reatividade deste genótipo. O genótipo arábica produziu calos embriogênicos após cinco meses quando a razão auxina/citocinina 1:5 foi mantida constante nos meios de indução e de diferenciação. Calos friáveis foram obtidos por SANTOS (2002) aos 10 meses de cultivo em meio de cultura contendo 20 µM de BAP e ágar como agente gelificante. Em todos os meios avaliados, o Catimor UFV 395-141 e os híbridos 337-610 e 447-12 não reagiram favoravelmente à produção de calos embriogênicos ou de calos embriogênicos friáveis.

FONTES et al. (2003) obtiveram a indução de calos friáveis embriogênicos em explantes foliares obtidos de sistemas caulinares de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho IAC H 2077-2-5-15 cultivados *in vitro*, com frequência de 32%. O meio de indução continha como regulador de crescimento no meio primário 2,4-D 2,26 μM + AIB 4,90 μM + 2iP 9,84 μM , e 2,4-D 4,52 μM + BAP 17,6 μM no meio secundário. Após a indução embriogênica de cultura líquida, estes autores obtiveram 17.500 embriões.g⁻¹ de matéria fresca de agregados celulares.

Considerando-se que as condições indutoras para a produção de calos friáveis embriogênicos possuem um caráter de genótipo-especificidade, diferentes combinações de meios de cultura foram testadas para a indução desta reação calogênica em explantes foliares de três híbridos, oriundos do programa de melhoramento genético da UFV-EPAMIG.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Estacas de plantas do campo experimental do programa de melhoramento do cafeeiro da Universidade Federal de Viçosa e da EPAMIG/CTZM, já haviam sido enxertadas por garfagem em porta-enxerto de Catuaí Vermelho contidos em vasos com capacidade para oito litros. As plantas assim obtidas estavam sendo mantidas em casa-de-vegetação efetuando-se regas periódicas e tratos culturais, conforme necessário.

Os genótipos utilizados para o desenvolvimento desse trabalho foram: UFV 395-141 (Catimor geração F₃), H 337-610 (F₁ obtido do cruzamento entre Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44 e Híbrido de Timor CIFC 832-1) e H 447-12 (F₁ derivado de Mundo Novo LCP 388-17-16 e Híbrido de Timor UFV 337-1). Estes híbridos possuem resistência à ferrugem e boa capacidade produtiva, no entanto, segregam quando propagados via semente. Cerca de três meses antes da coleta dos explantes, as plantas foram podadas.

2.2. Obtenção dos explantes foliares

Folhas recém expandidas do terceiro ramo plagiotrópico a partir do ápice foram coletadas em março de 2001 como fonte de explantes foliares. Aproximadamente 24 horas antes da retirada, as folhas das plantas na casa de vegetação foram pulverizadas com solução de Benlate[®] (2 g L⁻¹), Agrimicina[®] (2 g L⁻¹) e Mancozeb[®] (1 g L⁻¹), a fim de se reduzir infestações por fungos e bactérias.

As folhas coletadas foram lavadas em água corrente por 12 horas e desinfestadas após tratamento de 20 minutos em solução de hipoclorito de cálcio a 5% contendo Tween 20 a 0,04% (v/v), e lavadas quatro vezes em água deionizada autoclavada em câmara de fluxo de ar laminar. Foram cortados explantes com cerca de 7 x 7 mm, excluindo-se a nervura central e as margens das folhas utilizadas como fonte de explante. Estes explantes foram inoculados com a superfície adaxial em contato com o meio de cultura (SÖNDAHL et al., 1985), contidos em placas de Petri de poliestireno cristal estéreis, de 60 mm de diâmetro, com 12 mL de meio. Cada placa recebeu, inicialmente, cinco explantes, sendo o conjunto repetido vinte vezes.

2.3. Meios indutivos

Os meios de cultura utilizados para a indução calogênica continham macro e micronutrientes MS ½ força (MURASHIGE e SKOOG, 1962), complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), cisteína 0,272 mM, sacarose 30 g L⁻¹, Gelrite[™] 0,3%, e os reguladores de crescimento BAP nas concentrações de 0; 0,1; 1; 5; 10 e 20 µM e 2,4-D nas concentrações de 0; 1 e 10 µM, que originaram as associações descritas na tabela 1. Foram utilizados os sistemas de cultivo uni e bifásico, com o segundo meio (bifásico) introduzido na primeira repicagem, que ocorreu aos trinta dias do início da indução, sendo que o número de explantes por placa foi reduzido para três. As repicagens subseqüentes para os mesmos meios ocorreram a intervalos variando de 30 a 60 dias entre si. Todos os meios foram

preparados com água milli-Q. O pH foi corrigido para 5,6 com HCl ou NaOH; em seguida os meios foram autoclavados durante 20 minutos a temperatura de 121 °C e pressão de 1,1 atm. As placas foram fechadas com filme de PVC e mantidas em condições de obscuridade, em câmara de crescimento tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand), a 25± 2 °C.

TABELA 1 – Concentração (µM) de 2,4-D e de BAP utilizada nos meios de cultura indutivos da calogênese em explantes foliares dos híbridos UFV 395-141, H 337-610 e H 447-12; segundo a estratégia unifásica, apenas o meio primário, ou bifásica, meio primário e secundário.

TRATAMENTOS		MEIO PRIMÁRIO		MEIO SECUNDÁRIO	
		BAP	2,4-D	BAP	2,4-D
T1	B5	5	0	-	-
T1a	B5/D10	5	0	0	10
T1b	B5/B5D10	5	0	5	10
T2	B20	20	0	-	-
T2a	B20/D10	20	0	0	10
T2b	B20/B5	20	0	5	0
T3	B0,1 D1	0,1	1	-	-
T3a	B0,1D1/B0,1	0,1	1	0,1	0
T4	B1 D1	1	1	-	-
T4a	B1 D1/B1	1	1	1	0
T5	B10 D1	10	1	-	-
T5a	B10 D1/B10	10	1	10	0
T6	B1 D10	1	10	-	-
T6a	B1 D10/B1	1	10	1	0
T7	B10 D10	10	10	-	-
T7a	B10 D10/B10	10	10	10	0
T8	B20 D10	20	10	-	-
T8a	B20 D10/B20	20	10	20	0
T9	D10	0	10	-	-
T9a	D10/B5	0	10	5	0
T9b	D10/B20	0	10	20	0

(/) indica sucessão de meio primário/secundário.

2.4. Estabelecimento e manutenção das culturas celulares

Os calos friáveis embriogênicos foram cultivados em meio líquido de igual constituição (item 2.2) àqueles semi-sólidos de origem, sem o agente gelificante, contidos em Erlenmeyers. Na fase de estabelecimento houve uma sucessão de frascos de volumes crescentes (25, 50, 100 e 250 mL), que continham volumes de 5, 10, 25 e 100 mL de meio, respectivamente. A densidade de cultivo foi mantida em 10 g L^{-1} de MF (matéria fresca) de agregados celulares (ZAMARRIPA, 1991). Os Erlenmeyers foram fechados com tampões de celulose recobertos com papel-alumínio e filme de PVC. Uma vez estabelecidas, as culturas líquidas eram subcultivadas em 100 mL de meio contido em erlenmeyer de 250 mL, a intervalos de 14 dias, mantendo-se a densidade de cultivo (10 g L^{-1}). Os frascos, devidamente fechados, eram mantidos sobre agitador com movimento giratório excêntrico a 110 rpm e sob um fotoperíodo de 12 h, temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e irradiância de $4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

2.5. Indução da embriogênese

Para a diferenciação de agregados celulares a embriões, utilizou-se a biomassa recuperada de culturas líquidas em fase de multiplicação que foi transferida para os meios líquidos MD1 (sais MS) e MD2 ($\frac{1}{2}$ MS), na densidade de 1 g L^{-1} em erlenmeyer com capacidade de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido. Ambos meios continham BAP 5 mM, complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), cisteína 0,272 mM e sacarose 30 g L^{-1} .

Após 21 dias, fez-se a pesagem da MF da biomassa recuperada de cada frasco, e procedeu-se a subcultura na mesma densidade. Aos 15 e 30 dias desta última subcultura, renovou-se o meio líquido após decantação da biomassa, seguido da vertedura do meio líquido velho. Cerca de 12 dias após a última repicagem, recuperou-se a biomassa com embriões, e obteve-se o peso da sua MF. Em seguida, efetuaram-se contagens de embriões em três amostras, por Erlenmeyer, de 0,25 g de biomassa imobilizada em meio semi-sólido, contendo

macro-MS meia-força e Gelrite™ 0,3% (CORDEIRO, 1999). Mediram-se, também, os comprimentos dos embriões imobilizados em meio semi-sólido, a partir da imagem digitalizada (Scanner Genius- ColorPage- Vivid III), utilizando-se o Analisador de imagem – Image Pro Plus.

2.6. Desenvolvimento dos embriões

Cinquenta embriões somáticos por tratamento, provenientes de culturas líquidas e no estágio torpedo, foram semeados em 5 placas de Petri de poliestireno (60 mm de diâmetro), contendo 12 mL do meio semi-sólido M4 (ZAMARRIPA et al., 1991). Este meio contém sais MS ½ força, Na₂EDTA 18,65 mg L⁻¹, FeSO₄.7H₂O 13,9 mg L⁻¹, mio-inositol 100 mg L⁻¹, ácido nicotínico 1 mg L⁻¹, piridoxina-HCl 1 mg L⁻¹, tiamina-HCl 1 mg L⁻¹, biotina 10⁻² mg L⁻¹, pantotenato de cálcio 1 mg L⁻¹, BAP 1 µM, sacarose 10 g L⁻¹ e Gelrite™ 3 g L⁻¹. O pH foi ajustado para 5,6 anteriormente à autoclavagem. Após quatro semanas de cultivo, os embriões cotiledonares foram transferidos para o mesmo meio descrito anteriormente, desprovido de BAP (M5 ZAMARRIPA et al., 1991) aonde permaneceram por mais cinco semanas. Após este período, as plântulas foram transferidas para substrato organo-vegetal + vermiculita expandida (Substrato Agrícola Bioplant – Campo Verde) autoclavado e umedecido com água destilada autoclavada, contido em bandejas de plástico, sendo o conjunto envolvido com filme PVC. Estas bandejas foram mantidas em sala de crescimento sujeitas a um fotoperíodo de 12 h, temperatura de 25 ± 2 °C e irradiância de 34 µmol m⁻² s⁻¹. Após quatro semanas nestas condições, as bandejas com as plantas foram transferidas para casa de vegetação, sob sombrite, quando se efetuou a abertura progressiva do filme PVC, reduzindo-se, gradualmente, a umidade relativa do ar.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Indução calogênica

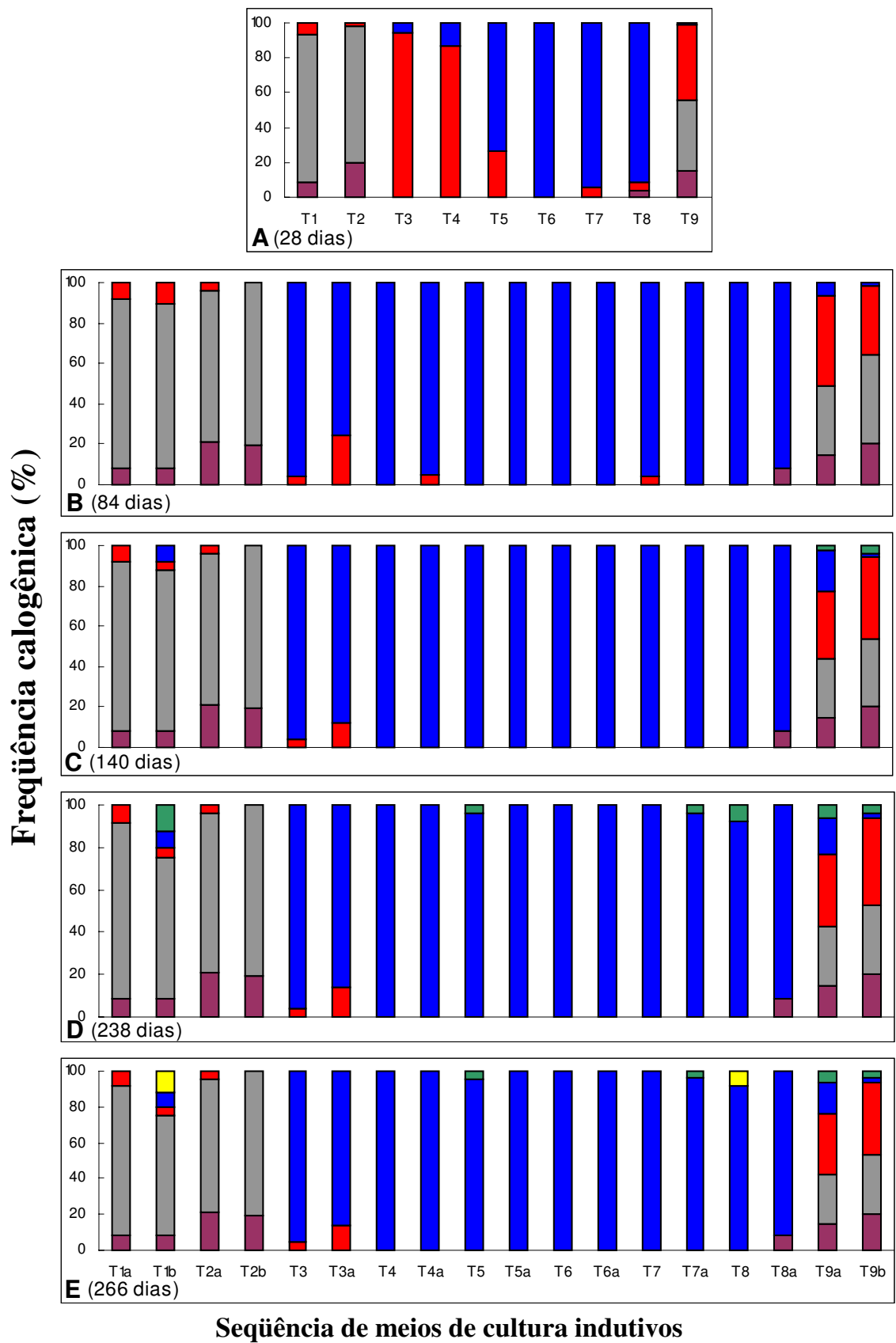
A avaliação da reação calogênica nos explantes induzidos em meio semi-sólido foi feita de acordo com a caracterização apresentada na Figura 1 do Capítulo 1.

