



**MICROPROPAGAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICO-ANATÔMICA EM
Coffea arabica e *Coffea canephora***

CÍNTIA GUIMARÃES DOS SANTOS

2001

52410

MFN:37114

CÍNTIA GUIMARÃES DOS SANTOS

**MICROPROPAGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICO
ANATÔMICA EM *Coffea arabica* E *Coffea canephora***

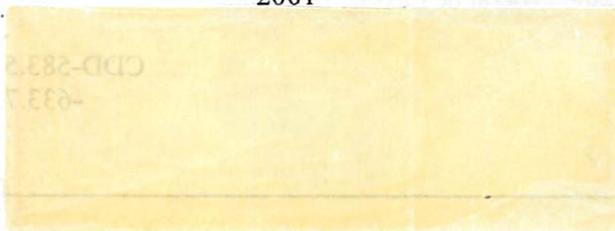
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre"

Orientador

Prof. Renato Paiva, PhD.

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2001



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

Santos, Cíntia Guimarães dos

Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e
Coffea canephora / Cíntia Guimarães dos Santos. -- Lavras : UFLA, 2001.

110 p. : il.

Orientador: Renato Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Micropropagação. 2. Análise bioquímica. 3. Anatomia. 4. Calogênese. 5.
Café. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-583.52
-633.733

CÍNTIA GUIMARÃES DOS SANTOS

MICROPROPAGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICO-ANATÔMICA EM *Coffea arabica* e *Coffea canephora*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Mestre”

APROVADA EM 28 DE AGOSTO DE 2001-10-26

Dr. Leonardo Ferreira Dutra

UFLA

Dra. Sttella Dellyzette Veiga Franco da Rosa

EMBRAPA/CAFÉ



Prof. Renato Paiva

UFLA

(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus irmãos Marcelo e Patrícia,
que sempre compartilham comigo alegrias e penas, tornando minha
vida iluminada.

Aos meus sobrinhos, Gustavo, Guilherme, Isadora e Iuri,
pelos momentos de alegria.

Ao Hugo,
que com sua amizade, cumplicidade e
companheirismo tem preenchido os dias de
minha vida.

OFEREÇO

Aos meus pais, Márcio e Vera, porque sem eles seria impossível a
realização de mais essa etapa.

DEDICO

“O homem é sempre memória, por mais que se ligue a projetos, entretenha-se com a criação e se perca em sondagem do futuro. A cada passo que ande, a cada paisagem que sinta, em tudo e em todos, sempre existe um elemento infinito que desperta e reanima e encadeando-se reconstrói o passado!”

(Márcio Vicente Silveira Santos, 1965)

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo.

À Universidade Federal de Lavras e a CAPES, pela oportunidade de realização do curso e concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Renato Paiva pela orientação, ensinamentos e amizade durante todo o curso.

Aos professores da Fisiologia vegetal Donizeti, Luiz Edson, Ângela, Amauri, Marcelo e Nelson pelos valiosos conhecimentos adquiridos durante o mestrado.

Ao grupo de cultura de tecidos: Mauro, Gustavo, Fernanda, José Raniere, Guilherme, Soami, Breno, Rodrigo e Michelle pela amizade, disposição e alegre colaboração, tornado melhores todas as etapas desse trabalho.

Ao Prof. Augusto pela orientação nas análises estatísticas

Ao Prof. Evaristo pela preciosa ajuda nos cortes anatômicos.

À Lena, Odorêncio, Joel, Evaristo, Izonel, pelo agradável convívio.

Aos pesquisadores Edilson Paiva e Paulo César Magalhães CNPMS – Sete Lagoas, pelo grande auxílio na realização deste trabalho.

Aos funcionários da EMBRAPA - Sete Lagoas, Miguel, Ubiraci, Alcione e Edina pelo grande auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

À Rúbia, Iara, Daniela, Sílvia e Leonardo, pelos almoços, jantares, conversas, festas e acima de tudo pela amizade.

À turma do mestrado: Sílvia, Luciano, Fabiana, Rúbia, Lucinéia, pelos momentos de estudos, convivência e amizade.

Ao Dr. Leandro L. Loguercio pelo incentivo constante.

Aos amigos que aqui encontrei: Ana Rita, Flávia, Janáina, Nair, Vânia e Marina.

A tia Jeanete pelas constantes orações.

Aos meus familiares, Adriano, Celênia, as minhas primas Renata, Gabriela, Carolina, Carol, Lúgia, Daniela, Cristiane e primos, Leonardo, Humberto, Paulo, Rafael e Tiago, tias e tios, que me incentivaram em todos os momentos.

