

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
CALOS E PLÂNTULAS A PARTIR DE
EMBRIÕES ZIGÓTICOS IMATUROS DE
Coffea arabica L. E ANÁLISE *in silico* DO
GENE SERK**

GUILHERME ARAÚJO LACERDA

2008

GUILHERME ARAÚJO LACERDA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CALOS E PLÂNTULAS A
PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS IMATUROS DE *Coffea arabica* L.
E ANÁLISE *in silico* DO GENE SERK**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Co-orientador

Prof. Antonio Chalfun-Junior, PhD

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Lacerda, Guilherme Araújo.

Obtenção e caracterização de calos e plântulas a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. e análise *in silico* do gene SERK / Guilherme Araújo Lacerda. – Lavras : UFLA, 2008.
150 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Morfogênese *in vitro*. 2. Cafeeiro. 3. Bioinformática. 4. Cultura de tecidos. 5. Micropropagação. 6. Biologia molecular. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.733

GUILHERME ARAÚJO LACERDA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CALOS E PLÂNTULAS A
PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS IMATUROS DE *Coffea arabica* L.
E ANÁLISE *in silico* DO GENE SERK**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 12 de dezembro de 2008.

Prof. Antonio Chalfun-Junior, PhD	UFLA
Prof. Dr. Sandro Barbosa	UNIFAL
Prof. Dr. Breno Regis Santos	UNIFAL
Prof. Dr. Eduardo Alves	UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,

por ter me dado a mão em todos os momentos de minha vida e por ter me carregado do colo nos mais difíceis.

OFEREÇO.

Aos meus pais e meu irmão, que são a base do meu ser e que sempre estão ao meu lado, dando-me força para seguir em frente,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de luz que guia meus caminhos e sempre está ao meu lado, acompanhando os passos da minha vida

Aos meus pais e meu irmão Gustavo, os quais eu tanto amo e que sempre me apoiaram com muito carinho e amor para que eu pudesse continuar sempre

A todos os meus amigos divinopolitanos, Leo Batata, Márcio Amaral, Carlos Vieira, Fernanda Assis e Maisa Duarte, que são a família que escolhi, sempre companheiros e que me fazem uma pessoa muito mais feliz

A todos os meus amigos lavrenses, Ademaria, Ney, Lord Adilson, Renata, Helder, Fabrícia, Lu, Tatá, Gordo, Gra, Verônica, Paty, Nina, Suerlaine e Solange, em especial a Anderson Castro, Carlos Alberto e Soraia, companheiros da república, que foram como uma família no doutorado.

Aos meus avós e aos meus familiares, que sempre estiveram junto comigo, me acompanhando e me dando todo apoio

À Dona Cidinha e família, e ao Elias *in memoriam*.

A todos os meus professores.. Se hoje estou redigindo esta tese é porque eles acreditaram em mim e me ajudaram a crescer em aprendizado a cada dia

A todos os amigos e colegas do LCBM, que me acompanharam nesses três anos e me ajudaram demais em todos os experimentos e pelo simples e saudável convívio. Em especial Anderson Ramos, Anderson Tadeu, Anderson José, Rodrigo Kelson, Humberto Henrique, Elizângela, Evânia, Kalynka, Brenda Oliveira, Kátia Possa, Lílian Mayumi, Marlúcia, Geraldo, Luis Gustavo e Douglas.

A Eloísa e Prof. Eduardo Alves, do LME, pela oportunidade de trabalharmos juntos em um harmonioso convívio.

A Izonel, Célen, Lena, Tininha, Tanhan e a todos os funcionários da Fisiologia, sempre dispostos a me ajudar.

Ao Luciano e ao Chalfun, pela orientação e formação acadêmica

À Epamig, nas pessoas dos pesquisadores Dra. Juliana Costa de Rezende e Dr. Gladyston Rodrigues Carvalho, pelo fornecimento das plantas matrizes.

A Dra. Adriana, pelas valiosas informações sobre a cafeicultura sul-mineira.

À Fapemig, por conceder a bolsa de estudos e a taxa bancada para o custeio dos experimentos.

À UFLA, pelo acolhimento e formação acadêmica.

Ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade e formação acadêmica

BIOGRAFIA

Guilherme Araújo Lacerda, filho de Raimundo Miguel de Lacerda e Edmirce Ribeiro de Araújo Lacerda, nasceu em 23 de abril de 1980, na cidade de Pitangui, estado de Minas Gerais. Concluiu o ensino normal - magistério de 1º grau, na Escola Estadual Coronel Antônio Corrêa, em dezembro de 1997, na cidade de Leandro Ferreira, Minas Gerais. Graduou-se em Biologia - licenciatura pela Universidade do Estado de Minas Gerais – Fundação Educacional de Divinópolis, em dezembro de 2003. Concluiu o mestrado em Biotecnologia, área de concentração em Biotecnologia Vegetal e Ambiental em fevereiro de 2006, na Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, Minas Gerais. Ingressou no doutorado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, em março de 2006, sendo bolsista desde agosto de 2006 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais na Universidade Federal de Lavras, onde o concluiu em dezembro de 2008.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO GERAL.....	ix
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Processos biotecnológicos que envolvem a cultura do cafeeiro.....	4
2.2 Fisiologia e desenvolvimento do fruto e do embrião do cafeeiro.....	5
2.3 Cultivares de cafeeiro para produção de cafés especiais.....	8
2.4 Propagação vegetativa de cafeeiro.....	10
2.5 Micropropagação de cafeeiro.....	11
2.6 Recursos genômicos baseados em ESTs.....	13
2.7 Projeto Genoma Café Brasileiro.....	15
2.8 Genes relacionados à embriogênese.....	16
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
CAPÍTULO 2 Obtenção de calos e plântulas a partir de embriões zigóticos imaturos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Bourbon Amarelo.....	24
1 RESUMO.....	25
2 ABSTRACT.....	27
3 INTRODUÇÃO.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Material vegetal.....	31
4.2 Desinfestação dos frutos, retirada e incisão dos embriões.....	32
4.3 Efeito do BAP, CIN e TDZ sobre a calogênese de embriões zigóticos imaturos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Bourbon Amarelo.....	33
4.4 Efeito do 2,4-D sobre a calogênese de embriões zigóticos imaturos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Bourbon Amarelo.....	34
4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	35
4.6 Curva de crescimento de calos obtidos a partir de embriões zigóticos imaturos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Bourbon Amarelo.....	36
4.7 Análise estatística.....	37
4.7.1 Dados quantitativos.....	37
4.7.2 Dados qualitativos.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40

5.1 Grupo controle de embriões zigóticos imaturos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Bourbon Amarelo	40
5.2 Efeito do BAP sobre a calogênese e a regeneração de embriões zigóticos imaturos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Bourbon Amarelo.....	42
5.2 Efeito da CIN sobre a parte aérea de embriões zigóticos imaturos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Bourbon Amarelo.....	46
5.3 Efeito do TDZ sobre a calogênese de embriões zigóticos imaturos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Bourbon Amarelo.....	47
5.4 Efeito do 2,4-D sobre a calogênese de embriões zigóticos imaturos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Bourbon Amarelo	51
5.5 Características histo-anatômicas das gemas e calos	55
5.6 Quanto ao crescimento e ao desenvolvimento dos calos e plântulas	60
5.6.1 Número de explantes com calos presentes e ausentes	60
5.6.2 Curva de crescimento.....	61
5.6.3 Número de brotos na região da incisão.....	64
5.6.4 Número de folhas dos brotos na parte incisada (hipocótilo) do embrião..	65
5.6.4 Número de folhas da parte aérea (cotiledonar) do embrião	66
5.7 Probabilidades entre resultados esperados e alcançados.....	67
6 CONCLUSÕES	74
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

CAPÍTULO 3 Características histo-anatômicas dos calos a partir de embriões zigóticos imaturos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Rubi	81
1 RESUMO.....	82
2 ABSTRACT	83
3 INTRODUÇÃO	84
4 MATERIAL E MÉTODOS	86
4.1 Material vegetal	86
4.2 Desinfestação e inoculação do material vegetal	86
4.3 Calogênese.....	86
4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	87
4.4 Microscopia fotônica	87
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
6 CONCLUSÕES	95
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

CAPÍTULO 4 Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de plântulas obtidas a partir de embriões zigóticos imaturos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Rubi	99
1 RESUMO.....	100
2 ABSTRACT	101
3 INTRODUÇÃO	102
4 MATERIAL E MÉTODOS	104

4.1 Material vegetal	104
4.2 Desinfestação dos frutos, retirada, incisão e estabelecimento dos embriões	105
4.3 Análise estatística das partes aéreas das plântulas	105
4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	106
4.5 Análise estatística da anatomia foliar	107
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
5.1 Obtenção de plântulas de cafeeiro ‘Rubi’	108
5.2 Análise da anatomia foliar de plântulas de cafeeiro <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	112
5.3 Análise da anatomia do caule de plântulas de cafeeiro <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ...	115
5.4 Análise da anatomia da raiz de plântulas de cafeeiro <i>in vitro</i>	117
6 CONCLUSÃO	119
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
CAPÍTULO 5 Expressão <i>in silico</i> de genes candidatos para a SERK (<i>Somatic Embryogenesis Receptor Kinase</i>) em <i>Coffea arabica</i> L.....	123
1 RESUMO	124
2 ABSTRACT	125
3 INTRODUÇÃO	126
4 MATERIAL E MÉTODOS	128
4.1 Identificação de seqüências para o gene SERK	128
4.2 Análise filogenética	129
4.3 Identificação de <i>motifs</i> comuns de agrupamento	129
4.4 <i>Northern</i> eletrônico	130
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	131
6 CONCLUSÃO	140
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
ANEXOS	145

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1 Estádios de maturação do fruto de cafeeiro *C. arabica* cv. Acaiá cerrado MG-1474 e suas diferenças histológicas em dias após o florescimento (DAF) (Estanislau, 2002). Barras = 2 mm (Adaptado de De Castro e Marracini, 2006). Perisperma (pe); integumento (in); saco embrionário jovem (se); endosperma (en); “semente verdadeira” (se); crescimento (setas); perisperma interno (ipe); linha do tecido do perisperma (ope); embrião maduro (em); Partes internas (in) e externas (ex) do mesocarpo são também indicadas. 7
- FIGURA 2.1 A) Aspecto da planta de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo) no campo experimental da UFLA. B) Detalhes dos frutos em estágio verde-cana. UFLA, Lavras, MG, 2008.31
- FIGURA 2.2 Embrião zigótico imaturo extraído de frutos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo em estágio verde-cana. A) Incisado na região do hipocótilo; B) Disposição no meio de cultura. Barra = 1 mm. UFLA, Lavras, MG, 2008.....32
- FIGURA 2.3 Embrião zigótico de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. Grupo controle na ausência dos reguladores de crescimento: A) 15 dias B) 30 dias; C) 45 dias; D) 60 dias; E) 75 dias; F) 90 dias; G) 105 dias; H) 120 dias. Barra = 1 mm. UFLA, Lavras, MG, 2008.41
- FIGURA 2.4 Embrião zigótico de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. Efeito aos na concentração de 12 mg L^{-1} ($53,29 \text{ } \mu\text{M}$) de BAP (6-Benzilaminopurina): A) 15 dias B) 30 dias; C) 45 dias; D) 60 dias; E) 75 dias; F) 90 dias; G) 105 dias; H) 120 dias. Barra = 1 mm. Broto (bt). UFLA, Lavras, MG, 2008. 43
- FIGURA 2.5 Embrião zigótico de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. Efeito aos na concentração de 16 mg L^{-1} ($71,05 \text{ } \mu\text{M}$) de BAP (6-Benzilaminopurina): A) 15 dias B) 30 dias; C) 45 dias; D) 60 dias; E) 75 dias; F) 90 dias; G) 105 dias; H) 120 dias. Barra = 1 mm. Calo (ca); broto (bt). UFLA, Lavras, MG, 2008..... 45
- FIGURA 2.6 Embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo em diferentes concentrações de CIN (6-Furfurilaminopurina). A) 30 dias e B) 120 dias. Barra = 1 mm. UFLA, Lavras, MG, 2008.46

- FIGURA 2.7 Embrião zigótico de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. Efeito aos na concentração de 4 mg L⁻¹ (18,17 μM) de TDZ (1-fenil-3(1,2,3-tiadiazol-5-il) uréia): A) 15 dias B) 30 dias; C) 45 dias; D) 60 dias; E) 75 dias; F) 90 dias; G) 105 dias; H) 120 dias. Barra = 1 mm. Calo (ca). UFLA, Lavras, MG, 2008..... 49
- FIGURA 2.8 Embrião zigótico de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. Efeito aos na concentração de 22 mg L⁻¹ (99,91 μM) de TDZ (1-fenil-3(1,2,3-tiadiazol-5-il) uréia): A) 15 dias B) 30 dias; C) 45 dias; D) 60 dias; E) 75 dias; F) 90 dias; G) 105 dias; H) 120 dias. Barra = 1 mm. Calo (ca); Gema (ge); Broto (bt). UFLA, Lavras, MG, 2008..... 50
- FIGURA 2.9 Embrião zigótico de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. Efeito aos na concentração de 4 mg L⁻¹ (18,1 μM) de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético): A) 15 dias B) 30 dias; C) 45 dias; D) 60 dias; E) 75 dias; F) 90 dias; G) 105 dias; H) 120 dias. Barra = 1 mm. Calo (ca); Gema (ge). UFLA, Lavras, MG, 2008..... 53
- FIGURA 2.10 Embrião zigótico de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. Efeito aos na concentração de 22 mg L⁻¹ (99,55 μM) de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético): A) 15 dias B) 30 dias; C) 45 dias; D) 60 dias; E) 75 dias; F) 90 dias; G) 105 dias; H) 120 dias. Barra = 1 mm. Calo (ca); Gema (ge). UFLA, Lavras, MG, 2008..... 54
- FIGURA 2.11 Eletromicrografia de varredura de um embrião zigótico imaturo (120 dias) tratado com 4 mg L⁻¹ (18,1 μM) de 2,4-D. A) Estrutura geral excisada de um calo; B) Detalhes das gemas, ladeadas pelos cotilédones do embrião zigótico imaturo (Barras = 1 mm); C e D) Gemas observadas ao estereomicroscópio. UFLA, Lavras, MG, 2008..... 55
- FIGURA 2.12 Eletromicrografia de varredura de um embrião zigótico imaturo tratado com 99,91 μM de TDZ. A) Gemas caulinares isolada; B) Detalhes da gema isolada. Inserção (in). UFLA, Lavras, MG, 2008. 57
- FIGURA 2.13 Eletromicrografia de varredura de um embrião zigótico imaturo (120 dias) tratado com 18,17 μM de TDZ. A e B) Calos compactos observados ao estereomicroscópio. Barras = 1 mm. Broto (bt), Calo (ca). C e D) Detalhes dos calos compactos observados ao MEV. UFLA, Lavras, MG, 2008. 58

- FIGURA 2.14 Eletromicrografia de varredura do calos obtido a partir do hipocótilo de um embrião zigótico imaturo tratado com 36,33 μM de TDZ. A e B) Calo do tipo friável. Barras = 1 μm . Calo (ca). C e D) Detalhe dos calos mostrando células isodiamétricas ao MEV. UFLA, Lavras, MG, 2008. 59
- FIGURA 2.15 Efeito do BAP e TDZ na obtenção de calos a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. A linha pontilhada representa o intervalo de confiança, enquanto a linha contínua representa os dados estimados. UFLA, Lavras, MG, 2008. 60
- FIGURA 2.16 Curva de crescimento a partir do peso fresco médio indicando o crescimento e desenvolvimento dos embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo na concentração de 22 mg L^{-1} (99,91 μM) de TDZ. A) Peso fresco médio (gramas/dia); B) Percentual de crescimento; C) Taxa de crescimento médio (gramas/dia); UFLA, Lavras, MG, 2008. 62
- FIGURA 2.17 Efeito do BAP e TDZ na obtenção de brotos a partir da incisão no hipocótilo de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. A linha pontilhada representa o intervalo de confiança, enquanto a linha contínua representa os dados estimados. UFLA, Lavras, MG, 2008. 64
- FIGURA 2.18 Efeito do BAP no número de folhas dos brotos obtidos na região da incisão nos embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. A linha pontilhada representa o intervalo de confiança, enquanto a linha contínua representa os dados estimados. UFLA, Lavras, MG, 2008. 65
- FIGURA 2.19 Número de folhas da parte aérea (cotiledonar) do embrião zigótico imaturo de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. A linha pontilhada representa o intervalo de confiança, enquanto a linha contínua representa os dados estimados. UFLA, Lavras, MG, 2008. 66
- FIGURA 2.20 Probabilidade de ocorrência de oxidação na região da incisão dos explantes. Doses (concentrações) em mg L^{-1} . UFLA, Lavras, MG, 2008. 68

FIGURA 2.21 Probabilidade de ocorrência de intumescimento na região da incisão dos explantes. Doses (concentrações) em mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, MG, 2008.	69
FIGURA 2.22 Probabilidade de ocorrência de calo na região da incisão nos explantes. Doses (concentrações) em mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, MG, 2008.....	70
FIGURA 2.23 Probabilidade de crescimento do calo na região da incisão nos explantes. Doses (concentrações) em mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, MG, 2008.....	71
FIGURA 2.24 Probabilidade de presença de gemas na região da incisão nos explantes. Doses (concentrações) em mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, MG, 2008.....	72
FIGURA 2.25 Probabilidade da ocorrência de brotos na região da incisão nos explantes. Doses (concentrações) em mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, MG, 2008.....	73
FIGURA 3.1 A) Plântula obtida a partir de um embrião zigótico imaturo de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Rubi mostrando o calo formado na região da incisão. B) Estereomicrografia para o detalhe do calo permitindo a visualização de seu aspecto e coloração clara. Barra = 1 mm. UFLA, Lavras, MG, 2008.....	89
FIGURA 3.2 Eletromicrografia de varredura mostrando o tecido adjacente ao calo de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Rubi. Amiloplastídeo (am); proteína like (pr). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	90
FIGURA 3.3 Eletromicrografia de varredura mostrando o tecido adjacente ao calo de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Rubi. Observou-se no interior das células o material protéico amorfo e os amiloplastídeos. E a delimitação entre o tecido adjacente da plântula e as células isodiamétricas do calo. A seta indica o pró-embrião em estágio globular inicial. UFLA, Lavras, MG, 2008.....	91
FIGURA 3.4 Eletromicrografia de varredura mostrando as células isodiamétricas em diversos tamanhos (estádios) do calo de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Rubi. A seta indica o pró-embrião em estágio globular inicial. UFLA, Lavras, MG, 2008.....	92

FIGURA 3.5 Eletromicrografia de varredura mostrando em detalhes as células isodiamétricas em diversos tamanhos (estádios) do calo de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Rubi. UFLA, Lavras, MG, 2008.....	93
FIGURA 3.5 Micrografia fotônica mostrando o embrião globular identificado no calo de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Rubi. A) Aspecto geral do embrião globular; B) Linha circular de células (procâmbio) em evidência ao centro. UFLA, Lavras, MG, 2008.....	94
FIGURA 4.1 Plantas matrizes de cafeeiro <i>Coffea arabica</i> L. cv. Rubi, localizadas na área experimental do Setor de Cafeicultura do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. A) Folhas novas do cafeeiro Rubi em seu desenvolvimento vegetativo; B) Frutos de cafeeiro em estágio verde-cana. UFLA, Lavras, MG, 2008.	104
FIGURA 4.2 Propagação clonal de cafeeiro <i>C. arabica</i> L. cv. Rubi. A) Calo compacto organogênico originado no hipocótilo por incisão (13 dias de estabelecimento); B e C) Brotações laterais por organogênese indireta (28 dias); D e E) Brotações laterais (60 dias); F) Plântulas individualizadas em meio de desenvolvimento das partes aéreas (90 dias). Barra: 1 mm. UFLA, Lavras, MG, 2008.....	109
FIGURA 4.3 Propagação clonal de cafeeiro <i>C. arabica</i> L. cv. Rubi. A) A seta indica uma plântulas que continua a emitir brotações laterais, em relação às outras que observou-se em desenvolvimento individual; B) Plântulas individualizadas com desenvolvimento completo da parte aérea; C) Transferência das plântulas para meio de enraizamento; D) Plântulas com sistema radicular desenvolvido após 120 dias em meio de enraizamento. UFLA, Lavras, MG, 2008.....	110
FIGURA 4.4 Eletromicrografia de varredura dos estômatos da superfície abaxial das folhas de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.) cv. Rubi cultivadas sob as condições: A e B) <i>in vitro</i> e C e D) <i>in vivo</i> . UFLA, Lavras, MG, 2008.....	113
FIGURA 4.5 Eletromicrografia de varredura dos caules de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.) cv. Rubi cultivadas sob as condições: A e B) <i>in vitro</i> e C e D) <i>in vivo</i> . UFLA, Lavras, MG, 2008.....	116

- FIGURA 4.6 Eletromicrografia de varredura de raiz de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cv. Rubi de plântula cultivada *in vitro*: A) Nota-se em maior campo as zonas pilíferas ricas em pelos radiculares e B. região superior a zona pilífera, com estruturas mais robustas. UFLA, Lavras, MG, 2008. 117
- FIGURA 5.1 Dendograma de similaridade relacionando seqüências candidatas de aminoácidos para a SERK. As seqüências mineiradas no CAFEST estão representadas por (♦) EST-*contigs* e (◇) EST-*singlets*. A seqüência de *C. canephora* está representada por seu acesso no NCBI. Valores de *bootstrap* menores que 50% foram omitidos. UFLA, Lavras, MG, 2008. 131
- FIGURA 5.2 Alinhamento parcial mostrando a região de identidade entre as seqüências protéicas do *contig* C9 e o acesso ABN42681 de *Coffea canephora* através do *software* Bioedit (Hall, 1999). UFLA, Lavras, MG, 2008. 132
- FIGURA 5.3 Composição dos aminoácidos constituintes através do *software* BioEdit (Hall, 1999) das seqüências protéicas traduzidas a partir do *contig* C9 (A) e do acesso ABN42681 de *Coffea canephora* (B). UFLA, Lavras, MG, 2008. 133
- FIGURA 5.4 MEME (*Multiple Expectation Minimization for Motif Elicitation*, <http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html>) para prováveis seqüências para SERK. Os parâmetros utilizados foram: número de repetições qualquer, máximo número de *motifs* 20 e amplitude ótima entre 6 e 200. UFLA, Lavras, MG, 2008. 136
- FIGURA 5.5 *Northern* eletrônico representando, por meio de escala de cinza, os níveis de expressão dos EST-*contigs* e EST-*singlets* nas diferentes bibliotecas (Vieira et al., 2006). 138

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.1 Características de genes relacionados à embriogênese somática. ^a*Motif* alvo é o *cis*-elemento no promotor que é ligado ao complexo protéico incluindo a codificação do fator de transcrição. ^bExpressão do gene nos tecidos EZ (embrião zigótico) e ES (embrião somático); (-) O fator de transcrição não apresenta ligação no *cis*-elemento do promotor; nd, não determinado (Adaptado de Ikeda et al., 2006)..... 17
- TABELA 2.1 Concentrações de BAP (6-Benzilaminopurina), CIN (6-Furfurilaminopurina) e TDZ (1-fenil-3(1,2,3-tiadiazol-5-il) uréia), utilizadas nos diferentes tratamentos visando a obtenção de calogênese em embriões zigóticos imaturos de *C. arabica* L. Bourbon Amarelo. UFLA, Lavras, MG, 2008..... 34
- TABELA 2.2 Concentrações de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) utilizadas nos diferentes tratamentos visando à obtenção de calogênese em embriões zigóticos imaturos de *C. arabica* L. Bourbon Amarelo. UFLA, Lavras, MG, 2008..... 35
- TABELA 4.1 Valores médios em relação ao tempo de cultivo *in vitro* de acordo com as características: número de brotos, número de folhas, massa fresca e massa seca das plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi. UFLA, Lavras, MG, 2008. 111
- TABELA 4.2 Valores médios para as características: (DE) diâmetro equatorial, (DP) diâmetro polar, (DE/DP) relação diâmetro equatorial/polar e número de estômatos por mm² de *C. arabica* L. cv. Rubi. UFLA, Lavras, MG, 2008. 114
- TABELA 5.1 Classificação dos aminoácidos para análise dos resultados do programa MEME (*Multiple Expectation Minimization for Motif Elicitation*, <http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html/>) versão 3.5.4 (Bailey et al., 2006). UFLA, Lavras, MG, 2008..... 130
- TABELA 5.2 Domínios conservados para as seqüências candidatas para proteína SERK de acordo com a base de dados CDD do NCBI (Marchler-Bauer et al., 2007). UFLA, Lavras, MG, 2008. 135

TABELA 5.3 Domínios conservados para as <i>motifs</i> obtidos pelo MEME, visualizados no MAST e anotados pelo SMART. UFLA, Lavras, MG, 2008.....	137
--	-----

RESUMO GERAL

LACERDA, Guilherme Araújo. **Obtenção e caracterização de calos e plântulas a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. e análise *in silico* do gene SERK.** 2008. 150p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Pretendeu-se, com a realização deste trabalho, obterem-se alternativas, além do explante foliar e nodal, visando à micropropagação de cultivares de cafeeiros, relacionadas à qualidade da bebida, como o “Bourbon Amarelo” e à produtividade, como o ‘Rubi’ para a região sul de Minas Gerais. Uma planta matriz de ‘Bourbon Amarelo’ foi utilizada para a obtenção dos frutos em estágio verde-cana de onde extraíram-se os embriões zigóticos imaturos. Observou-se que o maior percentual de crescimento pôde ser identificado aos 15 dias de cultivo dos embriões zigóticos imaturos em meio contendo o 99,91 μM de TDZ. O número médio de brotos na região da incisão no hipocótilo do embrião foi maior para o BAP (97,69 μM). Com o aumento da concentração de BAP, o número de folhas dos brotos aumenta proporcionalmente. Para a variável número de folhas isoladamente sob o efeito do BAP, em comparação a CIN e TDZ, observou-se efeito benéfico em decorrência do aumento de sua concentração. O efeito oxidativo do 2,4-D, causado pelas altas concentrações, chegou a 90% de probabilidade de oxidação e, possivelmente, estaria relacionado ao caráter herbicida do composto. O comportamento do TDZ e BAP, apesar de ambos apresentarem uma probabilidade menor para o crescimento do calo, revelou sua atuação no desenvolvimento do mesmo. Para o calo da cultivar Rubi, foi observado, ao MEV, que as células acumulam grande quantidade de grãos de amido, sugerindo que eles possam ser utilizados como marcadores iniciais do potencial embriogênico. A microscopia fotônica revelou que os calos provindos de embriões zigóticos apresentam-se como uma fonte de explante responsiva à embriogênese, mostrando indícios de formação de embriões somáticos em ‘Rubi’. Em relação à capacidade propagativa, não houve diferença significativa para a variável número de brotos entre o 6º e o 7º mês de cultivo, porém, houve um decréscimo no número de folhas e na matéria fresca e seca. Para os diâmetros polares e equatoriais, não houve diferenças significativas entre os cultivos *in vitro* e *in vivo* (de campo). Pôde ser observada diferença significativa ($p < 0,01$) entre a relação diâmetro equatorial/polar, indicando maior simetria dos estômatos (células-guarda + ostíolo) na condição de cultivo *in vitro*. O número médio de estômatos por mm^2 foi diferente, significativamente

*Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Antonio Chalfun Junior (Co-orientador) – UFLA.

($p < 0,01$), entre os cultivos, sendo maior no material *in vivo*. O caule *in vitro* mostrou grande quantidade de tricomas, os quais, *in vivo* (de campo), não foram encontrados. O sistema radicular obtido *in vitro* apresenta estrutura pelífera. Devido à natureza juvenil e ao alto potencial regenerativo, verificado por meio das características da morfoanatomia foliar, embriões zigóticos de *C. arabica* L. cv. Rubi se apresentam como excelentes explantes para a propagação *in vitro* de cafeeiro. Na busca por prováveis genes dentro do banco de dados CAFEST em *C. arábica*, com base na similaridade com a seqüência de *Coffea canephora* para SERK, após o processo de busca e seleção de *reads* relacionados às seqüências, realizaram-se a montagem dos EST-*contigs*, o alinhamento entre seqüências e a análise filogenética. A análise de *motifs* de agrupamento pelo MEME/MAST revelou seqüências contendo domínios de aminoácidos relacionados a SERK. O perfil de expressão obtido pelo *Northern* Eletrônico revelou uma maior expressão das seqüências nas bibliotecas de calos e células em suspensão como se esperava, devido à competência celular esperada desses materiais. Tecidos que apresentam totipotência como fontes de explantes, como, por exemplo, hipocótilo, sementes, gemas florais, frutos e folhas, também foram visualizados contendo expressões desses genes candidatos. Dessa forma, foi possível identificar 12 seqüências prováveis (07 *contigs* e 05 *singlets*) relacionadas à SERK no banco de dados do CAFEST para *Coffea arabica* L., dos quais pelo menos C9 apresenta fortes indícios de similaridade com a proteína SERK de *C. canephora*.

ABSTRACT

LACERDA, Guilherme Araújo. **Obtaining and characterization of calluses and plantules starting from immature zygotic embryos of *Coffea arabica* L. and gene SERK *in silico* analysis.** 2008. 150p. Thesis (Doctor's degree in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

It was intended in this work be obtained alternatives to the explant to foliate and nodal seeking the micropropagation of you cultivate of coffee plants related to the quality of the drink, like 'Bourbon Amarelo' and to the productivity as the 'Rubi' for the south area of Minas Gerais. A main plant of Bourbon Amarelo was used for obtaining of the fruits in stage verde-cana from where was extracted the immature zygotic embryos. We observed that the percentile largest of growth could be identified to the 15 days of cultivation of the immature zygotic embryos in medium containing 99,91 μM of TDZ. The medium number of sprouts in the area of the incision in the hypocotyls of the embryo went larger for BAP (97,69 μM). With the increase of the concentration of BAP the number of leaves of the sprouts increases proportionally. When observing the variable number of leaves separately under the effect of BAP in comparison with CIN and TDZ observed his beneficial effect due to the increase of his concentration. The oxidant effect of the 2,4-D caused by the high concentrations arrived to 90% of oxidation probability, it would be related possibly to the character herbicide of the composition. The behavior of TDZ and BAP, in spite of they present a smaller probability than for the growth of the callus, they reveal his performance in the development of the same. For the callus of cultivating Rubi it was observed SEM that the cells accumulate great amount of grains of starch, suggesting that the grains of starch can be used as initial markers of the embryogenic potential. The optical microscopy revealed that the calluses of the immature zygotic embryos come as a source of responsive explante to the embryogenesis, showing indications of formation of somatic embryos. In relation to propagates capacity there was not significant difference for the variable number of sprouts between the 6th and 7th month of cultivation, however there was a decrease in the number of leaves and in the fresh and dry matter. To the polar and equatorial diameters, there were not significant differences between the cultivations *in vitro* and *in vivo* (of field). As it can be observed there was significant difference ($p < 0,01$) among the relationship diameter equatorial/polar, indicating larger symmetry of the estomates (cell-guard + hostile) in the condition of cultivation *in vitro*. The

*Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Advisor), Antonio Chalfun Junior (Co-advisor) – UFLA.

medium number of stomates for mm² was different significantly ($p < 0,01$) among the cultivations, being larger in the material *in vivo*. The stem *in vitro* showed a great amount of trichomas, the ones which, *in vivo* (of field), they were not found. The root system was obtained *in vitro* presents structure rich in trichomas. Due to the juvenile nature and the high regenerative potential, verified through the characteristics of the morphoanatomy to foliate, immature zygotic embryos of *C. arabica* L. cv. Rubi comes as excellent explantes for propagation in coffee plant *in vitro*. In the search for probable genes inside of the database CAFEST in *C. arabica* based on the similarity with the sequence of *Coffea canephora* for SERK. After the search process and reads selection related to the sequences, the assembly of EST-*contigs*, alignment between sequences and phylogenetic analysis was accomplished. The analysis of grouping motifs for MEME/MAST revealed sequences containing domains of related amino acids SERK. The expression profile obtained by Electronic Northern revealed a larger expression of the sequences in the libraries of calluses and cells in suspension as if he waited, due to expected cellular competence of those materials. Woven that present totipotence as explantes sources as hypocotyls, seeds, floral buds, fruits and leaves were also visualized containing expressions of those genes candidates. This way, it was possible to identify 12 probable sequences (07 contigs and 05 singlets) related to SERK in the database of CAFEST for *Coffea arabica* L. Of the which at least C9 presents strong similarity indications with the protein SERK of *C. canephora*.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O café é uma das culturas de maior expressão, tanto no mercado interno quando no externo, contribuindo substancialmente para a pauta de exportações brasileiras. Tradicionalmente, o Brasil tem produzido café com qualidade um pouco abaixo de concorrentes, como a Colômbia. Entretanto, nos últimos anos, o Brasil mostrou sua capacidade de produção de cafés para bebidas finas como os obtidos principalmente nas regiões montanhosas de Minas e nos cerrados mineiro e goiano (Teixeira et al., 2004).

A melhora da qualidade do café deveu-se a uma série de procedimentos, tanto na condução da cultura quanto no processamento do grão, principalmente durante as fases de colheita, seca e armazenamento. Atualmente, em várias regiões do país, cafés com qualidade igual à dos melhores cafés colombianos vêm sendo produzidos e exportados.

Com a globalização da economia, dois fatores são essenciais para que o Brasil continue competitivo em relação aos concorrentes produtores de café. O primeiro deles refere-se à qualidade da bebida e o segundo, ao custo de produção. Quanto à primeira condição, a tecnologia disponível, associada a condições edafoclimáticas, permite produzir cafés de altíssima qualidade. Entretanto, no que se refere ao custo de produção, vários fatores devem ser trabalhados, com o objetivo de tornar a cultura menos vulnerável à variação sazonal de preços, o que é típico para esta cultura (Teixeira et al., 2004).

A possibilidade de diferenciação e segmentação de produtos é um dentre os fatores mais relevantes que, nos últimos anos, estão influenciando a competitividade dos produtos agroindustriais. Em consequência disso, alguns atributos de qualidade, passíveis de certificação, estão sendo incorporados como instrumento de concorrência do produto final. Além disso, a crescente demanda, particularmente em países desenvolvidos, por produtos saudáveis e socialmente

corretos, possibilita o surgimento de produtos diferenciados, com novos atributos (Souza et al., 2002).