3.1.1. Indução calogênica no genótipo UFV 395-141 (Catimor geração F₃)

Nas primeiras semanas de cultivo, vários explantes obtiveram uma coloração marrom-escura, como consequência da oxidação de compostos fenólicos presentes nas células. Esta coloração marrom pode ser atribuída à presença de quinonas, um produto da oxidação dos compostos fenólicos. Alta concentração de compostos fenólicos, como os ácidos clorogênicos, caféico, ferúlico, p-cumárico, trans-cinâmico e outros, são característicos do gênero *Coffea*. Este fato foi também observado por outros autores como SÖNDAHL e SHARP (1977), GARCIA e MENENDEZ (1987) e JUMA (1994).

A Figura 1 apresenta a frequência calogênica do genótipo Catimor em resposta aos diferentes meios indutivos, em cinco diferentes épocas de avaliação ao longo do período de cultivo.

Figura 1 – Caracterização temporal da reação calogênica de explantes foliares do genótipo Catimor UFV 395-141 submetidos a diferentes seqüências de meios de indução. T1: B5; T1a: B5/D10; T1b: B5/B5D10; T2: B20; T2a: B20/D10; T2b: B20/B5; T3: B0,1D1; T3a: B0,1D1/B0,1; T4: B1D1; T4a: B1D1/B1; T5: B10D1; T5a: B10D1/B10; T6: B1D10; T6a: B1D10/B1; T7: B10D10; T7a: B10D10/B10; T8: B20D10; T8a: B20D10/B20; T9: D10; T9a: D10/B5; T9b: D10/B20 (■ sem reação, ■ calo cicatricial, ■ calo nodular, ■ calo misto, ■ calo embriogênico, ■ calo friável embriogênico).



Aos 28 dias de cultivo, observou-se que a utilização de apenas citocinina no meio de cultivo promoveu a formação de calos cicatriciais na maioria dos explantes, em cerca de 85% dos cultivados com 5 μM de BAP (B5) e em 80% quando cultivado com 20 μM (T2). Nos meios de cultivo com a utilização de 2,4-D, verificou-se que na concentração de 1 μM , associado ao BAP 0,1 e 1 μM (T3), a maioria dos explantes produziu calos nodulares, enquanto que a adição de 10 μM de BAP, associado a 1 μM de 2,4-D (T5) produziu calos mistos em aproximadamente 75% dos explantes. Nota-se que calos mistos também foram formados em quase todos os explantes cultivados com 10 μM de 2,4-D, associado ao BAP (T6 a T8). Tais calos, no entanto, não foram encontrados quando apenas 10 μM de 2,4-D estavam presentes ao meio de cultivo (T9). Nessa condição, obtiveram-se cerca de 45% de explantes com calos cicatriciais e cerca de 42% de calos nodulares, ficando os demais explantes sem reagir à indução calogênica. Maior produção de calos mistos em meios utilizando-se 2,4-D foi semelhantemente verificada por CORDEIRO (1999).

A substituição de BAP por 2,4-D (T1a e T2a) não resultou em alteração na calogênese do genótipo Catimor até o 266^o dia de cultivo, uma vez que a maioria dos explantes apresentou calos cicatriciais (> 80%), sendo baixa a frequência de calos nodulares. A redução de 20 μM de BAP para 5 μM (T2b) no meio secundário também não resultou em modificações na frequência calogênica dos explantes de Catimor, que permaneceram apenas com calos cicatriciais na maioria dos explantes. CORDEIRO (1999), reduzindo a concentração de BAP de 22 μM para 5 μM no meio secundário, obteve a formação de calos embriogênicos, e, associado à utilização de sais MS na metade de sua concentração, obteve cerca de 40% de calos embriogênicos friáveis.

No genótipo Catimor (geração F₆, descendente da progênie CIFIC 7960 – F₅) GARCIA e MENENDEZ (1987) relataram que na ausência de 2,4-D a produção de calos foi quase nula ou muita baixa, encontrando-se um aumento na produção do mesmo ao se elevar a concentração deste regulador de crescimento. Estes autores relataram ainda que uma maior produção de calo no explante foi maior na associação ao BAP em relação a KIN.

Com a substituição de 10 μM de 2,4-D no meio primário para BAP 5 e 20 μM de BAP no meio secundário (T9a), observaram-se calos embriogênicos em, respectivamente, 2 e 4% dos explantes aos 140 dias de cultivo. Aos 238 dias de cultivo, o tratamento D10/B5 (T9a) apresentou 6,38% de explantes com calos embriogênicos, com cerca de sete embriões por explante. A seqüência de meios D10/B20 (T9b) apresentou 4% de explantes com calos embriogênicos, no entanto, com 42 embriões por explante, em média, sendo um número superior ao tratamento D10/B5 (T9a) (Figuras 1D e 2).

Neste mesmo período de cultivo (238 dias) novos tratamentos também apresentaram a produção de calos embriogênicos nos explantes. A seqüência de meios B5/D10 (T1a) produziu 12% de calos embriogênicos, com média de 35 embriões por explante (Figuras 1D e 2). Após outras quatro semanas de cultivo, observou-se que agregados celulares foram formados nos explantes com embriões, formando-se, assim, os calos friáveis embriogênicos (frequência de 12% dos explantes totais cultivados).

A seqüência de meios B20D10 (T8) também produziu calos embriogênicos na frequência de 8% com 22 embriões por explante em média (Figuras 1D e 2). Neste tratamento também foi observada a conversão dos calos embriogênicos para friáveis. Os agregados celulares obtidos foram transferidos para um meio líquido correspondente, sem o agente gelificante.

Nos trabalhos de GARCIA e MENENDEZ (1987) a maior produção de embriões foi obtida após um tratamento de oito semanas em meio com 1 mg L^{-1} de 2,4-D e 4 mg L^{-1} de KIN, sendo posteriormente transferidos para um meio de diferenciação com 0,05 mg L^{-1} de ANA e 0,5 mg L^{-1} de KIN. Após um período de onze semanas neste meio o calo começou a produzir embriões, primeiro em baixa frequência (entre um e cinco por explante) e depois de oito meses e meio chegou a se observar cerca de quarenta e dois embriões em um dos explantes. Sem dúvida, apenas os meios com 1 mg L^{-1} de 2,4-D e concentrações de BAP maiores que 2 mg L^{-1} é que originaram calos embriogênicos, sendo que os altamente embriogênicos eram provenientes dos meios com 8 mg L^{-1} ou mais de

BAP. Cerca de 75 embriões foram induzidos em um só explante, ao cultivar os tecidos por 14 semanas em meio com 1 mg L^{-1} de 2,4-D e 8 mg L^{-1} de BAP.

MENÉNDEZ-YUFFÁ e GARCIA (1997) obtiveram no genótipo Catimor cerca de 65% de calos embriogênicos após oitos meses de cultivo em meio com 2,4-D + BAP no meio primário e ANA no meio secundário. Os calos embriogênicos apresentaram 87 embriões somáticos por explante; entretanto, não houve a formação de calos embriogênicos friáveis.

Os outros tratamentos que apresentaram a formação de embriões foram o B10D1 (T5) (4,17%) com número médio de quatro embriões por explante e o B10D10/B10 (T7a) (4%) com média de cinco embriões por explante, inferiores aos demais que produziram embriões somáticos (Figuras 1D e 2).

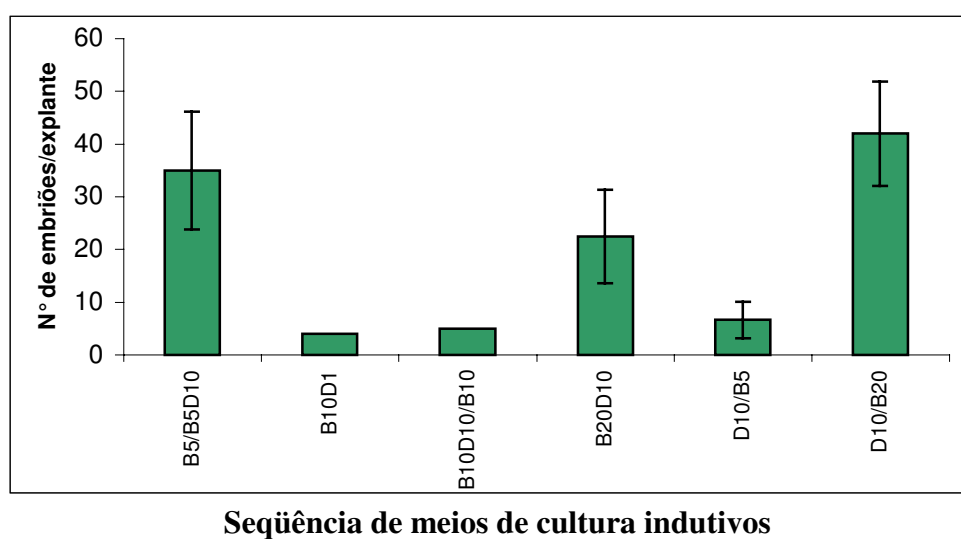


Figura 2 – Número total de embriões nos calos embriogênicos do genótipo Catimor UFV 395-141 aos 238 dias de pós-indução em resposta aos meios de cultura. As barras indicam o erro padrão da média.

3.1.2. Indução calogênica de H 337-610 (híbrido F₁)

Na indução calogênica do H 337-610, verificou-se que, aos 28 dias de cultivo em meio com apenas citocinina BAP, a maior frequência foi a de calos cicatriciais. Com a concentração de 5 µM de BAP (T1), 78,89% dos explantes reagiram a esse tipo de calo, além de 11,11% de calos nodulares e 10% sem reação (Figura 3A). Com 20 µM de BAP (T2), observou-se 67,11% de calos cicatriciais, 30,21% sem reação e 2% de calos nodulares.

A utilização de 2,4-D associada ao BAP promoveu a formação de calos nodulares (41,3%) e mistos (58,7%) no tratamento com 0,1 µM de BAP + 1 µM de 2,4-D (T3). Nos demais tratamentos, com a associação destes dois reguladores, a produção de calos mistos foi superior a 87%. Quando no primeiro mês de cultivo foi utilizado apenas 10 µM de 2,4-D (T9), a frequência calogênica foi de 34,44% de calos cicatriciais, 47,78% de calos nodulares, 2,2% de calos mistos e 15,56% de explantes sem reação (Figura 3A).