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

CINTIA GUIMARÃES DOS SANTOS, filha de Márcio Vicente da Silveira Santos e Vera Lúcia Guimarães dos Santos, nasceu em 17 de janeiro de 1971 em Sete Lagoas-MG. Ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa em 1992, concluindo-o em setembro de 1996. Após a conclusão da graduação, especializou-se na área de Biologia Aplicada, no Centro Nacional de pesquisa de Milho e Sorgo (EMBRAPA-CNPMS), sob orientação do Dr. Edilson Paiva, concluindo-o em 1999. Iniciou o curso de Mestrado em Agronomia - Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras em 1999, concluindo-o em 2001.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1. Descrição das espécies.....	2
2.1.1 <i>Coffea arabica</i>	3
2.1.2. <i>Coffea canephora</i>	5
2.2. Cultura de tecidos.....	7
2.2.1. Cultura de embriões.....	7
2.2.2. Calogênese.....	8
2.3. Aclimatização.....	9
2.4. Aspectos bioquímicos.....	10
2.5. Aspectos Anatômicos.....	10
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
CAPÍTULO II. CULTURA <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES DE <i>Coffea arabica</i> E <i>Coffea canephora</i>.....	14
1. RESUMO.....	14
2. ABSTRACT.....	14
3. INTRODUÇÃO.....	15
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5.1. Avaliação do desenvolvimento das plântulas originadas a partir da cultura de embriões de <i>Coffea arabica</i> e <i>Coffea</i> <i>canephora</i> , oriundas de frutos armazenados em diferentes condições ambientais.....	18
5.1.1. Obtenção e condição de armazenamento de frutos	

do cafeeiro.....	18
5.1.2. Desinfestação dos frutos, retirada e inoculação dos embriões.....	19
5.2. Efeito do BAP no desenvolvimento de plântulas originadas a partir da cultura de embriões de <i>Coffea arabica</i> e <i>Coffea canephora</i>	19
5.2.1. Obtenção e desinfestação dos frutos.....	19
5.2.2. Retirada e inoculação dos embriões.....	20
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
7. CONCLUSÕES.....	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

CAPÍTULO III. ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE BROTAÇÕES DE *Coffea arabica* e *Coffea canephora*

1. RESUMO.....	32
2. ABSTRACT.....	32
3. INTRODUÇÃO.....	33
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	34
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
5.1.Enraizamento <i>in vitro</i> de <i>Coffea arabica</i> e <i>Coffea canephora</i>	36
5.2.Enraizamento <i>ex vitro</i> de <i>Coffea arabica</i> e <i>Coffea canephora</i>	37
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÕES.....	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

CAPÍTULO IV. ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE <i>Coffea arabica</i> E <i>Coffea canephora</i>	47
1. RESUMO.....	47
2. ABSTRACT.....	47
3. INTRODUÇÃO.....	48
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	49
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
7. CONCLUSÕES.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

CAPÍTULO V. INDUÇÃO DE FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES E NODAIS DE <i>Coffea arabica</i> e <i>Coffea canephora</i>	56
1. RESUMO.....	56
2. ABSTRACT.....	56
3. INTRODUÇÃO.....	57
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	58
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
5.1. Efeito de 2,4-D e AIB na indução de calos em segmentos foliares e nodais de <i>Coffea arabica</i> ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e <i>Coffea canephora</i> ‘Apoatã’.....	60
5.1.1. Obtenção dos explantes.....	60
5.1.2. Inoculação dos explantes.....	60
5.2. Efeito de 2,4-D e BAP na indução de calos em segmentos foliares de <i>Coffea arabica</i> ‘Rubi’ e <i>Coffea canephora</i> ‘Apoatã’.....	61
5.2.1. Obtenção dos explantes.....	61

5.2.2. Inoculação dos explantes.....	61
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÕES.....	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

CAPÍTULO VI. CURVA DE CRESCIMENTO, ANÁLISE BIOQUÍMICA E PADRÃO PROTEÍCO DE CALOS OBTIDOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES E NODAIS DE *Coffea arabica* E *Coffea canephora*.....

1. RESUMO.....	70
2. ABSTRACT.....	71
3. INTRODUÇÃO.....	71
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	73
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	75
5.1. Obtenção da curva de crescimento de calos.....	75
5.2. Análise bioquímica.....	76
5.2.1. Quantificação de proteínas totais.....	76
5.2.2. Quantificação de açúcares redutores.....	77
5.3. Eletroforese da proteína total em gel de poliacrilamida.....	77
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
7. CONCLUSÕES.....	94
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

CAPÍTULO VII. CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS DO TECIDO FOLIAR DURANTE OS PROCESSOS DE CULTIVO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE *Coffea arabica* e *Coffea canephora*