A morfogênese nas plantas é consequência da integração dos processos de divisão e diferenciação celular, os quais conduzem a uma estrutura organizada e característica (Handro & Floh, 1990). Tais processos são controlados por uma variedade de sinais internos ou do ambiente, tais como os fitormônios e a luz, capazes de modificar o crescimento e o desenvolvimento. Os padrões mais comuns que ocorrem em tecidos cultivados *in vitro* são: a) a neoformação de raízes e gemas caulinares, vegetativas ou florais, por meio da organogênese, que pode ser, ainda, direta ou indireta, a partir de um calo e b) a formação de embriões somáticos por meio da embriogênese somática, que também pode ser direta ou indireta (Floh et al., 2007).

Pretende-se, neste trabalho, obterem-se alternativas além do explante foliar e nodal, visando à micropropagação de cultivares de cafeeiro relacionadas à qualidade da bebida, como ‘Bourbon Amarelo’ e à produtividade, como ‘Rubi’, para a região sul de Minas Gerais.

No presente trabalho são discutidos alguns aspectos relacionados à utilização de marcadores fisiológicos, histo-anatômicos e moleculares estágio-específicos, como estratégia para o estudo dos processos da embriogênese zigótica e somática. Sua identificação e utilização permitirão uma melhor compreensão dos aspectos básicos destes processos de desenvolvimento, além de propiciar a possibilidade de otimização de sistemas e protocolos de embriogênese somática para fins específicos e biotecnológicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Processos biotecnológicos que envolvem a cultura do cafeeiro

A biotecnologia proporciona novas idéias e técnicas que podem ser aplicadas na agricultura. Ela usa o quadro conceitual e as abordagens técnicas da biologia molecular para o desenvolvimento comercial de processos e produtos. O melhoramento de plantas tem sido beneficiado pela introdução de técnicas de engenharia genética baseadas no conhecimento estrutural e função dos genes. Os avanços celulares, fisiológicos e genético-moleculares, combinados com métodos de reprodução, podem conseguir melhorias agronômicas específicas e características de qualidade. O alto desempenho já alcançado nos cafeeiros propagados *in vitro* constitui um importante avanço na manipulação de processos de regeneração e obtenção de plântulas (Kumar et al., 2006).

O estabelecimento da era genômica vem transformando os estudos de expressão gênica em biotecnologia vegetal e promete revolucionar a forma como são estudadas as células e seus processos. Essa transformação acontece em função de biotecnologias de alto desempenho hoje existentes em transcriptômica (*chips* de DNA) e proteoma (eletroforese bidimensional e espectrometria de massa). Estudos nesses níveis apresentam grande potencial e certamente contribuirão para o desenvolvimento da produção cafeeira em todo o mundo (De Castro et al., 2001).

Estudos em biotecnologia cafeeira têm sido realizados, durante as três últimas décadas, em diversos laboratórios ao redor do mundo e concentram-se na melhoria das qualidades agronômicas e de transformação genética desta cultura (Alpizar et al., 2006).

2.2 Fisiologia e desenvolvimento do fruto e do embrião do cafeeiro

Apesar da importância econômica mundial do café, pouco se sabe sobre os fatores que atuam durante a floração e a formação do fruto e da semente de cafeeiros. Estas fases do desenvolvimento são essenciais no que se diz respeito ao estabelecimento de todas as características da semente madura e rendimento final da lavoura. É fundamental um melhor entendimento dos mecanismos moleculares e de programas regulatórios determinantes da qualidade da semente como propágulo e como produto (*commodity*) (De Castro et al., 2001).

Em espécies comerciais de cafeeiro (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*), o desenvolvimento do fruto é um processo longo, caracterizado por mudanças e evoluções nos tecidos. O tempo também é variável, pois, enquanto *C. arabica* requer de 6 a 8 meses para maturação, *C. canephora* requer de 9 a 11 meses (Cannell, 1985).

Logo após a fecundação e até a metade do desenvolvimento, o fruto é principalmente constituído pelo pericarpo e perisperma. Em seguida, o perisperma gradualmente desaparece e é progressivamente substituído pelo endosperma (semente). Inicialmente, o endosperma apresenta-se no estado mais hialino, o endosperma endurece durante a fase de maturação, como resultado do acúmulo gradual de proteínas de reserva, sacarose e polissacarídeos complexos representando as principais reservas da semente. De acordo com De Castro et al. (2005) existe uma tendência para sincronização, que foi observada nos estádios finais da maturação quando uma alta proporção de frutos se encontrava no tamanho cereja.

O último passo da maturação é caracterizado pela desidratação do endosperma e pela mudança de cor do pericarpo. Importantes alterações quantitativas e qualitativas acompanham o crescimento do fruto (Figura 1.1), ilustrando a importância do seu estudo para melhor compreender as características finais das sementes de café (De Castro e Marraccini, 2006).

Na Figura 1.1, de acordo com Estanislau (2002), observam-se as seguintes estruturas: A) ovário depois da antese (0-60 DAF) mostrando o perisperma (pe), integumento (in) e o saco embrionário jovem (se). Linhas indicadas por setas representam os futuros tecidos do pericarpo (60X); B) secção transversal de fruto imaturo com 90 DAF mostrando o pericarpo (pe) e o tecido líquido do endosperma (en) também referindo-se à “semente” (se) com o crescimento (setas) os tecidos do perisperma interno (ipe) são absorvidos; C) secção transversal do fruto imaturo entre 120-150 DAF, mostrando a remanescente dobradura externa da linha do tecido do perisperma (ope) e D) secção longitudinal do fruto “cereja” com 230-240 DAF, mostrando o desenvolvimento das duas sementes maduras e o cotilédone de um embrião maduro (em) dentro do endosperma sólido ou isolado (canto direito). Partes internas (in) e externas (ex) do mesocarpo são também indicadas.

O embrião é pequeno e se localiza na base do endosperma, possui duas folhas cotiledonares cordiformes e justapostas (Figura 1.1D), com eixo hipocotiledonar curto e plúmula reduzida (Mendes, 1998).

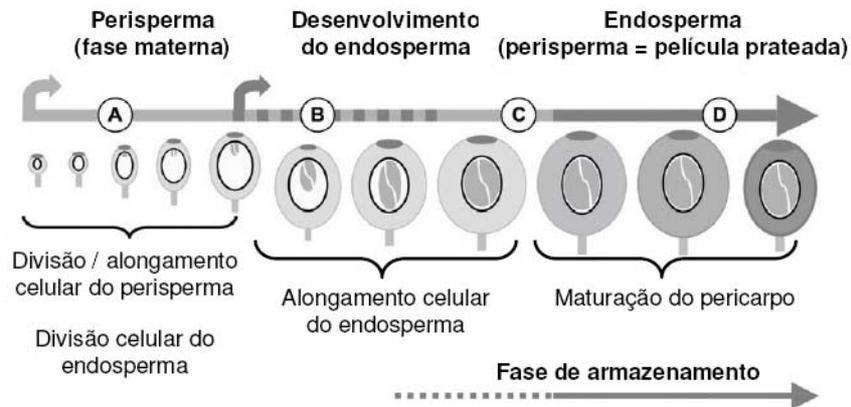
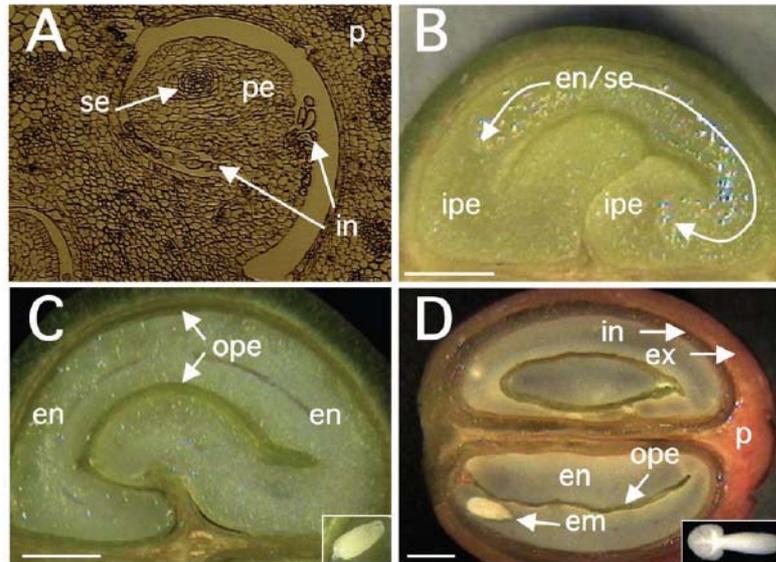


FIGURA 1.1 Estádios de maturação do fruto de cafeeiro *C. arabica* cv. Acaia cerrado MG-1474 e suas diferenças histológicas em dias após o florescimento (DAF) (Estanislau, 2002). Barras = 2 mm (adaptado de De Castro e Marracini, 2006). Perisperma (pe); integumento (in); saco embrionário jovem (se); endosperma (en); “semente verdadeira” (se); crescimento (setas); perisperma interno (ipe); linha do tecido do perisperma (ope); embrião maduro (em); partes internas (in) e externas (ex) do mesocarpo são também indicadas.

2.3 Cultivares de cafeeiro para produção de cafés especiais

A busca por qualidade em produtos agroindustriais tem mostrado um crescimento constante na última década, fruto de mudanças nas preferências dos consumidores. Há consumidores dispostos a pagar mais por produtos que possuem alguns atributos desejados (Souza et al., 2002).

No que diz respeito ao café, as possibilidades de diferenciação e segmentação do produto vão além da qualidade final da bebida. O segmento de cafés especiais representa, atualmente, cerca de 12% do mercado internacional (Pascoal, 1999). Os atributos de qualidade do café apresentam ampla gama de conceitos que vão desde características físicas, como origens, variedades, cor e tamanho do fruto, sensoriais, como corpo e aroma, até preocupações de ordem ambiental e social, como os sistemas de produção e as condições da mão-de-obra sob os quais o café é produzido. O segmento de cafés especiais também está crescendo no Brasil e pode requerer uma profunda reorganização do sistema agroindustrial para alcançar os atributos de qualidade necessários para atender a padrões de certificação (Souza et al., 2002).

Cafés especiais não são orgânicos, mas há afinidades no manejo da cultura, sobretudo na questão da sustentabilidade de seu cultivo e na preservação das florestas naturais. Adoglio (2008), da Ipanema Cafés Especiais, o define como o "manejo da cultura de café de modo ecologicamente sustentável, dentro dos padrões da BSCA (*Brazil Specialty Coffee Association*), órgão internacional certificador de cafés especiais."

O conceito de cafés especiais está intimamente ligado ao prazer proporcionado pela bebida. Esses cafés destacam-se por algum atributo específico associado ao produto, ao processo de produção ou ao serviço a eles associado. Diferenciam-se por características como qualidade superior da bebida, aspecto dos grãos, forma de colheita, tipo de preparo, história, origem dos plantios, variedades raras e quantidades limitadas, entre outras. Podem

também incluir parâmetros de diferenciação que se relacionam à sustentabilidade econômica, ambiental e social da produção, de modo a promover maior equidade entre os elos da cadeia produtiva. Mudanças no processo industrial também levam à diferenciação, com adição de substâncias, como os aromatizados, ou com sua subtração, como os descafeinados. A rastreabilidade e a incorporação de serviços também são fatores de diferenciação e, portanto, de agregação de valor (Zylbersztajn et al., 2001).

Sabe-se, ainda, que a qualidade depende da interação entre fatores nas fases de pré-colheita e pós-colheita que garantam a expressão final das características de sabor e aroma e que enquadrem os cafés produzidos nos melhores padrões de qualidade. Aos fatores pré-colheita somam-se os cuidados exigidos nas fases de colheita e do preparo do café. Finalmente, a realização adequada dos processos de benefício, armazenamento, moagem, torrefação e preparo da infusão garante a expressão final da qualidade do produto (Carvalho et al., 2007).

Com base nestas definições e no conhecimento de melhoristas de cafeeiro da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) – Centro Tecnológico do Sul de Minas e da Universidade Federal de Lavras, obtiveram-se quatro cultivares que se apresentam como genótipos elite para a produção de cafés especiais. São elas: ‘Bourbon Amarelo’, ‘Catiguá MG2’, ‘Catucaí Amarelo’ e ‘Catuaí Amarelo’. Destas, a cultivar Bourbon Amarelo vem apresentando, na região Sul de Minas, resultados satisfatórios, relacionados tanto com a qualidade da bebida quanto aos aspectos agronômicos (Carvalho et al., 2007; Lage et al., 2007; Ribeiro et al., 2007).

De acordo com Teixeira et al. (2004), há elementos suficientes para afirmar que a multiplicação clonal via embriogênese somática não acarreta variações genéticas ou epigenéticas que comprometam a qualidade da muda produzida. Com base nessa afirmação propõe-se a micropropagação de

cultivares selecionadas no sul de Minas Gerais, relacionadas à produção de cafés especiais.

2.4 Propagação vegetativa de cafeeiro

A propagação por meio de estacas caulinares é viável comercialmente, para várias espécies frutíferas, ornamentais e florestais, inclusive para o cafeeiro da espécie *Coffea canephora* Pierre ex Froehn. Para *Coffea arabica* L., no entanto, os estudos para a clonagem, por meio de estaquia, ainda são restritos à fase de enraizamento, não sendo encontrada, na literatura, nenhuma informação sobre mudas aptas ao plantio no campo (Jesus et al., 2005).

Para a espécie *C. canephora*, já se dispõe de metodologia para a sua multiplicação a partir de fragmentos de ramos, com “pegamento” de 95% a 100%. Essa metodologia foi descrita por Silveira & Fonseca (1995) como alternativa aos pequenos e médios cafeicultores do Espírito Santo, para a obtenção de cultivares mais uniformes e produtivas.

Por se tratar de planta autógama, a propagação de *C. arabica* é predominantemente por sementes, cujas progênies em gerações avançadas mantêm a cultivar com um mínimo de variabilidade, a exemplo do Catuaí, Mundo Novo e Rubi, dentre outras. Sua propagação por via assexuada não tem sido praticada em grande escala (Bergo & Mendes, 2000).

Cafeeiros, *Coffea arabica*, com alta produtividade, resistentes a enfermidades e pragas, obtidos nas primeiras seleções, poderiam ser propagados vegetativamente, pois híbridos F1 de um programa de melhoramento podem representar uma diminuição significativa de tempo e de recursos despendidos nesses programas, para o lançamento de uma nova cultivar.

2.5 Micropropagação de cafeeiro

Na cultura de tecidos vegetais utilizam-se técnicas por meio das quais pequenos fragmentos de tecido vegetal vivo, denominados explantes, são retirados de plantas de genótipos desejáveis e cultivados em meio nutritivo sob condições assépticas. Os fragmentos podem ser reduzidos ao tamanho de células individuais, de onde se originam calos que, pelo uso de hormônios vegetais adicionados ao meio, podem se diferenciar em raízes, brotos e, enfim, produzir uma planta inteira *in vitro* (Ribeiro, 1999). O princípio básico da cultura de tecidos é a totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa e com constituição idêntica à da planta matriz.

Os meios de cultura, por consistirem uma parte essencial da cultura de tecidos, têm evoluído juntamente com a própria ciência da biotecnologia. Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento e controlam, em grande parte, o desenvolvimento *in vitro* (Caldas et al., 1998). Eles devem suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com macro e micronutrientes, uma fonte de carboidrato (normalmente a sacarose) e outras substâncias, como vitaminas, aminoácidos, agente geleificante e reguladores de crescimento.

Para Andrade (1998), a cultura de tecidos vegetais torna-se vantajosa quando aplicada em variedades melhoradas que possuem pouco material e necessitam ser propagadas em curto espaço de tempo e em grande escala. Ela vem sendo importante, principalmente para as culturas de ciclo longo, podendo ser uma ferramenta complementar aos métodos convencionais de melhoramento genético. Pereira (2005) relata que, por meio de técnicas como cultura de embriões, de anteras, de células somáticas e de multiplicação genética *in vitro*, obtêm-se resultados promissores na obtenção mais rápida de genótipos superiores.

Neste aspecto, diversos trabalhos foram realizados utilizando-se cultura de tecidos para a propagação de variedades comerciais de café, regenerando plantas por meio de neoformação de gemas, de entrenós verdes, de ramos ortotrópicos e por indução de embriogênese somática a partir de explantes foliares (Dublin, 1980, 1981; Herman & Haas, 1975; Pierson et al., 1983; Söndahl & Sharp, 1977).

Os primeiros trabalhos de micropropagação de café via embriogênese somática foram publicados por Staritsky (1970), para *Coffea canephora* e por Herman & Haas (1975), para *Coffea arabica*. Posteriormente, Söndahl & Sharp (1977) ampliaram o trabalho de Herman & Haas (1975) e apresentaram em definitivo os fundamentos básicos para a multiplicação clonal de plantas de *Coffea arabica* via embriogênese somática.

Embriões somáticos de café podem ser produzidos via direta ou indireta. No primeiro caso, os embriões são produzidos diretamente do tecido foliar em cultivo *in vitro*, enquanto que, no segundo, inicialmente, observa-se uma proliferação de calos, nos quais ocorre a formação de um segundo tipo de calos de características embriogênicas (Teixeira et al., 2004).

Este tipo de calo pode ser subcultivado por um período de tempo relativamente longo, durante o qual pode ser transferido para meios apropriados à formação de grande número de embriões somáticos (Söndahl & Sharp, 1977; Söndahl et al., 1979; Boxtel & Berthouly, 1996).

Os calos embriogênicos podem ser cultivados em meio líquido em frascos de Erlenmeyer (Boxtel & Berthouly, 1996), em biorreatores de imersão contínua (Noriega & Söndahl, 1993) e biorreatores de imersão temporária (Teisson et al., 1995).

Os biorreatores permitem o cultivo tanto de gemas nodais como calos embriogênicos de café, o que constitui um dos meios mais promissores no sentido de aumentar a eficiência do processo. Em meio líquido, tanto a gema

nodal quanto os calos embriogênicos podem ser cultivados em condições ótimas, desde que alguns parâmetros sejam ajustados, como tipo de explante, meio de cultivo, sobretudo quanto à qualidade e à quantidade de reguladores de crescimento, ciclos de imersão/emersão, temperatura e luminosidade (Teixeira et al., 2004). Esta alternativa de cultivo permite uma melhor uniformidade dos embriões produzidos, uma vez que é possível induzir a sincronização do processo embriogênico (Noriega & Sondahl, 1993). Da mesma forma, a diferenciação do embrião pode ser conduzida de forma mais adequada, além de oferecer a oportunidade de encapsulamento do embrião diferenciado em larga escala. Estas vantagens comparativas poderão contribuir para uma substancial redução de custo da muda final de café (Teixeira et al., 2004).

2.6 Recursos genômicos baseados em ESTs

O seqüenciamento parcial de cDNAs produz pequenas seqüências representativas dos genes expressos no momento da extração do mRNA da célula ou do tecido em questão. Esses fragmentos seqüenciados funcionam como etiquetas, identificando genes expressos e sendo, por isso, chamados de ESTs (*Expressed Sequence Tags*).

O seqüenciamento de ESTs permite identificar diferentes transcritos, por meio da comparação com outras seqüências estudadas e armazenadas em bancos de dados públicos, e também estudar o grau de expressão na população pelo número de vezes em que cada transcrito é seqüenciado. Além disso, a estratégia de análise do transcriptoma é importante também para estudar o desenvolvimento dos organismos, pois produz bibliotecas de diferentes fases de desenvolvimento, possibilitando a identificação de quais genes estão sendo expressos em cada momento. Tal abordagem permite o estudo de como ocorre a expressão diferencial de genes em diferentes órgãos de um mesmo organismo, facilitando o entendimento de seu desenvolvimento e função. Assim, em uma

única análise, é possível obter uma perspectiva da expressão relativa de todos os genes de um dado organismo sob determinada condição ou em determinado tecido.

Geralmente, a comparação entre seqüências é realizada por meio de um alinhamento, utilizando-se o programa BLAST *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul et al., 1997). O algoritmo desse programa procura alinhar apenas

as regiões mais conservadas, independente da localização relativa de cada região em sua seqüência. Este método de comparação é utilizado para determinar o grau de similaridade entre duas ou mais seqüências, ou a similaridade entre fragmentos dessas seqüências. No caso de mais de duas seqüências, o processo é denominado alinhamento múltiplo. Consiste em introduzir espaços (*gaps*) entre os monômeros de uma ou mais seqüências, a fim de obter-se o melhor alinhamento possível, quando necessário. A qualidade de um alinhamento é determinada pela soma dos pontos obtidos por unidade pareada (*match*) menos as penalidades pela introdução de *gaps* e posições não pareadas (*mismatch*). Sua unidade de medida é o *E-value*, que representa a probabilidade de o alinhamento ter ocorrido por acaso, não sendo as seqüências similares. O alinhamento possui uma diversidade de aplicações e é considerado uma das operações mais importantes desta área.

Como exemplo de abordagens transcriptômicas no Brasil, cita-se o Projeto SUCEST da cana-de-açúcar¹ e de organismos parasitas, como o *Schistosoma mansoni*², além de outros. Em âmbito internacional, um grande número de ESTs de diversos organismos importantes vem sendo registrado³. Além da introdução de cultivares mais eficientes e do cultivo menos agressivo ao ambiente, é importante lembrar que projetos como esses citados permitem a

¹ <http://sucest.lad.ic.unicamp.br>

² <http://bioinfo.iq.usp.br/schisto/> e <http://bioinfo.cpqrr.fiocruz.br/>

³ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html

descoberta de novas drogas e a redução de seu tempo de entrada no mercado, por meio do estudo da expressão de proteínas e a obtenção de mapas de interação proteína-proteína. Esses setores ocupam os estágios, dos quais se espera o maior impacto econômico nos próximos anos (Prosdocimi et al., 2003).

2.7 Projeto Genoma Café Brasileiro

O café é um dos principais produtos agrícolas, sendo considerado o segundo item em importância do comércio internacional de “*commodities*”. O gênero *Coffea* pertence à família Rubiaceae que também inclui outras plantas importantes. Este gênero contém, aproximadamente, 100 espécies, mas a produção comercial é baseada somente em duas espécies, *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, que representam, aproximadamente, 70% e 30% do mercado total de café, respectivamente. O Projeto Genoma Café Brasileiro foi desenvolvido com o objetivo de disponibilizar os modernos recursos da genômica à comunidade científica e aos diferentes segmentos da cadeia produtiva do café. Para isso, foram seqüenciados 214.964 clones escolhidos aleatoriamente de 37 bibliotecas de cDNA de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*, representando estádios específicos do desenvolvimento de células e de tecidos do cafeeiro, resultando em 130.792, 12.381 e 10.566 seqüências de cada espécie, respectivamente, após processo de triagem.

Os ESTs foram agrupados em 17.982 *contigs* e em 32.155 *singlets*. A comparação entre estas seqüências pelo programa BLAST revelou que 22% delas não tiveram nenhuma similaridade significativa com as seqüências no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (de função conhecida ou desconhecida). A base de dados de ESTs do cafeeiro resultou na identificação de cerca de 33.000 *unigenes* diferentes. Os resultados de anotação das seqüências foram armazenados em base de dados *online*⁴. Os recursos

⁴ <http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe>

desenvolvidos por este projeto disponibilizam ferramentas genéticas e genômicas que podem ser decisivas para a sustentabilidade, a competitividade e a futura viabilidade da agroindústria cafeeira nos mercados interno e externo (Vieira et al., 2006).

2.8 Genes relacionados à embriogênese

Os processos moleculares que governam a competência e a indução para a embriogênese em células vegetais ainda não estão totalmente esclarecidos (Mordhost et al., 1997; Ikeda et al., 2006). Sem dúvida, esses processos envolvem a reprogramação da expressão gênica, que resultam em alterações morfológicas, bioquímicas e metabólicas nas células (Namasivayam, 2007). Trabalhos recentes têm sido realizados com objetivo de obter marcadores moleculares para a detecção e ou a promoção da competência embriogênica (Ikeda et al., 2006; Floh et al., 2007). A identificação e a expressão destes genes marcadores são, na sua maioria, utilizadas para a identificação de populações celulares competentes para a embriogênese.

Alguns genes que são expressos durante a embriogênese zigótica e somática (Tabela 1.1) têm sido identificados utilizando diferentes técnicas.

Genes e proteínas envolvidos com embriogênese foram isolados, sendo células embriogênicas extraídas de embriões somáticos e células do mesófilo foliar (tecidos não-embrionários). Compararam-se, então, a partir desses agrupamentos celulares, os padrões de expressão desses genes e proteínas relacionados à embriogênese. Em outras abordagens, foram identificados genes envolvidos na embriogênese zigótica, utilizando mutantes embriões-defeituosos (Ikeda et al., 2006).

TABELA 1.1 Características de genes relacionados à embriogênese somática. ^a*Motif* alvo é o *cis*-elemento no promotor que é ligado ao complexo protéico, incluindo a codificação do fator de transcrição. ^bExpressão do gene nos tecidos EZ (embrião zigótico) e ES (embrião somático); (-) o fator de transcrição não apresenta ligação no *cis*-elemento do promotor; nd, não determinado (Adaptado de Ikeda et al., 2006).

Nome do gene	Proteína	<i>Motif</i> alvo ^a	Expressão ^b	
			EZ	ES
ABI3	Fator de transcrição (domínios B2 e B3)	G-box (ABRE), RY <i>motif</i>	+	+
FUS3	Fator de transcrição (domínio B3)	RY <i>motif</i>	+	+
LEC1	Fator de transcrição (HAP3)	CCAAT box	+	+
LEC2	Fator de transcrição (domínio B3)	RY <i>motif</i>	+	nd
SERK	Receptor Kinase (<i>Leucine-rich repeat</i>)	-	+	+
AGL15	Fator de transcrição (MADS box)	GC[A/T] ₈ GG	+	+
BBM	Fator de transcrição (AP2/ERF)	nd	+	+

A utilização de marcadores bioquímicos, como poliaminas (substâncias liberadas em estresses), hormônios vegetais, proteínas e óxido nítrico (radical livre), em conjunto na expressão de genes marcadores, pode representar uma importante estratégia para a otimização e o controle dos processos morfogênicos *in vitro* (Floh et al., 2007). Adicionalmente, o uso desses marcadores pode ser crucial para estudos básicos em biologia celular, bioquímica e fisiologia vegetal, utilizando sistemas de cultura de tecidos de plantas. Esta estratégia pode ser importante para a viabilização da cultura de tecidos na propagação de genótipos superiores e na conservação de germoplasma, assim como sua utilização como ferramenta complementar em programas de melhoramento genético, que utilizam técnicas biotecnológicas, como a transformação genética, para aumentar o ganho genético.

Agregados celulares de *O. catharinensis* cultivados, com competência à embriogênese, foram associados à expressão do gene SERK e com perfis

específicos de poliaminas (PAs) e aminoácidos associados a síntese de PAs (Santa-Catarina et al., 2004). Ficou evidenciado que, para este sistema, é possível utilizar a expressão do gene SERK como um marcador para o reconhecimento das células competentes.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADOGLIO, A. **Cafés especiais**. Disponível em <<http://www.planetaorganico.com.br/cafespeciais.htm>> Acesso em: 2 jun. 2008.
- ALPIZAR, E.; DECHAMP, E.; ESPEOUT, S.; ROYER, M.; LECOULS, A.C.; NICOLE, M.; BERTRAND, B.; LASHERME, P.; ETIENNE, H. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.25, p.959-967, 2006.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.
- ANDRADE, L.M.C.O. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1998. 86p.. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ANDRADE, L.M.C.O.; PASQUAL, M.; MACIEL, A.L.R.; PEREIRA, A.B.; CAVALCANTE-ALVES, J.M. Cultura de embriões de *Coffea arabica*: influência de NAA e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.5, p.1063-1170, set./out. 2001.
- BERGO, C.L.; MENDES, A.N.G. Propagação vegetativa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) por meio de enraizamento de estacas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.392-398, abr./jun. 2000.
- BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration on liquid medium. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.44, p.7-17, 1996.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. p.87-132.

CANNELL, M.R.G. Physiology of the coffee crop. In: CLIFFORD, M.N.; WILSON, K.C. (Ed.). **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. London: Croom Helm, 1985. p.108-134.

CARVALHO, A.M.; GUIMARÃES, R.J.; BENJAMIM, L.H.; MENDES, A.N.G.; BOTELHO, C.E.; MEDEIROS, R.N. Crescimento e desenvolvimento inicial de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) var. Bourbon na região de Três Pontas – MG. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, SP: Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, 2007. CD ROM.

DE CASTRO, R.D.; ESTANISLAU, W.T.; CARVALHO, M.L.M.; HILHORST, H.W.M. Functional development and maturation of coffee (*Coffea arabica* L.) fruits and seeds. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 20., 2005, Paris. **Proceedings...** Paris: ASIC, 2005. p.619-635.

DE CASTRO, R.D.; ESTANISLAL, W.T.; MESQUITA, P.R.; HILHORST, H.W.M. A semente de café: desenvolvimento e perspectivas genômicas. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Vitória, ES: Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café, 2001. CD ROM

DE CASTRO, R.D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campinas, v.18, n.1, p.175-199, 2006.

DUBLIN, P. Multiplication vegetative “*in vitro*” de l’arabusta. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v.24, n.4, p.181-190, oct./dec. 1980.

DUBLIN, P. Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier arabusta. **Café Cacao, Thé**, Paris, v.25, p.237-241, 1981.

ESTANISLAU, W.T. **Modelo funcional de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)** 2002. 113p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FLOH, E.I.S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.13, p.1992-2001, 2007.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMPRAPA-CNPq, 1990. p.203-212.

HERMAN, E.B.; HASS, G.J. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. **HortScience**, Alexandria, v.10, n.6, p.588-189, Dec. 1975.

IKEDA, M.; UMEHARA, M.; KAMADA, H. Embryogenesis-related genes; Its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and Arabidopsis. **Plant Biotechnology**, Tokyo, v.23, n.2, p.153-161, 2006.

JESUS, A.M.S.; CARVALHO, S.P. DE; SOARES, A.M. Comparação entre sistemas radiculares de mudas de *Coffea arabica* L. obtidas por estaquias e por sementes. **Coffee Science**, Lavras, v.1, n.1, p.14-20, abr./jun. 2006.

KUMAR, V.; NAIDU, M.M.; RAVISHANKAR, G.A. Developments in coffee biotechnology - *in vitro* plant propagation and crop improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.87, p.49-65, 2006.

LAGE, P.A.; SILVA, G.H.; SANDY, E.C.; GUIMARÃES, R.J.; MALTA, M.R.; FERREIRA, A.D.; NANNETTI, A.C. Desenvolvimento inicial de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) var. Bourbon em duas regiões: Santo Antônio do Amparo – MG e Lavras – MG. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia. **Anais... Águas de Lindóia, SP: Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, 2007. CD ROM.**

MENDES, A.N.G. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: MENDES, A.N.G.; RUBENS, J.G. (Ed.). **Cafeicultura empresarial – produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. v.1, p.1-98.

MORDHOST, A.P.; TOONEN, M.A.J.; DE VRIES, S.C. Plant embryogenesis. **Critical Review in Plant Science**, Philadelphia, v.16, n.6, p.535-576, 1997.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.90, p.1-8, 2007.

NORIEGA, C.; SONDAHL, M.R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. In: BIOTECHNOLOGIE ASIE COLLOQUE, 15., 1993, Montpellier. **Proceedings ... Montpellier, [1993]. p.73-80.**

PASCOAL, L.N. **Aroma de café: guia prático para apreciadores de café.** São Paulo: Fundação Educar-DPaschoal, 1999. 159p.

PEREIRA, A.R. **Embriogênese Somática direta em *Coffea arabica* L. Açai Cerrado.** 2005. 60p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PIERSON, E.S.; VAN LAMMERN; SCHEL, J.H.; STARITSKY, G. *In vitro* development of embryoids from punched leaf disco f *Coffea canephora*. **Protoplasma**, Vienne, v.115, n.2/3, p.208-216, 1983.

PROSDOCIMI, F. ; JUNQUEIRA, A.C.M.; BINNECK, E.; CERQUEIRA, G.C.; FERREIRA, R.G.M.; PEREIRA, R.M.; PETRETSKI, J.H.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A.V.; SANTOS, A.C.F. Bioinformática: manual do usuário. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, n.29, p.18-31, jan. 2003.

RIBEIRO, A.O. **Definição do meio de cultura para a morfogênese indireta em alface variedades Verônica e Maioba.** 1999. 39p. Monografia (Especialização em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

RIBEIRO, F.L.F.; CARVALHO, G.R.; REIS, T.H.P.; PAIVA, B.T.; CHAGAS, S.J.R.; DIAS, F.P.; MELO, L.N. Avaliação de cafeeiros em Patrocínio – MG visando produção de cafês especiais. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÊS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, SP: Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, 2007. CD ROM.

SANTA-CATARINA, C.; HANAI, L.R.; DORNELAS, M.C.; VIANA, A.M.; FLOH, E.I.S. SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.79, p.53-61, 2004.

SILVEIRA, J.S.M.; FONSECA, A.F.A. **Produção de mudas clonais de café conilon em câmara úmida sob cobertura de folhas de palmeira.** Vitória, ES: EMCAPA, 1995. 15p. (EMCAPA. Documentos, 85).

SONDHAL, 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. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v.94, p.185-188, 1979.

SONDHAL, M.R.; SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultura leaf explant of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift fuer pflanzen physiologie**, Zurich, v.8, n.4, p.395-408, 1977.

SOUZA, M.C.M.; SAES, M.S.M.; OTANI, M.N. Pequenos agricultores familiares e sua possibilidade de inserção no mercado de cafés especiais: uma abordagem preliminar. In: IESA - SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE INVESTIGAÇÃO E EXTENSÃO EM SISTEMAS AGROPECUÁRIOS, 5.; ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO 5., 2002, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, SC: EPAGRI/SBSP, 2002. CD ROM.

STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v.18, p.509-514, 1970.

TEISSON, C.; ALVARD, D.; BERTHOULY, M.; COTE, F.; ESCALANTE, J.V.; ETIENNE, H. Culture *in vitro* par immersion temporaire: un nouveau recipient. **Plantations, Recherche, Développement**. Paris, v.2, n.5, p.29-31, 1995.

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

VIEIRA, L.G.E.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; MORAES, A.H.A.; MEHTA, A.; OLIVEIRA, A.C.; LABATE, C.A.; MARINO, C.L.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v.18, n.1, p.95-108, 2006.