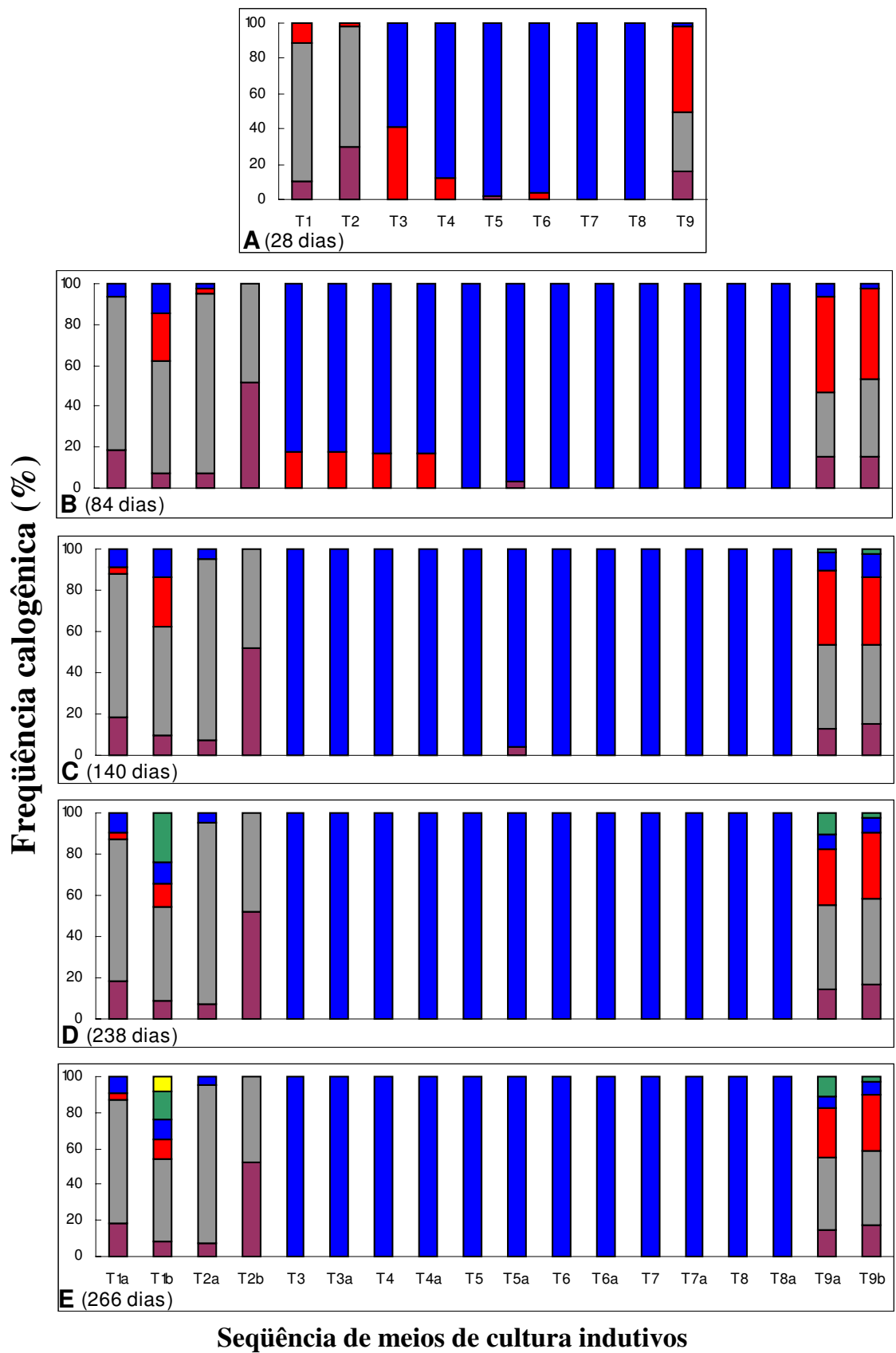
A substituição da citocinina pelo 2,4-D na seqüência de meios B5/D10 (T1a) não alterou a indução calogênica no híbrido H 337-610, sendo que 68,75% dos explantes apresentaram calos apenas cicatriciais e 9,38% calos mistos até o final do período avaliado (266 dias). Fato semelhante também ocorreu no tratamento B20/D10 (T2a), onde a maioria dos calos foi do tipo cicatricial (Figuras 3B-E). A redução na concentração de BAP no meio secundário no tratamento B20/B5 (T2b) promoveu apenas a formação de calos cicatriciais em 48% dos explantes e 52% dos explantes não reagiram à indução. Nos tratamentos onde os meios de cultura do primeiro mês de indução continham BAP e 2,4-D (T3 a T8a), apresentaram calos mistos na totalidade dos explantes (aos 266 dias), mesmo quando o 2,4-D foi suprimido do meio de cultivo (Figura 3E).

Calos embriogênicos somente foram formados aos 238 dias de cultivo. Esta indicação ocorreu quando os explantes foram cultivados com 5 µM de BAP no meio primário e acrescentado 10 µM de 2,4-D ao meio secundário (T1b). A frequência de calos embriogênicos foi de 23,91%, com média de 37 embriões por explante. Este tipo de calo também foi formado quando o meio primário continha

apenas 2,4-D, seguido da substituição da auxina por 5 e 20 μM de BAP (T9a e T9b), no meio secundário, com frequência de 10,71 e 2,44%, respectivamente, de calos embriogênicos, com 24 e 28 embriões por explante (Figuras 3D e 4). Nestes tratamentos prevaleceu a formação de calos cicatriciais e nodulares.

Calos friáveis embriogênicos foram formados a partir dos calos embriogênicos no tratamento B5/B5D10 (T1b) em 8,7% dos explantes, aos 266 dias de cultivo. Os demais tratamentos que haviam formado calos embriogênicos permaneceram inalterados até este período de cultivo (Figura 3E).

Figura 3 – Caracterização temporal da reação calogênica de explantes foliares do híbrido H 337-610 submetidos a diferentes seqüências de meios de indução. T1: B5; T1a: B5/D10; T1b: B5/B5D10; T2: B20; T2a: B20/D10; T2b: B20/B5; T3: B0,1D1; T3a: B0,1D1/B0,1; T4: B1D1; T4a: B1D1/B1; T5: B10D1; T5a: B10D1/B10; T6: B1D10; T6a: B1D10/B1; T7: B10D10; T7a: B10D10/B10; T8: B20D10; T8a: B20D10/B20; T9: D10; T9a: D10/B5; T9b: D10/B20 (■ sem reação, ■ calo cicatricial, ■ calo nodular, ■ calo misto, ■ calo embriogênico, ■ calo friável embriogênico).



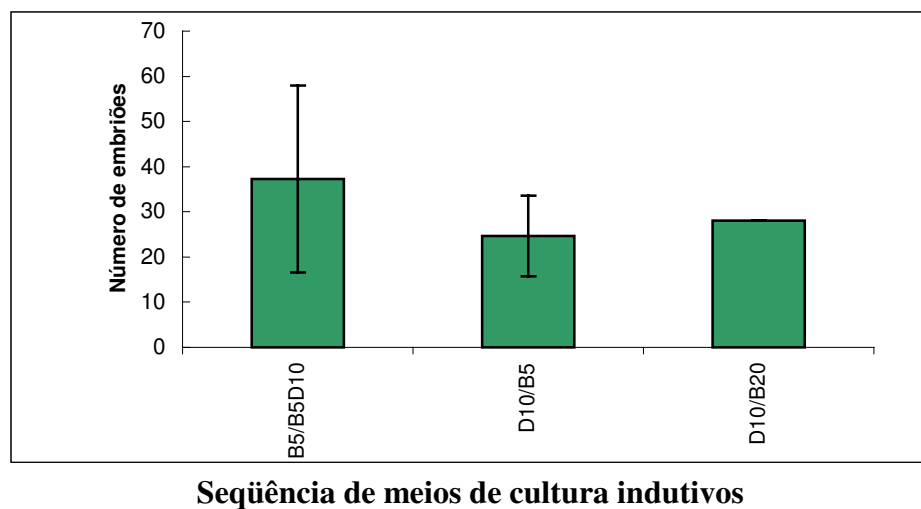


Figura 4 – Número total de embriões nos calos embriogênicos do híbrido H 337-610 aos 238 dias de pós-indução em resposta aos meios de cultura. As barras indicam o erro padrão da média.

3.1.3. Indução calogênica de H 447-12 (híbrido F₁)

Aos 28 dias de cultivo nos meios com apenas citocinina, a frequência calogênica foi de 89,58% e 69,39% de calos cicatriciais para os meios suplementados com 5 e 20 μM de BAP (T1 e T2), respectivamente, sendo que os demais explantes não reagiram à indução. A utilização simultânea de BAP e 2,4-D favoreceu a produção de calos nodulares e mistos, sendo que os calos mistos foram produzidos em maior proporção quando a dose de BAP de 10 μM foi associada a 1 μM de 2,4-D (T5) e quando se utilizou 10 μM de 2,4-D, independente da dose de BAP (T6, T7 e T8). Quando apenas 10 μM de 2,4-D foram utilizados no meio primário, a proporção da frequência calogênica foi de 37,18% de calos sem reação, 53,85% de calos cicatriciais e 8,97% de calos nodulares (Figura 5A).

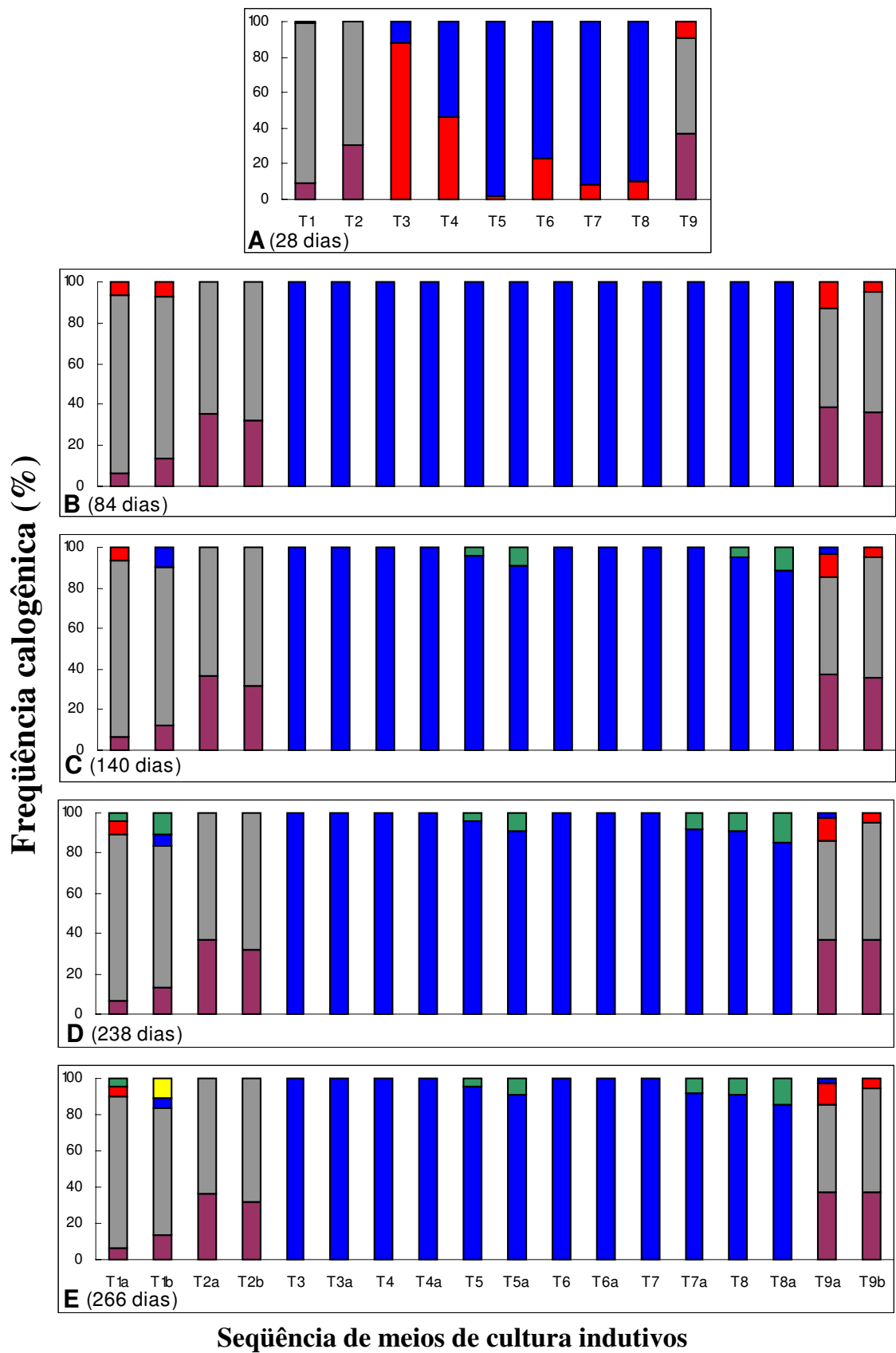
A substituição do BAP pelo 2,4-D no meio secundário, no tratamento B5/D10 (T1a), promoveu apenas a formação de calos nodulares em 6,38% dos

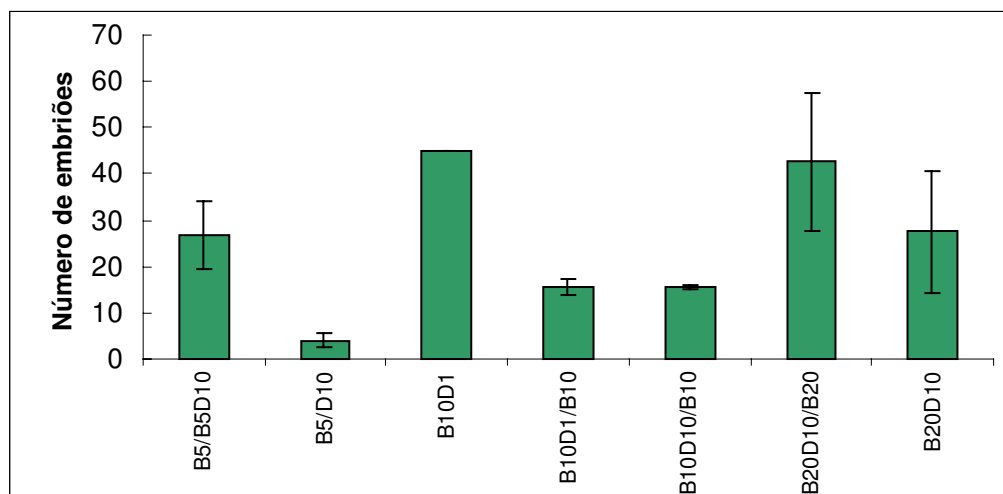
explantes aos 140 dias de cultivo. Quando 10 μ M de 2,4-D foi adicionado ao meio com 5 μ M de BAP (T1b), no meio secundário, calos mistos foram formados em 9,76% dos explantes e permaneceram com calos apenas cicatriciais. Nos tratamentos com a utilização simultânea da auxina e citocinina, calos mistos foram formados em todos os explantes aos 84 dias de cultivo. No entanto, aos 140 dias de cultivo, observou-se a formação de calos embriogênicos nos tratamentos B10D1/B10 (T5a), B10D1 (T5), B20D10/B20 (T8a), B20D10 (T8), com frequências de 8,7; 4,35; 11,11; 4,55 %, respectivamente.