1. RESUMO.....	97
2. ABSTRACT.....	97

3. INTRODUÇÃO.....	98
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	99
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	102
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	102
7. CONCLUSÕES.....	108
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Efeito da condição de armazenamento dos frutos no comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de cafeeiro oriundas de embriões.....	23
TABELA 2. Efeito da condição de armazenamento dos frutos no comprimento de raiz (cm) de plântulas de cafeeiro oriundas de embriões.....	25
TABELA 3. Efeito da condição de armazenamento dos frutos no peso da matéria fresca (mg) das plântulas de cafeeiro oriundas de embriões.....	26
TABELA 4. Contraste de médias para percentagem de cobertura de calos em explantes de <i>Coffea arabica</i> ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e <i>C. canephora</i> ‘Apoatã’	63
TABELA 5. Contraste de médias para percentagem de cobertura de calos em explantes de <i>Coffea arabica</i> ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e <i>C. canephora</i> ‘Apoatã’	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Aspecto visual de embriões em frutos do cafeeiro no estágio “verde-cana”	20
FIGURA 2. Aspecto geral do crescimento de plântulas de <i>Coffea arabica</i> ‘Rubi’, originadas de embriões retirados de frutos armazenados em temperatura ambiente (A) e sob refrigeração (B), por 7 dias.....	21
FIGURA 3. Efeito do armazenamento do fruto no comprimento da parte aérea de plântulas de <i>Coffea arabica</i> ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e <i>Coffea canephora</i> ‘Apoatã’ obtidas através da germinação <i>in vitro</i> de embriões.....	22
FIGURA 4. Efeito do armazenamento do fruto no comprimento de raiz de plântulas de <i>Coffea arabica</i> ‘Topázio’ e <i>Coffea canephora</i> ‘Apoatã’, obtidas através da germinação <i>in vitro</i> de embriões.....	24
FIGURA 5. Efeito do armazenamento do fruto no peso da matéria fresca de plântulas de <i>Coffea arabica</i> ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e <i>Coffea canephora</i> ‘Apoatã’, obtidas através da germinação <i>in vitro</i> de embriões.....	25
FIGURA 6. Número de folhas formadas em plântulas de ‘Apoatã’ e ‘Topázio’, obtidas a partir da cultura de embriões, em relação a diferentes concentrações de BAP.....	27
FIGURA 7. Comprimento médio da parte aérea de plântulas de ‘Apoatã’, ‘Acaiá Cerrado’, ‘Rubi’ e ‘Topázio’ obtido a partir da cultura de embriões, em diferentes concentrações de BAP	28
FIGURA 8. Percentual de enraizamento de <i>C. arabica</i> ‘Acaiá Cerrado’, ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e <i>Coffea canephora</i> ‘Apoatã’, em função da concentração de AIB (mg.L ⁻¹).....	38

FIGURA 9. Número médio de raiz emitidas por brotações de <i>Coffea arabica</i> ‘Acaia Cerrado’, ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e <i>Coffea canephora</i> ‘Apoatã’, em função da concentração de AIB (mg.L ⁻¹)	40
FIGURA 10. Comprimento médio de raiz de <i>Coffea arabica</i> e <i>Coffea canephora</i> , em função da concentração de AIB (mg.L ⁻¹).....	41
FIGURA 11. Aspecto visual de brotações de <i>C. canephora</i> ‘Apoatã’ inoculado <i>in vitro</i> na presença de A) 0; B) 2; C) 4; D) 6 mg.L ⁻¹ de AIB, aos 30 dias.....	42
FIGURA 12. Percentagem de enraizamento <i>ex vitro</i> de <i>C. arabica</i> ‘Acaia Cerrado’, ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e <i>C. canephora</i> ‘Apoatã’.....	42
FIGURA 13. Aspecto visual de brotações de <i>Coffea canephora</i> ‘Apoatã’ inoculadas <i>ex vitro</i> A) antes e B) após 30 dias de cultivo em vermiculita.....	44
FIGURA 14. Aspecto visual de plântulas de <i>Coffea arabica</i> ‘Rubi’ (A) e ‘Topázio’ e <i>Coffea canephora</i> ‘Apoatã’ (B) obtidas <i>in vitro</i> e transferidas para caixa tipo gerbox.....	51
FIGURA 15. Aspecto visual das plântulas <i>Coffea arabica</i> ‘Rubi’ (A) e <i>Coffea canephora</i> ‘Apoatã’ (B), após a aclimatização e transferência para vasos.....	53
FIGURA 16. Percentagem de plântulas aclimatizadas de <i>C. arabica</i> ‘Acaia Cerrado’, ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e <i>C. canephora</i> ‘Apoatã’.....	53
FIGURA 17. Efeito da concentração de 2,4-D, sobre a produção de calos, formados a partir de segmentos foliares da cultivar ‘Apoatã’ e ‘Rubi’.....	66
FIGURA 18. Efeito da interação 2,4-D x BAP sobre a produção de calos formados a partir de segmentos foliares da cultivar ‘Apoatã’.....	67