ZYLBERSZTAJN, D.; FARINA, E.M.M.Q.; SAES, M.S.M.; SOUZA, M.C.M. DE; SPERS, E.E.; SCARE, R.F.; SILVEIRA, R.L.F. DA. **Diagnóstico sobre o sistema agroindustrial de cafés especiais e qualidade superior do estado de Minas Gerais**: relatório final. São Paulo: Programa de Estudos dos Negócios do Sistema Agroindustrial/Fundação Instituto de Administração/Faculdade de Economia/Administração e Contabilidade/Universidade de São Paulo, 2001.

**CAPÍTULO 2 Obtenção de calos e plântulas a partir de embriões zigóticos
imatuross de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo**

1 RESUMO

LACERDA, Guilherme Araújo. Obtenção de calos e plântulas a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. **In: _____**. **Obtenção e caracterização de calos e plântulas a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. e análise *in silico* do gene SERK**. 2008. Cap.2, p.24-80. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O café é um dos principais produtos agrícolas, sendo considerado o segundo item, em importância, do comércio internacional de “*commodities*”. O gênero *Coffea* pertence à família Rubiaceae, que também inclui outras plantas importantes. Este gênero contém, aproximadamente, 100 espécies, mas a produção comercial é baseada somente em duas espécies, *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, que representam cerca de 70% e 30% do mercado total de café, respectivamente. Aos 15 dias do estabelecimento do experimento com as concentrações de BAP (0-97,69 μM), observou-se o intumescimento dos explantes. Após 60 dias de cultivo, já foi possível observar o crescimento de brotos oriundos do calo. Não foram observados efeitos da CIN na calogênese ou na obtenção de plântulas na região da injúria física no hipocótilo. Os resultados obtidos com TDZ demonstram que, a partir dos 30 dias na concentração inicial de 18,17 μM , obtêm-se calos de coloração e aspecto variados. O mesmo pode ser observado na concentração de 36,33 μM . Já na concentração de 54,5 μM , observou-se um processo organogênico direto, com a formação de brotos na região da incisão. Numa concentração mais alta, 81,74 μM , observou-se o crescimento de um calo mais uniforme e diferente daqueles das concentrações menores 18,17 e 36,33 μM . Na maior concentração testada, de TDZ 99,91 μM , observou-se um processo muito semelhante à concentração de 72,66 μM , porém, foram visualizadas gemas e brotos em diferentes estádios e numa mesma data, demonstrando uma assincronia do processo morfogenético. Aos 15 dias de desenvolvimento, nas concentrações de 18,1, 36,2 e 54,3 μM de 2,4-D, observou-se a ocorrência de calos do tipo friável. Já os calos observados nas concentrações de 72,4, 81,45 e 99,55 μM apresentaram, aos 15 dias, calos do tipo compacto. Formação de estruturas foliares ou gemas demonstrou a determinação do explante para a formação de primórdios foliares. Observou-se que o maior percentual de crescimento pôde ser identificado aos 15 dias de cultivo dos embriões zigóticos imaturos em meio contendo o 99,91 μM de TDZ. O número médio de brotos na região da incisão no hipocótilo do embrião foi

*Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Antonio Chalfun Junior (Co-orientador) – UFLA.

maior para o BAP (97,69 μM). Com o aumento da concentração de BAP, o número de folhas dos brotos aumenta proporcionalmente. Observando-se a variável número de folhas isoladamente, sob o efeito do BAP em comparação a CIN e TDZ, constatou-se seu efeito benéfico em decorrência do aumento de sua concentração. O efeito oxidativo do 2,4-D, causado pelas altas concentrações, chegou a 90% de probabilidade de oxidação, está relacionado, possivelmente, ao caráter herbicida do composto. O comportamento do TDZ e do BAP, apesar de apresentarem probabilidade menor que para o crescimento do calo, revela sua atuação no desenvolvimento do mesmo.

2 ABSTRACT

LACERDA, Guilherme Araújo. Obtaining of calluses and plantules starting from immature zygotic embryos of *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. **In: _____**. **Obtaining and characterization of calluses and plantules starting from immature zygotic embryos of *Coffea arabica* L. and gene SERK *in silico* analysis.** 2008. Cap.2, p.24-80. Thesis (Doctor's degree in Plant Physiology)–Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The coffee is one of the main agricultural products, being considered the second item in importance of the international trade of commodities. The genus *Coffea* belongs to the family Rubiaceae that also includes other important plants. This gender contains 100 species approximately, but the commercial production is only based on two species, *Coffea arabica* and *Coffea canephora*, that represent 70% and 30% of the total market of coffee approximately, respectively. To the 15 days of the establishment of the experiment with the concentrations of BAP (0-97,69 μM) the intumesciment of the explantes was observed, in the case the immature zygotics embryos. After 60 days of cultivation, it is already possible to observe with the naked eye the growth of sprouts originating from of the area of the callus. Effects of CIN were not observed in the callogenesis or in the obtaining of seedling in the area of the physical offense in the hypocotyls. The results obtained with TDZ demonstrate that starting from the 30 days in the initial concentration of 18,17 μM are obtained coloration calluses and aspect varied, the same can be observed in the concentration of 36,33 μM . Already in the concentration of 54,5 μM we observed a process direct organogenic, with the formation of sprouts in the area of the incision. In a higher concentration 81,74 μM observed the growth of a more uniform and different callus in those of the smaller concentrations 18,17 and 36,33 μM . In the largest tested concentration of TDZ 99,91 μM observed a very similar process the concentration of 72,66 μM however it forms visualized buds and sprouts in different stadiums and in a same date, demonstrating an asynchrony of the process morphogenetic. To the 15 days of treatment in the concentrations of 18,1, 36,2 and 54,3 μM 2,4-D observed the occurrence of calluses of the crumbly type. Already the calluses observed in the concentrations of 72,4, 81,45 and 99,55 μM presented to the 15 days calluses of the compact type. Formation of leaves or buds structures demonstrated the determination of the explante for the formation of origins foliate. We observed that the percentile largest of growth could be identified to the 15 days of cultivation of the

*Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Advisor), Antonio Chalfun Junior (Co-advisor) – UFLA.

immature zygotic embryos in medium containing 99,91 μM of TDZ. The medium number of sprouts in the area of the incision in the hypocotyls of the embryo went larger for BAP (97,69 μM). With the increase of the concentration of BAP the number of leaves of the sprouts increases proportionally. When observing the variable number of leaves separately under the effect of BAP in comparison with CIN and TDZ observed his beneficial effect due to the increase of his concentration. The oxidant effect of the 2,4-D caused by the high concentrations arrived to 90% of oxidation probability, it would be related possibly to the character herbicide of the composition. The behavior of TDZ and BAP, in spite of they present a smaller probability than for the growth of the callus, they reveal his performance in the development of the same.

3 INTRODUÇÃO

O embrião originado de um processo normal de fecundação pode ser facilmente separado e cultivado sob condições assépticas em meio de cultura adequado, mantendo-se geneticamente estável e produzindo descendentes idênticos a ele. Para a remoção do embrião, basta desinfestar apenas a superfície externa da semente, uma vez que ele está alojado em região estéril da semente. Assim, o índice de contaminação *in vitro* é muito baixo em relação aos demais tecidos (Illg, 1986).

O meio de cultura adequado, tanto para a propagação quanto para a cultura de embriões, deve ser adaptado para cada espécie. Embora diferentes meios sejam capazes de manter os microcultivos de embriões, o mais freqüentemente utilizado é o MS (Murashige & Skoog, 1962), com diferentes suplementos (Carvalho et al., 1998; Santos, 2001; Andrade et al., 2001).

No caso do cafeeiro, o endocarpo libera substâncias fenólicas que influenciam na germinação e no desenvolvimento do embrião, por impedir a absorção de água e de O₂ (Freitas et al., 2006). Então, a excisão do embrião eliminaria o problema da oxidação por este tipo de composto. Os reguladores de crescimento são amplamente utilizados na cultura de embriões, quando estes são muito jovens (imaturos). Tais substâncias possuem a capacidade de suprir as necessidades para germinação, desenvolvimento e crescimento do embrião (Santos, 2001).

De modo geral, baixas concentrações de auxinas têm favorecido o crescimento normal de embriões, enquanto altas concentrações tanto apresentaram efeito inibitório quanto favoreceram a formação de calos (Raghavan & Srivastava, 1982). Citocininas têm, usualmente, inibido o crescimento (Raghavan & Torrey, 1964), apesar de Pinfield & Stobar (1972) terem registrado estímulo ao crescimento de embriões de *Acer pseudoplatanus*

L. pelo uso de cinetina (CIN). De acordo com Andrade et al. (2001), a auxina sintética ANA proporciona os melhores resultados na concentração de 1 mg L⁻¹ para as variáveis número total de brotos, de folhas e de brotos maiores que 1 cm e na concentração de 0,53 mg L⁻¹, para a variável massa da matéria fresca da parte aérea de embriões zigóticos de cafeeiro.

Na cultura do cafeeiro, baixas concentrações de ácido giberélico e altas de citocininas promovem a germinação de embriões, enquanto altas concentrações de ácido giberélico podem causar a morte do embrião (Valio, 1957).

A cultura de embriões possibilita a recuperação de híbridos de cruzamentos incompatíveis, micropropagação, superação de dormência e esterilidade de sementes (Hu & Ferreira, 1988), além do estudo detalhado dos problemas nutricionais e fisiológicos do embrião, permitindo a clonagem de plantas selecionadas com o objetivo de antecipar a época de plantio em culturas como o café.

Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de obter um sistema eficiente para a propagação de plântulas a partir de embriões zigóticos imaturos de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Bourbon Amarelo, visando uma otimização de sua multiplicação clonal como alternativa ao explante foliar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Uma planta de cafeeiro cv. Bourbon Amarelo (Figura 2.1.A) foi utilizada para a obtenção dos frutos em estágio verde-cana (Figura 2.1.B) que, de acordo com Pezzopane et al. (2003), caracteriza o início da maturação, pois os frutos começam a mudar de cor (de verde para amarelo).



FIGURA 2.1 A) Aspecto da planta de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo) no campo experimental da UFLA. B) Detalhes dos frutos em estágio verde-cana. UFLA, Lavras, MG, 2008.

De acordo De Castro et al. (2001), o estágio verde-cana estaria em, aproximadamente, 210 dias após o florescimento (DAF) e os frutos apresentam diâmetro de 12-13 mm. As plantas de cafeeiro se localizam em área experimental do Setor de Cafeicultura do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais. Os frutos foram coletados entre os meses de março e abril do ano de 2008, correspondendo às fases de granação e maturação dos frutos, de acordo com Camargo & Camargo (2001).

4.2 Desinfestação dos frutos, retirada e incisão dos embriões

Os experimentos foram realizados no Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais.

Foram coletados frutos de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Bourbon Amarelo em estágio verde-cana e mantidos em sacos de papel, por 24 horas, sob refrigeração (4°C). Os frutos foram desinfestados em hipoclorito de sódio comercial 70% (v/v), durante 30 minutos, em câmara de fluxo laminar e lavados 3 vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida, os embriões foram isolados utilizando-se placas de Petri esterilizadas contendo papel filtro e água destilada e autoclavada (adaptado de Santos, 2001).

Com o objetivo de se induzir a calogênese, foi realizada uma incisão ou injúria física (Torres et al., 2000) no eixo embrionário radicular (hipocótilo) do embrião zigótico imaturo, no momento da excisão do fruto (Figura 2.2).

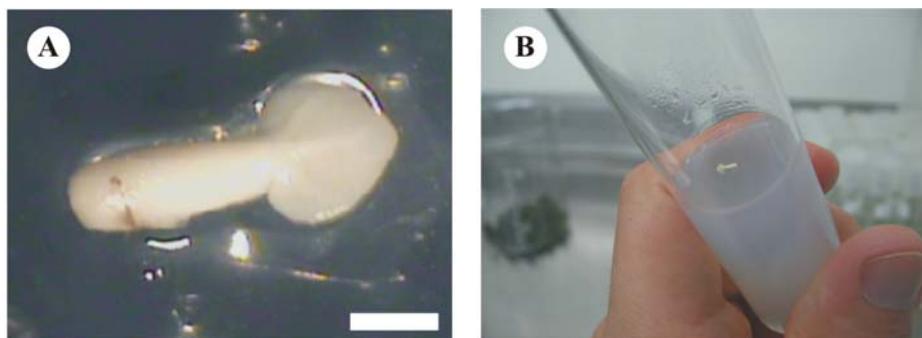


FIGURA 2.2 Embrião zigótico imaturo extraído de frutos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo em estágio verde-cana. A) Incisado na região do hipocótilo; B) disposição no meio de cultura. Barra = 1 mm. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Os embriões incisados foram, então, transferidos para tubos de ensaio de 2,5 x 15 cm contendo, aproximadamente, 20 mL do meio MS (Murashige &

Skoog, 1962), acrescido dos suplementos ágar (6 g L^{-1}) e sacarose (20 g L^{-1}) e dos reguladores de crescimento testados.

4.3 Efeito do BAP, CIN e TDZ sobre a calogênese de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo

O meio utilizado como base para a avaliação e o delineamento dos tratamentos para cultivo de embriões zigóticos de cafeeiro *C. arabica* L. descritos por Santos (2001). Como os experimentos se estenderiam até o 120º dia, diminuiu-se intencionalmente a concentração do ágar e da sacarose, a fim de diminuir o potencial osmótico do meio.

A partir desses experimentos, foram avaliadas diferentes concentrações de citocininas sintéticas como suplemento, sendo elas: BAP (6-Benzilaminopurina), CIN (6-Furfurilaminopurina) e TDZ (1-fenil-3(1,2,3-tiadiazol-5-il) uréia), visando à indução de calogênese em embriões zigóticos imaturos de *C. arabica* L. Bourbon Amarelo (Tabela 2.1).

O pH dos meios, autoclavados a 121°C por 20 minutos, foi ajustado em 5,8.

Depois de inoculados, os embriões foram mantidos em sala de crescimento, a $26\pm 2^\circ\text{C}$ e intensidade luminosa de $80 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$, em fotoperíodo de 16 horas.

TABELA 2.1 Concentrações de BAP (6-Benzilaminopurina), CIN (6-Furfurilaminopurina) e TDZ (1-fenil-3(1,2,3-tiadiazol-5-il) uréia) utilizadas nos diferentes tratamentos visando à obtenção de calogênese em embriões zigóticos imaturos de *C. arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Regulador	PM	mg L ⁻¹	μM
BAP	225,2	0	0
		4	17,76
		8	35,52
		12	53,29
		16	71,05
		18	79,93
		22	97,69
CIN	215,2	0	0
		4	18,59
		8	37,17
		12	55,76
		16	74,35
		18	83,64
		22	102,2
TDZ	220,2	0	0
		4	18,17
		8	36,33
		12	54,5
		16	72,66
		18	81,74
		22	99,91

4.4 Efeito do 2,4-D sobre a calogênese de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo

Foram avaliadas diferentes concentrações (Tabela 2.2.) da auxina sintética, 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) como suplemento, visando à indução da calogênese em embriões zigóticos imaturos de *C. arabica* L. 'Bourbon Amarelo' e a comparação com os resultados obtidos com as diferentes citocininas sintéticas (BAP, CIN e TDZ) avaliadas.

TABELA 2.2 Concentrações de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) utilizadas nos diferentes tratamentos visando à obtenção de calogênese em embriões zigóticos imaturos de *C. arabica* L. Bourbon Amarelo. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Regulador	PM	mg L ⁻¹	μM
2,4-D	221	0	0
		4	18,1
		8	36,2
		12	54,3
		16	72,4
		18	81,45
		22	99,55

O pH dos meios, autoclavados a 121°C por 20 minutos, foi ajustado em 5,8.

Depois de inoculados, os embriões foram mantidos em sala de crescimento, a 26±2°C e intensidade luminosa de 80 μmol.s⁻¹.m⁻², em fotoperíodo de 16 horas.

4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Calos e gemas obtidos de tratamentos com 2,4-D e TDZ foram fixados em Karnovsky modificado [glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%)] em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,0, por 24 horas, em temperatura ambiente.

Posteriormente, os calos foram colocados em glicerol 30% por 30 minutos e cortados em nitrogênio líquido com bisturi. Os fragmentos foram lavados por três vezes (10 minutos) em tampão cacodilato 0,05 M e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% por 1-2 horas. Em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%) por 10 minutos e em 100%, por 2 vezes de 10 minutos.

Posteriormente, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico, por meio de CO₂ líquido, para completar a secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs*, com fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Diversas imagens para cada amostra foram geradas e registradas digitalmente, a aumentos variáveis, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de 9 mm.

4.6 Curva de crescimento de calos obtidos a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo

Para a obtenção da curva de crescimento de calos a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo, utilizou-se o tratamento de 99,91 µM (22 mg L⁻¹) de TDZ.

Os embriões incisados foram, então, transferidos para placas de Petri 100 x 20 mm, contendo, aproximadamente, 40 mL do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido dos suplementos ágar (6 g L⁻¹), sacarose (20 g L⁻¹) e do regulador de crescimento.

O pH dos meios, autoclavados a 121°C por 20 minutos, foi ajustado em 5,8.

Depois de inoculados, os embriões foram mantidos em sala de crescimento, a 26±2°C e intensidade luminosa de 80 µmol.s⁻¹.m⁻², em fotoperíodo de 16 horas.

As avaliações da formação de calos, para a obtenção da curva de crescimento, foram feitas a partir do dia da inoculação (tempo 0) até o 135º dia, com intervalos de coleta de 15 dias. Em cada coleta, os explantes contendo os calos foram pesados cuidadosamente em balança de precisão, sendo posteriormente descartados.

O percentual de crescimento dos calos foi determinado, segundo Limeira (1997) e Santos (2001), por meio da equação:

$$\% \text{ crescimento} = \frac{P_f - P_i}{P_f} \times 100$$

sendo P_i = peso inicial e P_f = peso final de calos

A taxa de crescimento foi calculada de acordo com Teixeira et al. (2004) pela seguinte fórmula:

$$\text{TCM} = \frac{\ln P_f - \ln P_i}{t}$$

sendo TCM = taxa de crescimento médio; ln = logaritmo neperiano; P_f = peso final da matéria fresca; P_i = peso inicial da matéria fresca e t = o período de cultivo, em dias.

4.7 Análise estatística

4.7.1 Dados quantitativos

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, em que os tratamentos constituíam-se de quatro reguladores (BAP, CIN, TDZ, 2,4-D) e sete diferentes concentrações (0, 4, 8, 12, 16, 18 e 22 mg L⁻¹). As variáveis foram mensuradas após 120 dias de estabelecimento (Carvalho et al., 1997), avaliando-se as seguintes características: número de brotos, número de folhas dos brotos na incisão, número de folhas na plúmula e presença e ausência de calo na região da incisão (hipocótilo). Para análise estatística destas, foram utilizadas as metodologias de modelos lineares generalizados, por meio do pacote estatístico R (2007).

Os dados de número de brotos e número de folhas caracterizam-se por apresentar distribuição de Poisson (contagem), sendo utilizada como preditor linear (η) a função de ligação logarítmica, dada por:

$$\eta = \ln(\mu_i).$$

Os dados de presença e de ausência de calo na raiz caracterizam-se por apresentar distribuição binomial (presença ou ausência da característica), sendo utilizada, como preditor linear (η), a função de ligação logística, dada por:

$$\eta = \ln\left(\frac{\mu_i}{m_i - \mu_i}\right).$$

Os preditores lineares foram caracterizados por um modelo com estrutura fatorial, dado por:

$$\eta = \nu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij}$$

sendo ν uma constante inerente a cada observação; α_i o efeito do i -ésimo regulador, com $i = 1, 2, 3, 4$; β_j o efeito da j -ésima concentração, com $j = 1, \dots, 7$; $\alpha\beta_{ij}$ o efeito da interação entre o i -ésimo regulador e a j -ésima concentração.

4.7.2 Dados qualitativos

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições em que os tratamentos eram constituídos por

quatro reguladores (BAP; 2,4-D; CIN e TDZ), sete diferentes concentrações (0, 4, 8, 12, 16, 18 e 22 mg L⁻¹) e 8 tempos (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 dias). A variável resposta assumiu valores discretos de -1 a 5, dados por quatro juízes, de acordo com a escala abaixo, adaptada de Figueiredo (2007):

- -1 – oxidação dos explantes;
- 0 – explantes inalterados;
- 1 – intumescimento dos explantes;
- 2 – presença do calo;
- 3 – crescimento do calo;
- 4 – presença de gemas;
- 5 – presença de brotos.

Como os dados têm a estrutura categorizada, a análise estatística foi realizada utilizando-se a regressão logística multinomial por meio da metodologia de modelos lineares generalizados, utilizando-se o pacote estatístico R (2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar o embrião zigótico imaturo extraído do fruto do cafeeiro e incisado na região do hipocótilo (Figura 2.2.A). Pela coloração branca do embrião, assim como a extremidade do eixo hipocótilo-radícula arredondada, espera-se um alto poder germinativo (Sera & Miglioranza, 2003) e totipotente deste explante.

5.1 Grupo controle de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv.

Bourbon Amarelo

No intuito de verificar as respostas diferenciais na regeneração a partir da incisão realizada no hipocótilo, observou-se apenas o desenvolvimento da parte aérea do explante, enquanto, no decorrer do tempo, observou-se a cicatrização do ferimento (Figura 2.3). Uma radícula em protrusão pode ser observada a partir dos 45 dias (C-D). Nota-se, ainda, um processo de cicatrização aparente na região incisada do hipocótilo, a partir dos 90 dias.

De acordo com Carvalho et al. (2005), na indução *in vitro* de brotações adventícias a partir de segmentos de hipocótilo de urucum (*Bixa orellana* L.), observaram-se as menores médias avaliadas obtidas em meios na ausência de reguladores.

A utilização do hipocótilo como fonte de explante em *Coffea arabica* e *Coffea canephora* foi realizada por Giridhar et al. (2004a), porém, sem nenhum efeito embriogênico ou, mesmo, calogênico, sem a adição de reguladores de crescimento ao meio.

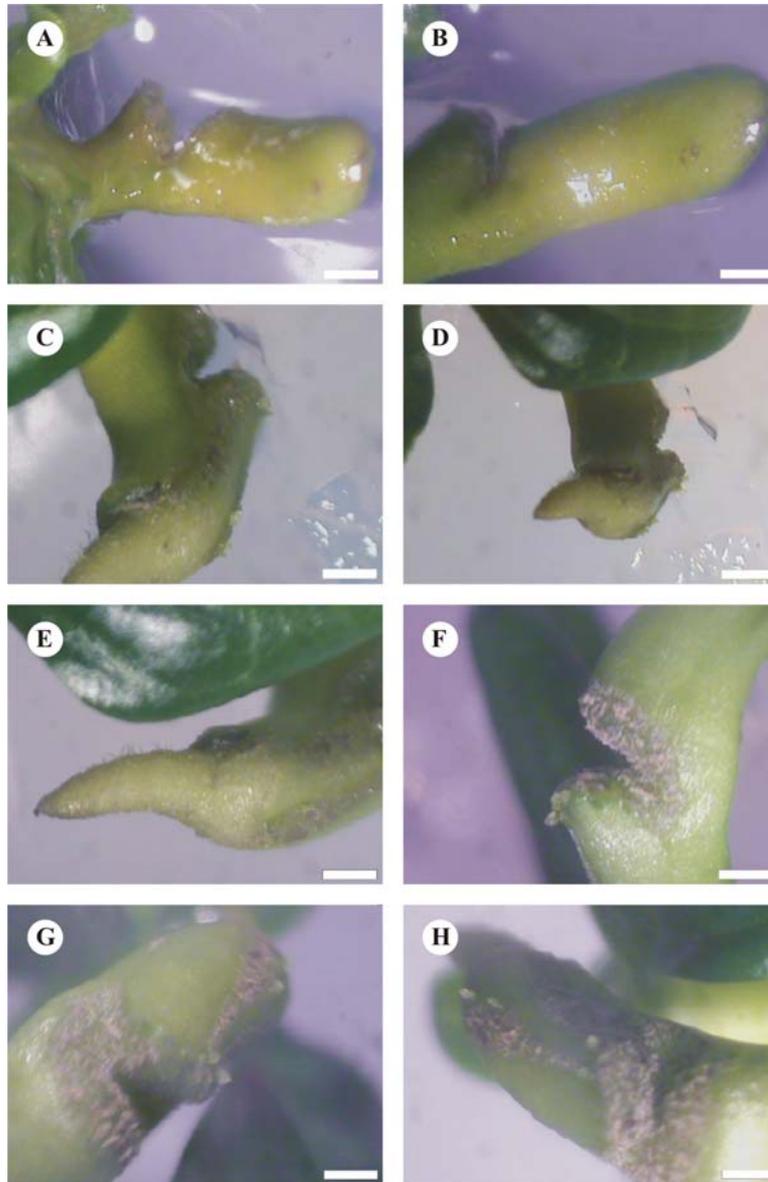


FIGURA 2.3 Embrião zigótico de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. Grupo controle na ausência dos reguladores de crescimento: A) 15 dias B) 30 dias; C) 45 dias; D) 60 dias; E) 75 dias; F) 90 dias; G) 105 dias; H) 120 dias. Barra = 1 mm. UFLA, Lavras, MG, 2008.

De acordo com Ribeiro et al. (2003), o meio ideal para o desenvolvimento de embriões zigóticos de *Coffea arabica* é o MS. Estes autores ainda observaram que diferentes cultivares tiveram seus melhores resultados neste meio, sem a adição de reguladores de crescimento para comprimento da parte aérea, peso fresco do sistema radicular e da parte aérea e peso seco total.

5.2 Efeito do BAP sobre a calogênese e a regeneração de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo

Aos 15 dias do estabelecimento do experimento com as concentrações de BAP (0-97,69 μM), observou-se o intumescimento dos explantes, no caso, os embriões zigóticos imaturos, em todas as concentrações (Figuras 2.4-2.7). Porém, o desenvolvimento dos cotilédones foi observado desde os 15 dias, na concentração controle de 0 μM de BAP (Figura 2.3A), demonstrando o efeito deste regulador de crescimento no desenvolvimento da parte aérea do embrião zigótico imaturo. Tal fato poderia estar relacionado à translocação do BAP do meio de cultura por meio da região da incisão do hipocótilo aos cotilédones do embrião para os tratamentos testados. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Santos (2001), que avaliou o efeito de diferentes concentrações de BAP sobre o embrião zigótico do cafeeiro. Esta autora ainda conclui que o melhor resultado é o de 12 mg L^{-1} , aproximadamente 53,29 μM de BAP para as características das partes aéreas dos embriões. Para Andrade et al. (2001), os melhores resultados com BAP são obtidos com 9 mg L^{-1} (aproximadamente 39,96 μM) para número total de folhas, comprimento de brotos e massa da matéria seca da parte aérea.

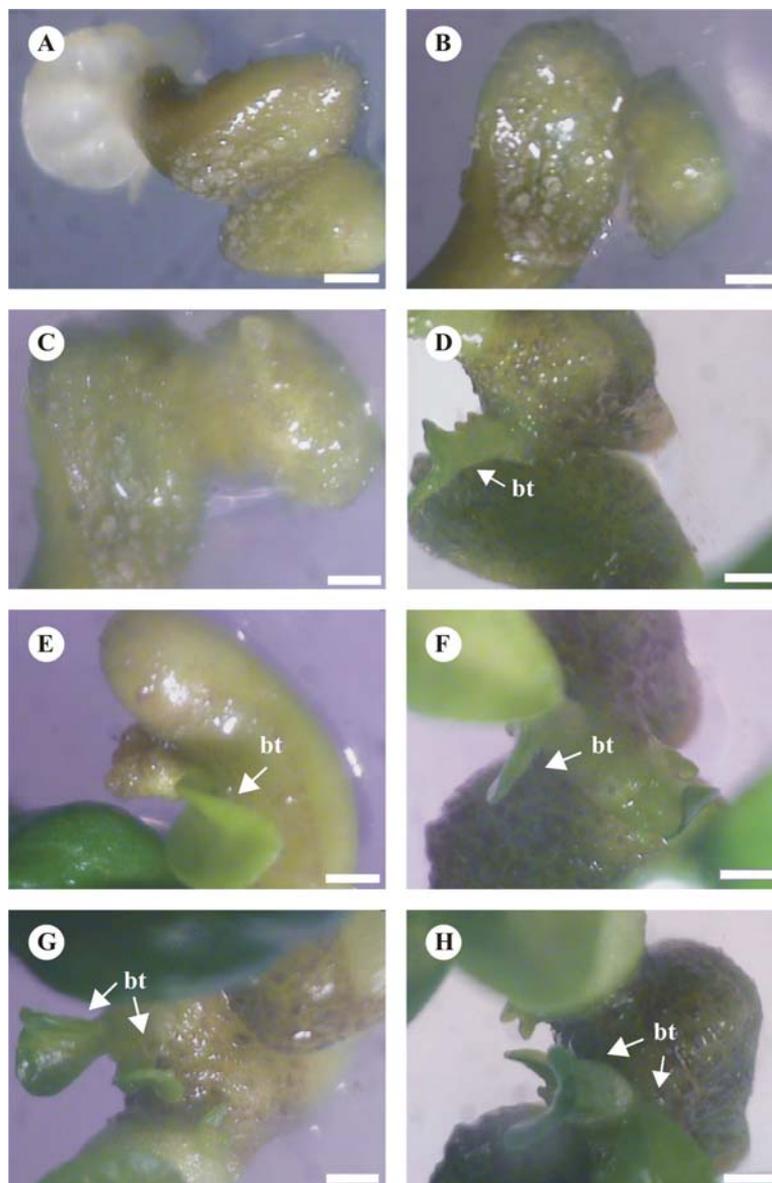


FIGURA 2.4 Embrião zigótico de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. Efeito na concentração de 12 mg L^{-1} ($53,29 \mu\text{M}$) de BAP (6-Benzilaminopurina): A) 15 dias B) 30 dias; C) 45 dias; D) 60 dias; E) 75 dias; F) 90 dias; G) 105 dias; H) 120 dias. Barra = 1 mm. Broto (bt). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Depois de 30 dias de cultivo, observou-se uma proliferação celular nas proximidades da incisão de alguns explantes (Figura 2.4B). Após 45 dias, foi possível observar, sob microscópio estereoscópico, a formação dos primeiros pontos de diferenciação organogênica, correspondente ao início de formação de brotos no tratamento de 53,29 μM de BAP (Figura 2.4C). Por meio das demais estereomicrografias é possível acompanhar o desenvolvimento das brotações no decorrer das quinzenas (Figuras 2.4D-H).

Ayub & Gebieluca (2003), trabalhando com embriogênese somática via explantes foliares, observaram o efeito dependente de citocininas e concluíram que a concentração de 5 μM de BAP produziu os melhores resultados para o híbrido Sachimor. Santos et al. (2007), avaliando o BAP e o 2iP na concentração de 9,84 μM , verificaram efeito semelhante na indução de calos primários, porém, com maior percentagem de calos embriogênicos para o tratamento com 2iP. Estes resultados discordam do de Santos et al. (2001) que não observaram calogênese em explantes foliares da cultivar Rubi na ausência de BAP e 2,4-D e nos tratamentos com BAP apenas (aproximadamente de 0-13,32 μM). Etienne (2005) utiliza o BAP em duas etapas distintas da embriogênese somática de cafeeiro, porém, utilizando uma mesma concentração de 17,76 μM no meio de produção do calo embriogênico (ECP) e no meio de regeneração (R). Maciel et al. (2003) concluíram que uma maior frequência de calos embriogênicos friáveis, em explantes foliares da cultivar Obatã, ocorreu na presença de BAP (8 mg L^{-1} , aproximadamente 35,52 μM), associado ou não ao 2,4-D.

Uma resposta organogênica pode ser observada por estereomicroscópio no tratamento de 71,05 μM com a formação de um calo a partir dos 30 dias de cultivo (Figura 2.5B). Até os 45 dias, este calo continua seu crescimento mudando a coloração de verde-claro a amarelo-claro (Figura 2.5C). Após 60 dias de cultivo, já é possível observar, a olho nu, o crescimento de brotos oriundo da região do calo (Figura 2.5D).

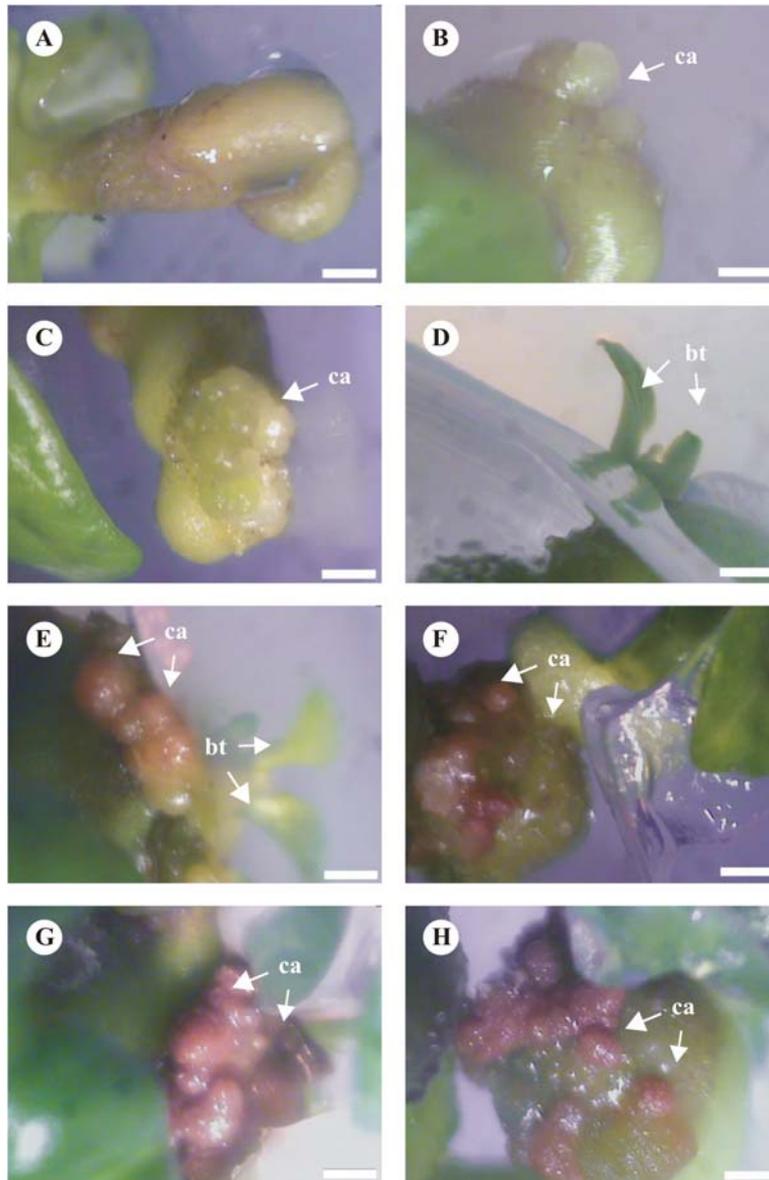


FIGURA 2.5 Embrião zigótico de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. Efeito na concentração de 16 mg L^{-1} ($71,05 \mu\text{M}$) de BAP (6-benzilaminopurina): A) 15 dias B) 30 dias; C) 45 dias; D) 60 dias; E) 75 dias; F) 90 dias; G) 105 dias; H) 120 dias. Barra = 1 mm. Calo (ca); broto (bt). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Segundo Quiroz-Figueroa et al. (2002), a proliferação ocorre nas células do câmbio vascular da folha, o que leva à formação do calo primário. Supõe-se que o tecido parenquimático do hipocótilo do embrião do cafeeiro apresente esta mesma totipotência (Giridhar et al., 2004a).