A remoção do 2,4-D nestes tratamentos, em geral, dobrou a frequência de calos que formaram embrião neste período, apesar das frequências ainda serem baixas. Aos 238 dias de cultivo houve a formação de embriões somáticos no meio B10D10/B10 (T7a) em 8,33% de explantes. Os tratamentos B20D10/B20 (T8a) e B20D10 (T8) tiveram suas frequências de calos embriogênicos aumentadas. Este tipo de calo também foi obtido aos 238 dias de cultivo quando 5 μ M de BAP foram substituídos por 10 μ M de 2,4-D (T1a) ou acrescentado no meio secundário (T1b). Neste período foi avaliado o número de embriões por explante, sendo que foram formados em média 26, 4, 45, 15, 15, 43, 27, respectivamente, para os tratamentos B5/B5D10 (T1b), B5/D10 (T1a), B10/D1 (T5), B10D1/B10 (T5a), B10D10/B10 (T7a), B20D10/B20 (T8a) e B20D10 (T8). Em geral, números maiores de embriões por explante foram obtidos em meios com ambos reguladores de crescimento. Entretanto, o melhor tratamento para obtenção de calos embriogênicos, e em maior número, foi quando se utilizaram 20 μ M de BAP + 10 μ M de 2,4-D no meio primário, sendo a auxina suprimida no meio secundário (Figuras 5D e 6).

Calos friáveis embriogênicos foram obtidos na seqüência de meios B5/B5D10 (T1b), após 266 dias de cultivo em 10,81 % de explantes (Figura 5E). Estes calos foram formados a partir dos calos embriogênicos.

Figura 5 – Caracterização temporal da reação calogênica de explantes foliares do híbrido H 447-12 submetidos a diferentes seqüências de meios de indução. T1: B5; T1a: B5/D10; T1b: B5/B5D10; T2: B20; T2a: B20/D10; T2b: B20/B5; T3: B0,1D1; T3a: B0,1D1/B0,1; T4: B1D1; T4a: B1D1/B1; T5: B10D1; T5a: B10D1/B10; T6: B1D10; T6a: B1D10/B1; T7: B10D10; T7a: B10D10/B10; T8: B20D10; T8a: B20D10/B20; T9: D10; T9a: D10/B5; T9b: D10/B20 (■ sem reação, ■ calo cicatricial, ■ calo nodular, ■ calo misto, ■ calo embriogênico, ■ calo friável embriogênico).





Seqüência de meios de cultura indutivos

Figura 6 – Número total de embriões nos calos embriogênicos do híbrido H 447-12 aos 238 dias de pós-indução em resposta aos meios de cultura. As barras indicam o erro padrão da média.

3.1.4. Análise da indução calogênica de UFV 395-141, H 337-610 e H 447-12

De modo geral, a indução calogênica nos três híbridos desenvolveu-se de forma semelhante. Quando foram utilizados apenas 5 μM de BAP no meio primário, e substituindo ou acrescentando 2,4-D ao meio secundário, observou-se que grande parte dos explantes apresentou reação apenas nas bordas dos explantes (calos cicatriciais). Com a utilização de 20 μM de BAP no meio primário, reduzindo-se para 5 μM ou substituindo por 10 μM de 2,4-D no meio secundário, foram produzidos apenas calos cicatriciais e nodulares nos três genótipos testados. Diferentemente, CORDEIRO (1999) obteve calos friáveis embriogênicos no Catimor CRN 8661 quando a concentração de 22 μM de BAP foi reduzida para 5 μM .

A utilização conjunta de auxina e de citocinina no meio primário levou o desenvolvimento de calos mistos em praticamente todos os explantes cultivados, mesmo nos tratamentos em que houve cultivo secundário, onde o 2,4-D foi

suprimido do meio. Estes dados confirmam relatos de vários autores (GARCIA e MENENDEZ, 1987; CORDEIRO, 1999; SANTOS, 2002).

Fortes indicações foram encontradas de que a reação de um genótipo para um meio de cultura é devido à combinação de reguladores de crescimento aplicados exogenamente e o metabolismo hormonal endógeno. Um bloqueio na formação de calos embriogênicos de genótipos recalcitrantes podem ser o resultado de uma alta razão auxina/citocinina, o que foi observado por van BOXTEL (1994) após um mês de cultivo de explantes de café em meio de cultura contendo $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e 2 mg L^{-1} de 2iP.

No presente trabalho, utilizando-se o método de cultivo auxina + citocinina, calos embriogênicos foram diferenciados nos genótipos Catimor UFV 395-141 e H 447-12 em, respectivamente, dois e cinco tratamentos diferentes. Em outros trabalhos, a presença de auxina e de citocinina, principalmente no meio primário, foi essencial para a obtenção de calos embriogênicos do tipo HFSE (GARCIA e MENENDEZ, 1987; SONDAHL e SHARP, 1977).

Por outro lado, BIEYSSE et al. (1993) na espécie *C. arabica* var. Caturra, APONTE ACUÑA (1993) e CORDEIRO (1999), no genótipo Catimor CRN 8661 e, HATANAKA et al. (1991) na espécie *C. canephora*, não observaram a dependência de auxina para a indução de calos friáveis embriogênicos. Estas semelhanças e contrastes, observados nos resultados do presente trabalho, em relação à literatura, podem ser devidos aos efeitos experimentados por MOLINA et al. (2002). Estes autores relataram diferenças nas respostas à indução embriogênica direta e indireta que poderiam ser atribuídas às diversas origens genéticas dos progenitores dos genótipos testados. Outro fator relatado por MOLINA et al. (2002) é que diferenças nas respostas embriogênicas dos genótipos ocorrem em função da época do ano em que os explantes são coletados.

Quanto à formação de calos embriogênicos, nos três genótipos, verificou-se o início da formação de embriões aos 140 dias de cultivo. No genótipo UFV 395-141, seis seqüências de meios induziram calos embriogênicos (Figura 2), três seqüências para o H 337-610 (Figura 4) e em sete tratamentos para o H 447-

12 (Figura 6), em geral, com baixas frequências. O único tratamento que induziu a produção de embriões nos três genótipos foi B5/B5D10, sendo que agregados friáveis se formaram a partir destes calos. SANTOS (2002) verificou que no genótipo arábica Catuaí Vermelho IAC LC 2077 cultivado apenas com citocinina, a maioria dos explantes não apresentou reação aos 4 meses de cultivo. Calos embriogênicos (LFSE) foram observados aos sete meses, tanto na ausência quanto na presença de auxina exógena, sendo as maiores frequências observadas quando a auxina esteve presente. Calos friáveis e calos friáveis embriogênicos foram obtidos somente aos 10 meses, utilizando-se 20 µM de BAP e ágar como agente gelificante. No entanto, CORDEIRO (1999) constatou superioridade do Gelrite™ com relação ao ágar na indução embriogênica friável em explantes foliares de partes aéreas micropropagadas de Apoatã.

Os dados da indução calogênica nos três genótipos utilizados neste trabalho mostraram que ocorrem particularidades, de acordo com cada genótipo. Em geral, o H 337-610 mostrou-se menos reativo às condições indutoras testadas. Isto se deve ao fato de um menor número de condições ter induzido a formação de embriões, bem como apresentar menor frequência de calos embriogênicos aos 140 dias, em relação aos outros genótipos. Como houve a formação de embriões nos três genótipos, a presença de células responsivas nos explantes não seria o fator diferencial entre os genótipos, e sim a adequação das condições indutoras, principalmente relacionadas aos dos reguladores de crescimento. Células responsivas são aquelas que possuem sensibilidade (receptores específicos) aos reguladores de crescimento, conferindo competência ao tecido em responder a um sinal específico (HARADA, 1999).

Em muitas espécies, o processo de indução é observado ao se cultivar o explante em meio com concentração relativamente elevada de 2,4-D, sendo os calos ou a suspensão celular, posteriormente transferidos para um meio com baixa concentração ou mesmo desprovido dessa substância. As citocininas podem favorecer a produção de calo embriogênico, embora, em algumas espécies, possam não ser efetivas (GUERRA, 1999).

Os embriões somáticos na forma torpedo, obtidos a partir dos calos embriogênicos dos três híbridos, foram retirados e desenvolvidos satisfatoriamente segundo metodologia descrita no item 2.5, sendo as plântulas mantidas *in vitro* para manutenção de germoplasma e fonte de explante.

3.2. Estabelecimento das culturas líquidas

As frequências de calos friáveis embriogênicos obtidas nos três genótipos foram relativamente baixas (12% para Catimor UFV 395-141, 8,7% para H 337-610 e 10,81% para H 447-12), mas suficientes para o estabelecimento e multiplicação dos agregados celulares em culturas líquidas, visando a propagação em grande escala.

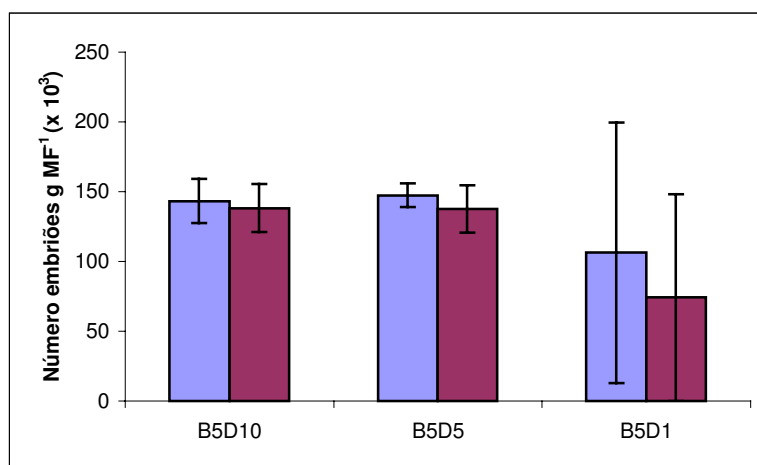
Culturas líquidas dos agregados celulares foram estabelecidas dos três híbridos, a partir dos agregados celulares dos calos friáveis embriogênicos obtidos na seqüência de meios B5/B5D10, e do meio B20D10, obtido apenas no genótipo Catimor utilizado. Todavia, os agregados obtidos em resposta ao meio B20D10 oxidaram-se rapidamente em meio líquido com perda do potencial embriogênico. Esta oxidação ocorre pelo acúmulo de compostos fenólicos formados pelas substâncias produzidas no metabolismo secundário das células, formando novos compostos, como as quinonas. A densidade de cultivo dos agregados celulares estabelecida em 10 g L^{-1} de meio (ZAMARRIPA, 1991), e o intervalo entre as repicagens de 14 dias, considerado um tempo aceitável quando se deseja crescimento rápido da massa celular (van BOXTEL, 1994), foi eficiente em manter a cultura de células indiferenciadas.

Calos friáveis embriogênicos obtidos a partir da seqüência de meios B5/B5D10 foram transferidos e multiplicadas no meio líquido B5D10. No entanto, parte das células foi transferida para novos meios (B5D5 e, subsequentemente B5D1) a fim de se reduzir a concentração de 2,4-D, pois se trata de uma auxina com elevado poder de reação. A indução da diferenciação dos agregados em embriões foi feita a partir destes três meios de manutenção, nos três híbridos.

3.3. Indução da diferenciação embriogênica

3.3.1. Diferenciação embriogênica de UFV 395-141 (Catimor, geração F₃)

Embriões somáticos foram diferenciados em todos os meios de manutenção dos agregados celulares do genótipo UFV 395-141. O número médio de embriões por grama de matéria fresca de agregados celulares (embriões.g⁻¹ MF) não diferiu entre os meios de manutenção, bem como nos meios de diferenciação (MD1 e MD2). No entanto, quando se reduziu a concentração de 2,4-D para 1 µM no meio de manutenção, verificou-se um elevado erro padrão da média, devido à ocorrência de dois frascos de manutenção terem diferenciado poucos embriões, e o terceiro ter produzido cerca de 290.000 embriões.g⁻¹ MF (Figura 7). Este fato mostrou que cada frasco Erlenmeyer das repetições deve ser considerado como uma cepa distinta, uma vez que a perda da capacidade embriogênica pode ocorrer em épocas distintas. Os fatores que levaram a esta perda não foram possíveis de serem avaliados, porque não foi uma ocorrência esperada. Sabe-se que o escurecimento do meio de cultivo ocorre em função do acúmulo de compostos fenólicos produzidos pelo metabolismo secundário das células. A oxidação destes compostos produz substâncias tóxicas, como quinonas, que podem ser responsáveis pela perda da capacidade embriogênica das células (SÖNDAHL e SHARP, 1977; GARCIA e MENENDEZ, 1987). A capacidade de diferenciação embriogênica deveria ser novamente estudada, avaliando-se períodos de coletas sistemáticas ao longo do tempo de manutenção.



