

**COMPARAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS EMBRIOGÊNICAS E NÃO EMBRIOGÊNICAS
DE CALOS DE *Coffea arabica* cv Catiguá**

MARLÚCIA SOUZA PÁDUA¹, KALYNKA GABRIELLA DO LIVRAMENTO²; LUCIANO
VILELA PAIVA³, ANA HORTÊNCIA FONSECA CASTRO⁴, EDUARDO ALVES⁵

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo analisar as características embriogênicas e não embriogênicas em dois tipos de calos de *Coffea arabica* cv Catiguá através de análises ultra-estruturais. Explantes foliares foram inoculados em meio contendo 2,4-D, AIB e 2iP para indução dos calos primários e transferidos após três semanas para meio contendo BAP 2,4-D para indução dos calos embriogênicos. Após cinco meses de cultivo foram obtidos dois tipos de calos, caracterizados visualmente em amarelo e friável e o outro em transparente e aquoso e os mesmos foram analisados através de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Através das observações em MET notou-se que as células do calo caracterizado morfológicamente em amarelo e friável apresentam características embriogênicas e o calo transparente e aquoso apresentou grandes vacúolos característico de calos em processo de morte celular.

Palavras-chaves: Análise ultra-estrutural, Embriogênese somática, Núcleo proeminente, Vacuolização, Amiloplastídeos.

INTRODUÇÃO

O cafeeiro (*Coffea arabica* L. – Rubiaceae) é uma espécie originária da Etiópia (MIRANDA et al., 1999) e seu cultivo é uma atividade de grande expressão no cenário do agronegócio mundial. Sendo o Brasil o maior produtor, consumidor e exportador de café do mundo (AGRIANUAL, 2009). Por ser uma espécie que possui grande importância social e econômica, *Coffea arabica* L. vem sendo amplamente estudado a fim de agregar características de interesse à espécie. Desta forma, métodos biotecnológicos são amplamente utilizados nos programas de melhoramento genético, auxiliando nas dificuldades encontradas em culturas perenes (MIRANDA et al., 1999; REZENDE, 2008). A cultura de tecidos de plantas mostra-se como boa alternativa para a rápida propagação de plantas de cafeeiro, em curto espaço de tempo e diferentes épocas do ano, aumentando a taxa de multiplicação e a difusão acelerada de novas cultivares (CARVALHO et al., 1999; PEREIRA et al., 2007). Dentre as várias técnicas da cultura de tecidos vegetais destaca-se a embriogênese somática. Esta técnica é uma das melhores opções para a propagação *in vitro* de plantas lenhosas, como o café, permitindo alta taxa de multiplicação, quando comparada a qualquer outro processo de propagação. O objetivo do presente trabalho foi induzir a calogênese em explantes foliares de *Coffea arabica* (cultivar Catiguá), e caracterizar as células de dois tipos de calos, possibilitando o aperfeiçoamento de protocolos futuros de regeneração de plantas *in vitro*, por vias indiretas.

MATERIAIS E MÉTODOS

¹ Mestranda em Biotecnologia Vegetal, LCBM/ UFLA, marluciabio@yahoo.com.br

² Pesquisadora Mestre, LCBM/UFLACNPq, kalynkagabriella@yahoo.com.br

³ Professor Associado, DQI/UFLA, luciano@dqi.ufla.br

⁴ Professora, Núcleo de Produtos Naturais/UFSJ, acastro@ufsj.edu.br

⁵ Professor Adjunto, DFP/UFLA ealves@ufla.br

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios: Central de Biologia Molecular e de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME), da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

Calogênese

Explantos foliares de 1cm² retirados de plantas de *Coffea arabica* cv. Catiguá MG2 foram inoculados em meio de cultivo MS suplementado com 2,26 µM de 2,4-D, 5 µM de AIB e 10 µM de 2iP, e mantidos em sala de crescimento, com temperatura de 25°C, na ausência de luz. Após três semanas os explantes foram transferidos para meio MS suplementado com 17 µM de BAP e 4,52 µM de 2,4-D e mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16h. Após cinco meses de cultivo foram coletados dois tipos de calos, caracterizados visualmente em amarelo friável e transparente aquoso, sendo, posteriormente, os mesmos analisados por microscopia eletrônica de transmissão.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para análise em Microscópio Eletrônico de Transmissão as amostras foram preparadas como descrito por Alves (2004). A observação dos espécimes foi realizada em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM 109, localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) no Departamento de Fitopatologia da UFLA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através das observações em MET, foi possível constatar que as células do calo caracterizado morfologicamente em amarelo e friável apresentaram citoplasma denso, núcleo organizado com nucléolo proeminente, grande quantidade de amiloplastídeos e ausência de vacúolos (Figura 1 A e B).