5.2 Efeito da CIN sobre a parte aérea de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo

Não foram observados efeitos da CIN (6-Furfurilaminopurina) na calogênese ou na obtenção de plântulas na região da injúria física no hipocótilo. Estes resultados se assemelham muito aos do grupo controle (Figura 2.2). Observou-se, no entanto, o desenvolvimento da parte aérea do explante (Figura 2.6A e 2.6B) em relação ao número de folhas e comprimento da parte aérea à medida que aumentava gradativamente a concentração do regulador e o tempo de cultivo (dados não demonstrados).

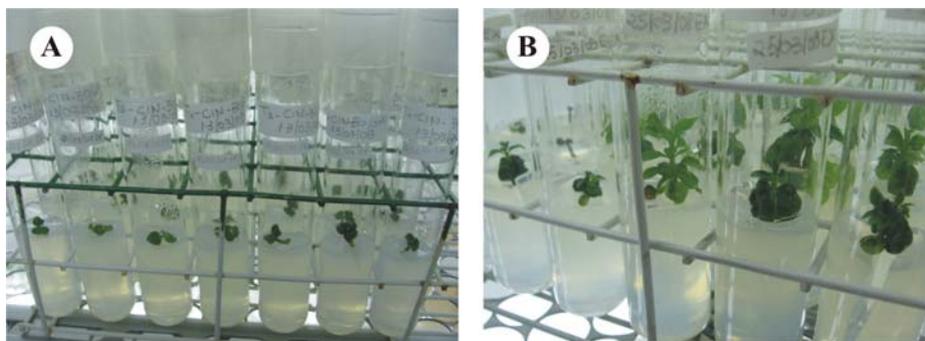


FIGURA 2.6 Embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo em diferentes concentrações de CIN (6-Furfurilaminopurina). A) 30 dias e B) 120 dias. Barra = 1 mm. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Pereira et al. (2007), ao trabalharem com cinetina (CIN) em explantes foliares de cultura de embriões de *Coffea arabica* L. cv. Acaia Cerrado, observaram o efeito deste regulador associado a GA₃ (ácido giberélico) e ANA

(ácido naftalenoacético), na indução de embriões somáticos pela via direta. Após 150 dias, o maior comprimento de embriões obtidos por estes autores foi observado na associação de 8 mg L⁻¹ de cinetina e 8 mg L⁻¹ de ANA ou 17 mg L⁻¹ de GA₃ e 8 mg⁻¹ de ANA.

Logo, o material vegetal obtido no experimento com CIN poderia ser utilizado, em futuros trabalhos, como fonte de explante.

5.3 Efeito do TDZ sobre a calogênese de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo

Até os 15 dias, todos os explantes se demonstram intumescidos, independente da concentração de TDZ (Figuras 2.7A-2.8A).

Os resultados obtidos com TDZ demonstram que, a partir dos 30 dias na concentração inicial de 18,17 µM (Figura 2.9 B-H), obtêm-se calos de coloração e aspecto variados. O mesmo pôde ser observado na concentração de 36,33 µM (Figura 2.10 B-H).

Já na concentração de 54,5 µM, observou-se um processo organogênico direto, com a formação de brotos na região da incisão. De acordo com Giridhar et al. (2004b), processos indiretos em explantes como hipocótilos de *Coffea* sp. são forte evidência da totipotência celular deste tecido. Ao contrário, na concentração de 72,66 µM, observou-se um processo organogênico indireto, com a formação de brotos e plântulas em meio à massa de calos.

Numa concentração mais alta, 81,74 µM, observou-se o crescimento de um calo mais uniforme e diferente daqueles das concentrações menores 18,17 e 36,33 µM. Porém, o mesmo não apresentou a formação de estruturas organogênicas nem embriogênicas até o período observado de 120 dias.

Na maior concentração testada de TDZ 99,91 µM (Figura 2.8), observou-se um processo muito semelhante à concentração de 72,66 µM, porém,

foram visualizadas gemas e brotos em diferentes estádios e numa mesma data, demonstrando uma assincronia do processo morfo-genético.

As concentrações testadas neste trabalho foram muito superiores às descritas na literatura para cafeeiros. Por exemplo, as concentrações de TDZ utilizadas por Giridhar et al. (2004b) ficaram entre 2,27-11,35 μM , estando esta faixa abaixo da inicialmente avaliada neste trabalho. O melhor meio de indução de agrupamentos de embriões somáticos diretos por explante foi de 9,08 μM em dois meses e os subcultivos reduzindo a concentração para 0,045-0,91 μM para embriões secundários.

Estes resultados estão de acordo com as afirmações de Huettman & Preece (1993) e Laszloffy et al. (1992), segundo os quais a presença de altas concentrações de citocininas no meio induz a excessiva formação de calos em explantes de espécies lenhosas. Já Venturiere & Venturiere (2004) observaram que o uso do TDZ no cotilédone de um híbrido cacauero produziu um calo não-organogênico. Giridhar et al. (2004a) demonstraram que explantes, como folha, hipocótilo e talo de *C. arabica* e *C. canephora*, são hábeis na formação de embriões somáticos diretos na definição de um meio ótimo em concentrações de TDZ, com variáveis como genótipo e tipo de explante.

O provável mecanismo de ação do TDZ na indução da embriogênese somática é comumente associado com sua modulação nas auxinas (Cappelle et al., 1983; Visser et al., 1992; Hutchinson et al., 1996). O TDZ promove a síntese e a acumulação de purinas (Cappele et al., 1983) e também altera o metabolismo de citocinina (Mok et al., 1982). De acordo com Murthy et al. (1998), o TDZ exibe uma propriedade única, mimetizando efeitos tanto da auxina quanto da citocinina.

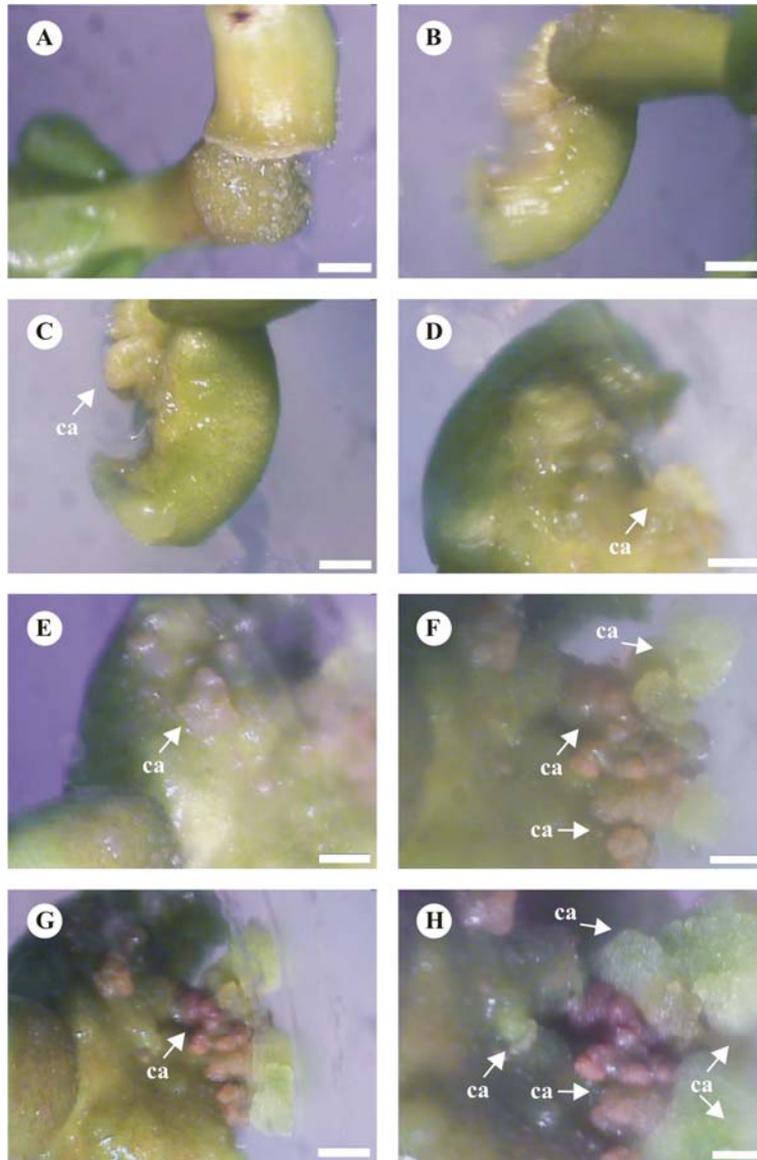


FIGURA 2.7 Embrião zigótico de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. Efeito na concentração de 4 mg L^{-1} ($18,17 \text{ } \mu\text{M}$) de TDZ (1-fenil-3(1,2,3-tiadiazol-5-il) uréia): A) 15 dias B) 30 dias; C) 45 dias; D) 60 dias; E) 75 dias; F) 90 dias; G) 105 dias; H) 120 dias. Barra = 1 mm. Calo (ca). UFLA, Lavras, MG, 2008.

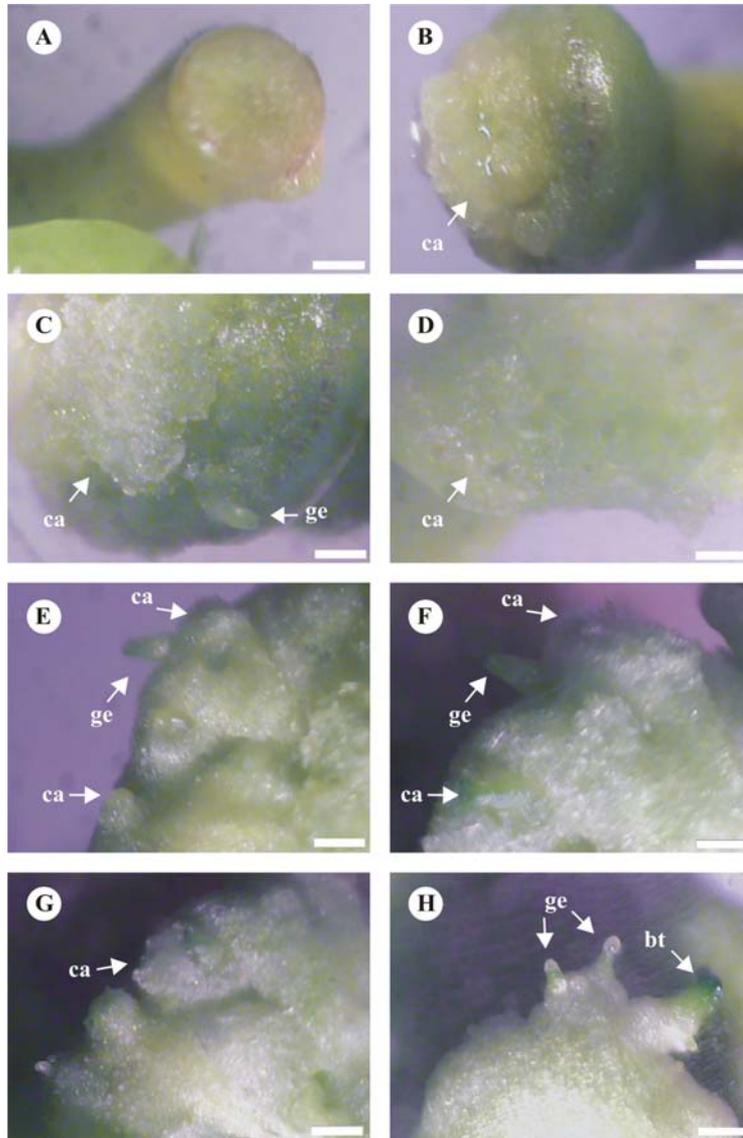


FIGURA 2.8 Embrião zigótico de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. Efeito na concentração de 22 mg L^{-1} ($99,91 \text{ } \mu\text{M}$) de TDZ (1-fenil-3(1,2,3-tiadizol-5-il) uréia): A) 15 dias B) 30 dias; C) 45 dias; D) 60 dias; E) 75 dias; F) 90 dias; G) 105 dias; H) 120 dias. Barra = 1 mm. Calo (ca); gema (ge); broto (bt). UFLA, Lavras, MG, 2008.

5.4 Efeito do 2,4-D sobre a calogênese de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo

Aos 15 dias de tratamento, nas concentrações de 18,1 (Figura 2.9A), 36,2 e 54,3 μM de 2,4-D, observou-se a ocorrência de calos do tipo friável. Os efeitos isolados do 2,4-D na formação de calos friáveis já foram obtidos a partir de explantes foliares de *C. arabica* (Forni, 1993).

Já os calos observados nas concentrações de 72,4, 81,45 e 99,55 μM (Figura 2.10A) apresentaram, aos 15 dias, calos do tipo compacto.

Santos (2001) demonstrou o efeito de 1 mg L^{-1} (aproximadamente 4,52 μM) de 2,4-D, quando aplicado isoladamente na formação de calos em 26%-81% dos explantes foliares e de 16%-41% em explantes nodais, variando de acordo com o cultivar de *C. arabica*. Porém, esta autora não determina o tipo de calo quanto à friável ou compacto.

A influência das auxinas exógenas, em especial o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), na indução da embriogênese somática, está bem documentada (Dudits et al., 1995). Foi sugerido que o 2,4-D atua indiretamente por meio de um aumento nos níveis endógenos do AIA e alterando o metabolismo das auxinas. Fehér et al. (2003) propuseram que o 2,4-D, quando acima de uma determinada concentração, possui um duplo efeito nas culturas, como uma auxina (diretamente ou através do metabolismo endógeno) e como um agente de estresse. A ativação simultânea das respostas ao estresse e aos sinais auxina/ABA (ácido abscísico) pode ser um evento chave na adaptação celular, causando reprogramações genéticas, metabólicas e fisiológicas que resultam na competência embriogênica das células somáticas. No sistema de agregados de *O. catharinensis* (Santa-Catarina et al., 2004), ficou demonstrada a indução da expressão do gene SERK por auxinas, mais especificamente o 2,4-D. Assim, em culturas nas quais o 2,4-D foi adicionado ao meio de cultura, foram

identificadas populações celulares competentes e não competentes para embriogênese, em um mesmo calo. Naquelas em que o regulador de crescimento estava ausente, populações de células competentes não foram observadas (Santa-Catarina et al., 2004).

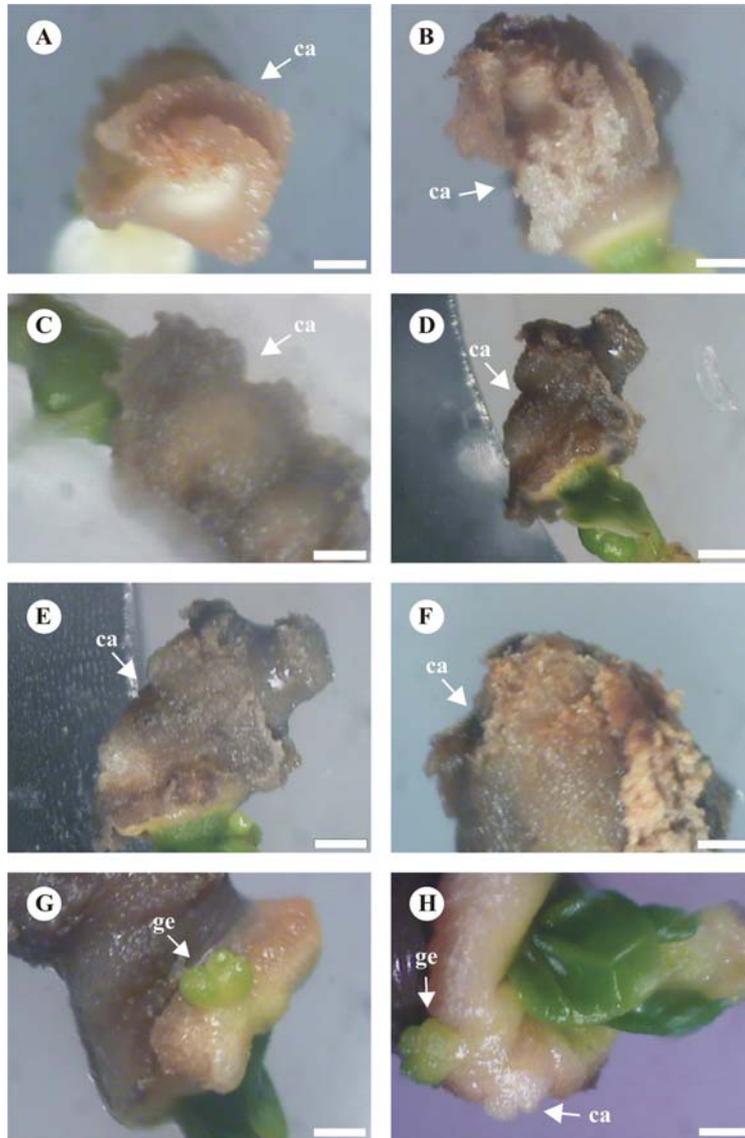


FIGURA 2.9 Embrião zigótico de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. Efeito na concentração de 4 mg L^{-1} ($18,1 \text{ } \mu\text{M}$) de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético): A) 15 dias B) 30 dias; C) 45 dias; D) 60 dias; E) 75 dias; F) 90 dias; G) 105 dias; H) 120 dias. Barra = 1 mm. Calo (ca); gema (ge). UFLA, Lavras, MG, 2008.

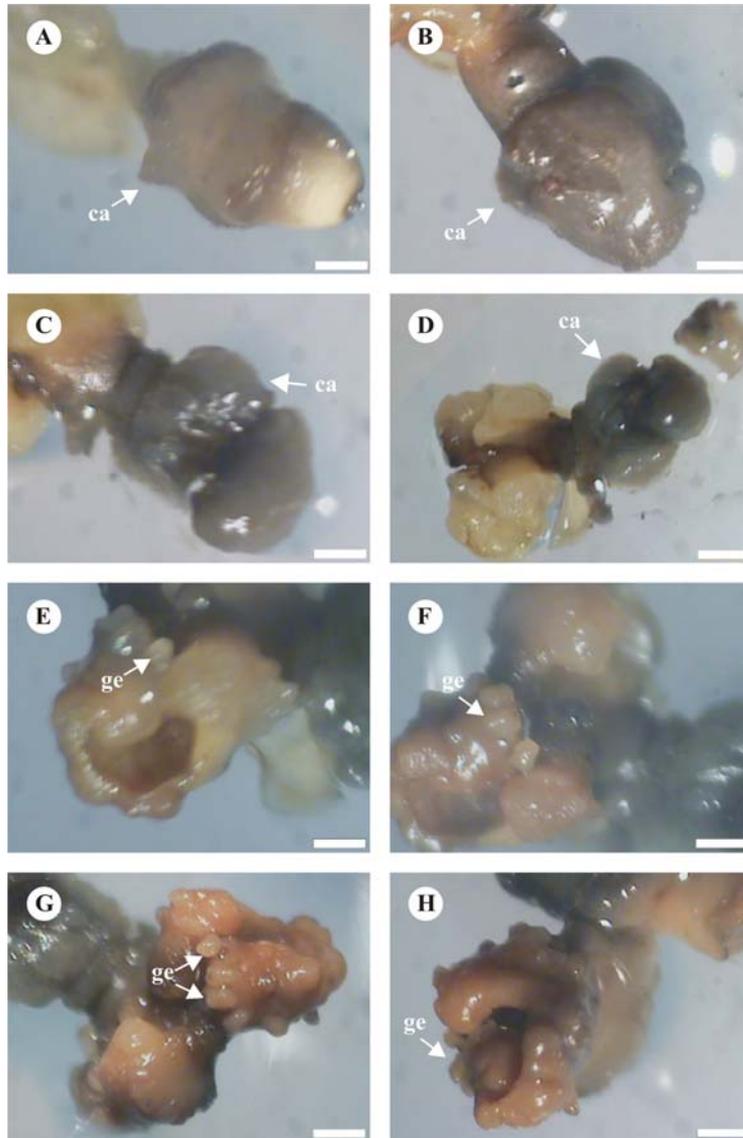


FIGURA 2.10 Embrião zigótico de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. Efeito na concentração de 22 mg L^{-1} ($99,55 \mu\text{M}$) de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético): A) 15 dias B) 30 dias; C) 45 dias; D) 60 dias; E) 75 dias; F) 90 dias; G) 105 dias; H) 120 dias. Barra = 1 mm. Calo (ca); gema (ge). UFLA, Lavras, MG, 2008.

5.5 Características histo-anatômicas das gemas e calos

A identificação de marcadores histo-anatômicos estágio-específicos, como estratégia para o estudo dos processos morfogenéticos *in vitro*, foi avaliada por meio da microscopia eletrônica de varredura.

Formação de estruturas foliares ou gemas (Figura 2.11), demonstrando, de acordo com Appezzato-da-Glória et al. (2005), a determinação do explante para a formação de primórdios foliares.

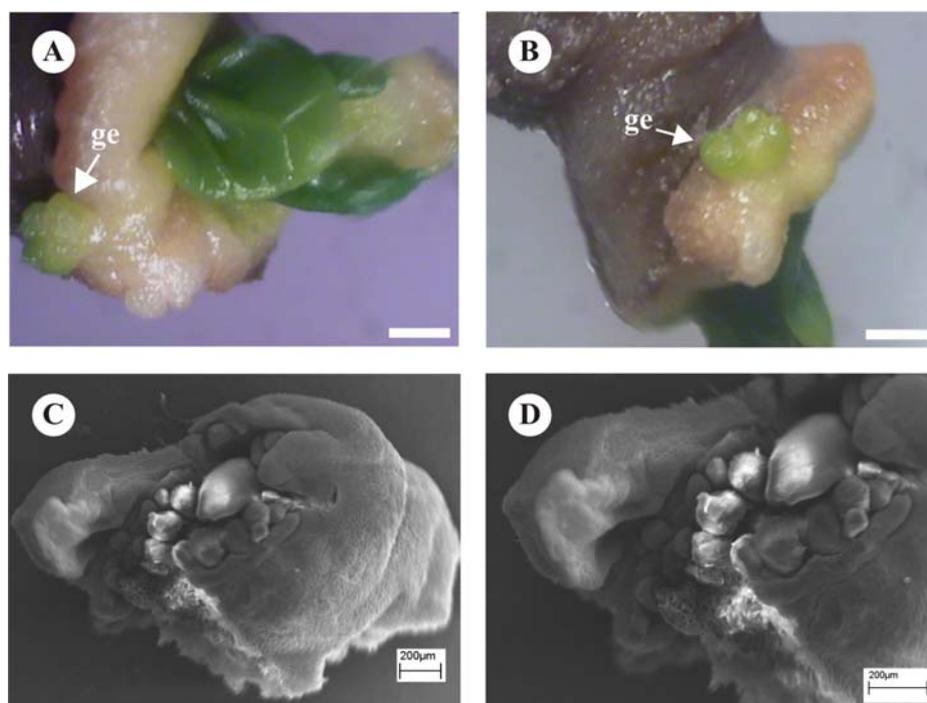


FIGURA 2.11 Eletromicrografia de varredura de um embrião zigótico imaturo (120 dias) tratado com 4 mg L^{-1} ($18,1 \text{ } \mu\text{M}$) de 2,4-D. A) Estrutura geral excisada de um calo; B) Detalhes das gemas, ladeadas pelos cotilédones do embrião zigótico imaturo (Barras = 1 mm); C e D) Gemas observadas ao estereomicroscópio. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Nota-se a origem multicelular das gemas (Figura 2.11A-B) a partir de um tecido não organizado (Quiroz-Figueroa et al., 2006), caracterizando uma possível organogênese indireta.

A presença de meristema caulinar é essencial para a produção de brotos (Apezzato-da-Glória et al., 2005). Esse fato justifica a observação de os tratamentos obtidos com 2,4-D não apresentarem potencial embriogênico, porém, com a ocorrência de brotações isoladas, características de um processo organogênico fora da região da incisão (hipocótilo).

Paiva Neto et al. (2003), trabalhando com embriões zigóticos imaturos como fonte de explante para *Bixa orellana* L., observaram estruturas semelhantes (Figura 2.11C-D), definindo-as como embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento.

As observações ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) permitiram a diferenciação morfológica entre gemas caulinares e estruturas foliares isoladas, baseando-se no fato de que, nestas, a base se insere diretamente no explante (Figura 2.12), enquanto os primórdios foliares saem de um eixo comum.

Foram observadas estruturas nodulares, provavelmente precursores de embriões globulares nos setores embriogênicos (Figura 2.13). Essas estruturas constituem, de acordo com Teixeira et al. (2004), uma característica desejável para se obter tecidos embriogênicos. Estas estruturas nodulares constituem também um calo do tipo compacto (firme) que apresentam textura dura (Figura 2.13).

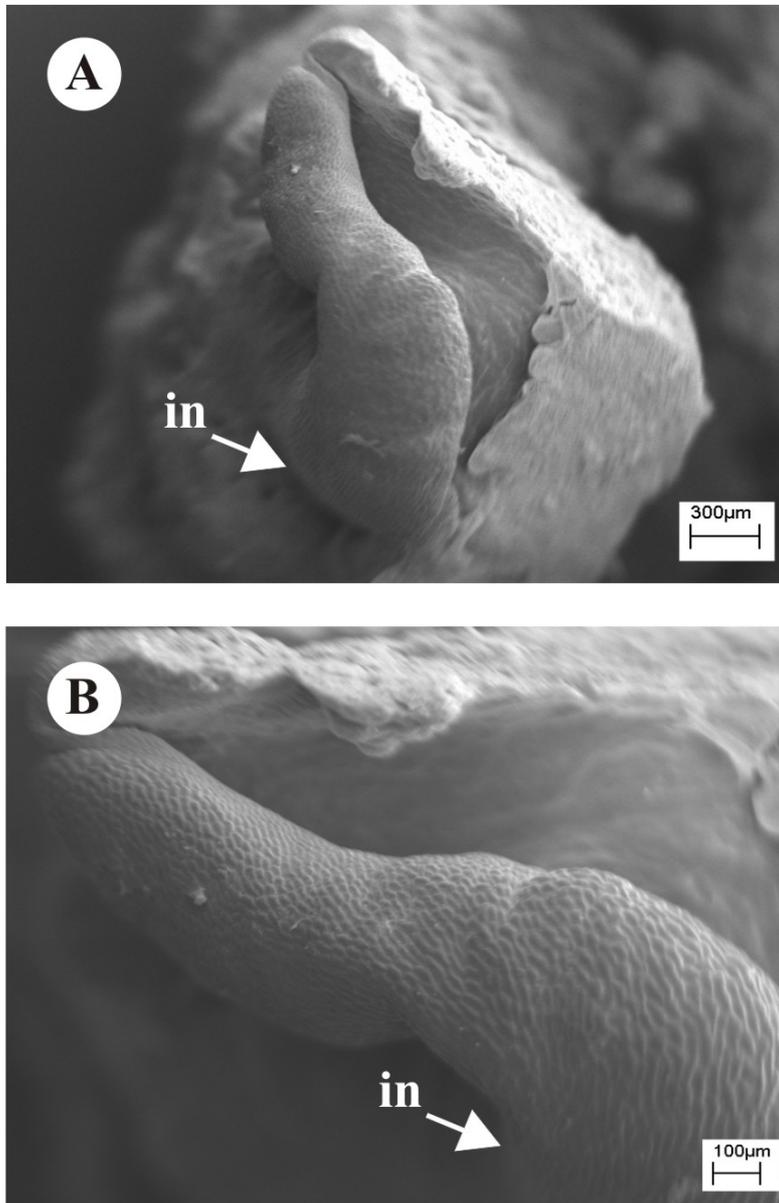


FIGURA 2.12 Eletromicrografia de varredura de um embrião zigótico imaturo tratado com 99,91 µM de TDZ. A) Gemas caulinares isolada; B) detalhes da gema isolada. Inserção (in). UFLA, Lavras, MG, 2008.

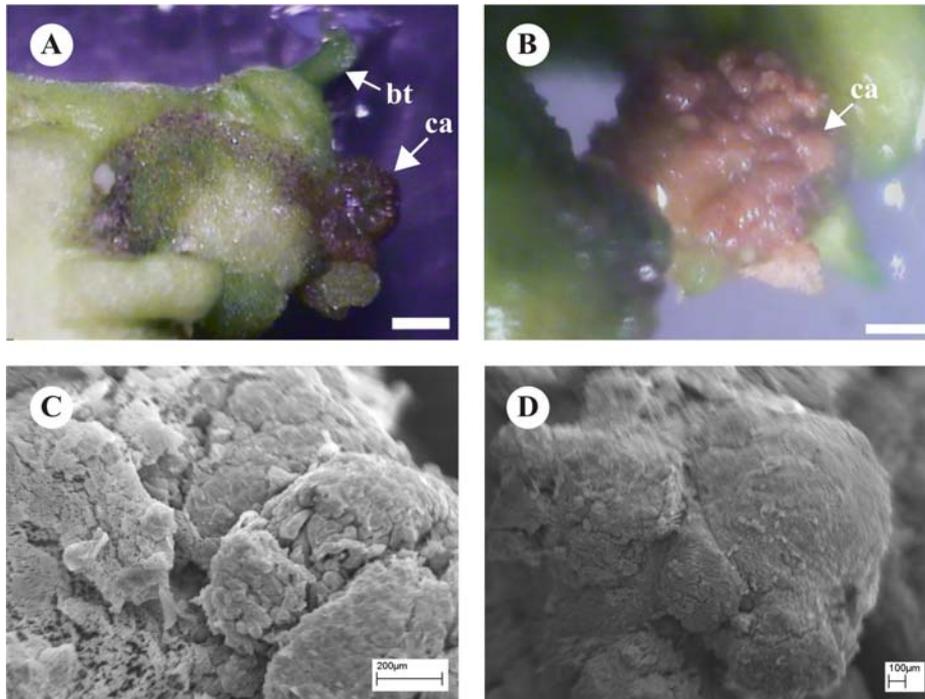


FIGURA 2.13 Eletromicrografia de varredura de um embrião zigótico imaturo (120 dias) tratado com 18,17 μM de TDZ. A e B) Calos compactos observados ao estereomicroscópio. Barras = 1 mm. Broto (bt), calo (ca). C e D) Detalhes dos calos compactos observados ao MEV. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Outras concentrações, como 36,33 μM de TDZ, se mostraram promissoras apenas na obtenção de calos com aspecto bastante organizado apresentando células com formato isodiamétrico (Figura 2.14). Estes calos são do tipo friável (mole), com crescimento frágil e se separam prontamente quando incisados.

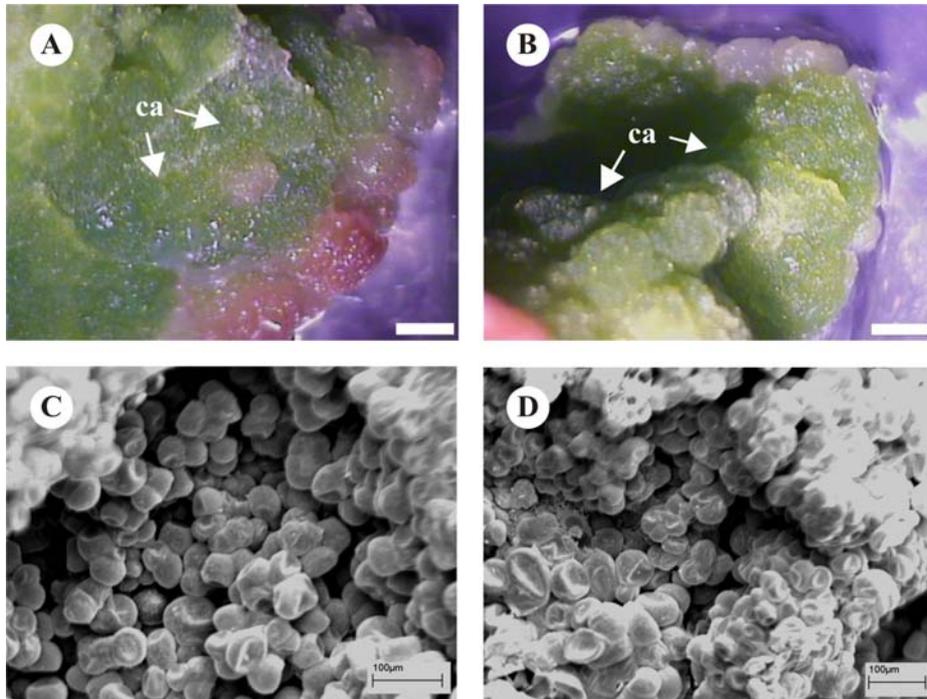


FIGURA 2.14 Eletromicrografia de varredura dos calos obtidos a partir do hipocótilo de um embrião zigótico imaturo tratado com $36,33 \mu\text{M}$ de TDZ. A e B) calo do tipo friável. Barras = 1 mm. Calo (ca). C e D) detalhe dos calos, mostrando células isodiamétricas ao MEV. UFLA, Lavras, MG, 2008.

O formato isodiamétrico é característico de células meristemáticas (Murashige & Skoog, 1962). Os calos embriogênicos são compostos, em sua maioria, por células meristemáticas com dimensões relativamente pequenas e com citoplasma denso (Apezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2006).