Meios de manutenção dos agregados celulares

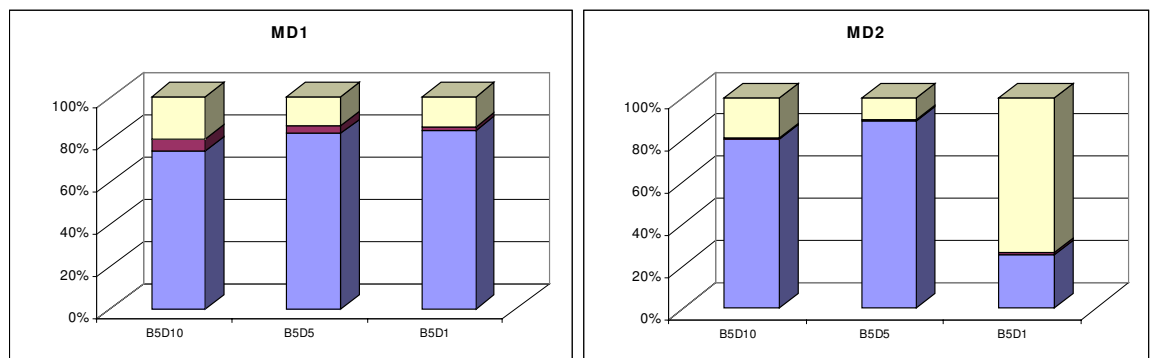
Figura 7 – Número de embriões por grama de matéria fresca de agregados celulares do híbrido Catimor UFV 395-141 em meios de diferenciação MD1–sais MS (■) e MD2 – sais ½ MS (■) em função do meio de manutenção das culturas líquidas. As barras indicam o erro padrão da média.

Quanto ao estágio de desenvolvimento dos embriões, observou-se que acima de 70% dos embriões estavam no estágio torpedo, nos três tratamentos de manutenção, quando o meio de diferenciação continha sais MS em total concentração – MD1 (Figura 8). Quando o meio de diferenciação possuía sais MS na metade da concentração – MD2, observou-se 70 e 80% de embriões torpedo, que só foram obtidos nos meios de manutenção B5D10 e B5D5. No meio de manutenção B5D1 apenas 20% dos embriões estavam neste estado, sendo que a maioria era apenas globular (Figura 8).

Diferenças expressivas foram observadas no comprimento dos embriões-torpedo diferenciados. Comprimentos significativamente maiores – cerca de 2,75 mm – foram obtidos nos embriões oriundos dos meios de manutenção B5D10 e B5D5, com o meio de diferenciação com sais MS total. Quando os embriões foram diferenciados no meio MD2, com metade dos sais MS, o comprimento médio foi cerca de 2,25 mm. Uma redução drástica no comprimento dos embriões foi verificada no meio de manutenção B5D1, em ambos os meios de diferenciação – MD1 e MD2 – com cerca de 0,85 e 0,58 mm de comprimento.

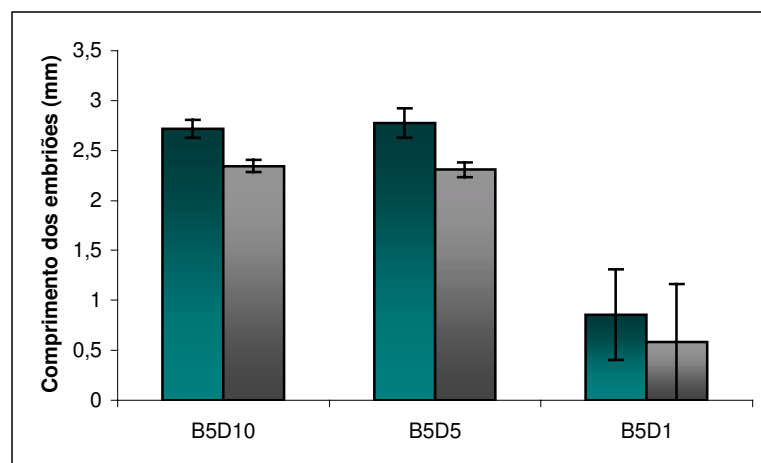
O tratamento que proporcionou o maior número de embriões.g⁻¹ MF, com maior porcentagem de embriões no estágio torpedo e com maior crescimento, foi

aquele em que se utilizaram os meios de manutenção B5D10 e B5D5, com o meio de diferenciação com total concentração dos sais MS. SANTANA (1989) avaliando o desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos, observou que o número de embriões desenvolvidos decresceu com a redução da concentração dos sais MS no meio de cultivo, semelhantemente aos dados obtidos neste trabalho com embriões somáticos.



Meios de manutenção dos agregados celulares

Figura 8 – Estádio de desenvolvimento dos embriões somáticos do híbrido Catimor UFV 395-141 após 60 dias da indução dos agregados celulares (■ globular, ■ cordiforme, ■ torpedo).



Meios de manutenção dos agregados celulares

Figura 9 – Comprimento médio dos embriões somáticos torpedos do híbrido Catimor UFV 395-141 após 60 dias da indução dos agregados celulares. Meios de diferenciação MD1– sais MS (■) e MD2 – sais 1/2 MS (■). As barras indicam o erro padrão da média.

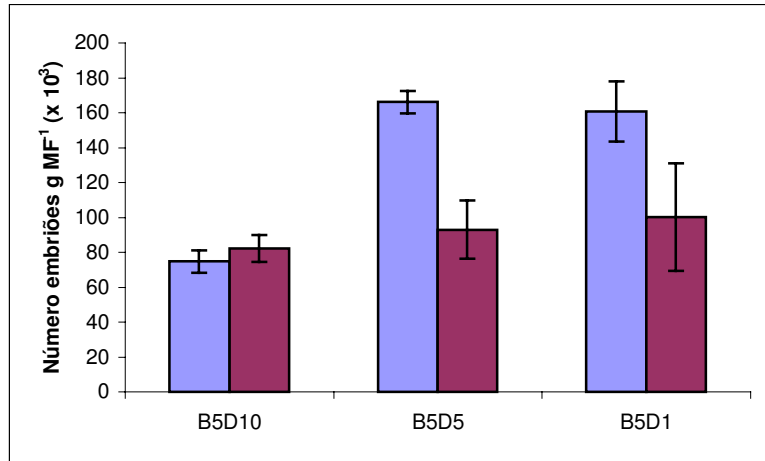
3.3.2. Diferenciação embriogênica de H 337-610 (Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44 e Híbrido de Timor CIFIC 832-1)

Maiores números de embriões a partir de agregados celulares de UFV 337-610 foram obtidos quando o meio de manutenção foi o B5D5 e B5D1, com cerca de 160.000 embriões.g⁻¹ MF, quando o meio de desenvolvimento dos embriões apresentava sais MS em total concentração – MD1. Quando o meio de diferenciação continha a metade dos sais MS, o número de embriões.g⁻¹ MF foi de cerca de 82.000, 93.000 e 100.000, respectivamente, para os meios de manutenção B5D10, B5D5 e B5D1, não diferindo entre si. Um menor número de embriões foi obtido no meio de manutenção B5D10, com cerca de 74.000 embriões.g⁻¹ MF (Figura 10). No entanto, quando o meio de desenvolvimento dos embriões foi o MD1, observou-se que acima de 80% dos embriões estavam no estágio torpedo, apresentando ainda, juntamente com os embriões do meio de manutenção B5D5/MD1, os maiores comprimentos (>2,6 mm) (Figuras 11 e 12). A porcentagem de embriões-torpedo para os meios de manutenção B5D5 e B5D1 foi de aproximadamente 65 e 50% para o meio de desenvolvimento MD1 e, 58 e 48% para o MD2 (Figura 12).

Quando os embriões foram obtidos no meio de manutenção B5D1 em ambos meios de diferenciação (MD1 e MD2) e, nos meios de manutenção B5D10, B5D5 e B5D1, com o meio de diferenciação com a metade dos sais MS – MD2, o comprimento médio dos embriões foi menor, menos de 2,2 mm.

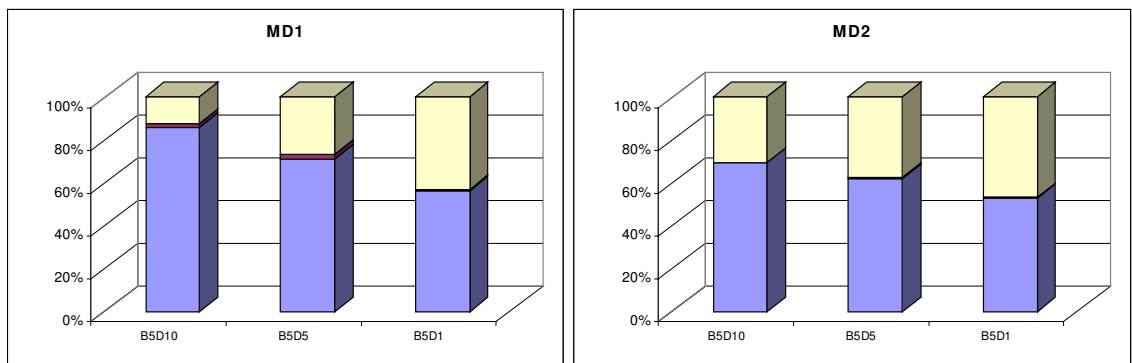
Estes dados mostram que a redução na fonte de nutrientes no meio de desenvolvimento reduz a porcentagem de embriões-torpedo e o comprimento dos mesmos.

Em análise conjunta, para o híbrido 337-610, os melhores resultados foram obtidos quando o meio de manutenção possuía 5 µM de BAP e de 2,4-D, pois produziu maior número de embriões, com cerca de 65% de embriões-torpedo com média de 2,77 mm.



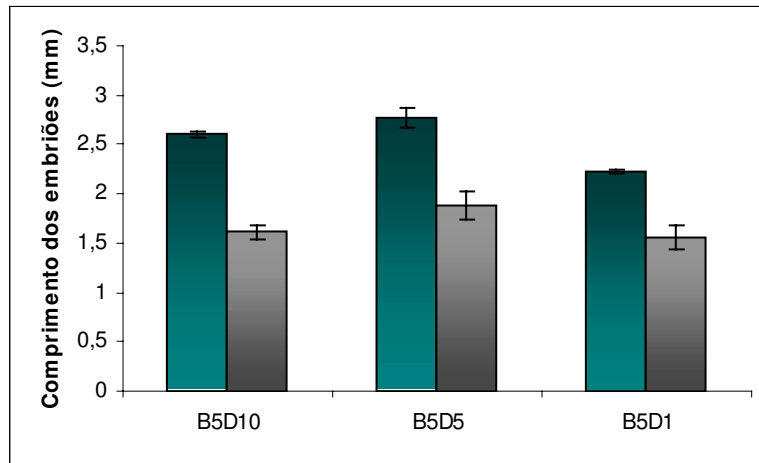
Meios de manutenção dos agregados celulares

Figura 10 – Número de embriões por grama de matéria fresca de agregados celulares do híbrido H 337-610 em meios de diferenciação MD1 – sais MS (■) e MD2 – sais ½ MS (■) em função do meio de manutenção das culturas líquidas. As barras indicam o erro padrão da média.



Meios de manutenção dos agregados celulares

Figura 11 – Estádio de desenvolvimento dos embriões somáticos do híbrido H 337-610 após 60 dias da indução dos agregados celulares (■ globular, ■ cordiforme, ■ torpedo)



Meios de manutenção dos agregados celulares

Figura 12 - Comprimento médio dos embriões somáticos torpedos do híbrido H 337-610 após 60 dias da indução dos agregados celulares. Meios de diferenciação MD1- sais MS (■) e MD2 - sais 1/2 MS (■). As barras indicam o erro padrão da média.

3.3.3. Diferenciação embriogênica de H 447-12 (Mundo Novo LCP 388-17-16 e Híbrido de Timor UFV 337-1)

Embriões somáticos diferenciados a partir das culturas líquidas do híbrido 447-12 só foram obtidos nos meios de manutenção B5D10 e B5D5, com respectivo rendimento de 90.800 e 16.000 embriões.g⁻¹ MF no meio de diferenciação MD1 e 93.600 e 41.800 embriões.g⁻¹ MF para o meio de diferenciação MD2.

Não houve diferença nos números de embriões obtidos no meio de manutenção B5D10 em ambos meios de diferenciação (MD1 e MD2). Estes valores também não diferiram dos resultados obtidos com o meio de manutenção B5D5 e com o meio de diferenciação MD2, devido ao grande erro padrão observado, em função de que em duas repetições não ocorreu a diferenciação de embriões, enquanto que na terceira repetição, o valor foi superior a 125.000 embriões.g⁻¹ MF (Figura 13). Esta observação foi semelhante ao ocorrido no genótipo Catimor no meio de manutenção B5D1, mostrando que cada frasco Erlenmeyer de manutenção deveria ser considerado como uma cepa, uma vez que

a perda da capacidade de diferenciação dos embriões pode ocorrer em épocas diferentes umas das outras.

Durante a multiplicação de suspensões celulares líquidas, os agregados celulares são mantidos em estado indiferenciado. van BOXTEL e BERTHOULY (1996) descreveram condições ótimas para a embriogênese somática em alta frequência em *C. canephora*, Arabusta e *C. congesta*. Estes autores obtiveram alta taxa de multiplicação cultivando os agregados celulares na densidade de 10 g L⁻¹ em meio MS modificado, e o potencial embriogênico foi mantido cultivando-se os agregados celulares na densidade de 5 g L⁻¹. Nessas condições, o potencial embriogênico em *C. canephora* foi mantido por dois anos.

Neste genótipo não houve a diferenciação de embriões quando o meio de manutenção possuía apenas 1 µM de 2,4-D, em ambos meios de diferenciação (Figura 13). Isto pode ter ocorrido devido a esta diferenciação ter sido realizada após 210 dias de cultivo de manutenção. A perda da capacidade dos agregados em se diferenciar em embriões parece ocorrer inicialmente nos meios com menores doses de 2,4-D. Deve-se lembrar que, no meio de manutenção com 5 µM de 2,4-D, dois frascos Erlenmeyer também já haviam perdido esta capacidade, que não foi observada quando 10 µM desta auxina foi mantida no meio de cultivo.