FIGURA 19. Curva de crescimento dos calos formados a partir de segmentos foliares de <i>Coffea arabica</i> ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e <i>C. canephora</i> ‘Apoatã’ inoculados em meio MS suplementado com 1 mg.L ⁻¹ de 2,4-D, durante 84 dias.....	79
FIGURA 20. Curva de crescimento dos calos formados a partir de segmentos nodais de <i>Coffea arabica</i> ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e <i>C. canephora</i> ‘Apoatã’ inoculados em meio MS suplementado com 1 mg.L ⁻¹ de 2,4-D, durante 84 dias.....	82
FIGURA 21. Teores de proteínas totais do explante e de calos de <i>C. canephora</i> ‘Apoatã’ formados a partir de segmentos foliares e nodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg.L ⁻¹ de 2,4-D, durante 84 dias.....	85
FIGURA 22. Teores de proteínas totais do explante e de calos de <i>C. arabica</i> ‘Rubi’ formados a partir de segmentos foliares e nodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg.L ⁻¹ de 2,4-D, durante 84 dias.....	86
FIGURA 23. Teores de proteínas totais do explante e de calos de <i>C. arabica</i> ‘Topázio’ formados a partir de segmentos foliares e nodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg.L ⁻¹ de 2,4-D, durante 84 dias.....	87
FIGURA 24. Teores de proteínas totais do explante e de calos de <i>C. canephora</i> ‘Apoatã’ formados a partir de segmentos foliares e nodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg.L ⁻¹ de 2,4-D, durante 84 dias.....	88
FIGURA 25. Teores de açúcares redutores do explante e de calos de <i>C. arabica</i> ‘Rubi’ formados a partir de segmentos foliares e nodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg.L ⁻¹ de 2,4-D, durante 84 dias.....	89

FIGURA 26. Teores de açúcares redutores do explante e de calos de <i>C. arabica</i> ‘Topázio’ formados a partir de segmentos foliares e nodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg.L ⁻¹ de 2,4-D, durante 84 dias.....	90
FIGURA 27. Padrão de eletroforese das proteínas extraídas de explante foliar e nodal e de calos de ‘Apoatã’, durante 84 dias de crescimento	91
FIGURA 28. Padrão de eletroforese das proteínas extraídas de explante foliar e nodal e de calos de ‘Rubi’, durante 84 dias de crescimento	92
FIGURA 29. Seção transversal da lâmina foliar de <i>Coffea arabica</i> ‘Rubi’ cultivadas (A) <i>in vitro</i> e (B) <i>in vivo</i> , evidenciando o parênquima paliçádico (pp) e o parênquima lacunoso (pl).....	103
FIGURA 30. Seção transversal da lâmina foliar de <i>Coffea canephora</i> ‘Apoatã’ cultivadas (A) <i>in vitro</i> e (B) <i>in vivo</i> , evidenciando o parênquima paliçádico (pp) e o parênquima lacunoso (pl).....	104
FIGURA 31. Seção transversal da nervura principal (A) <i>in vivo</i> e (B) <i>in vitro</i> da cultivar Rubi <i>C. arabica</i>	106

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento da cultura do cafeeiro através, de métodos convencionais, envolve a utilização de diferentes técnicas. Vários métodos de melhoramento apropriados às plantas, que se reproduzem, predominantemente, por autofecundação, são usados em *Coffea arabica*. A espécie *Coffea canephora*, pela natureza alógama, possibilita o emprego de métodos bem mais variados de melhoramento do que *Coffea arabica*.

Numa população de *Coffea canephora*, pode-se empregar desde métodos simples de seleção massal, até métodos que utilizam a seleção recorrente via obtenção, avaliação, seleção e recombinação de famílias selecionadas (meio-irmãos e irmãos-germanos). Porém, após o cruzamento intervarietal são necessárias cerca de 7 a 9 gerações de autofecundação, para se chegar à uniformidade genotípica, levando cerca de 15 a 20 anos, para se obter um material superior.

A introdução de técnicas de propagação *in vitro* tem mostrado um grande potencial, para a multiplicação dos genótipos superiores, em taxas mais altas e em curto espaço de tempo, além de romper barreiras de cruzamentos existentes nos métodos convencionais e obtenção de ciclos de seleção mais curtos.

Existem várias metodologias de cultura de tecidos que podem auxiliar no programa de melhoramento do cafeeiro, por exemplo: a cultura de anteras pode ser utilizada para a obtenção de plantas homozigotas; a cultura de embriões, para a recuperação de indivíduos provenientes de cruzamentos interespecíficos e antecipação da época de plantio; a embriogênese somática,

através de explantes foliares, para obtenção de plantas; a cultura de meristemas, para obtenção de plantas livres de vírus e a micropropagação, com o objetivo de realizar rápida multiplicação do material melhorado, manutenção de bancos de germoplasma e multiplicação de híbridos interespecíficos.