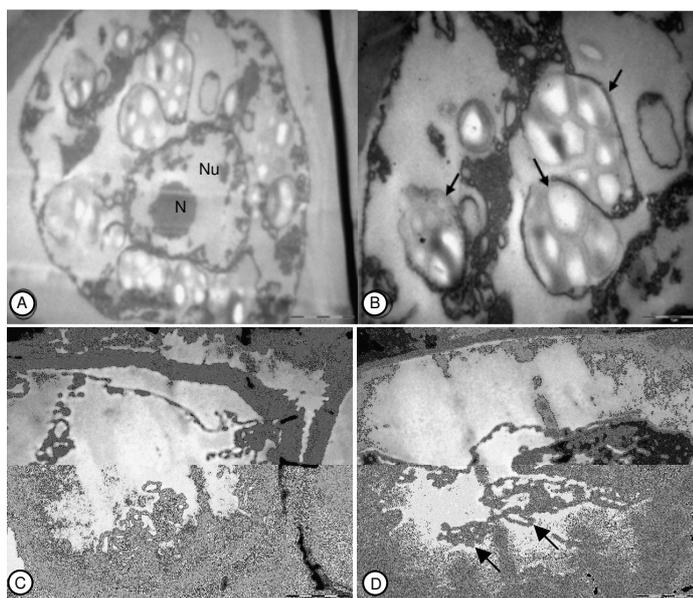


Figura 1 - Eletromicrografia de transmissão de células obtidas de calo de *Coffea arabica* cv. Catiguá caracterizado morfologicamente em amarelo e friável apresentando núcleo (N) e nucléolo (Nu) (A) e calo amarelo e friável destacando a presença de amiloplastídeos (setas pretas) (B). Células obtidas de calo de *Coffea arabica* cv. Catiguá caracterizado morfologicamente em transparente e aquoso (C) e (D). Vacúolo ocupando totalmente o espaço citoplasmático da célula (C). Seta preta mostrando vesículas (D).

Nos calos transparentes e aquosos (figura 1 C e D), foi observada a presença de vacúolo autofágico ocupando toda a célula, vesículas, espaço intercelular marcante e a ausência de outras

organelas citoplasmáticas. Esses resultados vão de encontro com os de Nogueira et al. (2007), que observaram em células de calos de *Byrsonima intermedia* obtidos no cultivo inicial núcleos desorganizados e poucas organelas citoplasmáticas.

Características semelhantes às obtidas com o calo amarelo e friável foram observadas em *Feijoa sellowiana* (Canhoto et al. 1996) e em *Byrsonima intermedia* (Nogueira et al. 2007) cujas células embriogênicas apresentaram núcleo bem desenvolvido com nucléolo proeminente e grânulos de amido.

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

CONCLUSÃO

Foi possível distinguir as características embriogênicas e não embriogênicas dos dois tipos de calos através da microscopia eletrônica de transmissão.

O calo amarelo e friável apresentou características embriogênicas e o calo transparente e aquoso apresentou algumas características não embriogênicas em suas células. Inferindo que o calo amarelo e friável possui maior potencial para regenerar plantas via embriogênese somática.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL2009. **Anuário da agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, 2009. 497p.

ALVES, E. **Apostila do curso introdutório de Microscopia Eletrônica de Varredura**. Lavras:UFLA, 2004. 43 p.

BOBÁK, M.; SAMAJ, J.; PRETOVÁ, A.; BLEHOVÁ, A.; HLINKOVÁ, E.; OVECKA, M.; HLAVACKA, A.; KUTARNOVÁ, Z. The histological analysis of indirect somatic embryogenesis on *Drosera spathulata* Labill. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 26, n.3, p.353-361, may. 2004.

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

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

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.

MARTIN, A. B.; CUADRADO, Y.; GUERRA, H. GALLEGO, P.; HITA, O.; MARTIN, L.; DORADO, A.; VILLALOBOS, N. Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in

embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. **Plant Science**, v. 154, p. 143-151, may. 2000.

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

MIRANDA, E. M. de; PEREIRA, R. de C. A.; BERGO, C. L. Comportamento de seis linhagens de café (*Coffea arabica* L.) em condições de sombreamento e a pleno sol no estado do Acre, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.1, p.62-69, jan/mar. 1999.

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

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

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

REZENDE, J, C, de. **Embriogênese somática indireta em clones elite de *Coffea arabica* L.** 2008. 91 p. Tese (Doutorado em Agronomia: Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.