Apesar de não terem ocorrido diferenças expressivas nos meios de manutenção B5D10 e B5D5/MD2, observou-se que, no primeiro meio citado, ocorreu a formação de mais de 80% de embriões-torpedo, enquanto que no tratamento B5D5/MD2 somente 25% dos embriões estavam neste estágio de desenvolvimento (Figura 14). Neste tratamento foi observado ainda que os embriões apresentavam cerca de 0,50 mm de comprimento, sendo significativamente inferior aos demais tratamentos. Diferenças expressivas no comprimento dos embriões-torpedo também ocorreram nos meios de diferenciação MD1 e MD2, quando o meio de manutenção foi o B5D10. Médias superiores ocorreram quando o meio de diferenciação possuía sais MS total, com embriões de 2,7 mm, enquanto que com sais MS na metade da concentração, os embriões possuíam cerca de 1,93 mm de comprimento (Figura 15). Quantidades

suficientes de nutrientes são essenciais no processo de diferenciação, e não possuem caráter inibitório.

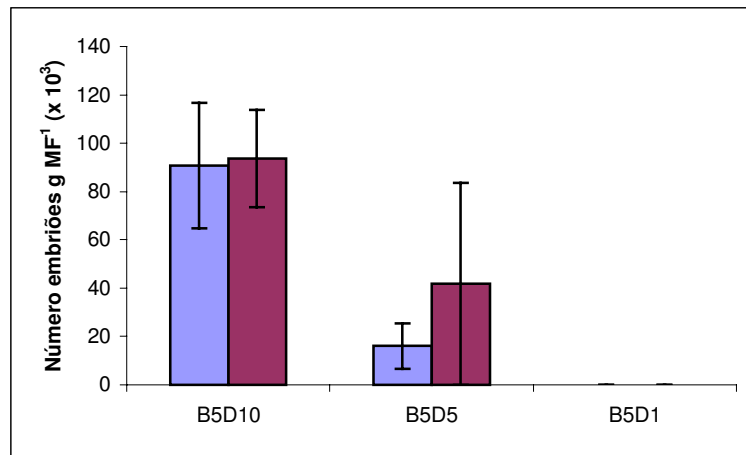
Com base nestes dados, as melhores condições para a obtenção de embriões somáticos, nas condições avaliadas, seriam a utilização do meio de manutenção B5D10 e do meio de diferenciação MD1. Nestas condições, observou-se a produção de 90.800 embriões, com cerca de 80% de embriões-torpedo, e média de comprimento de 2,7 mm.

Segundo YASUDA et al. (1995), as auxinas são, na maioria das vezes, essenciais na indução de calos e na embriogênese somática. Entretanto, o crescimento dos calos na presença de auxinas não é adequado para a manutenção da capacidade embriogênica, e a totipotência é rapidamente perdida durante o subcultivo. No caso dos explantes foliares de *Coffea arabica*, a citocinina é essencial na indução e na manutenção dos calos embriogênicos.

No entanto, nossos dados foram diferentes do trabalho de YASUDA, sendo que, quando o 2,4-D foi reduzido no meio de manutenção (B5D1), os calos friáveis perderam mais rapidamente a capacidade embriogênica. Por outro lado, a concentração de 10 μ M de 2,4-D (B5D10) apresentou melhores resultados referentes a essa capacidade embriogênica.

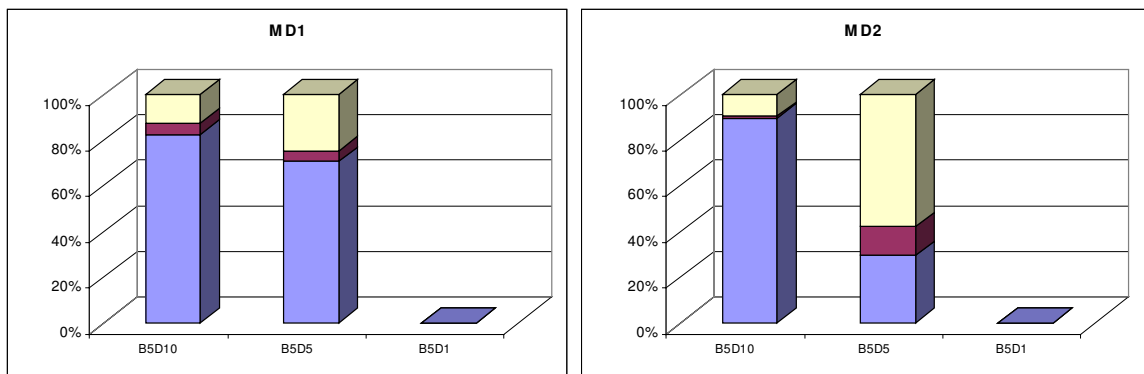
A embriogênese somática em cafeeiro, e em muitas outras espécies, é um processo muito assincrônico e todos os estágios do desenvolvimento embrionários podem ser encontrados simultaneamente. Além disso, os embriões do mesmo estágio de desenvolvimento (globular, cordiforme ou torpedo) apresentam diferenças no tamanho (MENÉNDEZ-YUFFÁ et al., 1994).

Na indução embriogênica via cultura líquida utilizando biorreator, NORIEGA e SÖNDAHL (1993) obtiveram 45.000 embriões/biorreator de 5 L em *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho. Após 14 semanas do início do cultivo a partir dos agregados celulares, amostras demonstraram que 25% dos embriões estavam no estágio torpedo, 45% no estágio cordiforme e 30% no estágio globular, com comprimentos de 3-4 mm, 1,5-2 mm e 0,7-1 mm, respectivamente. Para a indução dos calos friáveis, foi utilizado o 2,4-D + KIN no meio primário e ANA + KIN no meio secundário.



Meios de manutenção dos agregados celulares

Figura 13 – Número de embriões por grama de matéria fresca de agregados celulares do híbrido H 447-12 em meios de diferenciação MD1 – sais MS (■) e MD2 – sais ½ MS (■) em função do meio de manutenção das culturas líquidas. As barras indicam o erro padrão da média.



Meios de manutenção dos agregados celulares

Figura 14 – Estádio de desenvolvimento dos embriões somáticos do híbrido H 447-12 após 60 dias da indução dos agregados celulares (■ globular, ■ cordiforme, ■ torpedos)

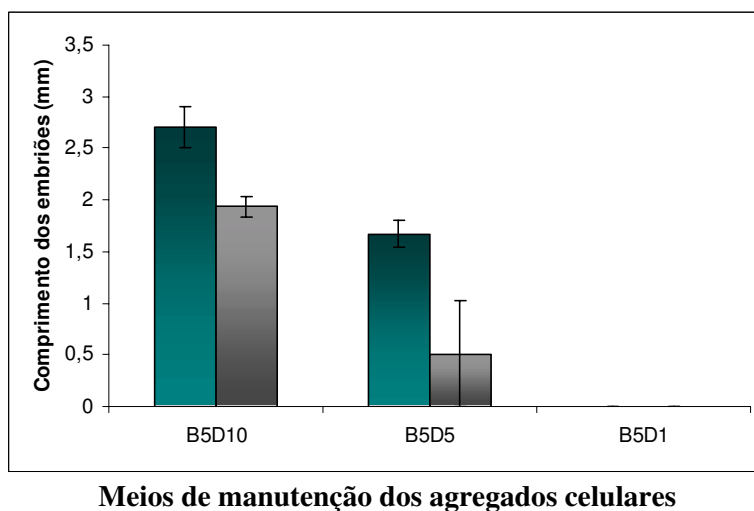


Figura 15 - Comprimento médio dos embriões somáticos torpedos do híbrido H 447-12 após 60 dias da indução dos agregados celulares. Meios de diferenciação MD1– sais MS (■) e MD2 – sais ½ MS (■). As barras indicam o erro padrão da média.

3.4. Desenvolvimento dos embriões

3.4.1. Desenvolvimento dos embriões de UFV 395-141 (Catimor, geração F₃)

A avaliação do desenvolvimento dos embriões somáticos em plântulas foi feita após dois meses na seqüência de meios de desenvolvimento. Foram considerados como desenvolvidos os embriões que apresentaram a iniciação da expansão das folhas, com a conseqüente produção de clorofila, demonstrada pela coloração verde das plântulas. A Figura 16 apresenta a porcentagem de desenvolvimento dos embriões do genótipo UFV 395-141.

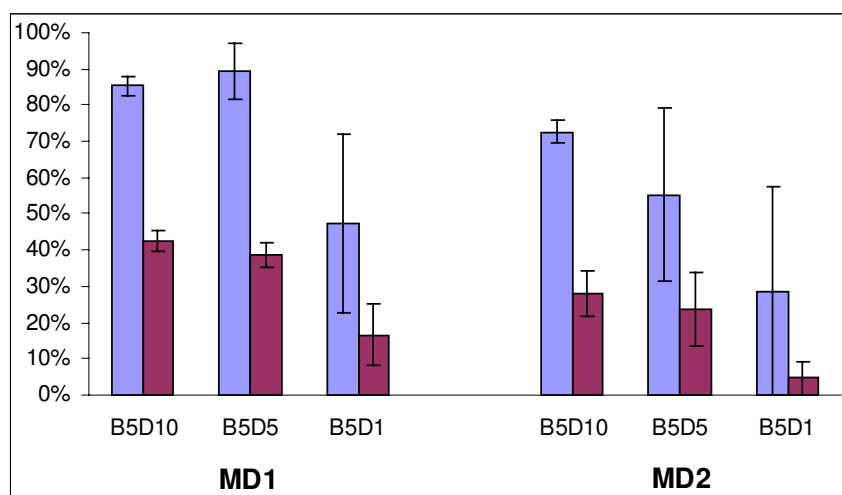


Figura 16 – Porcentagem de plântulas desenvolvidas em meio semi-sólido de UFV 395-141 (Catimor, geração F₃) após 9 semanas de cultivo. Meios de diferenciação MD1– sais MS e MD2 – sais ½ MS. (■ % de desenvolvimento dos embriões, ■ % de plântulas com raízes). As barras indicam o erro padrão da média.

Os embriões obtidos a partir dos meios de diferenciação com sais MS total apresentaram melhor taxa de desenvolvimento, sendo que, quando cultivados em meio de manutenção B5D10 (85,3%) e B5D5 (89,33%), foram superiores ao mantido no meio B5D1 (47,3%). A formação de plântulas com raízes foi menor em relação ao total de embriões desenvolvidos, com valores de 42,6; 38,6 e 16,5%, respectivamente para meios de manutenção B5D10, B5D5 e B5D1, apresentando tendência semelhante ao do desenvolvimento, em relação aos meios de manutenção e de diferenciação. Quando foram utilizados sais MS na metade da concentração, as freqüências de desenvolvimento dos embriões foram de 72,7; 55,27 e 28,7%, respectivamente para os meios de manutenção B5D10, B5D5 e B5D1. As taxas de plântulas com raízes foram de 28; 23,7 e 4,7%, respectivamente para os mesmos meios de manutenção.

3.4.2. Desenvolvimento dos embriões de H 337-610

Não houve diferença expressiva nas taxas de desenvolvimento em plântulas do híbrido 337-610, obtidos a partir de todos os meios de manutenção, quando o meio de diferenciação foi MD1 (MS total), com valores de 78% para o meio B5D10 e 83% para os meios B5D5 e B5D1. As porcentagens de plântulas com raiz foram menores, com 48; 53,3 e 46% (Figura 17).

Os valores obtidos de embriões com raízes, no meio MD2, foram de 30, 19,2 e 18%, respectivamente para os meios de manutenção B5D10, B5D5 e B5D1, sendo inferiores aos encontrados quando o meio de diferenciação possuía sais MS total.

Os embriões obtidos no meio de diferenciação com metade dos sais MS apresentaram menores valores de desenvolvimento de embriões, exceto quando originado do meio de manutenção B5D10, com taxas próximas (73,3%) às encontradas no meio MD1.

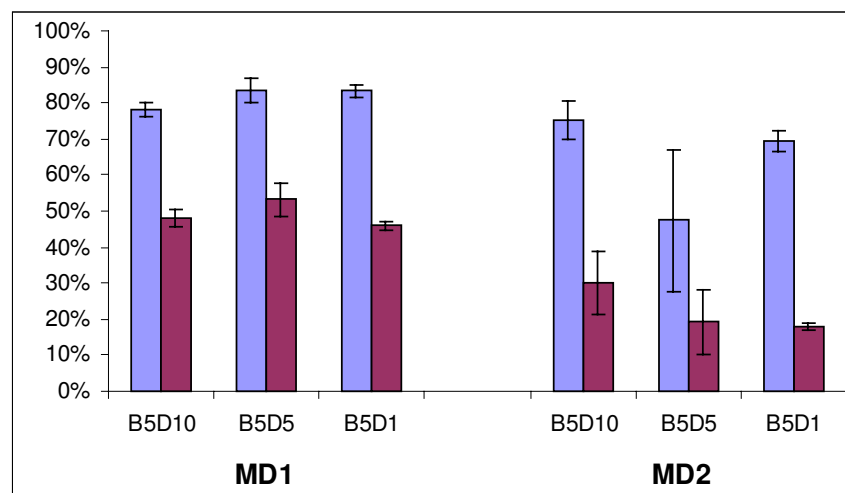


Figura 17 - Porcentagem de plântulas desenvolvidas em meio semi-sólido no híbrido F₁ 337-610 após 9 semanas de cultivo. Meios de diferenciação MD1 – sais MS e MD2 – sais ½ MS. (■ % de desenvolvimento dos embriões, ■ % de plântulas com raízes). As barras indicam o erro padrão da média.