Com isso, a cultura de tecidos pode ser extremamente valiosa na propagação de genótipos superiores, desde que os protocolos possibilitem altas frequências de regeneração de plantas. Por outro lado, no melhoramento de plantas, a tecnologia *in vitro* é uma ferramenta poderosa com vantagens qualitativas (obtenção de variantes somaclonais) e quantitativas (espaço e tempo), precedendo a incorporação das plantas regeneradas em um programa de melhoramento.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento de plântulas, originadas a partir da cultura de embriões, o enraizamento *in vitro* e *ex vitro*, de brotações e a aclimatização de plântulas de *Coffea arabica* e de *Coffea canephora*, além de estudar a curva de crescimento de calos, em diferentes explantes, caracterizando-a bioquimicamente e identificar alterações anatômicas foliares entre o cultivo *in vivo* e *in vitro*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Descrição das espécies

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae, compreendendo vários gêneros, dentre os quais o *Coffea*, que abrange cerca de 60 espécies com grande heterogeneidade entre si. As espécies mais conhecidas são o *Coffea arabica* var. *arabica* e o *Coffea canephora* var. *robusta*, sendo que cerca de 75% do cafeeiro cultivado em escala comercial é do tipo *arabica* e 25% é do tipo *robusta*. Existem, também, outras espécies, que são utilizadas exclusivamente em

programas de melhoramento, mas que possuem baixa produção. No entanto, possuem características diferenciadas como a resistência a diversas moléstias e pragas (Graner e Godoy Júnior, 1967).

2.1.1 *Coffea arabica*

A espécie *Coffea arabica* é originária do sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia, em região restrita e marginal às demais espécies, em uma faixa de altitude entre 1000 a 2000 metros. Essa espécie distribuiu-se, amplamente, em regiões de altitudes mais elevadas e temperaturas mais amenas, entre 18 e 21°C, no continente americano e algumas regiões da África. É autofértil, portanto, autocompatível, reproduzindo-se predominantemente por autofecundação, com uma taxa de alogamia de aproximadamente 10% em média (entre 7 a 15%). A maior parte das cultivares plantadas no Brasil pertence a essa espécie, cujo produto possui aspecto e qualidade de bebida superiores àquela do robusta (Mendes e Guimarães, 1998).

***Coffea arabica* cultivar Acaiá Cerrado**

A cultivar Acaiá foi selecionada da cultivar Mundo Novo, a partir de plantas que apresentaram sementes de maior tamanho e boa capacidade produtiva. No dialeto guarani, o termo Acaiá significa “frutos com sementes grandes”. Acredita-se que esse fenótipo tenha sido herdado da cultivar Sumatra, que participou do cruzamento que originou a cv. Mundo Novo. A seleção foi realizada em cafeeiros descendentes, principalmente, da planta prefixo P-474, que originou as progênies atuais de Acaiá. Apresenta-se com boa produção de café beneficiado e boa rusticidade. A altura média das plantas chega a atingir 4,2 metros (entre 4,1 e 4,4m) e o diâmetro médio da copa 1,8 metro (1,6 a 2 m). A cor da brotação jovem é, geralmente, bronze e os ramos secundários são menos

abundantes que nas seleções de Mundo Novo. Em Minas Gerais, no ano de 1995, foi lançada uma cultivar derivada da Acaiá, que recebeu a denominação de Acaiá Cerrado. Ao final de 5 ciclos de seleção, chegou-se à cultivar Acaiá Cerrado, que exibe excelente desenvolvimento vegetativo, elevadas produções, mesmo em condição de solos menos férteis. O diâmetro de copas e a altura média é inferior ao Acaiá tradicional. A progênie que tem se mostrado mais promissora é MG-1474 (Mendes e Guimarães, 1998).

***Coffea arabica* cultivar Rubi**

Foi com o objetivo de diversificar as características da cultivar Catuaí e selecionar formas mais produtivas, vigorosas, precoces e uniformes quanto à maturação de frutos que se obteve a cultivar Rubi, através de retrocruzamentos de Catuaí com Mundo Novo. Vários materiais foram obtidos, sendo o trabalho inicial realizado pelo IAC, nas décadas de 1960 a 1970. Posteriormente, com a introdução desse material em Minas Gerais, pelo Sistema Estadual de Pesquisa Agropecuária (EPAMIG-UFLA-UFV), novos retrocruzamentos foram realizados e a seleção intensificada. O material selecionado e lançado em Minas Gerais possui porte baixo como o Catuaí, com altura ao redor de 2 metros e diâmetro médio de copa de 1,8 metros aos sete anos. O número de ramificações secundárias é abundante, angulação dos ramos produtivos um pouco mais aberta que a Catuaí, o que permite maior aeração e insolação no interior da planta. A maturação de frutos é intermediária entre Catuaí e Mundo Novo, em época e uniformidade. Os frutos são de coloração vermelha e as folhas em plantas novas são, predominantemente, de cor bronze escuro, marcador genético que a difere da Catuaí (brotos verdes) (Mendes e Guimarães, 1998).