5.6 Quanto ao crescimento e ao desenvolvimento dos calos e plântulas

5.6.1 Número de explantes com calos presentes e ausentes

Para a avaliação da presença e da ausência do calo no decorrer dos diferentes reguladores e de suas concentrações pela análise estatística seguindo modelo binomial. O gráfico contendo os resultados estimados a partir da análise binomial pode ser observado na Figura 2.15.

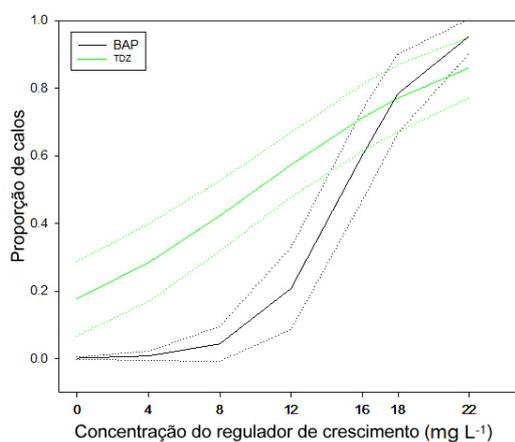


FIGURA 2.15 Efeito do BAP e TDZ na obtenção de calos a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. A linha pontilhada representa o intervalo de confiança, enquanto a linha contínua representa os dados estimados. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Ainda assim, para os reguladores BAP e TDZ (Figura 2.15), observou-se que, até a concentração de 12 mg L⁻¹, o TDZ se demonstra o melhor na obtenção de uma maior proporção de calos. Porém, em concentrações mais altas, a partir de 14 mg L⁻¹, eles já não apresentam diferenças estatísticas entre si.

5.6.2 Curva de crescimento

Os resultados referentes às avaliações de crescimento podem ser observados na Figura 2.16. No gráfico, observou-se o peso fresco médio dos explantes, seu logaritmo neperiano, a taxa de crescimento do calo (Teixeira et al., 2004) e o percentual de crescimento do calo (Lameira, 1997; Santos, 2001).

Observou-se que o maior percentual de crescimento pôde ser identificado aos 15 dias de cultivo dos embriões zigóticos imaturos em meio contendo o 99,91 μM (22 mg L^{-1}) de TDZ. Do 1º até o 15º dia provavelmente ocorreu o período caracterizado pela fase exponencial do crescimento. Esse fato pode ser devido ao 15º dia apresentar a maior taxa de crescimento 0,1939 grama/dia e o maior percentual de crescimento 94,54 % (Figura 2.16).

De acordo com Santos (2001), a fase exponencial, período no qual ocorre máxima divisão celular, ocorreu, para o explante foliar de *C. arabica* L. cv. Apatã entre o 28º e 63º dias de inoculação, com 92% de crescimento do calo. Esta mesma autora verificou que pequenas variações no crescimento dos calos, de acordo com a cultivar, ocorreram entre o 42º e o 77º dia de cultivo, em 87% e 91% de crescimento para as cultivares Rubi e Topázio.

Pode-se observar também o período de crescimento linear, em que os calos diminuem a divisão e aumentam a área celular, entre o 15º e o 60º dia (Figura 2.16).

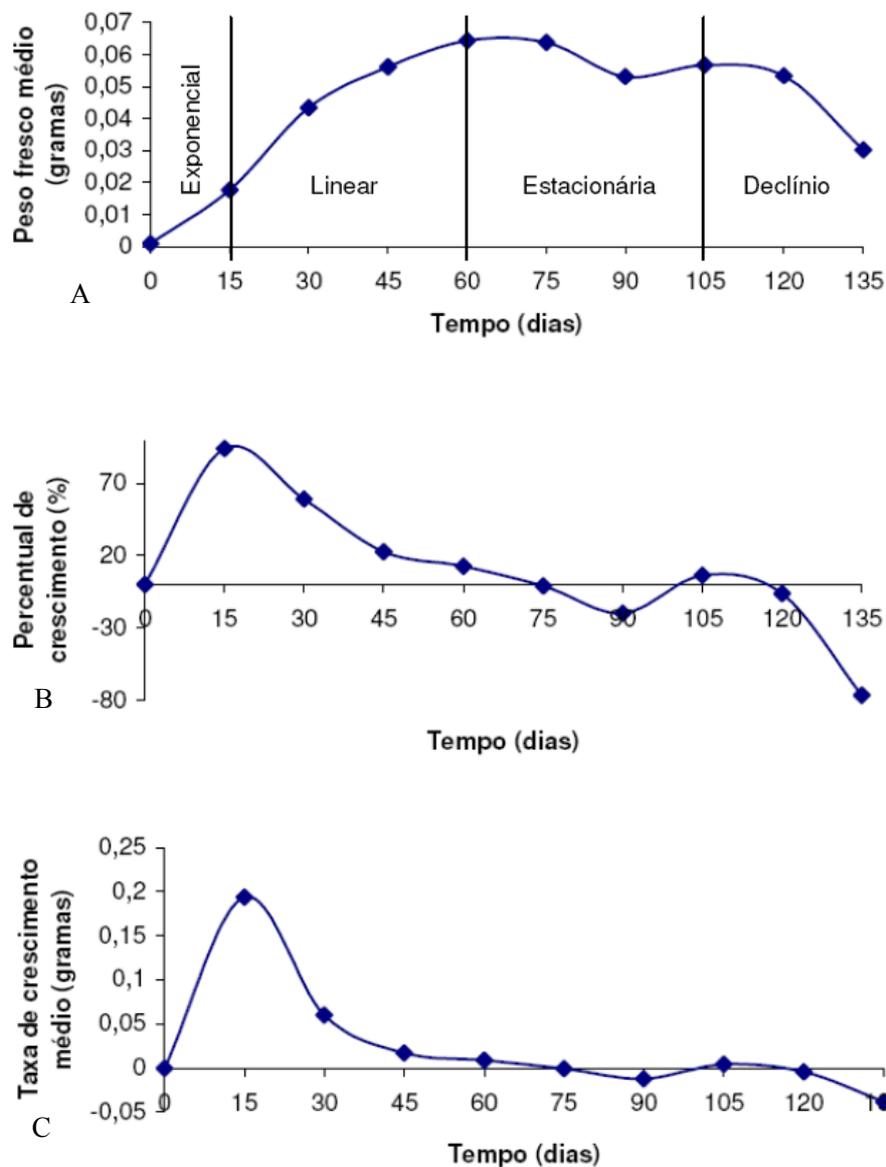


FIGURA 2.16 Curva de crescimento a partir do peso fresco médio, indicando o crescimento e o desenvolvimento dos embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo na concentração de 22 mg L^{-1} ($99,91 \text{ } \mu\text{M}$) de TDZ. A) Peso fresco médio (gramas/dia); B) percentual de crescimento; C) taxa de crescimento médio (gramas/dia). UFLA, Lavras, MG, 2008.

A partir da determinação das fases lag (preparação para o crescimento), exponencial, linear e estacionária da curva de crescimento de calos, pode-se determinar o índice mitótico para cada fase desta curva (Guerra et al., 1999). Com isso, é possível estipular o intervalo médio de subcultivos que serão feitos quando as culturas estiverem no ponto mediano da fase linear da curva de crescimento, no caso, aproximadamente 30 dias.

Logo, a fase linear foi observada entre o 15° e o 60° dia de cultivo, indicando o possível período de subcultivos do material, para os calos a partir do embrião zigótico imaturo de 'Bourbon Amarelo'.

Segundo Nogueira (2006), na curva de crescimento do murici-pequeno, a fase lag ocorreu até o 20° dia após a inoculação; a fase exponencial estendeu-se do 20° ao 40° dia de cultivo; a fase linear foi observada entre o 40° e o 60° dia de cultivo; entre o 60° e o 80° dia ocorreu a fase de desaceleração e do 80° ao 100° dia ocorreu a fase estacionária, na qual pode ocorrer o acúmulo de metabólitos secundários. Entre o 57° e o 106° dia ocorre a fase estacionária, demonstrando que o material não acumula biomassa (aumento no número de células).

Entre o 60° e o 105° dia, ocorre a fase estacionária, demonstrando que o material não acumula biomassa (aumento no número de células) para os calos a partir do embrião zigótico imaturo de 'Bourbon Amarelo'.

A partir do 100° dia, a cultura entra na fase de declínio (Smith, 1992; Nogueira, 2006). Observou-se que a fase de declínio a partir do 105° até a última avaliação aos 135 dias de cultivo dos calos obtidos a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo.

5.6.3 Número de brotos na região da incisão

Como as plantas com os reguladores 2,4-D e CIN não apresentaram nenhuma brotação, estes dados foram desconsiderados da análise. Com base nos resultados da análise dos efeitos do BAP e do TDZ separadamente, pôde-se observar que o BAP atuou como intercepto da mesma.

Pelo gráfico da Figura 2.17, pode-se melhor visualizar os resultados obtidos, observando-se os dados dispersos e a interação entres as diferentes concentrações de cada um dos reguladores de crescimento.

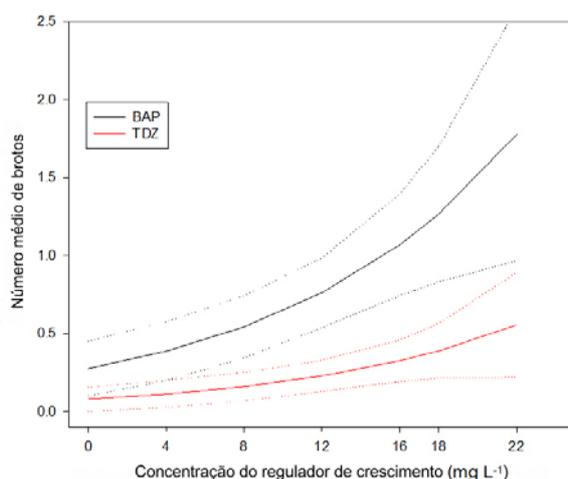


FIGURA 2.17 Efeito do BAP e TDZ na obtenção de brotos a partir da incisão no hipocótilo de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. A linha pontilhada representa o intervalo de confiança, enquanto a linha contínua representa os dados estimados. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Como se observou no gráfico da Figura 2.17, o número médio de brotos na região da incisão no hipocótilo do embrião foi maior para o BAP na concentração de 22 mg L⁻¹ (97,69 μM). O número médio de, aproximadamente, dois brotos por explante é inferior, se comparado com, aproximadamente, três, obtidos por Ribeiro (2001). Porém, as superfícies de contato do explante nodal

são maiores se comparadas à região da injúria sofrida pelo hipocótilo. De acordo com Carvalho et al. (1997), o melhor resultado para número total de brotos em *C. arabica* L. cv. Catuaí foi obtido na maior concentração de BAP testada, 9 mg L⁻¹ (aproximadamente 39,96 µM).

5.5.4 Número de folhas dos brotos na parte incisada (hipocótilo) do embrião

Como as plantas nos reguladores 2,4-D e CIN não apresentaram nenhuma brotação, estes dados foram desconsiderados na análise. Baseados nos resultados entre BAP e TDZ, observou-se que somente as plantas no BAP apresentaram brotações nas quais as folhas tiveram tamanho suficiente para contagem.

Pelo gráfico da Figura 2.18, observam-se os dados dispersos e a interação entres as diferentes concentrações do regulador de crescimento.

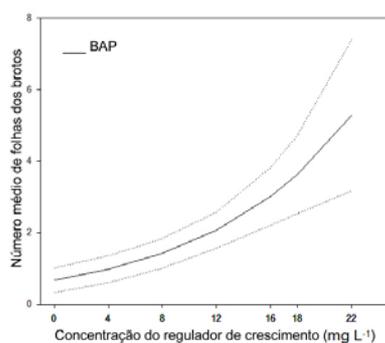


FIGURA 2.18 Efeito do BAP no número de folhas dos brotos obtidos na região da incisão nos embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. A linha pontilhada representa o intervalo de confiança, enquanto a linha contínua representa os dados estimados. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Pelo mesmo gráfico, observa-se que, com o aumento da concentração de BAP, o número de folhas dos brotos aumenta proporcionalmente. A característica número de folhas é interessante pelo fato de apresentar-se como

material *in vitro* para futuros testes para propagação maciça, a partir desse explante (Molina et al., 2002; Teixeira et al., 2004).

5.6.4 Número de folhas da parte aérea (cotiledonar) do embrião

Neste trabalho, ao observar a variável número de folhas isoladamente sob o efeito do BAP em comparação aos resultados da CIN e do TDZ, constatou-se seu efeito benéfico em decorrência do aumento de sua concentração (Figura 2.19).

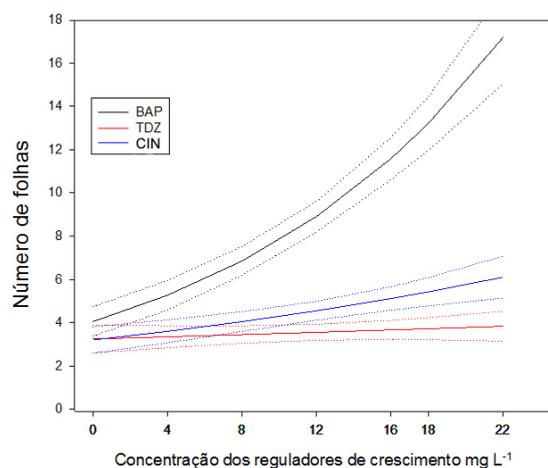


FIGURA 2.19 Número de folhas da parte aérea (cotiledonar) do embrião zigótico imaturo de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. A linha pontilhada representa o intervalo de confiança, enquanto a linha contínua representa os dados estimados. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Estes dados discordam dos de Carvalho et al. (1998), que não observaram diferenças estatísticas quanto à característica primeiro par de folhas de *Coffea arabica* cv. Acaíá, avaliando a interação entre os reguladores GA₃ e BAP. Estes autores observaram que um maior número de embriões apresentou o primeiro par de folhas no tratamento com 6 mg L⁻¹ de GA₃ e 8 mg L⁻¹ de BAP.

Contudo, verificaram também uma tendência de superioridade no tratamento envolvendo apenas a concentração 6 mg L^{-1} de GA_3 o que indicaria, segundo Carvalho et al. (1998), que a citocinina BAP não influenciaria no aparecimento das primeiras folhas e que a BAP é dispensável na cultura de embriões no cafeeiro, quando se trata da emergência de folhas.

5.7 Probabilidades entre resultados esperados e alcançados

Para a discussão entre resultados esperados e alcançados, observaram-se as probabilidades de ocorrência dos fenômenos morfogênicos *in vitro* por meio da probabilidade de ocorrência dos mesmos no decorrer das concentrações (doses), dos reguladores e do tempo (Figuras 2.20-2.25).

De acordo com os gráficos para a probabilidade de ocorrência de oxidação dos explantes *in vitro* (Figura 2.20), o regulador 2,4-D destacou-se dos demais, sendo que à medida que se aumentam a concentração e o tempo, a oxidação dos explante foi notada (Figuras 2.9 e 2.10). O efeito oxidativo do 2,4-D causado pelas altas concentrações, chegando a 90% de probabilidade de oxidação, estaria relacionado, possivelmente, ao caráter herbicida do composto.

Como, no decorrer dos dias (15-120)n, nenhum explante apresentou-se de acordo com a escala de avaliação no conceito zero (inalterado), o mesmo não será demonstrado na forma de figura.

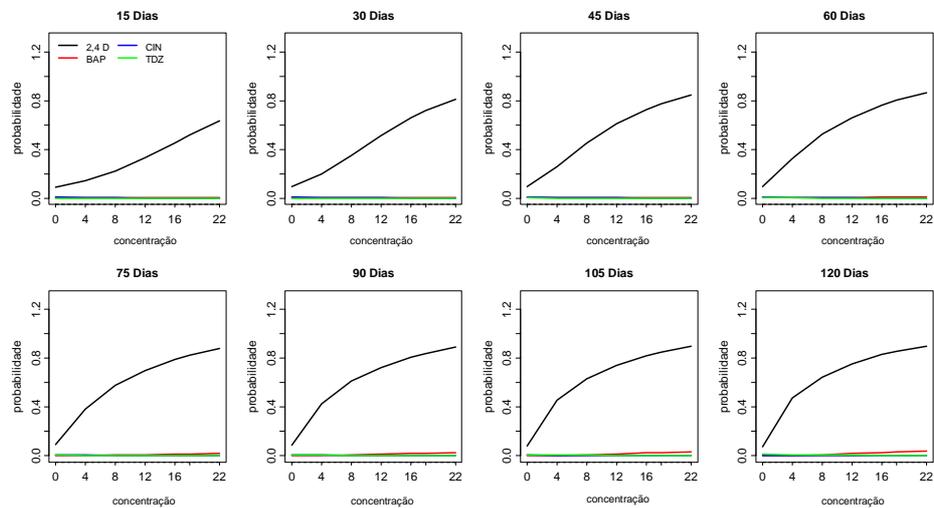


FIGURA 2.20 Probabilidade de ocorrência de oxidação na região da incisão dos explantes. Doses (concentrações) em mg L^{-1} . UFLA, Lavras, MG, 2008.

De acordo com os gráficos para a probabilidade de ocorrência de intumescimento dos explantes *in vitro* (Figura 2.21), observou-se que o regulador CIN (cinetina) manteve-se proporcionalmente constante. Tal fato pôde ser observado tanto pela ordenada doses quanto ao decorrer dos dias.

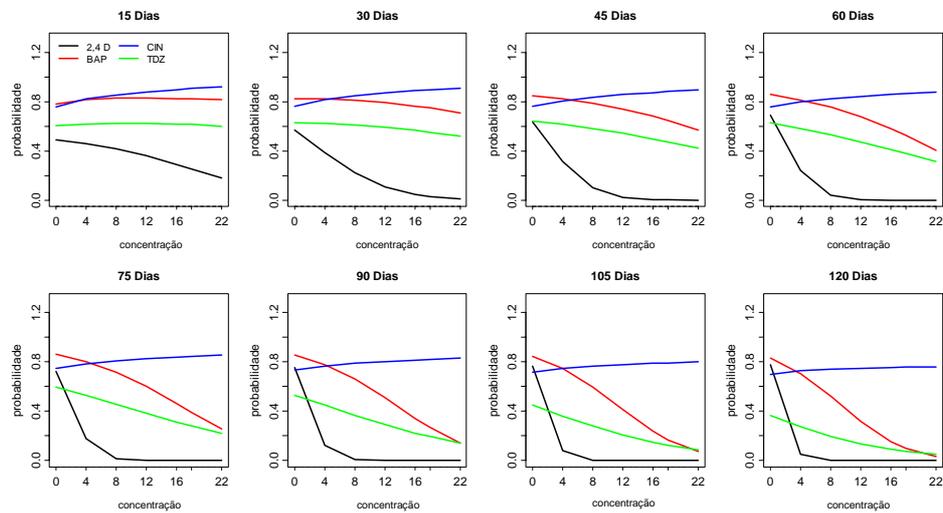


FIGURA 2.21 Probabilidade de ocorrência de intumescimento na região da incisão dos explantes. Doses (concentrações) em mg L^{-1} . UFLA, Lavras, MG, 2008.

O intumescimento do explante é, geralmente, relacionado à capacidade do tecido em produzir o calo (Figueiredo, 2007). Para todos os reguladores, principalmente 2,4-D, BAP e TDZ, observou-se que essa correlação não se demonstra na mesma escala em que se aumentam as doses e os dias (Figura 2.21 e 2.22).

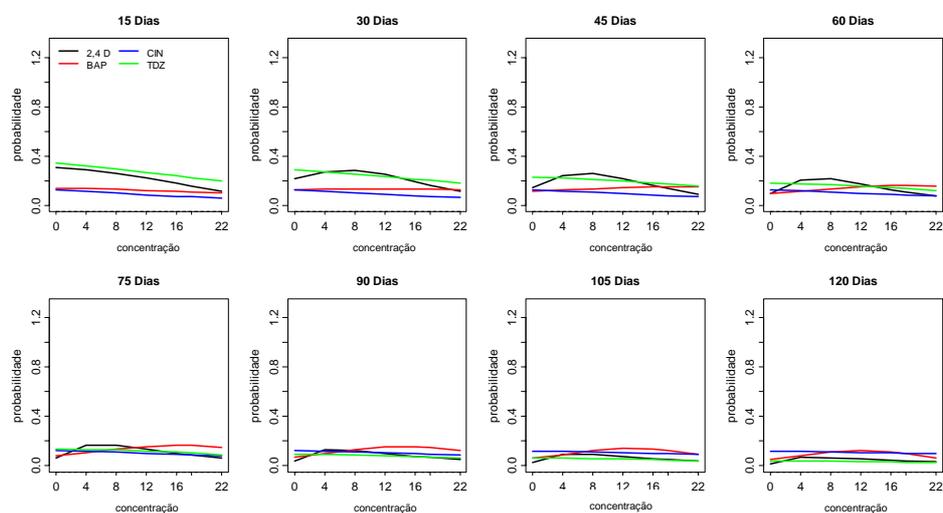


FIGURA 2.22 Probabilidade de ocorrência de calo na região da incisão nos explantes. Doses (concentrações) em mg L^{-1} . UFLA, Lavras, MG, 2008.

Até os 60 dias, observou-se que os reguladores 2,4-D, nas doses 4 e 8 mg L^{-1} e TDZ apresentam maiores probabilidades de ocorrência de calo em relação aos demais reguladores. Ainda, a partir dos 75 dias, a ocorrência de calo se manteve próximo à faixa de 20% de probabilidade para todos os reguladores. Enquanto a ocorrência do calo não se diferencia a partir deste período, o TDZ apresenta-se como um regulador com efeito direto no crescimento do calo (Figura 2.23), sendo posteriormente seguido pelo BAP.

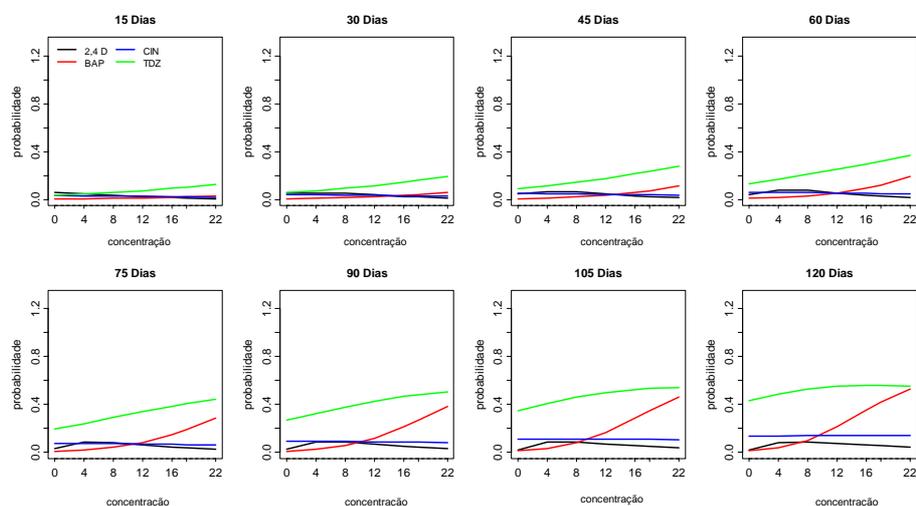


FIGURA 2.23 Probabilidade de crescimento do calo na região da incisão nos explantes. Doses (concentrações) em mg L^{-1} . UFLA, Lavras, MG, 2008.

Enquanto o 2,4-D e o CIN permanecem constantes ao decorrer das doses e dias, o TDZ e o BAP apresentam-se como atuantes diretos no crescimento do calo no explante (Figura 2.32). No entanto, o comportamento do TDZ no decorrer da dose e do tempo é gradativo, estabilizando em 55% de calos, enquanto o BAP atua no crescimento do calo de abruptamente a partir da dose de 8 mg L^{-1} ($35,52 \mu\text{M}$), alcançando 53% na dose de 22 mg L^{-1} ($97,69 \mu\text{M}$), aos 120 dias.

Mathur et al. (2000), utilizando embriões zigóticos imaturos de *Pinus roxburghii* Sarg., constataram 48,31% de extrusão (calo) e 13,5% de culturas embriogênicas estabelecidas. Vale ressaltar que estes autores utilizaram uma associação entre altas concentrações de reguladores, sendo 2,4-D ($50 \mu\text{M}$), BAP ($20 \mu\text{M}$) e CIN ($20 \mu\text{M}$).

A presença de gemas, como indicativo de um processo organogênico (Appezato-da-Glória et al. 2005), foi observada (Figura 2.24).

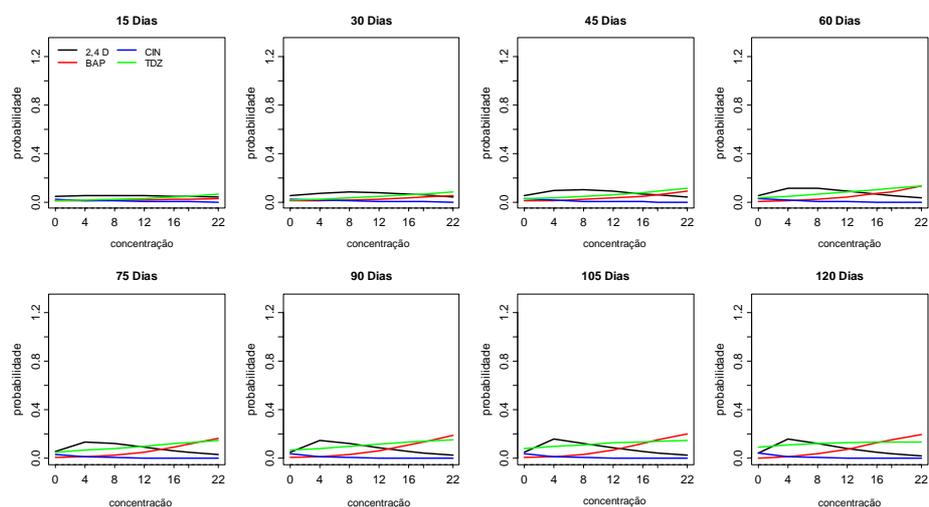


FIGURA 2.24 Probabilidade de presença de gemas na região da incisão nos explantes. Doses (concentrações) em mg L^{-1} . UFLA, Lavras, MG, 2008.

A ocorrência de gemas foi registrada pelos juízes na dose inicial de 2,4-D ($4 \text{ mg L}^{-1}/18,1 \mu\text{M}$), a partir do 60º dia, chegando a 13% de probabilidade de ocorrência. O comportamento do TDZ e BAP, apesar de apresentarem uma probabilidade menor que para o crescimento do calo, revela sua atuação no desenvolvimento do mesmo. Após os 120 dias, o TDZ apresentou probabilidade de 13% enquanto o BAP, 19% na presença de gemas. Aqui se considerou a presença de gemas como processo organogênico indireto, devido ao fato de os resultados de MEV demonstrarem a ocorrência dessas estruturas. Essas gemas, posteriormente, se desenvolveram em brotos que foram também avaliados quanto à probabilidade de sua ocorrência (Figura 2.25).

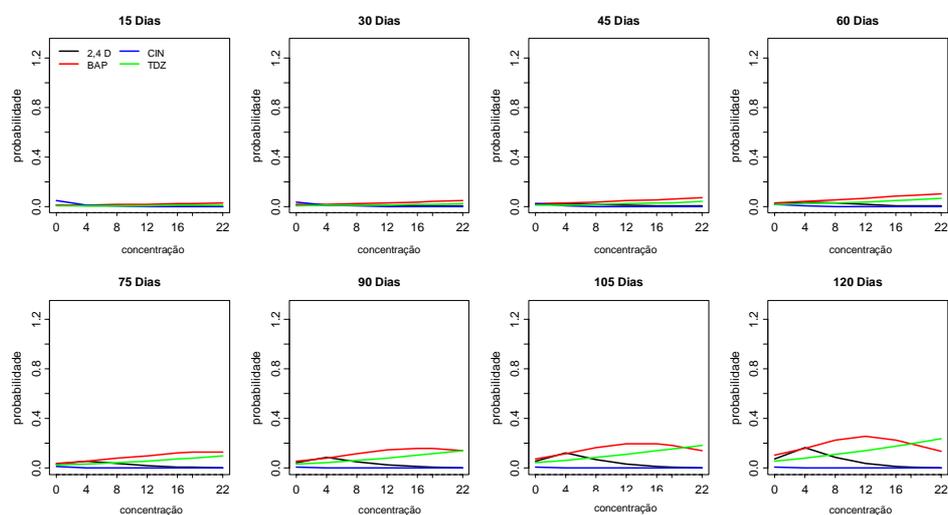


FIGURA 2.25 Probabilidade da ocorrência de brotos na região da incisão nos explantes. Doses (concentrações) em mg L^{-1} . UFLA, Lavras, MG, 2008.

Até os 120 dias, a probabilidade da ocorrência de brotos para o TDZ (23%) e o BAP (13%) na dosagem máxima de 22 mg L^{-1} ($99,91/97,69 \mu\text{M}$) é divergente do comportamento até os 75 dias (9/12%), em que aparecem paralelos.

Esperava-se, neste trabalho, que o 2,4-D atuasse diretamente na calogênese e proporcionasse os melhores resultados no crescimento e no desenvolvimento de tecidos embriogênicos e ou organogênicos. Porém, reguladores análogos às citocininas, como BAP e TDZ, demonstraram melhores resultados nas doses testadas.

Devido à natureza juvenil que proporciona o alto potencial regenerativo de embriões zigóticos de *C. arabica* L. cv. Bourbon Amarelo, os mesmos se apresentam como fontes alternativas de explantes para a obtenção de calo e de plântulas *in vitro* de cafeeiro.

6 CONCLUSÕES

A incisão no hipocótilo, conciliada com a adição de reguladores de crescimento, provoca efeitos calogênicos e organogênicos nos explantes.

Concentrações mais baixas de 2,4-D promovem a produção de calos friáveis com 15 dias, enquanto o TDZ proporcionou calos com potencial organogênico a partir do mesmo período.

Foi observado que alta concentração de BAP promove a emissão e um desenvolvimento favorável das partes aéreas das plântulas propagadas vegetativamente, a partir do embrião zigótico desta cultivar.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal**. 2.ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 438p.

APPEZZATTO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J.A.; MACHADO, S.R.; VIEIRA, M.L.C. Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultraestruturais da organogênese *in vitro* do maracujazeiro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p.382-407.

ANDRADE, L.M.C.O.; PASQUAL, M.; MACIEL, A.L.R.; PEREIRA, A.B.; CAVALCANTE-ALVES, J.M. Cultura *in vitro* de embriões de *Coffea arabica*: influência de NAA e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.5, p.1063-1070, set./out. 2001.

AYUB, R.A.; GEBIELUCA, A.N. Embriogênese somática em genótipos de café (*Coffea arabica*) é citocinina dependente. **Publicatio UEPG Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, v.9, n.2, p.25-30, ago. 2003.

CAMARGO, J.F.R.P. de; CARVALHO, C.R. de; OTINI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n.6, p.887-895, 2005.

CAMARGO, A.P.; CAMARGO, M.B.P. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, Campinas, v.60, n.1, p.65-68, 2001.

CAPELLE, S.C.; MOK, D.W.S.; KIRCHNER, S.C.; MOK, M.C. Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N⁶-(Y²-isopentyl) [8-14c] adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. **Plant Physiology**, Rockville, v.73, p.796-802, 1983.

CARVALHO, G.R.; PASQUAL, M.; ANTUNES, L.E.C.; SILVA, A.T.; SCARANTE, M.J. Efeito do triadimenol e benzilaminopurina no desenvolvimento de brotos *in vitro* do cafeeiro cv. Catuaí. **Revista UNIMAR**, Marília, v.19, n.3, p.767-775, 1997.

CARVALHO, G.R.; PASQUAL, M.; GUIMARÃES, R...; MENDES, A.N.G., ANTUNES, L.E.C.; SILVA, A.T. da. Efeito do ácido giberélico e benzilaminopurina no crescimento *in vitro* de embriões do cafeeiro cv. Acaía. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.6, p.847-851, 1998.

DE CASTRO, R.D.; ESTANISLAL, W.T.; MESQUITA, P.R.; HILHORST, H.W.M. A semente de café: desenvolvimento e perspectivas genômicas. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Vitória, ES: Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café, 2001. CD ROM

DUDITS, D.; GYORGYEY, J.; BOGRE, L.; BAKÓ, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. ***In vitro embryogenesis in plants***. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.267-308.

ETIENNE, H. Somatic embryogenesis protocol: coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.) In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K. (Ed.). **Protocols for somatic embryogenesis in woody plants**. Springer: Netherlands, 2005. p.167-179.

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

FIGUEIREDO, M.A. **Obtenção, análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de *Passiflora* spp.** 2007. 113p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FORNI, R.C. **Níveis de “MS”, BAP, número de gemas do explante e período de repicagem na produção de brotos, folhas, matéria seca e níveis de 2,4-D e cinetina para tamanho e fenótipo dos calos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44.** 1993. 81f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FREITAS, J.A.E.; SOUZA, F.A.; BERBARA, F.L.L.; STARK, E.M.L.M.; SOUZA, S.R. Produção de plântulas de *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* P. *in vitro* a partir de embriões maduros extraídos de sementes. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, 16., 2006, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: UFRRJ, 2006. 2p. CD-ROM

GIRIDHAR, P.; INDU, E.P.; CINOD, K.; CHANDRASHEKAR, A.; RAVISHANKAR, G.A. Direct somatic embryogenesis from *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* P ex Fr. under influence of ethylene action inhibitor-silver nitrate. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, Heidelberg, v.26, n.3, p.299-305, 2004a.

GIRIDHAR, P.; KUMAR, V.; INDU, E.P.; RAVISHANKAR, G.A.; CHANDRASHEKAR, A. Thiadizuron induced somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* P ex Fr. **Acta Botanica Croatica**, Zagreb, v.63, n1, p.25-33, 2004b.

GUERRA, P.G.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, I.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1999. v.2, p.533-568.

HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPH. p.371-393, 1998.

HUETTMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.33, n.2, p.105-119, 1993.

HUTCHINSON, M.J.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Morphoregulatory role of TDZ: evidence of the involvement of endogenous auxin in TDZ-induced somatic embryogenesis of Geranium (*Pelargonium X hortorum* Bailey). **Journal of Plant Physiology**, v.149, p.573-579, 1996.

ILLG, R.D. Metodologia de seleção *in vitro* para resistência a fatores causadores de estresse. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. **Anais...** Brasília: ABCTP/ EMBRAPA, 1986. p.45-47.