3.4.3. Desenvolvimento dos embriões H 447-12

No híbrido 447-12, a maior porcentagem de plântulas foi obtida no meio B5D10, com meio de diferenciação MD1 (66%). Entretanto, não houve diferença expressiva quando o meio de diferenciação foi o MD2, para o mesmo meio de manutenção (47,3%). Quanto à formação de plântulas com raízes, as frequências foram de 39,3% para o meio com embriões oriundos do meio B5D10 e 22,6% para o meio B5D10/MD2 (Figura 18).

As taxas de obtenção de plântulas a partir dos meios de manutenção B5D5 foram expressivamente mais baixas. No entanto, valores superiores poderiam ter sido observados, uma vez que várias plântulas desse tratamento se desenvolveram, mas houve oxidação e morte dessas plântulas, quando mantidas no meio de desenvolvimento.

Embriões somáticos não foram obtidos neste genótipo, quando o meio de manutenção foi B5D1; portanto não houve condição de ser avaliado seu desenvolvimento.

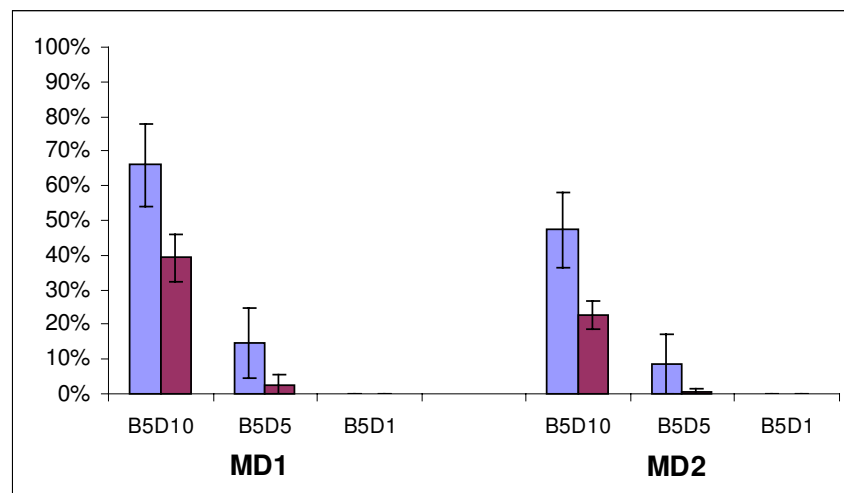


Figura 18 - Porcentagem de plântulas desenvolvidas em meio semi-sólido no híbrido F₁ 447-12 após 9 semanas de cultivo. Meios de diferenciação MD1– sais MS e MD2 – sais ½ MS. (■ % de desenvolvimento dos embriões, ■ % de plântulas com raízes). As barras indicam o erro padrão da média.

As menores taxas de obtenção de plântulas com raízes no três genótipos, em relação ao número de embriões desenvolvidos, podem ter ocorrido devido ao fato de que no meio de desenvolvimento de embriões em plântulas foi adicionado apenas citocinina no meio de cultivo. Tal fato pode ter favorecido mais a formação de parte aérea em relação à rizogênese. A adição de auxina em meios de desenvolvimento dos embriões poderia aumentar a porcentagem de plântulas com raiz, o que promoveria maior sucesso na fase de aclimação.

Com o objetivo de melhorar o rendimento da conversão dos embriões-torpedo em plântulas, ZAMARRIPA et al. (1991) observaram modificações das condições de cultivo de *Coffea canephora* (substratos, reguladores de crescimento e periodicidade das repicagens) que permitiram aumentar a taxa de conversão de 5 para 50-60%, quatro meses após o cultivo em meio semi-sólido. Após três semanas, mais de 90% dos embriões mostraram um crescimento completo e 40% desses embriões foram enraizados. Após oito semanas, o enraizamento atingiu 100% e os primeiros pares de folhas se desenvolveram. A aclimação em casa de vegetação pode ser efetuada desde que as plântulas apresentem dois a três pares de folhas.

GARCIA e MENENDEZ (1987) a partir de explantes foliares de Catimor (geração F₆, descendente da progênie CIFIC 7960 – F₅) observaram que no desenvolvimento dos embriões torpedo, as folhas cotiledonares tenderam a se expandir antes de iniciar o desenvolvimento das raízes. Nesse mesmo trabalho, em todos os tratamentos houve um número baixo de embriões germinados (20 a 27%), com um requerimento mínimo de oito semanas para se obter embriões com cotilédones expandidos e com raízes.

A taxa de regeneração de plantas a partir de embriões em fase de torpedo na cultivar Apoatã, obtida por SANTOS (2002), foi de 100%. González et al. (1994), citados por este mesmo autor, obtiveram taxas de 50 e 60% de conversão de embriões do genótipo UFV 395-141 em plântulas.

O processo de desenvolvimento dos embriões somáticos obtidos a partir da diferenciação em meio líquido e a aclimação em casa de vegetação estão ilustrados na Figura 19.

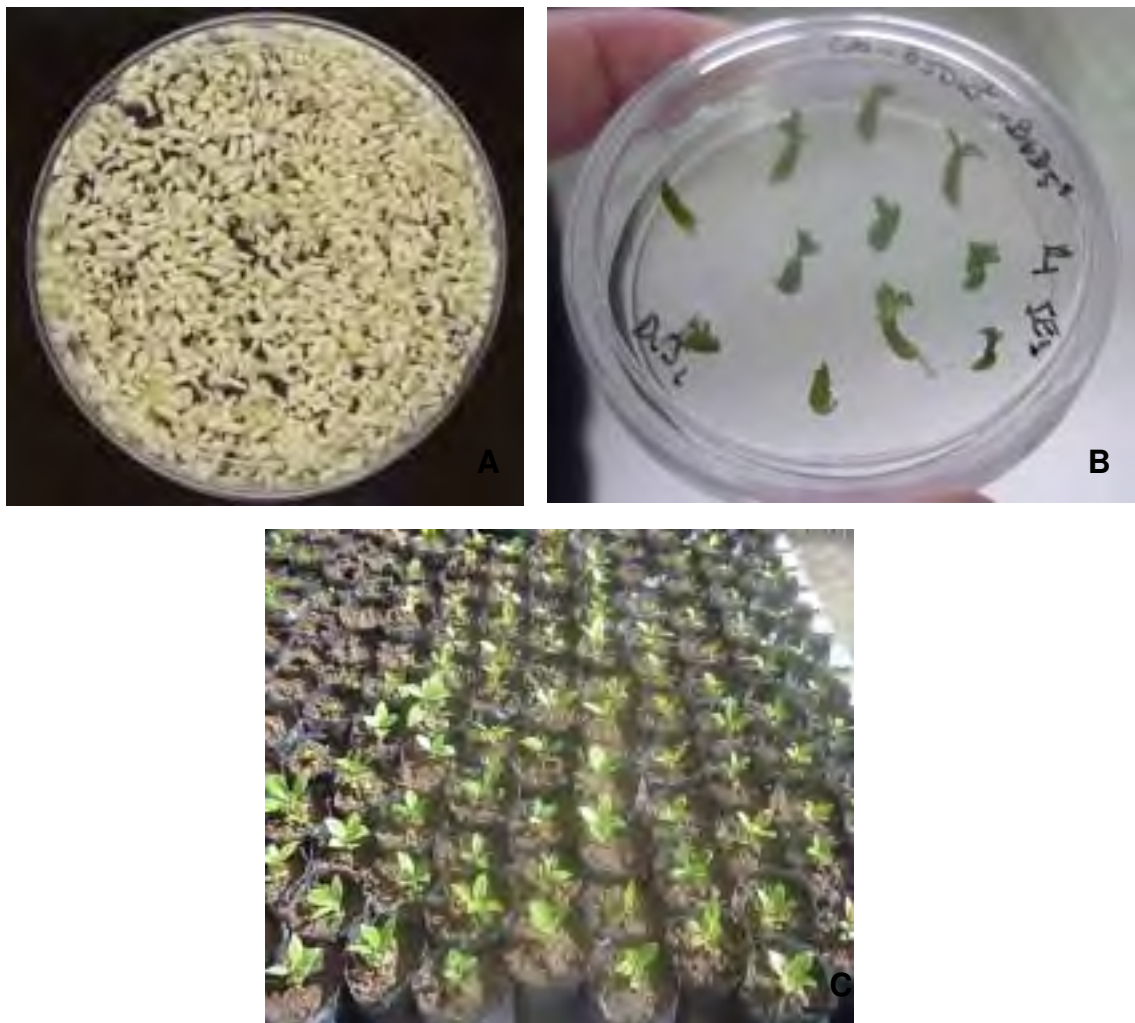


Figura 19 – Embriogênese somática indireta no genótipo Catimor UFV 395-141. Embriões tipo torpedo aos 63 dias do início da diferenciação de agregados celulares cultivados em meio líquido MD1 (A) e tipo cotiledonar após 28 dias da semeadura de embriões torpedo no meio semi-sólido M4 (B). Plantas clonadas crescendo em condições de casa de vegetação, em sacolas de polietileno contendo mistura de terra, adubo orgânico, superfosfato simples e cloreto de potássio (C), após três meses.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A propagação clonal de cafeeiros, em grande escala, requer a indução de calos friáveis embriogênicos (CFE) para o estabelecimento de culturas líquidas e sua diferenciação embriogênica posterior. Considerando-se que as condições indutoras para a produção de CFE's possuem, aparentemente, um caráter de genótipo-especificidade, testaram-se diferentes meios de cultura para a indução desta reação calogênica em explantes foliares de três genótipos heterozigóticos oriundos do programa de melhoramento genético da UFV-EPAMIG.

Os genótipos escolhidos foram UFV 395-141 (Catimor, geração F₃), H 337-610 (híbrido F₁ de Catuaí Vermelho x Híbrido de Timor CIFC 832-1), e H 447-12 (híbrido F₁ de Mundo Novo x Híbrido de Timor UFV 337-1). Explantes foliares destes cafeeiros, após desinfecção em solução de hipoclorito de cálcio 5% contendo Tween 20 0,04%, foram distribuídos com o lado adaxial em contato com o meio semi-sólido contido em placas de Petri estéreis. Cada placa recebeu, inicialmente, cinco explantes, sendo o conjunto repetido vinte vezes e mantidos em condições de obscuridade a 25°C. Os meios de cultura continham sacarose 30 g L⁻¹, Gelrite 0,3%, vitaminas de Gamborg combinados com macro e micronutrientes MS ½ força, cisteína 0,272 µM e os reguladores de crescimento BAP (B = 0; 0,1; 1; 5; 10 e 20 µM) e 2,4-D (D = 0; 1 e 10 µM), que originaram os seguintes tratamentos: B5/D10 (BAP 5 µM e 2,4-D 10 µM – a razão indica

sucessão de dois meios de cultivo, primário e secundário, com o segundo introduzido na primeira repicagem, que ocorreu aos trinta dias do início da indução); B5/B5D10; B20/D10; B20/B5; B0,1D1/B0,1; B0,1D1; B1D1/B1; B1D1; B1D10/B1; B1D10; B10D1/B10; B10D1; B10D10; B10D10/B10; B20D10/B20; B20D10, D10/B5 e D10/B20. As subculturas subseqüentes ocorreram a intervalos variando de 30 a 60 dias entre si.

Aos oito meses de pós-indução, calos embriogênicos (CE) foram induzidos em explantes dos três genótipos experimentados. Todavia, as suas condições indutoras confirmaram o caráter de genótipo-especificidade. Assim, as maiores produtividades embriogênicas ocorreram para os genótipos UFV 395-141 (45 embriões explante⁻¹) e os híbridos 337-610 (38 embriões explante⁻¹) e 447-12 (45 embriões explante⁻¹) quando 2,4-D foi suprido no meio primário e BAP no meio secundário, ambos os reguladores associados apenas no meio secundário e ambos os reguladores associados apenas no meio primário, respectivamente. CFE's foram induzidos em explantes foliares dos três genótipos. Embora para os híbridos 337 (10%) e 447 (12%) o único tratamento eficaz tenha sido B5/B5D10, explantes de UFV 395-141 (Catimor, geração F₃) induziram CFE's em resposta aos tratamentos B5/B5D10 e B20D10, nas frequências de 12 e 7% dos explantes, respectivamente. Estes calos foram utilizados para o estabelecimento de culturas líquidas. Todavia, aqueles calos friáveis embriogênicos obtidos em explantes de UFV 395-141 em resposta ao meio B20D10 oxidaram-se rapidamente em meio líquido com perda total do potencial embriogênico. Para todos os genótipos experimentados, os agregados celulares induzidos com B5/B5D10 foram distribuídos e transferidos para meios líquidos contendo B5D10, B5D5 e B5D1. Depois de estabelecidas tais cepas, avaliaram-se seus potenciais embriogênicos em meios contendo sais MS força total (MD1) ou ½ força (MD2).