Coffea arabica cultivar Topázio

Para a obtenção da cultivar Topázio, semelhantemente a cultivar Rubi, foram realizados estudos com a cultivar Catuaí, tendo como meta a diversificação de suas características. Em algumas condições de plantio e manejo, a cultivar Catuaí pode exibir reduzido vigor vegetativo, depois de elevadas produções, caracterizando-se pela seca de ramos, à semelhança da cultivar Caturra que lhe deu origem. O método empregado no seu melhoramento, que se assemelha ao genealógico, fez com que, ao final, suas progênies apresentassem cerca de 50% dos alelos da cultivar Mundo Novo e 50% da cultivar Caturra amarelo.

Em razão do porte e arquitetura serem semelhantes à cultivar Catuaí, as recomendações de espaçamento para plantio, tanto no sistema adensado, quanto no de livre crescimento (renque mecanizado) são as mesmas para essa cultivar. O que diferencia as cultivares Rubi e Topázio é somente a coloração do fruto, sendo o vermelho característico da cultivar Rubi e o amarelo, da cultivar Topázio (Mendes e Guimarães, 1998).

2.1.2. *Coffea canephora*

A espécie *Coffea canephora* tem origem numa extensão geográfica mais ampla, numa faixa de região ocidental, central-tropical e subtropical do continente africano, em menores altitudes, temperaturas mais elevadas e precipitação entre 1500 a 2000 mm anuais. Sua origem e diversidade estendem-se por vasta região da África, desde a Libéria até o Sudão Anglo-Egípcio, com grande concentração na região do Congo Belga. Distribui-se, amplamente, no continente africano e em algumas regiões na América, caracterizadas por menores altitudes e temperaturas mais elevadas, com média anual entre 22 e 26°C.

Citologicamente, a espécie é diplóide ($2n=22$ cromossomos), sendo o cruzamento com *Coffea arabica* possível apenas, quando há duplicação do número de cromossomos. *Coffea canephora* multiplica-se, exclusivamente, por fecundação cruzada. Essa característica de autoincompatibilidade faz com que as populações de *Coffea canephora*, inclusive cultivares, sejam extremamente desuniformes, quando obtidas por sementes, em função da elevada heterozigose apresentada pelas plantas individualmente, gerando ampla segregação na descendência. Em *Coffea canephora*, a propagação vegetativa de plantas selecionadas é de grande interesse, como forma de uniformizar as lavouras, pela obtenção de “cultivares clonais” (Mendes e Guimarães, 1998).

A produção de café robusta vem crescendo e concorrendo com a de arabica, embora a qualidade de sua bebida seja inferior. O robusta apresenta algumas vantagens comerciais: é cotado no mercado internacional a preço mais reduzido, é muito usado na indústria de café solúvel e pode ser utilizado em misturas com o arabica, reduzindo o custo do produto final. Devido a maior sensibilidade do café arabica ao fungo *Hemileia vastatrix*, causador da ferrugem, principal fonte de prejuízo à produção, o *Coffea canephora* cv. Conilon, menos sensível a esse patógeno, passou a apresentar, interesse econômico para algumas áreas do território nacional (Fazuoli, 1986). O café robusta é explorado em regiões de temperaturas mais elevadas, nos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso, Rondônia, Acre e sul da Bahia (Mendes e Guimarães, 1998).

***Coffea canephora* cultivar Apoatã**

Com vistas aos acréscimos da frequência gênica, para a resistência a nematóides e à ferrugem, ciclos de seleção foram e vêm sendo utilizados em progênies de cultivares de *Coffea canephora*. Tal metodologia contribuiu para o aparecimento, no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), do cultivar Apoatã,

que foi originado a partir da introdução C2258 do germoplasma *Coffea canephora* cv. Robusta (Fazuoli, 1986).

2.2. Cultura de tecidos

Na cultura do cafeeiro, tem-se realizado vários trabalhos de cultivo de tecidos, utilizando-se como explantes meristemas, folhas, gemas, segmentos de ramos, embriões, anteras e protoplastos, com diferentes objetivos. Porém, a eficiência da técnica apresenta limitações, principalmente, devido a contaminações, oxidação, baixa ou nula regeneração e problemas na aclimatização das plantas (Londoño e Orozco, 1986).

2.2.1. Cultura de embriões

A terminologia “cultura de embriões” tem sido empregada para descrever os processos de crescimento e desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro*, independente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado (Rapport, 1957, citado por Hu e Ferreira, 1998).