LAMEIRA, O.A. **Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.)**. 1997. 88p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LASZLOFFY, K.; ABDUL KADER, A.M.; MATHÉ, A. *In vitro* propagation of 'Julyred' apple. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.300, p.149-154, 1992.

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

MATHUR, G.; ARNOLD, S.V.; NADGAUDA, R. Studies on somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of chir pine (*Pinus roxburghii* Sarg.) **Current Science**, Bangalore, v.79, n.7, p.999-1004, 2000.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; ARMSTRONG, D.J.; SHUDO, K.; ISOGAI, Y.; OKAMOPTO, T. CytoCINin activity of N-phenyl-N'-1,2,3,-thidiazol-5-yl urea (thidiazuron). **Phytochemistry**, Elmsford, v.21, p.1509-1511, 1982.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-92, 1962.

MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Berlin, v.34, p.267-275, 1998.

NOGUEIRA, R.C. **Caracterização de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. 2006. 41p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PAIVA NETO, V.B.; BOTELHO, M.N.; AGUIAR, R.; SILVA, E.A.M.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v.39, n.6, p.629-634, 2003.

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

PEZZOPANE, J.R.M.; JÚNIOR, M.J.P.; THOMAZIELLO, R.A.; MARCELO CAMARGO, M.B.P. Escala para avaliação dos estádios fenológicos do cafeeiro arábica. **Bragantia**, Campinas, v.62, n.3, p.499-505, 2003.

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 Reports**, Berlin, v.20, p.1141-1149, 2002.

QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R.M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.86, p.285-301, 2006.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**, a language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing. Vienna, 2007.

RIBEIRO, L. de S.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. de R.; CHAGAS, E. A.; DUTRA, L. F. Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de *Coffea arabica*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, p.1479-1483, dez. 2003. Edição Especial.

SANTA-CATARINA, C.; HANAI, L.R.; DORNELAS, M.C.; VIANA, A.M.; FLOH, E.I.S. SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.79, p.53-61, 2004.

SANTOS, A.C. R.; OLIVEIRA, P.L.; TEIXEIRA, J.B.; PADILHA, L.; CARVALHO, C.H. Produção de calos embriogênicos em genótipos elite de café arábica. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, SP: Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, 2007.

SANTOS, C.G. **Micropropagação e caracterização bioquímico anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)—Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

SERA, G.H.; MIGLIORANZA, E. Avaliação visual do potencial germinativo de sementes de café pelo formato e coloração do embrião. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, n.2, p.307-310, jul./dez. 2003.

SMITH, R.M. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic, 1992. 171 p.

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

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A.; AS, M.F.G. de; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M. de M.; PINHO, E.R.C. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2000. 128p.

VENTURIERI, G.A.; VENTURIERI, G.C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* X *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazonica**, Manaus, v.34, n.4, p.507-511, 2004.

VISSER, C.; AURESHI, J.A.; GILL, R.; SAXENA, P.K. Morphoregulatory role of thidiazuron: substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyls cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v.99, p.1704–1707, 1992.

CAPÍTULO 3 Características histo-anatômicas dos calos a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Rubi

1 RESUMO

LACERDA, Guilherme Araújo. Características histo-anatômicas dos calos de *Coffea arabica* L. cv. Rubi. In: _____. **Obtenção e caracterização de calos e plântulas a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. e análise *in silico* do gene SERK.** 2008. Cap.3, p.81-98. (Doutorado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Com o objetivo de estudar o processo de calogênese utilizando-se embriões zigóticos imaturos de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Rubi como fonte alternativa de explantes, foi realizado o presente trabalho. Foram coletados frutos de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Rubi em estágio verde-cana e mantidos em sacos de papel, por 24 horas, sob refrigeração (4°C). Os frutos foram desinfestados com hipoclorito de sódio comercial 70% (v/v) durante 30 minutos, em câmara de fluxo laminar e lavados 3 vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida, os embriões foram isolados utilizando-se placas de Petri esterilizadas contendo papel filtro e água destilada e autoclavada. Para induzir a calogênese, foi realizada uma incisão no hipocótilo do embrião zigótico imaturo no momento de sua excisão do fruto. Calos provindos de plantas de cafeeiro com um ano de estabelecimento foram observados quanto aos seus aspectos histo-anatômicos. Foram feitos cortes transversais corados com safrablau (safranina e azul de astra) e observados e fotografados em microscópio fotônico. Foi observado, ao MEV, que as células acumulam grande quantidade de amiloplastídeos, sugerindo que os grãos de amido podem ser utilizados como marcadores iniciais do potencial embriogênico. A microscopia fotônica revelou que os calos provindos de embriões zigóticos apresentam-se como uma fonte de explante responsiva à embriogênese, mostrando indícios de formação de embriões somáticos.

*Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Antonio Chalfun Junior (Co-orientador) – UFLA.

2 ABSTRACT

LACERDA, Guilherme Araújo. Histo-anatomical characteristics of the calluses from *Coffea arabica* L. cv. Rubi. In: _____. **Obtaining and characterization of calluses and plantules starting from immature zygotic embryos of *Coffea arabica* L. and gene SERK *in silico* analysis.** 2008. Cap.3, p.81-98. Thesis (Doctor's degree in Plant Physiology)–Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

With the objective of studying the callogenesis process being used zygotic embryos immature of coffee plant *C. arabica* L. cv. Rubi as alternative source of explants was accomplished the present work. Coffee plant fruits were collected *C. arabica* L. cv. Rubi in stage verde-cana and maintained in paper bags by 24 hours under cooling (4 °C). The fruits were disinfected with commercial hypochlorite of sodium 70% (v/v) for 30 minutes, in flow camera to laminate and washed 3 times in distilled water and autoclavada. Soon afterwards the embryos were isolated using plates of sterilized Petri containing paper filter and distilled water and autoclavada. To induce the callogenese an incision it was accomplished in the hypocotyls of the immature zygotic embryo in the moment of his excised of the fruit. Calluses of the coffee plant plants with 1 year old of establishment were observed. They were made red-faced traverse cuts with safrablau (safranina and astra blue) and observed and photographed in optical microscope. It was observed SEM that the cells accumulate great amount of grains of starch, suggesting that the grains of starch can be used as initial markers of the embryogenic potential. The optical microscopy revealed that the calluses of the zygotic embryos come as a source of responsive explante to the embryogenesis, showing indications of formation of somatic embryos.

*Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Adviser), Antonio Chalfun Junior (Co-adviser) – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

A embriogênese somática torna-se uma estratégia viável para o estudo do desenvolvimento fisiológico do embrião e da produção de sementes sintéticas em larga escala. Esta técnica é uma das melhores opções para a propagação massal de plantas elite (Gupta et al., 1993), proporcionando alta taxa de multiplicação, escalonamento da produção, manutenção de embriões em meios de cultura, plantio direto da muda sem necessidade de enxertia, além de possibilitar a transferência de genes, tanto pela fusão de protoplastos como pela transformação genética (Barros, 1999).

Segundo Ammirato (1983), na embriogênese somática, uma única célula ou um grupo de células somáticas são precursoras de embriões somáticos, sendo esse processo similar ao da embriogênese zigótica. Os embriões somáticos *in vitro* podem ser formados a partir de dois padrões básicos de embriogênese, direto ou indireto.

Embora o sucesso da embriogênese somática em plantas lenhosas seja muito baixo, foi possível estabelecer protocolos de indução de embriogênese somática para várias espécies florestais, incluindo vários membros da família Lauraceae, como para *Laurus nobilis* (Canhoto et al., 1999), *Persea americana* Mill. (Witjaksono et al., 1999) e *Ocotea catharinensis* (Viana & Mantell, 1999).

Pescador et al. (2000) reportam que a possibilidade de manipular sistemas *in vitro* para a clonagem de genótipos vegetais superiores depende de vários fatores, como parâmetros morfológicos, genéticos, bioquímicos, citológicos e o conhecimento da fisiologia do desenvolvimento celular, que é de fundamental importância para se obter respostas morfogenéticas nos sistemas de cultura *in vitro*.

Embora não se conheça, ainda, de forma satisfatória, por que certos eventos regenerativos, *in vitro*, são mais facilmente induzidos em alguns tecidos

do que em outros, admite-se que as diferentes expressões morfogênicas reflitam na natureza e no grau de diferenciação destes tecidos.

Assim, alguns autores tentam relacionar as características ultra-estruturais ao potencial embriogênico (Radojevic et al., 1975). No entanto, a caracterização citológica de calos durante o desenvolvimento não tem sido realizada com frequência na cultura de tecidos. O estudo das alterações ultra-estruturais durante a organogênese *in vitro* para caracterizar as células meristemóides e a formação dos brotos é escasso (Pihakashi-Maunsbach et al., 1993; Arai et al., 1997).

Dessa forma, a falta de conhecimento dos fatores que regulam a embriogênese somática e a assíncronia no desenvolvimento de embriões somáticos são os principais responsáveis por sua reduzida aplicação comercial (Pihakashi-Maunsbach, 1993). Uma das estratégias que podem aumentar a eficiência do processo embriogênico seria uma análise ultra-estrutural ainda no estágio de calo.

Com o objetivo de estudar o processo de calogênese utilizando-se embriões zigóticos imaturos de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Rubi como fonte alternativa de explantes, foi realizado o presente trabalho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Os experimentos foram realizados em associação com o Laboratório Central de Biologia Molecular, o Laboratório de Anatomia Vegetal e o Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais. Foram coletados frutos de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Rubi em estágio verde-cana e mantidos em sacos de papel, por 24 horas, sob refrigeração (4°C).

4.2 Desinfestação e inoculação do material vegetal

Os frutos foram desinfestados com hipoclorito de sódio comercial 70% (v/v) durante 30 minutos, em câmara de fluxo laminar e lavados 3 vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida, os embriões foram isolados utilizando-se placas de Petri esterilizadas contendo papel filtro e água destilada e autoclavada. Para induzir a calogênese, foi realizada uma incisão no hipocótilo do embrião zigótico imaturo, no momento de sua retirada do fruto.

4.3 Calogênese

Os embriões zigóticos imaturos foram utilizados como fonte de explante para calogênese, sendo, posteriormente, inoculados em 20 mL de meio em frascos do tipo *baby food*. Foi utilizado meio para cultivo de embriões zigóticos de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Rubi, descrito como o melhor tratamento para desenvolvimento das partes aéreas, por Santos (2001), constituído pelo MS sais e vitaminas (Murashige & Skoog, 1962) e suplementado com BAP (12 mg L⁻¹), ágar (8 g L⁻¹) e sacarose (30 g L⁻¹). O pH dos meios, autoclavados a 121 °C por 20 minutos, foram ajustados em 5,8.

Depois de inoculados, os embriões foram mantidos em sala de crescimento a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ e intensidade luminosa de $80 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, sob fotoperíodo de 16 horas, durante todo o experimento.

4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Calos provindos de plantas de cafeeiro com um ano de estabelecimento em meio de cultura foram fixados em Karnovsky (1965) modificado [glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%)] em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,0, por 24 horas, em temperatura ambiente.

Posteriormente, os calos foram colocados em glicerol 30% por 30 minutos e cortados em nitrogênio líquido com bisturi. Os fragmentos foram lavados três vezes (10 minutos) em tampão cacodilato 0,05 M e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% por 1-2 horas. Em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%) por 10 minutos e em 100% por 2 vezes de 10 minutos.

Posteriormente, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico por meio de CO_2 líquido para completar a secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs*, com fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Diversas imagens para cada amostra foram geradas e registradas digitalmente, a aumentos variáveis, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de 9 mm.

4.4 Microscopia fotônica

Foram feitos cortes transversais nos calos, que foram corados com safrablau (safranina e azul de astra) (Bukatsh, 1972) e observado e fotografados em microscópio fotônico.

Para a captura das imagens foi utilizado o microscópio Leica DM LS[®] com câmera Nikon[®] acoplada, no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ocorrência do calo em decorrência do BAP pode ser visualizada nas plantas que sofreram uma incisão na região do hipocótilo, o que, provavelmente devido ao estresse, provocou uma resposta calogênica do tecido (Figura 3.1).



FIGURA 3.1 A) Plântula obtida a partir de um embrião zigótico imaturo de *Coffea arabica* L. cv. Rubi, mostrando o calo formado na região da incisão. B) Estereomicrografia para o detalhe do calo, permitindo a visualização de seu aspecto e coloração clara. Barra = 1 mm. UFLA, Lavras, MG, 2008.

De forma geral, a maioria dos calos apresentava-se com o mesmo aspecto da Figura 3.1B, porém, com diferenças na coloração de marrom-claro (Figura 3.1B), marrom-escuro, verde e alguns avermelhados.

Foi observado, ao MEV, que as células acumulam grande quantidade de grãos de amido e material protéico amorfo (Figura 3.2).

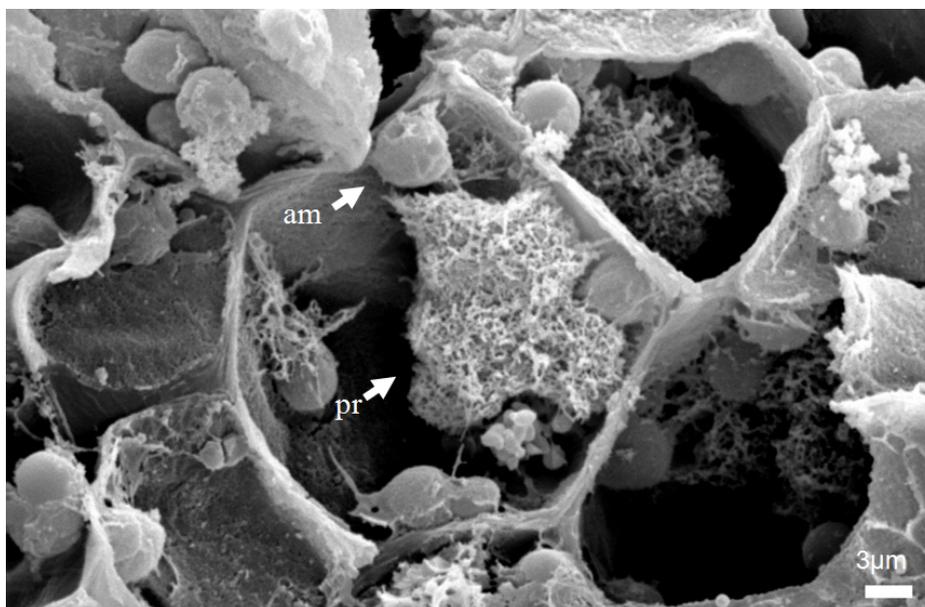


FIGURA 3.2 Eletromicrografia de varredura mostrando o tecido adjacente ao calo de *Coffea arabica* L. cv. Rubi. Amiloplastídeo (am); proteína like (pr). UFLA, Lavras, MG, 2008.

A afinidade da técnica de microscopia eletrônica de varredura por proteínas pôde ser constatada com a utilização de glicerol. Moore et al. (2005), trabalhando com biofilmes de queratina, concluíram que, à medida que aumentava a concentração de glicerol, observava-se maior homogeneidade dos biofilmes protéicos.

Santos (2001) observou que os teores de proteínas totais (método do ácido bicinonínico) de calos de explantes foliares mantiveram-se constantes e em baixas concentrações durante o período de crescimento, para a cultivar Rubi.

Durante a cultura de embriões somáticos, as células acumulam grande quantidade de grãos de amido, sugerindo que os grãos de amido podem ser utilizados como marcadores iniciais do potencial embriogênico (Radojevic,

1979; Ho & Vasil, 1983; Godbole et al., 2004; Appezzato-da-Glória e Machado, 2004).

Em detalhe, na Figura 3.3, observa-se onde fica a delimitação do tecido adjacente que originou o calo, mostrando a ligação morfoanatômica entre a presença de grãos de amido (internos as células do caule) e as células isodiamétricas do calo.

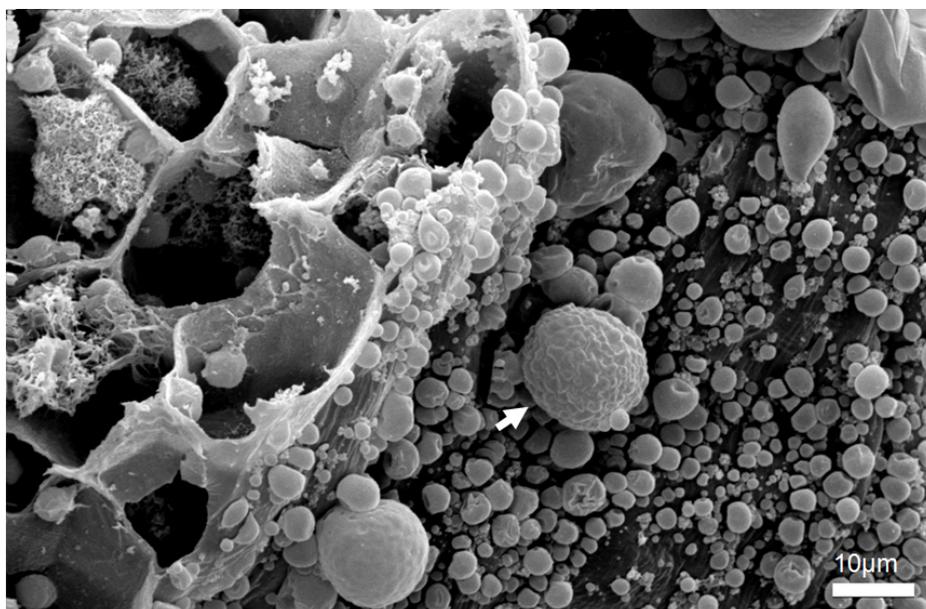


FIGURA 3.3 Eletromicrografia de varredura, mostrando o tecido adjacente ao calo de *Coffea arabica* L. cv. Rubi. Observou-se, no interior das células, o material protéico amorfo e os amiloplastídeos, e a delimitação entre o tecido adjacente da plântula e as células isodiamétricas do calo. A seta indica o pró-embrião em estágio globular inicial. UFLA, Lavras, MG, 2008.

As células embriogênicas, de maneira geral, apresentam características comuns ao comportamento de células embriogênicas ativas, incluindo rápida

divisão mitótica, pequeno tamanho, citoplasma denso, núcleo grande com nucléolo proeminente, vacúolo pequeno e abundância de grãos de amido. Essas características sugerem intensa síntese de RNA e ampla atividade metabólica.

De acordo com Quiroz-Figueroa et al. (2002), o desenvolvimento de um embrião se inicia com pequenas células isodiamétricas, com citoplasma denso, que é sucedido de uma série de divisões celulares sucessivas, idêntica à observada durante a embriogênese zigótica (Moens, 1965).

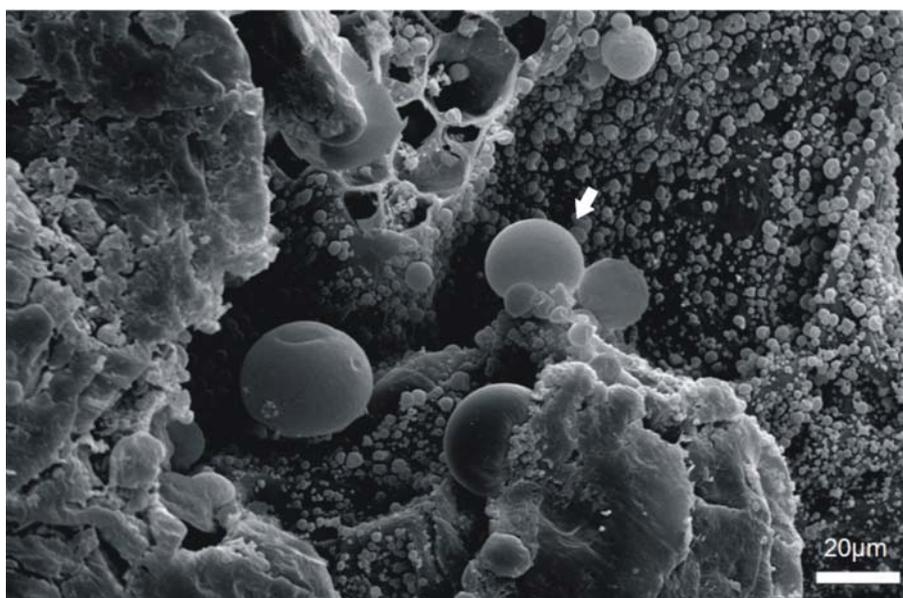


FIGURA 3.4 Eletromicrografia de varredura mostrando as células isodiamétricas em diversos tamanhos (estádios) do calo de *Coffea arabica* L. cv. Rubi. A seta indica o pró-embrião em estágio globular inicial. UFLA, Lavras, MG, 2008.

A embriogênese somática direta ocorre a partir do explante, que possui células programadas para a diferenciação e a formação de embriões somáticos. Para a embriogênese somática indireta, a desdiferenciação dos explantes resulta

na formação de calos, com células ou grupo de células competentes, ou seja, com capacidade de responder aos efeitos estimulantes do meio de cultura.

As estruturas globulares (Figura 3.4) notadas no centro indicam a ocorrência de pró-embriões somáticos em estágio inicial. Quiroz-Figueroa et al. (2002) definem estas estruturas como sendo uma célula embriogênica com o diâmetro entre 15 e 20 μm , demonstrando sinais de polarização (Figura 3.5).

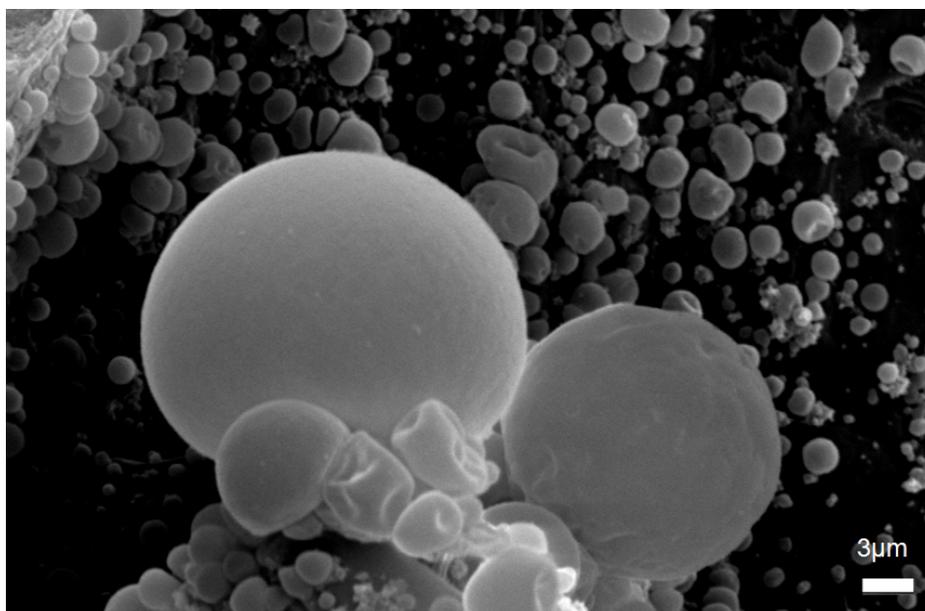


FIGURA 3.5 Eletromicrografia de varredura, mostrando, em detalhes, as células isodiamétricas em diversos tamanhos (estádios) do calo de *Coffea arabica* L. cv. Rubi. UFLA, Lavras, MG, 2008.

A microscopia fotônica revelou que os calos provindos de embriões zigóticos apresentam-se como uma fonte de explante responsiva à embriogênese, mostrando indícios de formação de embriões somáticos (Figura 3.5). De acordo com Quiroz-Figueroa et al. (2002), trata-se de um embrião globular e estágio avançado de cafeeiros em embriogênese somática indireta.

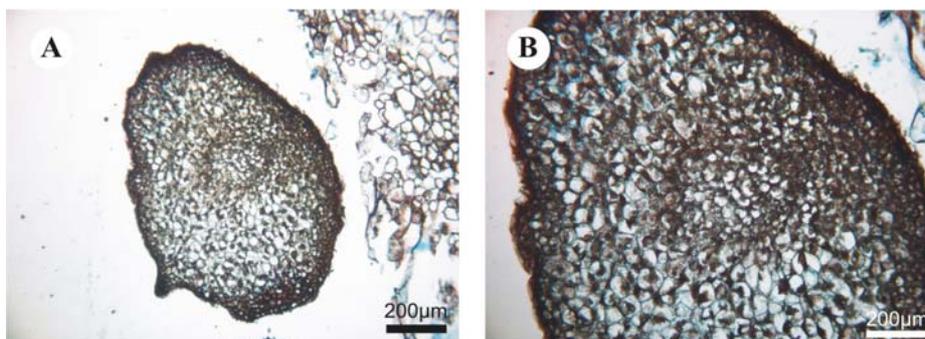


FIGURA 3.5 Micrografia fotônica, mostrando o embrião globular identificado no calo de *Coffea arabica* L. cv. Rubi. A) Aspecto geral do embrião globular; B) linha circular de células (procâmbio) em evidência ao centro. UFLA, Lavras, MG, 2008.

A secção de embriões somáticos em estágio globular (Figura 3.5) demonstra um procâmbio bem definido (linha circular de células ao centro das estruturas). O mesmo procâmbio é facilmente visualizado em outros estádios da embriogênese somática, demonstrando o desenvolvimento dos embriões de *C. arabica* L. cv. Caturra Rojo (Quiroz-Figueroa et al, 2002).

Segundo Vikrant & Rashid (2001), a embriogênese somática direta ocorre mais frequentemente em explantes de micrósporos, óvulos e embriões imaturos. Em contraste, embriogênese somática indireta ocorre nas células indeterminadas e não diferenciadas, formadas, primeiramente, nos calos.

Portanto, a compreensão da organogênese de plantas nos estádios iniciais de desenvolvimento das células meristemáticas requer a observação das mudanças subcelulares e as suas correlações com as alterações bioquímicas (Pihakashi-Maunsbach et al., 1993). A grande aplicação desta metodologia é fornecer informações associadas aos parâmetros morfológicos e bioquímicos das células competentes (Santiago, 2003).

6 CONCLUSÕES

O calo provindo de embriões zigóticos imaturos apresenta-se como uma fonte de explante responsiva à embriogênese, mostrando indícios de formação de embriões somáticos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; MACHADO, S. R. Ultrastructural analysis of *in vitro* direct and indirect organogenesis. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.27, n.3, p.429-437, jul./set. 2004.
- AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. U.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmilian, 1983. p.82-123.
- ARAI, M.; SAITO, T.; KANEKO, Y.; MATSUSHIMA, H. Cellular origin and ultrastructural changes of regenerating shoots from tobacco (*Nicotiana tabacum*) internodes cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhgen, v.99, n.4, p.523-528, Apr. 1997.
- BARROS, L. de M. Embriogênese somática. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v.2, n.7, p.36-43, jan./fev. 1999.
- BUKATSH, F. Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina. **Microkosmos**, Stuttgart, v.61, p.255, Nov. 1972.
- CANHOTO, J. M.; LOPES, M. L.; CRUZ, G. S. Somatic embryogenesis in Bay Laurel (*Laurus nobilis*). In: JANI, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1999. v.4, p.41-367.
- GODBOLE, S.; SOOD, A.; SHARMA, M.; NAGAR, P.K.; AHUJA, P.S. Starch deposition and amylase accumulation during somatic embryogenesis in bamboo (*Dendrocalamus hamiltonii*). **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.245-248, 2004.
- GUPTA, P.K.; PULLMAN, G.; TIMMIS, R.; KREITINGER, M.; CARLSON, W.C.; GROB, J.; WELTY, E. **Forestry in the 21st Century**. Bio/Technology, New York, v.11, n.4, p.454-459, Apr. 1993.
- HO, W.; VASIL, I.K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, New York, v.118, p.169-180, 1983.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v.27, p.137A-138A, 1965.

MOENS, P. Développement de l'ovule et embryogenèse chez *Coffea canephora* Pierre. **La Cellule**, Paris, v.65, p.129-147, 1965.

MOORE, G.R.P.; MARTELLI, S.M.; ANDREO, P.D.; GANDOLFO, C.A.; MACHADO, R.F.A.; BOLZAN, A.; LAURINDO, J.B. Obtenção de biofilmes a partir de queratina de penas de frango. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v.10, n.1, p.8-13, mar. 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-92, 1962.

PESCADOR, R.; ARAÚJO, P. S.; MAAS, C. H.; REBELO, R. A.; GIOTO, C. R.; WENDHAUSEN Jr., R.; LARGURA, G. TAVARES, L. B. B. Biotecnologia de *Piper hispidinervium*-pimenta longa. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.3, n.15, p.19-23, jul./ago. 2000.

PIHAKASHI-MAUNSBACH, K.; NYGAARD, K.B.; JENSEN, K.H.; RASMUSSEN, O. Cellular changes in early development of regenerating thin cell layer-explants of rapeseed analysed by light and electron microscopy. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.87, n.2, p.167-176, Feb. 1993.

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 Reports**, Berlin, v.20, p.1141-1149, 2002.

RADOJEVIC, L. Somatic embryos and plantlets from callus cultures of *Paulownia tomentosa* teud. Zeitschrift für. **Pflanzenphysiologie**, Jena, v.91, n.1, p.57-62, 1979.

RADOJEVIC, L.; VUJICIC, R.; NESKOVIC, M. Embryogenesis in tissue culture of *Coryllus avellana* L. Zeitschrift für. **Pflanzenphysiologie**, Jena, v.77, p.33-41, 1975.

SANTIAGO, E.J.A. de. **Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, DeCandolle)**. 2003. 184p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, C.G. dos. **Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

VIANA, A.M.; MANTELL, S.H. Somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*: an endangered tree of the mata atlântica (South Brazil). In: JAIN, S. M.; GUPTA P. K.; NEWTON, R. J. **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1999. v.5, p.3-30.

VIKRANT; RASHID, A. Comparative study of somatic embryogenesis from immature and mature embryos and organogenesis from leaf-base of Triticale. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.64, n.1, p.33-38, 2001.

WITJAKSONO, R.E.; LITZ, R.E.; PLIEGO-ALFARO, F. Somatic embryogenesis of avocado (*Persea americana* Mill.). In: JAIN, S.M.; GUPTA P.K.; NEWTON, R.J. **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1999. v.5, p.197-214.

CAPÍTULO 4 Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de plântulas obtidas a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Rubi

1 RESUMO

LACERDA, Guilherme Araújo. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de plântulas obtidas a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Rubi. In: _____. **Obtenção e caracterização de calos e plântulas a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. e análise *in silico* do gene SERK.** 2008. Cap.4, p.99-122. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Processos de crescimento e desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro*, independente da idade, do tamanho e do estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado, são definidos como “cultura de embriões”. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a potencialidade regenerativa das estruturas vegetativas para a propagação de plântulas a partir de embriões zigóticos imaturos de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Rubi, visando uma otimização deste processo como alternativa ao explante foliar. Para a análise estatística das variáveis analisadas, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quinze repetições para a variável número de estômatos por mm² e vinte repetições para as variáveis mensuradas: diâmetro polar, diâmetro equatorial e a relação diâmetro equatorial/polar. Folhas, caules e raízes formados *in vitro* foram preparados e observados em microscópio eletrônico (LEO Evo 40), operando a 20 kV. Em relação à capacidade propagativa, não houve diferença significativa para a variável número de brotos entre o 6º e o 7º mês de cultivo, porém, houve um decréscimo no número de folhas e na matéria fresca e seca. Aos diâmetros polares e equatoriais, não houve diferenças significativas entre os cultivos *in vitro* e *in vivo* (de campo). Como se pode observar, houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre a relação diâmetro equatorial/polar, indicando maior simetria dos estômatos (células-guarda + ostíolo) na condição de cultivo *in vitro*. O número médio de estômatos por mm² foi diferente significativamente ($p < 0,01$) entre os cultivos, sendo maior no material *in vivo*. O caule *in vitro* mostrou uma grande quantidade de tricomas, os quais, *in vivo* (de campo), não foram encontrados. O sistema radicular obtido *in vitro* apresenta estrutura pelífera. Devido à natureza juvenil e ao alto potencial regenerativo, verificado por meio das características da morfoanatomia foliar, embriões zigóticos de *C. arabica* L. cv. Rubi se apresentam como excelentes explantes para a propagação *in vitro* de cafeeiro.

* Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Antonio Chalfun Junior (Co-Orientador) – UFLA.

2 ABSTRACT

LACERDA, Guilherme Araújo. Morphoanatomical of the vegetative organs of plantules obtained starting from embryos immature of the *Coffea arabica* L. cv. Rubi. In: _____. **Obtaining and characterization of calluses and plantules starting from immature zygotic embryos of *Coffea arabica* L. and gene SERK *in silico* analysis.** 2008. Cap.4, p.99-122. Thesis (Doctor's degree in Plant Physiology)–Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Growth processes and development of the zygotic embryo *in vitro*, independent of the age, size and development stage that the embryo was excised, is defined as "culture of embryos". This work had as objective the evaluation of the regenerative potentiality of the vegetative structures of the for the propagation of plantules starting from immature zygotic embryos of coffee plant *C. arabica* L. cv. Rubi, seeking an optimization of this process as alternative to the explant to leaves. For the statistical analysis of the analyzed variables the experimental delineate was used randomic entirely, with fifteen repetitions for the variable estomate number for mm², and twenty repetitions for the measured variables: polar diameter, equatorial diameter and the relationship diameter equatorial/polar. Leaves, stems and roots formed *in vitro* were prepared and observed in electronic microscope (LEO Evo 40), operating between 10 and 20 kV. In relation to propagates capacity there was not significant difference for the variable number of sprouts between the 6th and 7th month of cultivation, however there was a decrease in the number of leaves and in the fresh and dry matter. To the polar and equatorial diameters, there were not significant differences between the cultivations *in vitro* and *in vivo* (of field). As it can be observed there was significant difference (p <0,01) among the relationship diameter equatorial/polar, indicating larger symmetry of the estomates (cell-guard + hostile) in the condition of cultivation *in vitro*. The medium number of estomates for mm² was different significantly (p <0,01) among the cultivations, being larger in the material *in vivo*. The stem *in vitro* showed a great amount of tricomas, the ones which, *in vivo* (of field), they were not found. The root system was obtained *in vitro* presents structure rich in tricomas. Due to the juvenile nature and the high regenerative potential, verified through the characteristics of the morphoanatomy to foliate, immature zygotic embryos of *C. arabica* L. cv. Rubi comes as excellent explantes for propagation in coffee plant *in vitro*.

*Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Adviser), Antonio Chalfun Junior (Co-adviser) – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

A terminologia utilizada para a descrição dos processos de crescimento e desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro*, independente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado, é “cultura de embriões” (Hu & Ferreira, 1998).

A cultura de embriões *in vitro* tem sido empregada para a regeneração de embriões advindos de cruzamentos interespecíficos, multiplicação rápida do material selecionado e antecipação da época de plantio. Os fatores que afetam a cultura de embriões *in vitro* são a escolha do meio nutritivo adequado, os reguladores de crescimento utilizados, as substâncias fenólicas liberadas e a própria remoção inadequada do embrião (Ribeiro, 2001).

O embrião originado de um processo normal de fecundação pode ser facilmente separado e cultivado sob condições assépticas em meio de cultura adequado, mantendo-se geneticamente estável, produzindo descendentes idênticos a ele. Para a remoção do embrião, basta desinfestar apenas a superfície externa da semente, pelo fato de que o embrião está alojado em região estéril da semente. Assim, o índice de contaminação *in vitro* é muito baixo em relação às demais culturas (Illg, 1986; Santos, 2001).

Embora diferentes meios sejam capazes de manter os microcultivos de embriões, o mais freqüentemente utilizado é o MS (Murashige & Skoog, 1962).

Os reguladores de crescimento são amplamente utilizados na cultura de embriões, quando estes são muito jovens. Tais substâncias possuem a capacidade de suprir as necessidades para germinação, desenvolvimento e crescimento do embrião (Santos, 2001).

Na cultura do cafeeiro, baixas concentrações de ácido giberélico e altas de citocininas promovem a germinação de embriões, enquanto altas

concentrações de ácido giberélico podem causar a morte do mesmo (Valio, 1957).

Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a potencialidade regenerativa do sistema aéreo, especificamente da morfoanatomia dos órgãos vegetativos para a propagação de plântulas a partir de embriões zigóticos imaturos de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Rubi, visando à otimização desse processo como alternativa ao explante foliar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Foram coletados frutos de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Rubi em estágio verde-cana, no campo experimental do Setor de Cafeicultura do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (Figura 4.1), que foram mantidos em sacos de papel por 24 horas, sob refrigeração (4°C), no Laboratório Central de Biologia Molecular.



FIGURA 4.1 Plantas matrizes de cafeeiro *Coffea arabica* L. cv. Rubi, localizadas na área experimental do Setor de Cafeicultura do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. A) Folhas novas do cafeeiro Rubi em seu desenvolvimento vegetativo; B) Frutos de cafeeiro em estágio verde-cana. UFLA, Lavras, MG, 2008.

A maturação dos frutos do cafeeiro ‘Rubi’ é intermediária entre ‘Catuai’ e ‘Mundo Novo’, em época e uniformidade. Os frutos são de coloração vermelha e as folhas, quando novas, são predominantemente de cor bronze-escuro (Figura 4.1A), marcador morfológico que a difere de ‘Catuai’ (brotos verdes) (Mendes, 1998).

4.2 Desinfestação dos frutos, retirada, incisão e estabelecimento dos embriões

Os frutos foram desinfestados em hipoclorito de sódio 70% (v/v), durante 30 minutos, em câmara de fluxo laminar e lavados 3 vezes em água destilada e autoclavada (adaptado de Santos, 2001). Em seguida, os embriões foram isolados utilizando-se placas de Petri esterilizadas contendo papel filtro, fazendo-se uma incisão no hipocótilo. Os embriões foram posteriormente cultivados em 20 mL de meio em tubos de ensaio (2,5 x 15 cm), constituindo-se um embrião por tubo. Foi utilizado meio para cultivo de embriões zigóticos de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Rubi descritos como melhores tratamentos por Santos (2001), em que o meio de desenvolvimento de partes aéreas foi constituído pelo MS (Murashige & Skoog, 1962), sendo suplementado com BAP (6-benzilaminopurina) (12 mg L⁻¹), ágar (7 g L⁻¹) e sacarose (30 g L⁻¹). Já o meio de enraizamento constituiu-se de MS suplementado com AIB (ácido indol-butírico) (2 mg L⁻¹), ágar (7 g L⁻¹) e sacarose (30 g L⁻¹). O pH dos meios, autoclavados a 121 °C por 20 minutos, foram ajustados em 5,8.

Após inoculados, os embriões foram mantidos em sala de crescimento a 27±2°C e intensidade luminosa de 80 µmol.s⁻¹.m⁻², em fotoperíodo de 16 horas.

4.3 Análise estatística das partes aéreas das plântulas

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com nove repetições em quatro parcelas, cada placa consistindo em uma parcela. A avaliação do experimento foi realizada 6 e 7 meses após o estabelecimento, sendo avaliadas as características número de brotos, número de folhas, massa fresca e massa seca. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo software SISVAR (Ferreira, 2000). Os efeitos dos tempos (tratamentos) foram comparados pelo Teste Scott-Knott, a 5%.

4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

No Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural, as amostras de folhas de ambos os cultivos foram fixadas em Karnovsky (1965) modificado: glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2 por um período de 24 horas.

Posteriormente, as folhas, caules e raízes foram fixados em Karnovsky modificado [glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%)] em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,0, por 24 horas, em temperatura ambiente.

Posteriormente, os calos foram colocados em glicerol 30%, por 30 minutos e cortados em nitrogênio líquido com bisturi. Os fragmentos foram lavados três vezes (10 minutos) em tampão cacodilato 0,05 M e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1%, por 1-2 horas. Em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%), por 10 minutos e em 100%, por 2 vezes de 10 minutos.

Posteriormente, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico por meio de CO₂ líquido para completar a secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs*, com fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Diversas imagens para cada amostra foram geradas e registradas digitalmente, a aumentos variáveis, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de 9 mm.

4.5 Análise estatística da anatomia foliar

A frequência estomática baseou-se em eletromicrografias de diferentes áreas foliares da superfície abaxial, observando-se a média entre o número das plantas variantes e não-variantes *in vitro*. Para cada planta, foram determinados os diâmetros polar e equatorial de 20 estômatos tomados aleatoriamente, segundo metodologia proposta por Boeger & Wisniewski (2003). Para aferição dos diâmetros, foi utilizado o software LEO-32 v 4.0 2003.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quinze repetições para a variável número de estômatos por mm² e vinte repetições para as variáveis mensuradas: diâmetro polar, diâmetro equatorial e a relação diâmetro equatorial/polar. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo software SISVAR (Ferreira, 2000). Os efeitos dos tipos de cultivo (*in vitro* e *in vivo*) foram comparados pelo Teste Scott-Knott, a 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção de plântulas de cafeeiro ‘Rubi’

Uma vez o embrião estabelecido no meio de desenvolvimento de partes aéreas (M2) e sob as condições descritas na metodologia, observou-se a ocorrência de uma estrutura rudimentar, supostamente um calo compacto organogênico, presente na região da incisão (Figura 4.2A).

O aspecto geral do crescimento de plântulas, formadas a partir de embriões retirados de frutos em estágio verde-cana de *Coffea arabica* L. cv. Rubi, pode ser observado na Figura 4.2.

As estruturas rudimentares, ou calos organogênicos, constituem-se de forma parcialmente organizada que podem continuar a se multiplicar definitivamente, por brotações laterais (Figura 4.2B e 4.2C), que originam estruturas semelhantes. Eventualmente, estas estruturas se transformam em plântulas, dando origem às partes aéreas.

Após um período de aproximadamente 60 dias, as plântulas apresentam-se com várias ramificações das partes aéreas ou brotações laterais, sendo estas seccionadas e separadas individualmente (Figura 4.2D e 4.2E).

Já as plântulas que se apresentavam individualizadas e com desenvolvimento completo das partes aéreas (Figura 4.2B e 4.2C) foram inoculadas em meio de enraizamento, havendo formação de raízes com 120 dias (Figura 4.2D), em meio e metodologia descritos por Santos (2001). Porém, de acordo com Carvalho et al. (1999), houve 100% de enraizamento em todos os tratamentos por eles testados, indicando que a aclimatização de plântulas de cafeeiro pode ser feita sem a necessidade de enraizamento *in vitro*.

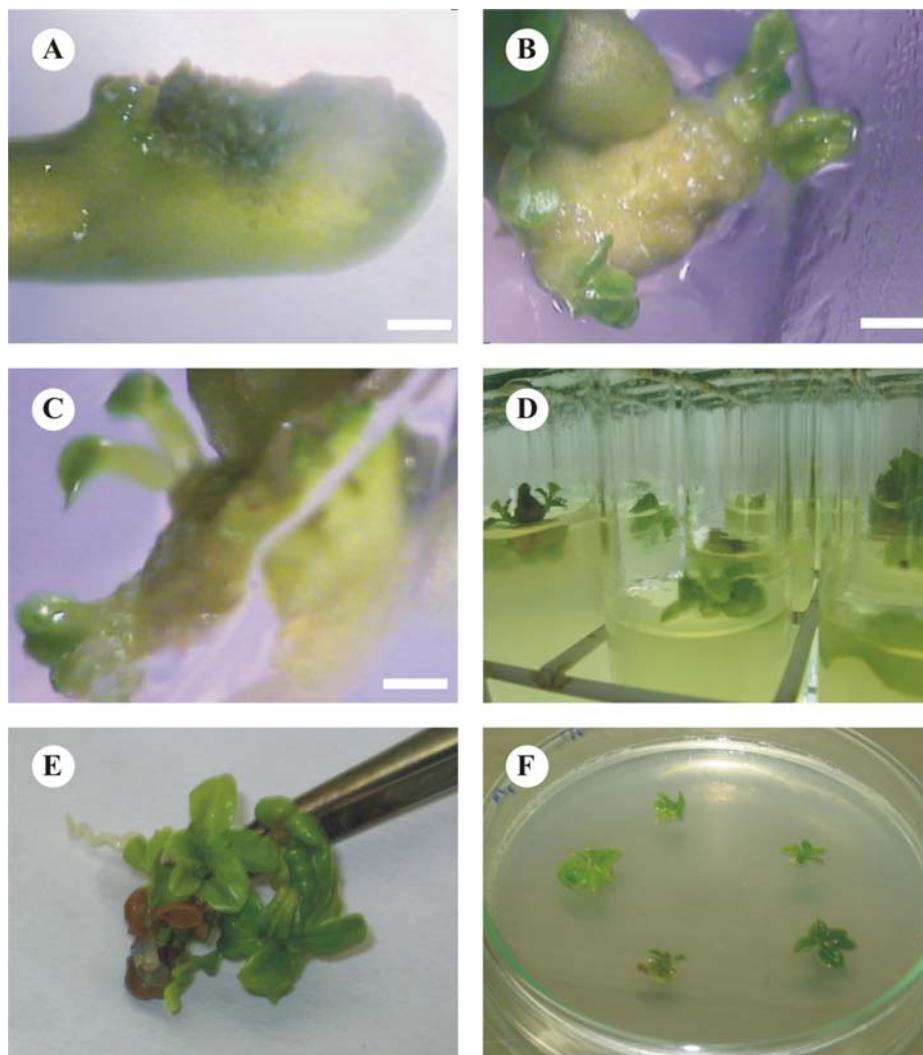


FIGURA 4.2 Propagação clonal de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Rubi. A) Calo compacto organogênico originado no hipocótilo por incisão (13 dias de estabelecimento); B e C) brotações laterais por organogênese indireta (28 dias); D e E) brotações laterais (60 dias); F) plântulas individualizadas em meio de desenvolvimento das partes aéreas (90 dias). Barra: 1 mm. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Subseqüentemente, depois de 60 dias, novos repiques ocorreram nas plantas que ainda apresentavam brotações laterais oriundas do calo compacto por organogênese indireta (Figura 4.3A).

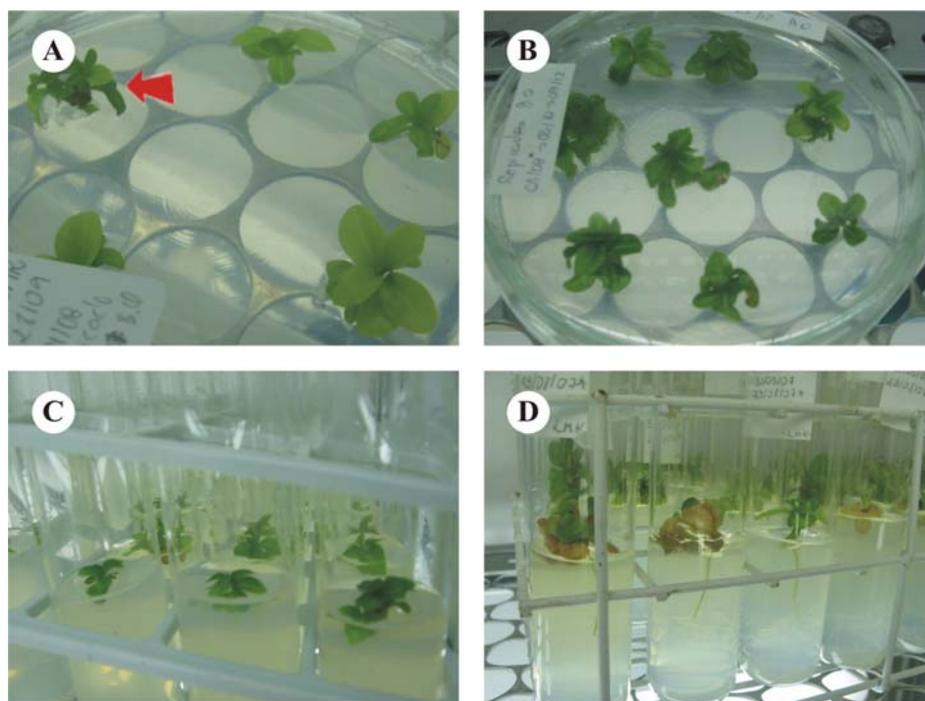


FIGURA 4.3 Propagação clonal de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Rubi. A) A seta indica uma plântula que continua a emitir brotações laterais, em relação às outras em que se observou desenvolvimento individual; B) plântulas individualizadas com desenvolvimento completo da parte aérea; C) transferência das plântulas para meio de enraizamento; D) plântulas com sistema radicular desenvolvido após 120 dias em meio de enraizamento. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Foram analisadas características das partes aéreas das plântulas a partir do sexto mês de cultivo *in vitro*, para se avaliar o potencial regenerativo da técnica de secção e multiplicação clonal dos indivíduos (Tabela 4.1).

Observa-se, pelos dados da Tabela 4.1, que não houve diferença significativa para a variável número de brotos ao decorrer dos meses, porém, houve um decréscimo nas demais, de acordo com teste estatístico empregado.

TABELA 4.1 Valores médios em relação ao tempo de cultivo *in vitro*, de acordo com as características: número de brotos, número de folhas, massa fresca e massa seca das plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Tempo	Nº de brotos	Nº de folhas	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
6 meses	3,52 a	18,11 a	0,058 a	0,009 a
7 meses	2,63 a	11,11 b	0,043 b	0,005 b

* Médias seguidas de letra e número distintos diferem entre si, pelo Teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

O decréscimo no número de folhas formadas, massa fresca e massa seca durante o período em análise foi significativo ($p < 0,01$), sendo menor no sétimo mês. Dessa forma sugere-se que tempos menores no cultivo e repique de brotações advindas da propagação clonal de embriões zigóticos proporcionam plântulas mais vigorosas.

Segundo Ramos et al (1997), genótipos cuja capacidade produtiva é classificada como alta apresentam peso de massa seca das folhas e comprimento da parte aérea mais elevados.

Santos (2001), trabalhando com efeito do BAP no desenvolvimento de plântulas originadas a partir da cultura de embriões de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, observou que o aumento da concentração de BAP promove um aumento no número de folhas formadas. Constatou também que a adição de BAP, na concentração de 12 mg L^{-1} (aproximadamente $53,29 \text{ } \mu\text{M}$), ao meio de

cultura, proporciona um maior acréscimo no número de folhas para ‘Apoatã’ e ‘Topázio’.

Ainda segundo a autora, a utilização de 12 mg L^{-1} de BAP proporcionou um maior crescimento da parte aérea nas plântulas de ‘Acaiá Cerrado’ e ‘Rubi’.

5.2 Análise da anatomia foliar de plântulas de cafeeiro *in vitro* e *in vivo*

Os estômatos foram classificados como sendo, em sua maioria, do tipo paracítico, de acordo com o formato e o arranjo das células subsidiárias (Figura 4.4).

Estes dados corroboram os obtidos por Carvalho et al. (2001) que, trabalhando com cafeeiro *Coffea arabica* L. cv. Catuai-Vermelho, de 50 estômatos observados, definiu 35 como sendo do tipo paracítico, enquanto, em *Coffea canephora* Pierre ‘Conilon’, havia uma predominância do tipo actinocítico.

Tanto as plantas *in vitro* como as plantas *in vivo* apresentaram ausência total de tricomas (Figura 4.4A-D). Notou-se, nitidamente, a regularidade da cera para as amostras *in vivo* (Figura 4.4C e 4.4D), enquanto as amostras *in vitro* apresentaram cera descamada e irregular (Figura 4.4A e 4.4B).

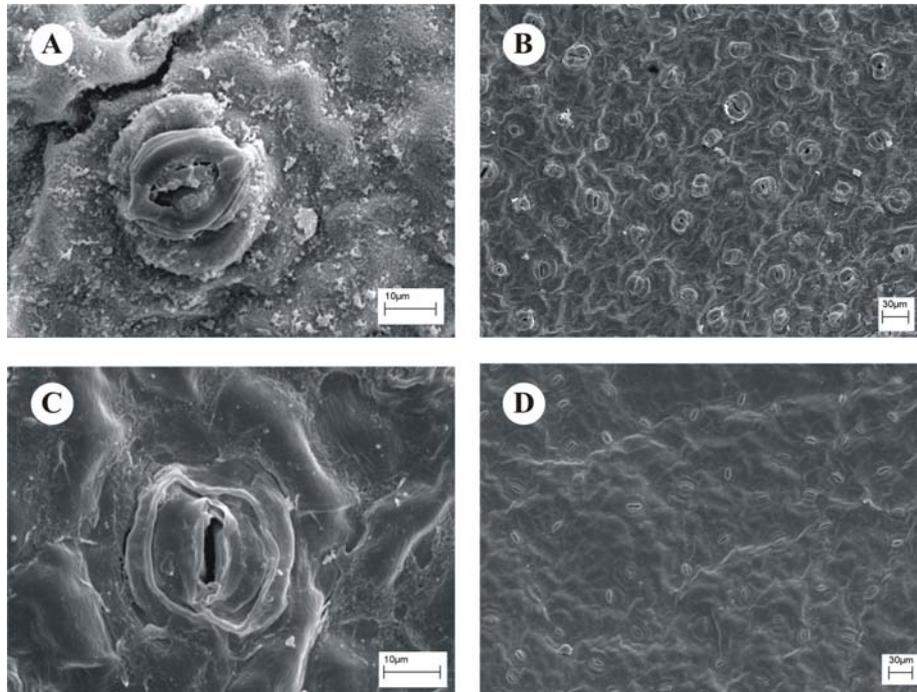


FIGURA 4.4 Eletromicrografia de varredura dos estômatos da superfície abaxial das folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cv. Rubi cultivadas sob as condições: A e B) *in vitro* e C e D) *in vivo*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Esses resultados diferem dos de Lacerda et al. (2008) que trabalharam com plantas variantes e não variantes somaclonais de bananeiras (*Musa* sp. Colla cv. Prata-anã). Segundo estes autores, na superfície abaxial, a descamação de cera é evidente somente nas plantas variantes de ambos os materiais (*in vitro* e *in vivo*), podendo atuar dessa forma como marcador morfoanatômico.

Diferenças nas ceras podem estar relacionadas aos constituintes da cutícula foliar que, de acordo com Albert & Filho (2002), podem ser divididos em componentes hidrofóbicos (cera), semi-hidrofóbicos (cutina) e hidrófilos (pectinas e celulose). Então, se a cera é um componente hidrofóbico, sua função

está relacionada ao controle da evaporação. Como exemplo, a cutícula em condições áridas funciona como uma membrana extracelular em toda a área foliar, promovendo uma barreira entre a planta e o meio ambiente, agindo primariamente como uma barreira contra a evaporação excessiva (Cameron et al., 2006).

Ainda segundo Cameron et al. (2006), as ceras cuticulares consistem de séries homólogas de longas cadeias de ácidos graxos, alcoóis, aldeídos, alcanos, ésteres e compostos orgânicos cíclicos. Estes concordam com outros autores ao discutirem uma correlação indicando que o aumento da cera reduziria a condutância epidérmica de algumas plantas. Da mesma forma, a diminuição da cera aumentaria a condutância.

O número médio de estômatos, bem como os dados relativos aos diâmetros polares e equatoriais e a relação entre eles de acordo com as condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*, são apresentados na Tabela 4.2.

TABELA 4.2 Valores médios para as características: (DE) diâmetro equatorial, (DP) diâmetro polar, (DE/DP) relação diâmetro equatorial/polar e número de estômatos por mm² de *C. arabica* L. cv. Rubi. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Tipo de cultivo	DE	DP	DE/DP	Número médio de estômatos (mm²)
	μM			
<i>In vitro</i>	23,4 a	23,65 a	1,00 a	299,66 b
<i>In vivo</i>	21,6 a	24,75 a	0,87 b	367,84 a

*Médias seguidas de letra e número distintas diferem entre si, pelo Teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Em relação aos diâmetros polares e equatoriais, não houve diferenças significativas entre os cultivos *in vitro* e *in vivo* (de campo).

Como se pode observar, houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre a relação diâmetro equatorial/polar, indicando maior simetria dos estômatos (células-guarda + ostíolo) na condição de cultivo *in vitro*.

O número médio de estômatos por mm^2 foi diferente, significativamente, ($p < 0,01$) entre os cultivos, sendo maior no material *in vivo*.

De acordo com Lee & Wetzstein (1988) e Sciutti & Morini (1995), há evidências de uma maior funcionalidade dos estômatos com formato elipsóide em relação aos de formato mais arredondado.

De acordo com Faria et al. (2000), fatores ambientais podem alterar, dentro de certos limites, o número de estômatos por unidade de área foliar, fato este comprovado por Ferris & Taylor (1994), relacionando mudanças na anatomia foliar, como a densidade estomática, por incrementos de CO_2 atmosférico.

5.3 Análise da anatomia do caule de plântulas de café *in vitro* e *in vivo*

Caules provindos de plantas de café com 1 ano de estabelecimento em meio de cultura foram utilizados como material *in vitro*. O caule *in vitro* mostrou uma grande quantidade de tricomas, os quais, *in vivo* (de campo), não foram encontrados (Figura 4.5).

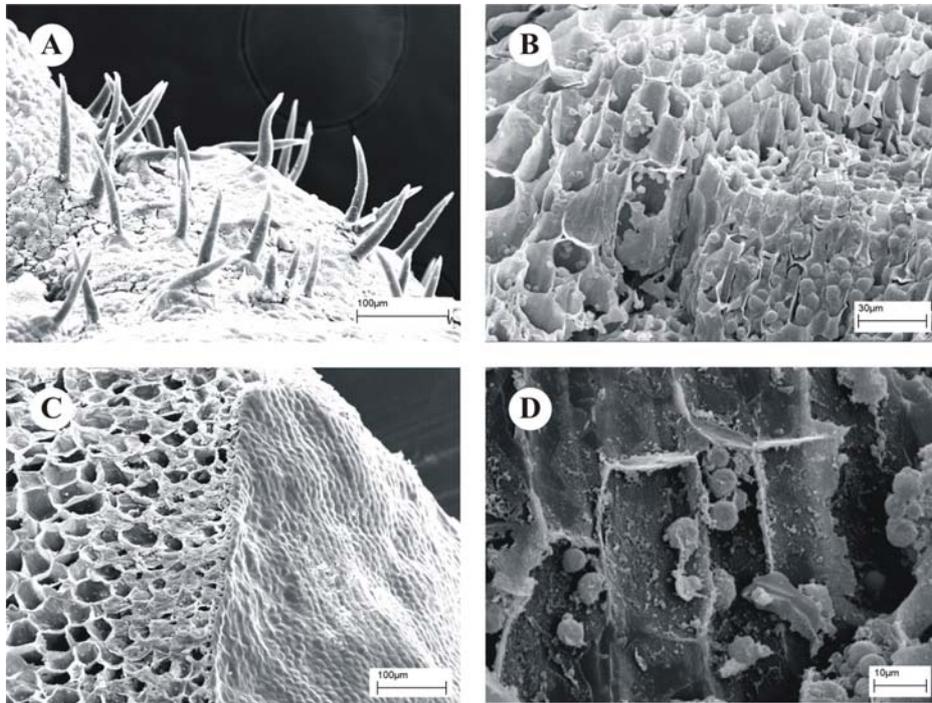


FIGURA 4.5 Eletromicrografia de varredura dos caules de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cv. Rubi cultivado sob as condições: A e B) *in vitro* e C e D) *in vivo*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Os tricomas, tal como a cutícula e estômatos, também se manifestam de diferentes maneiras de acordo com as condições oferecidas às plantas (Fidelis et al., 2000; Silva et al., 2005). Organizações morfoanatômicas dos tecidos e órgãos vegetativos foram diferentes em função da origem do material: *in vivo* (de campo) e *in vitro*.

Com base nas eletromicrografias obtidas em *Coffea arabica* L. cv. Rubi, foi observado que as estruturas desenvolvidas *in vitro* e *in vivo* apresentaram organizações morfoanatômicas diferentes. Devido ao ressecamento do meio pelo longo período de cultivo *in vitro*, supomos uma relação de estresse hídrico e a presença de tricomas caulinares.

5.4 Análise da anatomia da raiz de plântulas de cafeeiro *in vitro*

As eletromicrografias do sistema radicular obtido *in vitro* apresentam estrutura pelífera (Figura 4.6A) e estruturas mais robustas (Figura 4.6B).

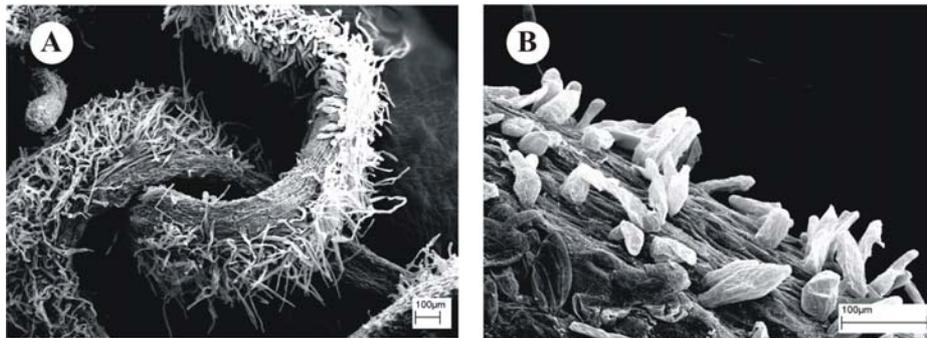


FIGURA 4.6 Eletromicrografia de varredura de raiz de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cv. Rubi de plântula cultivada *in vitro*: A) Nota-se em maior campo as zonas pilíferas ricas em pêlos radiculares e B. região superior à zona pelífera, com estruturas mais robustas. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Barry-Etienne et al. (2002), por meio de MEV, demonstraram diferenças entre radículas de *Coffea arabica* L. formadas *in vitro* em meio semi-sólido e radículas formadas em substrato horticultural, indicando a ocorrência de raízes secundárias somente na condição *ex vitro*. Segundo Mayer et al. (2008), em *Cymbidium*, na raiz da planta matriz, é possível observar a ausência de pêlos radiculares e maior diâmetro. Ao contrário, a planta cultivada *in vitro* dessa orquídea apresenta grande quantidade de pêlos radiculares e menor diâmetro.

Apesar da característica presença e ausência de raízes na cultura *in vitro* de embriões não ter sido avaliada estatisticamente, observou-se sua rara ocorrência nessa forma de cultivo. De acordo com Barry-Etienne et al. (2002), o sistema radicular de *Coffea arabica* L., além de desenvolver-se bem *ex vitro*, é

mais freqüente, apresentando características qualitativas similares às do sistema radicular de mudas. Uma situação similar foi observada também com a regeneração *in vitro* em mudas de maçã (*Mallus domestica*) (Díaz-Pérez et al., 1995).

Este trabalho servirá como base para futuras pesquisas com a transformação genética de cafeeiro no Laboratório Central de Biologia Molecular, pois a adequação de protocolos eficientes para a propagação clonal sustenta a obtenção de populações de plantas transformadas.

6 CONCLUSÃO

Plântulas obtidas a partir de embriões zigóticos imaturos de *C. arabica* L. cv. Rubi apresentam características favoráveis à propagação *in vitro* desse explante.

Organizações morfoanatômicas dos tecidos e órgãos vegetativos foram diferentes em função da origem do material: *in vivo* (de campo) e *in vitro*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, L.H.B.; FILHO, R.V. Características morfológicas da cutícula foliar e efeitos de adjuvantes no controle químico de três espécies de Guanxumas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.5, p.888-899, 2002.

BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B.; VASQUEZ, N.; ETIENNE, H. Comparison of somatic embryogenesis-derived Coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated *in vitro* or *ex vitro*: morphological, mineral and water characteristics. **Annals of Botany**, London, v.90, p.77-85, 2002.

BOEGER, M.R.T.; WISNIEWSKI, C. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica) no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.26, n.1, p.61-72, mar. 2003.

CAMERON, K.D.; TEECE, M.A.; SMART, L.B. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v.140, p.176-183, 2006.

CARVALHO, G.R.; PASQUAL, M.; RESENDE, E.; SCARANTE, M.J.; CARVALHO, G.R. Aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.3, p.483-490, jul./set. 1999.

CARVALHO, L.M.; SILVA, E.A.M.; SILVA, M.; AZEVEDO, A.A.; MOSQUIM, P.R.; CECON, P.R. Aspectos morfofisiológicos das cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.3, p.411-416, mar. 2001.

DÍAZ-PÉREZ, J.C.; SUTTER, E.G.; SHACKEL, K.A. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.95, p.225-232, 1995.

FARIA, L.L.; ALVARENGA, A.A.; CASTRO, E.M.; SOBRINHO, J.C.S. Alguns aspectos morfofisiológicos do feijão Jacatupé [*Pachyrrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.3, p.688-695, jul./set. 2000.

- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos, SP: 2000. p.255-258.
- FERRIS, R.; TAYLOR, G. Stomatal characteristics of four native herbes following exposure to elevated CO₂. **Annals of Botany**, London, v.73, p.447-453, 1994.
- FIDELIS, I.; CASTRO, E.M. de; PINTO, J.E.B.P.; GAVILANES, M.L.; SANTIAGO, E.J.A. de. Características anatômicas de estruturas vegetativas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. desenvolvidas *in vitro* e *in vivo*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.327-336, abr./jun. 2000
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPH, 1998. p.371-393.
- ILLG, R.D. Metodologia de seleção *in vitro* para resistência a fatores causadores de estresse. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. **Anais...** Brasília: ABCTP/ EMBRAPA, 1986. p.45-47.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v.27, p.137A-138A, 1965.
- LACERDA, G.A.; SILVA, J.O.C.; ABREU, J.C.; ALVES, E.; PAIVA, L.V. Características morfoanatômicas da epiderme foliar de plantas variantes e não variantes somaclonais de bananeiras (*Musa* sp. Colla cv. Prata-anã) cultivadas *in vitro*. **Acta Botanica Brasílica**, São Paulo, v.22, n.1, p.85-90, 2008.
- LEE, N.; WETZSTEIN, H.Y. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed sweetgum leaves. **The Journal of the American Society for Horticulture Science**, Alexandria, v.113, n.1, p.167-171, Jan. 1988.
- MENDES, A.N.G. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: MENDES, A.N.G.; RUBENS, J.G. (Ed.). **Cafeicultura empresarial – produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. v.1, p.1-98.

MAYER, J.L.S.; RIBAS, L.L.F.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.22, n.2, p.323-332, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.6, p. 473-479, June 1962.

RAMOS, L.C.S.; LIMA, M.A.; CARVALHO, A. Shoot and root evolutions on seedlings from *Coffea* genotypes. **Bragantia**, Campinas, v.56, p.59-68, 1997.

RIBEIRO, L.S. **Cultura *in vitro* de embriões de segmentos nodais do cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2001. 73p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTOS, C.G. dos. **Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)–Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SCIUTTI, B.R.; MORINI, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.70, n.2, p.221-228, Mar. 1995.

SILVA, L.M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V.J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.19, n.1, p.183-194, 2005.

VALIO, I.F. **The experimental control of plant growth**. New York: The Ronald, 1957. p.164-168. (Chronica Botanica. International Biological and Agricultural Series, 17).

CAPÍTULO 5 Expressão *in silico* de genes candidatos para a SERK
(*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) em *Coffea arabica* L.

1 RESUMO

LACERDA, Guilherme Araújo. Expressão *in silico* de genes candidatos para a SERK (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) em *Coffea arabica* L. In: _____. **Obtenção e caracterização de calos e plântulas a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. e análise *in silico* do gene SERK.** 2008. Cap.5, p.123-144. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Estudos sobre a ontogênese dos embriões zigóticos e do processo de embriogênese somática, nos seus aspectos fisiológicos e bioquímicos complementados com a caracterização molecular, tornam os protocolos de cultivo *in vitro* menos empíricos e mais eficientes. No presente trabalho, foi avaliada a expressão *in silico* de genes candidatos para a proteína SERK (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*), visando à sua futura utilização como marcador molecular estágio-específico. Essa estratégia pretende otimizar o estudo da calogênese e da embriogênese somática em *Coffea arabica* L., na distinção de tecidos totipotentes. Foi realizada uma busca por prováveis genes dentro do banco de dados CAFEST em *C. arábica*, baseados na similaridade com a seqüência de *Coffea canephora* para SERK. Após o processo de busca e a seleção de *reads* relacionados às seqüências, foram realizados a montagem dos EST-*contigs*, o alinhamento entre seqüências e a análise filogenética. A análise de *motifs* de agrupamento pelo MEME/MAST revelou seqüências contendo domínios de aminoácidos relacionados a SERK. O perfil de expressão obtido pelo *Northern* Eletrônico revelou uma maior expressão das seqüências nas bibliotecas de calos e células em suspensão como se esperava, devido à competência celular esperada desses materiais. Tecidos que apresentam totipotência como fontes de explantes, como hipocótilo, sementes, gemas florais, frutos e folhas, também foram visualizados contendo expressões desses genes candidatos. Foi possível identificar 12 seqüências prováveis (7 *contigs* e 5 *singlets*) relacionadas a SERK no banco de dados do CAFEST para *Coffea arabica* L. Desses, pelo menos C9 apresenta fortes indícios de similaridade com a proteína SERK de *C. canephora*.

*Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Antonio Chalfun Junior (Co-Orientador) – UFLA.

2 ABSTRACT

LACERDA, Guilherme Araújo. *In silico* expression of genes candidates for SERK (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase) in *Coffea arabica* L. In: _____ . **Obtaining and characterization of calluses and plantules starting from immature zygotic embryos of *Coffea arabica* L. and gene SERK *in silico* analysis.** 2008. Cap.5, p.123-144. Thesis (Doctor's degree in Plant Physiology)–Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Studies on the ontogenesis of the zygotic embryos and of the process of somatic embryogenesis, in their physiologic and biochemical aspects complemented with the molecular characterization, they turn the protocols of cultivation *in vitro* less empiric and more efficient. In the present work the *in silico* expression of genes was evaluated candidates for the protein SERK (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase) seeking his future use as stage-specific molecular marker. That strategy intends to optimize the study of the callogenesis and somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. in the distinction of fabrics totipotents. A search was accomplished by probable genes inside of the database CAFEST in *C. arabica* based on the similarity with the sequence of *Coffea canephora* for SERK. After the search process and reads selection related to the sequences, the assembly of EST-*contigs*, alignment between sequences and phylogenetic analysis was accomplished. The analysis of grouping motifs for MEME/MAST revealed sequences containing domains of related amino acids SERK. The expression profile obtained by Electronic Northern revealed a larger expression of the sequences in the libraries of calluses and cells in suspension as if he waited, due to expected cellular competence of those materials. Woven that present totipotence as explantes sources as hypocotyls, seeds, floral buds, fruits and leaves were also visualized containing expressions of those genes candidates. This way, it was possible to identify 12 probable sequences (07 contigs and 05 singlets) related to SERK in the database of CAFEST for *Coffea arabica* L. Of the which at least C9 presents strong similarity indications with the protein SERK of *C. canephora*.

*Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Adviser), Antonio Chalfun Junior (Co-adviser) – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

A embriogênese somática constitui um exemplo da expressão da totipotencialidade, na qual as células vegetais possuem a capacidade de regenerar indivíduos completos a partir de uma única célula. A sua utilização como técnica para propagação clonal tem sido tema de diferentes estudos e revisões (Santa-Catarina et al., 2001; Quiroz-Figueroa et al., 2006). Entretanto, a embriogênese constitui um modelo bastante interessante para estudos básicos de fisiologia, biologia celular, bioquímica, genética da diferenciação e morfogênese em vegetais.

Estudos utilizando esta abordagem têm sido realizados em especial com abordagens morfológicas e cito-histológicas (Cangahuala-Inocente et al., 2004). Neste aspecto, deve-se destacar a importância de estudos sobre a ontogênese dos embriões zigóticos e do processo de embriogênese somática, nos seus aspectos fisiológicos e bioquímicos, complementados com a caracterização molecular, tornando os protocolos de cultivo *in vitro* menos empíricos e mais eficientes.

Um dos primeiros genes descritos como envolvidos na expressão da competência celular foi o *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase* (DcSERK) (Schmidt et al., 1997), em cultura de tecidos de *Daucus carota*. A expressão do gene SERK tem sido utilizada como um marcador, dentro de uma população de células embriogênicas competentes e não competentes (Santa-Catarina et al., 2004). Esta situação também foi identificada para outros sistemas, como *Arabidopsis* (AtSERK1) (Hecht et al., 2001), *Dactylis glomerata* (DgSERK) (Somleva et al., 2000) e *Medicago trunculata* (MtSERK1) (Nolan et al., 2003).

A identificação do gene SERK *in silico* para posterior utilização *in vitro* permitiria uma melhor compreensão dos aspectos básicos desses processos de desenvolvimento em *Coffea arabica*, além de propiciar a possibilidade de otimização de sistemas e protocolos de embriogênese somática para fins

aplicados e biotecnológicos. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de analisar a expressão *in silico* de genes candidatos para a proteína SERK (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*), relacionados à sua utilização como marcadores moleculares estágio-específicos, como estratégia para o estudo da calogênese e embriogênese somática em *Coffea arabica* L.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Identificação de seqüências para o gene SERK

As seqüências identificadas como SERK candidatos tiveram como fonte de dados o banco de ESTs gerado pelo Projeto Genoma Café Brasileiro (Vieira et al., 2006). Por meio da interface *Gene Project*⁵, foi possível procurar por *reads*, montar *clusters* e analisar os prováveis genes para SERK. Inicialmente, realizou-se uma busca por palavra-chave, no caso SERK, tendo em vista que todos os *reads* haviam sido previamente anotados automaticamente por comparação com o banco de genes do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*⁶).

Um segundo tipo de busca foi realizado por meio da ferramenta *Basic Local Alignment Search* (BLAST), utilizando-se uma seqüência de proteína SERK já identificada e publicada para *Coffea canephora* (Santos et al., 2007). Assim, por meio da ferramenta tBLASTN (Altschul et al., 1997), foram comparados os aminoácidos da fita consenso SERK, com os nucleotídeos traduzidos do banco de dados e selecionados todos os *reads* que apresentaram alinhamento significativo ($E\text{-value} > 10^{-5}$).

Dessa forma, os mais de 67 *reads* encontrados foram agrupados em *clusters*, formando os 09 EST-*contigs* e 17 EST-*singlets* sendo submetidos à anotação manual. Para a verificação da similaridade por BLAST com a SERK, inspecionaram-se as seqüências montadas com o programa InterProScan⁷. Todos os EST-*contigs* identificados como SERK após a anotação, foram usados para uma terceira busca no banco CAFEST, utilizando-se a ferramenta BLASTN, visando encontrar novas seqüências de genes para SERK, bem como corrigir

⁵ <http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe>

⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

⁷ <http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>

clusters incompletos. Esse processo, também chamado de saturação, foi repetido até que não se encontrasse mais nenhum novo *read* significativo. Aquelas que apresentavam baixo *E-value*, não contendo nenhum domínio conservado completo, foram desconsideradas, obtendo-se, assim, 07 EST-*contigs* e 05 EST-*singlets*.

4.2 Análise filogenética

O alinhamento entre os EST-*contigs* do CAFEST com a seqüência do SERK de *Coffea canephora* do NCBI foi feito pelo programa *ClustalW* (Thompson et al., 1994) com os parâmetros padrões (*default*) e utilizando-se as seqüências de aminoácidos deduzidas.

A árvore filogenética foi feita pelo programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007), com o modelo de comparação *Neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987), método de *p distance* e supressão *pair-wise*. A validade da árvore quanto à distância filogenética dos *clusters* pôde ser medida pelo teste probabilístico de *bootstraps* (Sitnikova et al., 1995).

4.3 Identificação de *motifs* comuns de agrupamento

Para descobrir *motifs* de agrupamento entre as seqüências para SERK selecionadas no CAFEST, utilizou-se o programa MEME (*Multiple Expectation Minimization for Motif Elicitation*, <http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html/>) versão 3.5.4 (Bailey et al., 2006), empregando-se os parâmetros: qualquer número de repetições de *motifs*, máximo de 20 *motifs* por seqüência e tamanho para cada um deles entre 6 e 200 aminoácidos. Para a interpretação dos resultados do MEME, tem-se uma correlção entre as cores dos *motifs* com a classificação dos aminoácidos (Tabela 5.1).

TABELA 5.1 Classificação dos aminoácidos para análise dos resultados do programa MEME (*Multiple Expectation Minimization for Motif Elicitation*, <http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html/>) versão 3.5.4 (Bailey et al., 2006). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Aminoácidos	Cor	Propriedades
A, C, F, I, L, V, W e M	Azul	Mais hidrofóbicos (Kyte & Doolittle, 1982)
N, Q, S, T	Verde	Polares, não-carregados, resíduos não-alifáticos
D, E	Magenta	Ácidos
K, R	Vermelho	Carregados positivamente
H	Rosa	
G	Laranja	
P	Amarelo	
Y	Turquesa	

4.4 Northern eletrônico

Primeiramente, foram calculadas as frequências de *reads* formadores de cada EST-*contigs* que apareciam expressos nas bibliotecas. Esse procedimento exigiu que os dados de expressão dos *reads* nas bibliotecas (Vieira et al., 2006) fossem previamente normalizados, já que as bibliotecas formadas não possuíam o mesmo tamanho. O procedimento para a normalização consistiu em multiplicar cada *read* pela razão entre o número total de *reads* de todas as bibliotecas e o número de *reads* da biblioteca na qual aparecia expresso. Com os dados foi feita uma matriz, relacionando *clusters* e bibliotecas, posteriormente lançada nos programas *Cluster* e *TreeView* (Eisen et al., 1998). Os EST-*contigs* e os EST-*singlets* das bibliotecas foram agrupados por *hierachical clustering* e os resultados de expressão foram apresentados em uma escala cinza, em que expressão zero ou negativa foi representada por coloração mais clara, sendo aumentada gradativamente até atingir o preto, que representava o grau máximo de expressão positiva.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final do processo, obtiveram-se 7 EST-*contigs* e 5 EST-*singlets* para SERK que, depois de anotados, foram corrigidos quanto a problemas de seqüenciamento e montagens errôneas. Das 8 seqüências, todas demonstraram certa similaridade com domínios relacionados à proteína SERK, sendo comparadas a banco de dados públicos.

Analisando-se as relações filogenéticas encontradas, observaram-se dois grupos iniciais distintos no dendograma, em que as candidatas obtidas no CAFEST e caracterizadas *in silico* se agruparam com os polipeptídios para SERK de *Coffea canephora* (Figura 5.1).

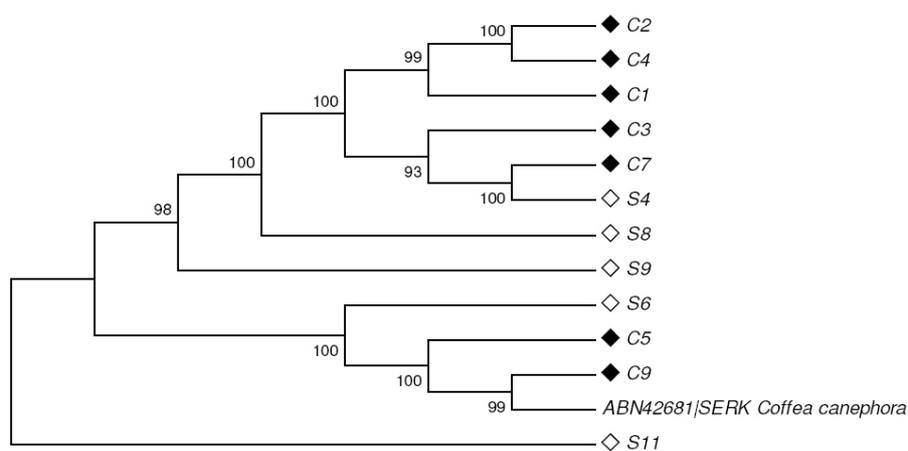


FIGURA 5.1 Dendograma de similaridade relacionando seqüências candidatas de aminoácidos para a SERK. As seqüências mineiradas no CAFEST estão representadas por (◆) EST-*contigs* e (◇) EST-*singlets*. A seqüência de *C. canephora* está representada por seu acesso no NCBI. Valores de *bootstrap* menores que 50% foram omitidos. UFLA, Lavras, MG, 2008.

A composição dos aminoácidos constituintes foi obtida por meio do *software* BioEdit (Hall, 1999) das seqüências protéicas traduzidas a partir do *contig* C9 (Figura 5.3A) e do acesso ABN42681 de *Coffea canephora* (Figura 5.3B).

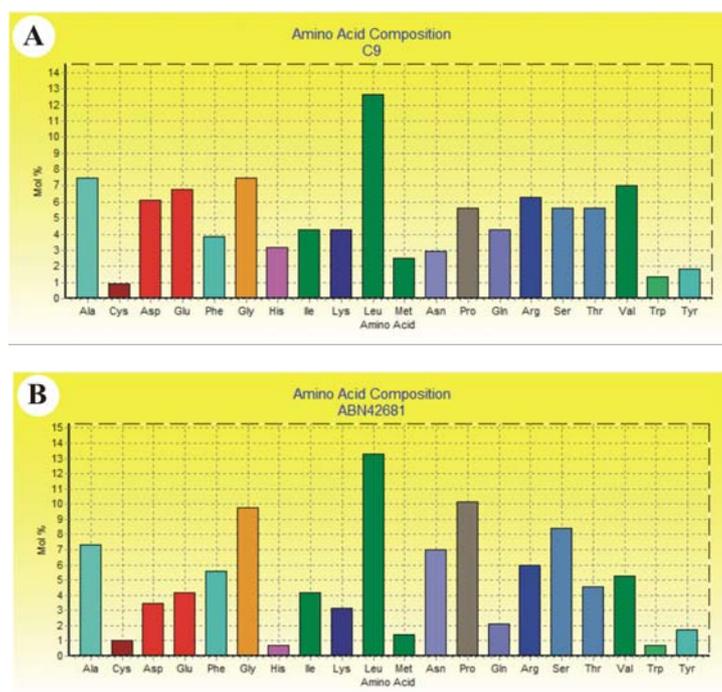


FIGURA 5.3 Composição dos aminoácidos constituintes através do *software* BioEdit (Hall, 1999) das seqüências protéicas traduzidas a partir do *contig* C9 (A) e do acesso ABN42681 de *Coffea canephora* (B). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Observou-se, em ambas as seqüências protéicas, uma concentração superior do aminoácido leucina (Leu), 12,64% e 13,29%, para C9 e ABN42681, respectivamente, em relação aos demais aminoácidos. Este resultado relaciona-se ao fato de estas seqüências possuírem uma relação com o gene que codifica

para SERK, possuindo uma *leucine-rich repeat* e a *receptor-like Kinase protein* (Shmidt et al., 1997).

As *receptor-like Kinases* (RLKs) atuam em várias rotas do crescimento, desenvolvimento e reações de defesa das plantas. Como exemplos, têm-se controle do meristema, sinalização fitohormonal, resistência a doenças e auto-reconhecimento (Tichtinsky et al., 2003).

As RLKs consistem em quatro domínios distintos, um peptídeo sinal N-terminal, um domínio receptor extracelular, um único domínio transmembrana e uma proteína citoplasmática domínio quinase com especificidade com serina/treonina (Ito et al., 2005). Ligando um *ligand* a um domínio extracelular de uma RLK, induz-se a ativação de seu domínio citoplasmático quinase que conduz à sua autofosforilação, como também transfosforilação do substrato protéico. As proteínas de transdução fosforiladas adicionam o sinal para induzir uma resposta específica para o *ligand*. Embora genes de RLKs constituam uma família muito grande no genoma vegetal, vários genes foram clonados de várias espécies de plantas, mas a elucidação de suas funções ainda está limitada (Tichtinsky et al., 2003).

As RLKs de plantas são divididas em vários grupos, como LRR-RLK, S-domain-RLK, EGF-repet-RLK e vários outros grupos (Shiu & Bleecker, 2001). LRR-RLK é dividido, mais adiante, em várias subfamílias, como a LRR II. Os membros desta subfamília têm vários números pequenos de repetições ricas em leucina (Figura 5.3 e Tabela 5.2) no domínio de receptor deles ou, mesmo, nenhum domínio. Logo, a família de proteínas quinases SERK pertence à subfamília LRR II e atua na competência embriogênica (Ito et al., 2005).

De acordo com Marchler-Bauer et al. (2007), o CDD (*Conserved Domain Database*) é parte do sistema de entrada de dados do NCBI e atua como uma busca primária na anotação de domínios conservados de proteínas. A partir

desse banco de dados, foram localizados os domínios conservados para as seqüências candidatas e o acesso de *Coffea canephora* (Tabela 5.2).

TABELA 5.2 Domínios conservados para as seqüências candidatas para proteína SERK de acordo com a base de dados CDD do NCBI (Marchler-Bauer et al., 2007). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Acesso	Domínios Conservados
C1	
C2	
C3	
C4	
C5	
C7	
C9	
EF370120	
S4	
S6	
S8	
S9	
S11	

Os *motifs* de agrupamento dentro das seqüências para SERK são mostrados na Figura 5.4, em que os padrões conservados aparecem nos EST-*contigs* e nos EST-*singlets*, seguidos pelos demais *motifs* característicos de cada seqüência.

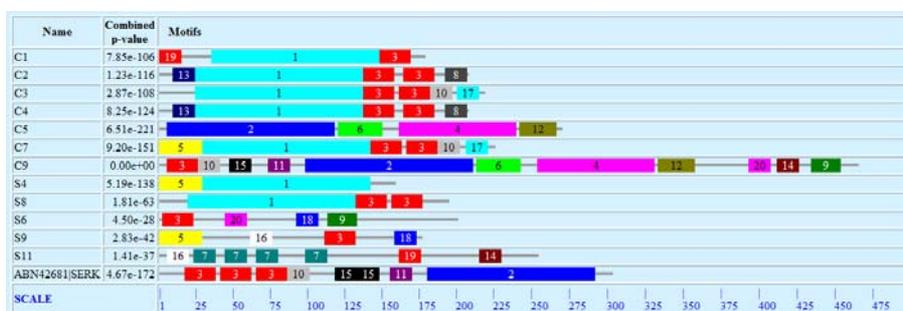


FIGURA 5.4 MEME (*Multiple Expectation Minimization for Motif Elicitation*, <http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html>) para prováveis seqüências para SERK. Os parâmetros utilizados foram: número de repetições qualquer, máximo número de *motifs* 20 e amplitude ótima entre 6 e 200. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Como se observa na Figura 5.4, o gene candidato C9 apresentou *Combined P-value* = 0,00e+00, demonstrando, de acordo com Bailey et al. (2006), que, dentre as seqüências analisadas pelo MEME, esta se apresenta com maiores probabilidades de serem similares a seqüências do banco de dados.

A análise de *motifs* de agrupamento pelo MAST (*Motif Alignment and Search Tool*) revelou 3 seqüências (*motifs* 1, 2 e 4) contendo mais de 50 aminoácidos. Esses *motifs* maiores foram anotados pelo SMART (*Simple Motif Architecture Research Tool*, <http://smart.embl-heidelberg.de/>), tendo somente os *motifs* 1 e 2 apresentado homologia com domínios de aminoácidos relacionados as seqüências candidatas para SERK (Tabela 5.3).

TABELA 5.3 Domínios conservados para as *motifs* obtidos pelo MEME, visualizados no MAST e anotados pelo SMART. UFLA, Lavras, MG, 2008.

<i>Motif</i>	Domínios	Nome	Início	Fim	<i>E-value</i>
1	LRR_SD22	<i>Leucine-rich repeat, SDS22-like subfamily</i>	66	98	1.84e+02
	LRR_TYP□	<i>Leucine-rich repeats, typical (most populated) subfamily</i>	66	90	3.65e+01
	LRR_RI□	<i>Leucine-rich repeat, ribonuclease inhibitor type</i>	90	113	2.18e+03
2	TyrKc□	<i>Tyrosine Kinase, catalytic domain</i>	43	113	2.55e+03

De acordo com Bailey et al. (2006), um *motif* é um padrão de sucessão que acontece repetidamente em um grupo de proteínas relacionadas ou seqüências de DNA. O MEME, então, representa *motifs* como matrizes de aminoácido-probabilidade (Figura 5.4) posição-dependentes que descrevem a probabilidade de cada possível aminoácido a cada posição no padrão. *Motifs* de MEME individuais não contêm aberturas. Padrões com aberturas de comprimento variável e fendas por MEME em dois ou mais *motifs* separados.

O perfil de expressão obtido pelo *Northern* Eletrônico (Figura 5.5) revelou uma maior expressão das seqüências na biblioteca (Vieira et al., 2006) de calos e células em suspensão, devido à competência e à totipotência esperada desses materiais. Tecidos que apresentam totipotência como fontes de explantes como hipocótilo, sementes, gemas florais, frutos e folhas também podem ser visualizados contendo expressões desses genes candidatos.

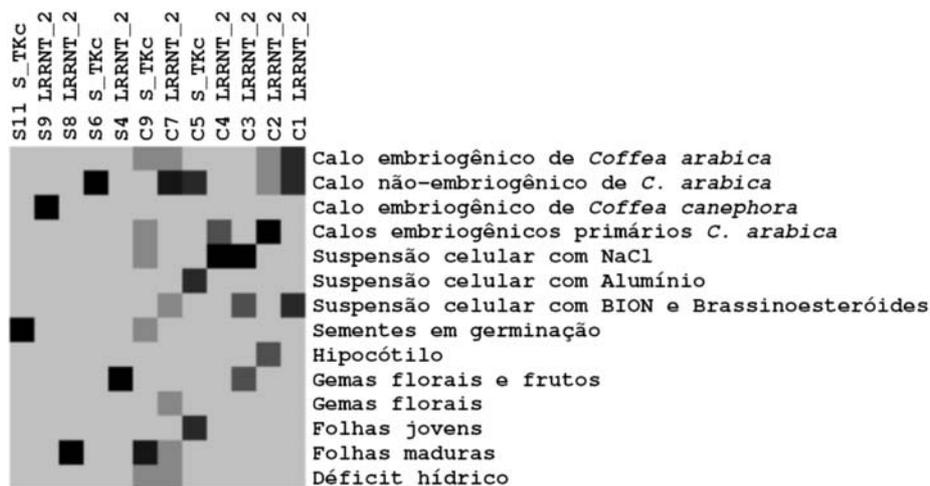


FIGURA 5.5 *Northern* eletrônico representando, por meio de escala de cinza, os níveis de expressão dos EST-*contigs* e EST-*singlets* nas diferentes bibliotecas (Vieira et al., 2006).

Observou-se, por meio do *Northern* eletrônico (Figura 5.5), que os *contigs* C1, C2 e C7 não seriam bons marcadores do processo de diferenciação do calo embriogênico e não-embriogênico, de acordo com as bibliotecas obtidas por Vieira et al. (2006). O *singlets*6 atuaria, entretanto como possível marcador molecular de um calo não-embriogênico. Já, assim como os resultados posteriores, o *contig* C9 aparece com um possível marcador da característica embriogênica, mesmo tendo se expressado em intensidade menor que sua ocorrência na biblioteca de folhas maduras de *C. arabica*. Tal fato pode estar relacionado ao fato de o gene SERK1 ter sido expresso no procâmbio de bainhas vasculares de vários tecidos vegetativos como folhas, caules e raízes (Hecht al., 2001; Kwaaitaal et al., 2005). SERK1 é expresso tanto em tecidos reprodutivos quanto na bainha vascular de plântulas (Albrecht et al., 2005; Kwaaitaal et al., 2005), corroborando, assim, a ocorrência de C9 na biblioteca (Vieira et al., 2006) de sementes em germinação (Figura 5.5).

A expressão de C9 em bibliotecas como suspensão celular tratada com NaCl e em *pool* de tecidos em déficit hídrico demonstra um possível caráter de sinalização a estresses abióticos.

Salienta-se, entretanto, que a expressão desses homólogos não é específica para marcar células competentes para formar embriões, mas está também envolvida no processo que confere a competência embriogênica, podendo ser um componente da via de sinalização da embriogênese especialmente durante os estádios iniciais de desenvolvimento (Ikeda et al., 2006). As células competentes podem conter um receptor inativo, que pode ser ativado pela presença de algum fator que aciona o programa genético da embriogênese (Fehér et al., 2003; Nolan et al., 2003). Agregados celulares de *Ocotea catharinensis* cultivados, com a competência à embriogênese, foram associados à expressão do gene SERK (Santa-Catarina et al., 2004). Ficou evidenciado que, para este sistema, é possível a utilização da expressão do gene SERK como um marcador para o reconhecimento das células competentes.

6 CONCLUSÃO

Foi possível identificar 12 seqüências (7 *contigs* e 5 *singlets*) relacionadas à SERK no banco de dados do CAFEST para *Coffea arabica*, com alta similaridade à seqüência de *Coffea canephora*. Desses, pelo menos C9 apresenta os mais fortes indícios de ser a seqüência de interesse. O SERK atua em *C. arabica* como marcador molecular em eventos relacionados à embriogênese zigótica e somática, assim como na totipotência de explantes relacionados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, C.; RUSSINOVA, E.; HECHT, V.; BAAIJENS, E.; DE VRIES, S. The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES 1 and 2 control male sporogenesis. **The Plant Cell**, Rockville, v.17, p.3337–3349, 2005.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.

ALTSCHUL, S.F.; WOOTTON, J.C.; GERTZ, E.M.; AGARWALA, R.; MORGULIS, A.; SCHÄFFER, A.A.; YU, Y.K. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. **The FEBS Journal**, v.272, p.5101-5109, 2005.

BAILEY, T.L.; WILLIAMS, N.; MISLEH, C.; LII, W.W. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.34, p.W369-W373, 2006.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M.P. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**, Wien, v.224, p.33-40, 2004.

EISEN, M.B.; SPELLMAN, P.T.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, Washington, v.95, p.14863-8, 1998.

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

HALL, T.A. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. **Nucleic Symposium Series**, Oxford, v.41, p.95-98, 1999.

HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J-P.; HARTOG, M.V.; SCHMIDT, E.D.L.; BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; DE VRIES, S.C. The *Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, Rockville, v.127, p.803–816, 2001.

IKEDA, Y.; BANNO, H.; NIU, Q-W.; HOWELL, S.H.; CHUA, N-H. The ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2 gene in *Arabidopsis* regulates CUP-SHAPED COTYLEDON 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.47, n.11, p.1443–1456, 2006.

ITO, Y.; TAKAYA, K.; KURATA, N. Expression of SERK family receptor-like protein kinases genes in rice. **Biochimica et Biophysica Acta**, Berlin, v.1730, p.253-258, 2005.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v.157, p.105-132, 1982.

KWAAITAAL, M.A.; DE VRIES, S.C.; RUSSINOVA, E. *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor Kinase 1 protein is present in sporophytic and gametophytic cells and undergoes endocytosis. **Protoplasma**, v.226, p.55–65, 2005.

MARCHLER-BAUER, A.; ANDERSON, J.B.; DERBYSHIRE, M.K.; DEEWEESE-SCOTT, C.; GONZALES, N.R.; GWADZ, M.; HAO, L.; HE, S.; HURWITZ, D.I.; JACKSON, J.D.; KE, Z.; KRYLOV, D.; LANCZYCKI, C.J.; LIEBERT, C.A.; LIU, C.; LU, F.; LU, S.; MARCHLER, G.H.; MULLOKANDOV, M.; SONG, J.S.; THANKI, N.; YAMASHITA, R.A.; YIN, J.J.; ZHANG, D.; BRYANT, S.H. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.35, p.D237-D240, 2007.

NOLAN, K.E.; IRWANTO, R.R.; ROSE, R.J. Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago trunculata* root-forming and embryogenic cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v.133, p.218-230, 2003.

QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; ROJAS-HERRERA, F.; GALAZ-AVALOS, R.M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.86, p.285–301, 2006.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.4, p.406-425, 1987.

SANTA-CATARINA, C.; HANAI, L.R.; DORNELAS, M.C.; VIANA, A.M.; FLOH, E.I.S. SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.79, p.53-61, 2004.

SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, S.C.; PEDROTTI, E.L. Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n.4, p.501-510, 2001.

SANTOS, M. O.; ROMANO, E.; TINOCO, M. L. P.; ARAGAO, F. J. L. ***Coffea canephora* somatic embryogenesis receptor-like Kinase (serk) mRNA, partial CDs**. Direct submission (17 jan. 2007). Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=125489041>> Acesso em: 14 set. 2008.

SCHMIDT, E.D.L.; GUZZO, F.; TOONEN, M.A.J.; DE VRIES, S.C. A leucine-rich repeat containing receptor-like Kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, Great Britain, v.124, p.2049–2062, 1997.

SHIU, S.H.; BLEECKER, A.B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.98, p.10763-10768, 2001.

SITNIKOVA, T.; RZHETSKY, A.; NEI, M. Interior-branch and bootstrap tests of phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.12, p.319-33, 1995.

SOMLEVA, M.N.; SCHMIDT, E.D.L.; DE VRIES, S.C. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracing and by *SERK* expression. **Plant Cell Report**, Berlin, v.19, p.718-726, 2000.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.24, n.8, p.1596-1599, 2007.

TICHTINSKY, G.; VANOOSTHUYSE, V.; COCK, J.M.; GAUDE, T. Making inroads plant receptor kinase signaling pathways. **Trends Plant Science**, v.8, p.231-237, 2003.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.22, p.4673-4680, 1994.

VIEIRA, L.G.E.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; MORAES, A.H.A.; MEHTA, A.; OLIVEIRA, A.C.; LABATE, C.A.; MARINO, C.L.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v.18, n.1, p.95-108, 2006.

ANEXOS

ANEXOS

TABELA 1A. Meio nutritivo MS. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Solução estoque (SE)	Compostos	Concentração da SE (mg L ⁻¹)	Volume da SE adicionada ao meio (mL)	Concentração final (mg L ⁻¹)
1	NH ₄ NO ₃	82500	20	1650,00
2	KNO ₃	95000	20	1900,00
3	H ₃ BO ₃	1240	5	6,20
	KH ₂ PO ₄	34000		170,00
	KI	166		0,83
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	50		0,25
	CoCl ₂ .6H ₂ O	5		0,025
4	CaCl ₂ .2H ₂ O	8800	50	440,00
5	MgSO ₄ .7H ₂ O	74000	5	370,00
	MnSO ₄ .4H ₂ O	4460		22,30
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1720		8,6
	CuSO ₄ .5H ₂ O	5		0,025
6	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	7450	5	37,25
	FeSO ₄ .7H ₂ O	5570		27,85
Vitaminas	Tiamina HCl	50	10	0,50
	Piridonina HCl	50		0,50
	Ac. nicotínico	50		0,50
Aminoácido	Glicina	80	25	2,00
Hexitol	Mio-inositol	2000	50	100,00
Açúcar	Sacarose (3%)	--	--	30000,00

TABELA 2A. Estimativas dos parâmetros para o modelo binomial para a variável número de explantes com calos presentes e ausentes. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Parâmetros	Estimativa	Erro padrão
Intercepto (2,4-D)	-0,51114	0,64865
BAP	-6,08383	2,47163
CIN	-2,36034	1,68264
TDZ	-1,02545	0,99449
CONCENTRAÇÃO	-0,00131	0,04787
BAP x C	0,43926	0,15963
CIN x C	-0,06591	0,1524
TDZ x C	0,15401	0,07565

TABELA 3A. Avaliação do crescimento dos calos obtidos a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. ln = logaritmo neperiano; TCM = taxa de crescimento médio. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Tempo (dias)	Peso médio (gramas)	ln	TCM	% de crescimento
0	0,0009	-6,94	0	0
15	0,0176	-4,03	0,1939	94,54
30	0,0434	-3,13	0,0601	59,44
45	0,0562	-2,87	0,0172	22,77
60	0,0644	-2,74	0,0090	12,73
75	0,0638	-2,75	-0,0006	-0,94
90	0,0532	-2,93	-0,0121	-19,92
105	0,0567	-2,86	0,0043	6,25
120	0,0534	-2,92	-0,0040	-6,27
135	0,0302	-3,49	-0,0379	-76,82

TABELA 4A. Estimativas dos parâmetros para o modelo Poisson para a variável número de brotos na região da incisão. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Parâmetros	Estimativa	Erro padrão
Intercepto (BAP)	-1,3050	0,5462
REGULADOR TDZ	-1,1985	0,4925
CONCENTRAÇÃO	0,0859	0,0344

TABELA 5A. Estimativas dos parâmetros para o modelo Poisson para a variável número de folhas dos brotos na parte incisada (hipocótilo) do embrião. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Parâmetros	Estimativa	Erro padrão
Intercepto (BAP)	-0,38859	0,49978
CONCENTRAÇÃO	0,09331	0,03437

TABELA 6A. Estimativas dos parâmetros para o modelo Poisson para a variável número de folhas da parte aérea (cotiledonar) do embrião. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Parâmetros	Estimativa	Erro padrão
Intercepto (BAP)	1,3995	0,1677
REGULADOR CIN	-0,2366	0,2548
REGULADOR TDZ	-0,2228	0,2591
I(C)	0,0657	0,0112
REGULADOR CIN:I(C)	-0,0364	0,0174
REGULADOR TDZ:I(C)	-0,0581	0,0182

TABELA 7A. Estimativas do modelo com interação Regulador x Dose x Dias.
UFLA, Lavras, MG, 2008.

Parâmetros do modelo	Categorias					
	0	1	2	3	4	5
Intercepto (*)	-4,13759	1,59758	1,64290	-0,32352	-0,61556	-2,65718
BAP	8,03860	3,73602	2,13379	0,53030	1,60038	3,26756
CIN	3,40508	2,41597	0,57682	0,99603	0,92512	4,15912
TDZ	1,65772	5,25996	4,89815	3,91667	3,18411	3,94161
Dose	0,07258	0,01048	-0,14287	-0,19622	-0,09414	-0,15731
Tempo	-0,08231	0,00607	-0,02751	-0,00940	0,00106	0,02179
BAP x Dose	-0,47804	0,06010	0,17099	0,30776	0,17945	0,25662
CIN x Dose	0,01058	0,19094	0,29599	0,36083	0,18533	-0,07918
TDZ x Dose	0,15293	0,20740	0,32281	0,46675	0,38322	0,41183
BAP x Dias	0,00527	0,00167	0,02487	0,02538	-0,00046	0,00786
CIN x Dias	0,07747	0,00278	0,03630	0,03231	0,01567	-0,03307
TDZ x Dias	0,06979	-0,03502	-0,01717	0,00911	-0,00543	-0,01940
Dose x Dias	0,00110	-0,00959	0,00053	0,00104	-0,00043	-0,00076
BAP x Dose x Dias	0,00320	0,00662	-0,00184	-0,00175	-0,00003	-0,00114
CIN x Dose x Dias	-0,00182	0,00811	-0,00171	-0,00224	-0,00243	0,00136
TDZ x Dose x Dias	-0,00208	0,00770	-0,00155	-0,00253	-0,00117	-0,00016

*O intercepto é formado da interação do regulador 2,4-D com as dose e dias na categoria -1.