Após oito semanas, a produtividade embriogênica do genótipo UFV 395-141 foi de 145.000, 140.000, 148.000, 140.000, 120.000 e 80.000 embriões.g⁻¹ de matéria fresca de agregados celulares para as cepas B5D10-MD1, B5D10-MD2, B5D5-MD1, B5D5-MD2, B5D1-MD1 e B5D1-MD2, respectivamente.

Relativamente ao híbrido 337-610, as produtividades embriogênicas foram 78.000, 80.000, 160.000, 90.000, 168.000 e 100.000 embriões.g⁻¹ de matéria fresca de agregados celulares para as cepas B5D10-MD1, B5D10-MD2, B5D5-MD1, B5D5-MD2, B5D1-MD1 e B5D1-MD2, respectivamente. Já para o híbrido 447-12, tais produtividades embriogênicas foram de 90.000, 92.000, 16.000 e 40.000 embriões.g⁻¹ de matéria fresca de agregados celulares para as cepas B5D10-MD1, B5D10-MD2, B5D5-MD1 e B5D5-MD2, respectivamente. A cepa B5D1, independentemente da concentração de macro e microelementos MS, não diferenciou embriões. Amostras de embriões somáticos tipo torpedo dos três genótipos foram tomadas para avaliação do desenvolvimento embriogênico, e apresentaram melhores respostas nos meios de manutenção e diferenciação B5D10/MD1 com respectivos valores de desenvolvimento e formação de raízes de 89 e 42%, no genótipo UFV 395-141. Para o híbrido H 337-610, esses valores foram de 83 e 53% nos meios B5D5/MD1; e para o híbrido H 447-12 foram obtidos 66 e 39,3% nos meios B5D10/MD1.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA, R., de PENA, M. Plant regeneration from protoplasts of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. cv. Caturra. **Plant Cell Rep.**, v. 10, p. 345-348, 1991.
- APONTE ACUÑA, M.E. Somatic embryogenesis induced by culture on single media in coffee plants from crosses of *Coffea arabica* by Timor Hybrid. In: COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15, 1993, Montpellier. **Annales...** Paris: ASIC, 1993, p. 338-349.
- BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 44, p. 169-176, 1996.
- BERTHOULY, M. Biotecnologías aplicadas al mejoramiento genético del café. In: Seminário Internacional sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira, 3, 1999. Londrina, PR, Brasil. **Anais...**, p. 9-22.
- BIEYSSE, D.; GOFFLOT, A.; MICHAUX-FERRIERE, N. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Can. J. Bot.**, v. 71, p. 1496-1502, 1993.

- CHEN, T.H.H., MAROWITCH, J. THOMPON, B.G. Genotypic effects on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of alfafa. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 8, p. 73-81, 1987.
- CLOSE, K.R., LUDEMAN, L.A. The effect of auxin-like plant growth regulators and osmotic regulation on induction of somatic embryogenesis from elite maize inbreds. **Plant Sci.**, v. 52, p.81-89, 1987.
- CORDEIRO, A. T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplastos em *Coffea***. Viçosa, Minas Gerais, Universidade federal de Viçosa. Dissertação de Doutorado. 111 p. 1999.
- de PENA, M. Somatic embryo induction and plant regeneration from *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. In: SIMPÓSIO SOBRE FERRUGENS DO CAFEIEIRO, 1983. Oeiras-Portugal. **Anais...** Oeiras: CIFC, 1983. p. 493-512.
- DUBLIN, P. Induction de bourgeons néoformés et embriogênese somatique. Deux voies de multiplication vegetative *in vitro* des caféiers cultivés. **Café Cacao Thé**, v. 24, n. 2, p. 121-130, 1980.
- DUBLIN, P. Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier arabusta. **Café Cacao Thé**, v. 25, n. 4, p. 237-242, 1981.
- DUBLIN, P. Techniques de reproduction vegetative *in vitro* et amelioration genétique chez lez caféirs cultivés. **Café Cacao Thé**, v. 28, n. 4, p. 231-244, 1984.
- 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 Rep.**, v. 19, p. 111-117, 1999.

- FONTES, M.A., CORDEIRO, A.T., FREDERICO, A.H., ZANETTI, R.S., CAMARGO, F.P., CRUZ, A.C.F., ZAMBOLIM, L. Embriogênese somática em explantes foliares de Catuaí Vermelho e de Robusta 201 via cultura líquida. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 3, 2003. Porto Seguro, BA, Brasil. **Anais...**, p. 94.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp. Cell Res.**, v. 50, p. 151-158, 1968.
- GARCÍA, E., MENÉNDEZ, A. Embriogenese somatique à partir d'explantos foliares del cafeto Catimor. **Café Cacao Thé**, v. 31, p. 15-22, 1987.
- GMITTER, F.G., MOORE, G.A. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: embryo production, germination and plant survival. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 6, p. 139-147, 1986.
- GUERRA, M.P., TORRES, A.C., TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v. 2, Embrapa, 1999. 354 p.
- HARADA, J.J. Signaling in plant embryogenesis. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 2, p. 23-27, 1999.
- HATANAKA, T., ARAKAWA, D., YASUDA, T., UCHIDA, N., YAMAGUCHI, T. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. **Plant Cell Rep.**, v. 10, p. 179 – 182, 1991.
- HERMAN, E., HAAS, G. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. **HortScience**, v. 10, p. 588-589, 1975.
- JUMA, C. Tissue culture for coffee: The case of Uganda. **Biotechnology and Development Monitor**, v. 20, September, 1994.

- 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 Sci.**, v. 121, p. 75-84, 1996.
- MENÉNDEZ-YUFFÁ, A., GARCÍA, E. G., NIETO, M. S. Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv. Catimor. **Plant Cell Rep.**, v. 13, p. 197-202, 1994.
- MENÉNDEZ-YUFFÁ, A., GARCÍA, E. G. Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee “Catimor”. **Protoplasma**, v. 199, p. 208-214, 1997.
- MICHAUX-FERRIERE, N., BIEYSSE, D., ALVARD, D., DUBLIN, P. Étude histologique de l’embryogenèse somatique chez *Coffea arabica*, induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de génotypes différents. **Café Cacao Thé**, v. 33, p. 207-217, 1989.
- MOLINA, D. M., APONTE, M. E., CORTINA, H., MORENO, G. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 71, p. 117 – 123, 2002.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NEUENSCHWANDER, B., BAUMANN, T. W. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Plant Cell Rep.**, v. 10, p. 608-612, 1992.
- NORIEGA, C.; SÖNDAHL, M.R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15, 1993, Montpellier. **Annales...** Paris: ASIC, 1993. p. 73-81.

- PIERSON, E.S.; van 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.
- 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.
- SANTANA, N. Efecto de algunos componentes del medio de cultivo sobre embriones de café (*Coffea arabica*, L.) cultivados *in vitro*. **Cultivo Tropicales**, v. 11, n. 4, 1989.
- SANTOS, A. C. P. **Embriogênese somática indireta em genótipos de *Coffea arabica* e de *C. canephora***. Viçosa, Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Doutorado. 90 p. 2002.
- SCHOPKE, C., MULLER, L.E., KOHLENBACH, H.W. Coffee protoplasts: isolation, culture and plantlet regeneration. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 12, 1987. Montreux. **Annales...** Paris: ASIC, 1987. P. 426-432.
- SÖNDAHL, M. R., NAKAMURA, T., SHARP, W. R. Propagation of coffee. In: HENKE, R. R., HUGHES, K. W., CONSTANTIN, M. P., HOLLAENDER, A. (Eds.), **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum, 1985. p. 215 – 232.
- SÖNDAHL, M.R.; SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explant of *Coffea arabica* L. **Z. Pflanzenphysiol.** (Supplement), v. 81, p. 395-408, 1977.
- SÖNDAHL, M.R., SÖNDAHL, C.N., GONÇALVES, W. Custo comparativo de diferentes técnicas de clonagem. In: Seminário Internacional sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira, 3, 1999. Londrina, PR, Brasil. **Anais...**, p. 59-65.

- SPIRAL, J., PETIARD, V. Protoplast culture and regeneration in *Coffea* species. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 14, 1991. San Francisco. **Annales...** Paris: ASIC, 1991. p. 383-390.
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Bot. Neerl.**, v. 19, p. 509-514, 1970.
- van BOXTEL, J.H.J. **Studies on genetic transformation of coffee by using electroporation and the biolistic method.** Wageningen: [s.n.], 1994. 125 f. Thesis (Ph.D.).
- van BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 44, p. 4-17, 1996.
- YASUDA, T., FUJII, Y., YAMAGUCHI, T. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. **Plant Cell Physiol.**, v. 26, p. 595-597, 1985.
- YASUDA, T., TAHARA, M., HATANAKA, T., NISHIBATA, T., YAMAGUCHI. Clonal propagation through somatic embryogenesis of *Coffea* species. **ASIC**, 16° Colloque, Kyoto, p. 537-541, 1995.
- YAVAD, R.C., SALEH, M.T., GRUMET, R. High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 45, p. 207-214, 1996.
- ZAMARRIPA, A., DUCOS, J. P., BOLLON, H., DUFOUR, M., PETIARD, V. Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. **Café Cacao Thé**, v. 35, p. 233-244, 1991.

3. CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de analisar estruturalmente e histoquimicamente cortes de explantes foliares de café, sendo as amostras coletadas ao longo do tempo pós-indução com a finalidade de se avaliar nos genótipos arábica e robusta os processos de divisão celular, o acúmulo de reservas e as diferenças ocorridas neste período. Considerando-se que as condições indutoras para a produção de calos friáveis embriogênicos possuem um caráter de genótipo-especificidade, diferentes combinações de meios de cultura também foram testadas para a indução desta reação calogênica em explantes foliares de três híbridos arábicas segregantes, oriundos do programa de melhoramento genético da UFV-EPAMIG. Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- A primeira modificação estrutural que ocorreu nas células dos explantes em cultivo foi o aumento do volume celular do parênquima paliçádico;
- As células perivasculares foram as primeiras que iniciaram o processo de divisão celular, sendo que a presença de amido e de proteínas foi verificada nestas células em divisão;
- Divisões unidirecionais no 6º dia de cultivo nas células do parênquima paliçádico foram verificadas apenas no genótipo Catimor cultivado com auxina e citocinina. Nestas condições de cultivo, a intensidade de divisão celular e a desorganização do mesofilo foram maiores;

- Nos genótipos Catimor e Apoatã, cultivados apenas com citocininas, observou-se um dimorfismo nas células que formam o calo - o primeiro com células maiores, vacuolizadas e sem reservas (amido e proteína), e outro formando grupos de células com características meristemáticas, menores, isodiamétricas, com pequenos grânulos de amido, núcleo proeminente e citoplasma denso, com grande quantidade de proteína – as quais são denominadas células embriogênicas, que são responsáveis pela formação dos pré-embriões;
- No genótipo arábica, cultivado em meio com 2,4-D e cinetina, observou-se que as divisões celulares foram unidirecionais, sendo que as células apresentaram características meristemáticas, limitadas apenas à periferia do calo. Também se apresentaram com tamanhos semelhantes às demais células que formam o calo e não formaram estruturas organizadas em grupos de células, advindas de divisões periclinais e anticlinais;
- As diferenças na resposta dos explantes a diferentes condições indutoras poderiam ser utilizadas como marcadores estruturais para seleção de cepas potencialmente embriogênicas;
- Em relação à indução calogênica em híbridos de *Coffea arabica*, a maioria das condições indutoras testadas foi favorável à reação calogênica;
- Explantes foliares dos híbridos Catimor e H 337-610 produziram calos embriogênicos somente com o suprimento de 2,4-D e BAP nos meios primários e secundários, respectivamente, no entanto com baixa frequência;
- O híbrido H 447-12 apresentou calos embriogênicos quando os meios continham 2,4-D e BAP no meio primário, e em maiores frequências em relação aos outros genótipos testados;
- A formação de calos embriogênicos friáveis ocorreu na seqüência de meio suplementado com BAP 5 μ M, seguido do acréscimo de 10 μ M de 2,4-D, nos três genótipos testados e com BAP 20 μ M + 2,4-D 10 μ M em Catimor;

- O número, o estágio de desenvolvimento e o comprimento dos embriões variaram de acordo com o genótipo testado nos diferentes meios de manutenção e de diferenciação;
- No genótipo Catimor não houve diferença na diferenciação embriogênica, no estágio de diferenciação e no comprimento dos embriões quando cultivados em meio de manutenção BAP 5 μ M + 2,4-D 5 e 10 μ M. Em meios de diferenciação houve diferença no comprimento dos embriões (MD1 > MD2);
- No genótipo H 337-610 foram obtidos maior número e comprimento dos embriões no meio de manutenção com 5 μ M de BAP + 5 μ M de 2,4-D e no meio de diferenciação com concentração total de sais MS (meio de diferenciação MD1);
- No genótipo H 447-12 não houve diferença no número e frequência de embriões torpedo nos meios de indução MD1 e MD2, quando o meio de manutenção foi 5 μ M de BAP + 10 μ M de 2,4-D. No entanto, o comprimento dos embriões foi maior no meio de diferenciação com concentração total de sais MS (MD1);
- Quanto ao desenvolvimento dos embriões em plântulas, as melhores respostas foram nos meios de manutenção e diferenciação B5D10/MD1 com respectivos valores de desenvolvimento e formação de raízes de 89 e 42%, no genótipo Catimor. Para o híbrido H 337-610, esses valores foram de 83 e 53% nos meios B5D5/MD1; e para o híbrido H 447-12 foram obtidos 66 e 39,3% nos meios B5D10/MD1.