Entre as numerosas aplicações da cultura de embriões, destacam-se: a recuperação de híbridos de cruzamentos incompatíveis; a micropropagação clonal; a superação de dormência e esterilidade de sementes e o estudo da fisiologia da embriogênese.

O cruzamento interespecífico é um passo importante do melhoramento de muitas espécies, visando ampliar a base de variabilidade genética. Entretanto, o cruzamento entre espécies, na maior parte dos casos, apresenta algum tipo de incompatibilidade. Em certos casos, a fecundação ocorre, mas o embrião aborta no início do seu desenvolvimento, ficando a sobrevivência do embrião condicionada a um isolamento do tecido maternal. Devido à natureza juvenil,

com alto potencial regenerativo, os embriões são excelentes explantes para a propagação clonal *in vitro*. A dormência de sementes de muitas espécies deve-se a inibidores químicos, ou à resistência mecânica presente nas estruturas que recobrem o embrião e não a uma dormência do embrião. A técnica de cultura de embriões pode ser capaz de produzir plântulas viáveis dessas sementes (Hu e Ferreira, 1998).

A cultura de embriões oferece um sistema controlado para estudar os problemas nutricionais, fisiológicos e bioquímicos dos embriões em vários estádios de desenvolvimento. Do ponto de vista técnico, as duas mais importantes considerações na cultura de embriões são a composição do meio de cultura e a excisão do embrião, com a composição do meio e a preparação asséptica do embrião variando entre as espécies (Andreoli, 1985).

2.2.2. Calogênese

Os calos são definidos como aglomerados de células não organizadas, irregularmente diferenciadas, que se multiplicam desordenadamente e se desenvolvem em resposta a injúrias químicas ou físicas. Os calos possuem a capacidade de se diferenciar em tecidos e órgãos (Torres e Caldas, 1990).

A cultura de calos tem sido de grande importância, para a propagação em larga escala de diversas espécies, mesmo possibilitando a obtenção de variações genéticas nos descendentes, o que constitui uma vantagem, quando se deseja garantir a biodiversidade. Além disso, possibilita a produção de metabólitos secundários e de ser pré-requisito, para o desenvolvimento de um sistema de transformação genética.

Na cultura de calos há três fases distintas: (1) indução de calos; (2) cultura de calos propriamente dita; (3) regeneração de órgãos adventícios (organogênese) ou embriões somáticos.

A embriogênese somática do cafeeiro é um sistema de micropropagação, podendo ser por via indireta, onde embriões são formados a partir de calos, ou por via direta, sem passar pela fase de calogênese (Dublin, 1982; Ramos, Yokoo e Gonçalves, 1993).

Duas estratégias têm sido geralmente utilizadas, para a obtenção de tecidos embriogênicos em *Coffea*: a primeira, unifásica, envolve o cultivo de explantes sobre um único meio, que pode conter como regulador de crescimento apenas citocinina, ou a ação combinada de auxina e citocinina (Pierson et al., 1983). A Segunda estratégia - bifásica, utiliza o cultivo de explantes sobre um meio primário, tido como de indução, seguido da transferência dos explantes para um meio secundário, tido como de diferenciação (Dublin, 1984) ou de condicionamento (Sondahl et al, 1985), que difere do primeiro por possuir uma menor razão auxina/citocinina (Zamarripa et al., 1993).

2.3. Aclimatização

A aclimatização é conceituada como sendo a fase, ou estágio da micropropagação, em que ocorre a transferência das mudas produzidas *in vitro*, para o ambiente natural, ou um ambiente de transição, como uma casa-de-vegetação ou telado (Debergh e Maene, 1981).

Existem poucos trabalhos que relatam os detalhes do procedimento de transplante e aclimatização, as dificuldades e as soluções encontradas durante esse processo. Embora existam algumas regras gerais, a experiência individual, a familiarização com a cultura, a escala de trabalho e as facilidades disponíveis são os principais fatores que determinam a otimização dessa fase.

O sucesso da técnica de propagação *in vitro*, requer que as plantas que se desenvolvem heterotroficamente, sob condições de alta umidade (90-100%), posteriormente se adaptem, tornando-se autotróficas e cresçam sob condições de

moderada ou baixa umidade. Tradicionalmente, a aclimação *ex vitro* das plantas micropropagadas é realizada através do incremento progressivo na irradiância mantendo, inicialmente, alta umidade relativa, após o transplante, com gradativa redução, até que a fase de endurecimento se complete, ou seja, até corrigir as alterações, ou anormalidades induzidas *in vitro*, o que inclui a transição do metabolismo heterotrófico para autotrófico e o estabelecimento de relações hídricas normais, através da regulação da perda e da absorção de água (Smith, Palta e McCown, 1986; Wardle, Dobbs e Short, 1983).

2.4. Aspectos bioquímicos

Embora seja uma técnica de possibilite resultados práticos, a cultura de tecidos ainda necessita de informações básicas para seu perfeito entendimento. Estudos bioquímicos que possam caracterizar as possíveis mudanças, que ocorrem no explante, culminando com indução de calogênese, ainda estão em fase inicial de exploração (Paiva Neto, 1996).

O requerimento de nutrientes e compostos orgânicos em tecidos vegetais, mantidos *in vitro*, tem sido estudado, visto que tais tecidos podem perder, diminuir ou aumentar, em certos casos, a síntese de substâncias exigidas para o seu desenvolvimento normal.

2.5. Aspectos anatômicos

Nos tecidos em cultura, o controle da organogênese é feito através da introdução exógena de sinais e de substratos diversos. A retirada de um fragmento de tecidos de um organismo íntegro e sua colocação num meio de cultura, que contenha nutrientes e reguladores de crescimento, traz como consequência a liberação de suas células do controle a quem estavam submetidas

nesse organismo, expondo-as a uma nova condição, onde a capacidade de divisão pode ser readquirida (desdiferenciação) e o genoma pode expressar-se de novas formas, conduzindo-se a novos padrões de diferenciação. Esses eventos podem, de diversas maneiras, levar à formação de novas estruturas organizadas, num processo morfogenético, ou organogenético que ocorre *de novo* (Torres e Caldas, 1990).

A morfogênese é, fundamentalmente, o resultado da divisão e diferenciação celular organizadas, com padrões definidos e que dependem, basicamente, da atividade e expressão de certos genes. Assim, fatores que controlam ou afetam esses eventos são responsáveis pela morfogênese. Tais fatores são variados e interagem de diversas formas, sendo quase impossível caracterizar um único fator específico para cada fenômeno morfogenético. Os efeitos isolados, ou sinérgicos desses fatores, variam de acordo com as condições de cada tipo de célula, que podem ser mais ou menos definidos de acordo com o tecido, órgão, espécie, variedade ou cultivar, e peculiar a uma dada condição fisiológica de momento. Os fatores que afetam a morfogênese são os fitorreguladores e nutrientes, além de fatores físicos como o estado físico do meio, o pH, a temperatura e a luz (Torres e Caldas, 1990).

As condições ambientais sob as quais ocorre o cultivo *in vitro*, no que se refere a composição do meio de cultura e do ar no interior dos recipientes, bem como, quanto à luminosidade e à temperatura, fazem com que a planta proveniente da micropropagação apresente algumas características peculiares. Ainda que haja variação entre as espécies, algumas características são encontradas em, praticamente, todas as plantas. A descrição dessas características pode ser feita em relação às folhas, às raízes e ao mecanismo de nutrição (George, 1996).

Não se sabe como a anatomia de órgãos vegetativos, principalmente, de plântulas micropropagadas, são afetadas pelas condições ambientais de cultivo,

ou como a anatomia das plantas transplantadas, são modificadas durante a aclimatização, antes de serem levadas para o campo.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOLI, C. Cultura de embriões. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, I, Brasília, 1985. *Anais...* Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1986. p.25-28
- DEBERGH, P.C.; MAENE, L.V. Escheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.14, p.335-345, 1981.
- DUBLIN, P. Culture de tissue et amélioration genetique des caféiers cultivés. *Assoc. Scient. Int. Café. Coloque*, Salvador,.
- DUBLIN, P. Tequiniques de reproduction végétative *in vitro* et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. *Café, Cacao, Thé*, Paris, v. 28, n.4, p.281-290, oct./dec. 1984.
- FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A.B., MALAVOLTA, E. ROCHA, M., YAMADA, T. (Ed.) *Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1986. p.87-106.
- GEORGE, E. F. *Plant propagation by tissue culture*. Part. 2. The technology 2.ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361p.
- GRANER, E. A., GODOY JUNIOR, C. *Manual do cafeicultor*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1967. 320p.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: *Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia*. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v.1, p.261-297
- LONDOÑO, R. L. C.; OROZCO, C. F. J. Método de propagacion de cafetos mediante cultivo *in vitro*. *Cenicafé*, Colômbia, v.37, n.4, p.119-133, 1986.

- MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, R. J. **Genética e melhoramento do cafeeiro**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 99p. (Curso de Especialização Pós-graduação “*Latu Sensu*” por tutoria a distância: Cafeicultura empresarial).
- PAIVA NETO, V. B. de. **Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud)**. Lavras: UFLA, 1996. 33p (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- PIERSON, E. S. ; VAN LAMMEREN, A. A. M. ; SCHEL, J. H. N.; STARITSKY, G. ***In vitro* development of embryoids from punched leaf disc of *Coffea canephora***. *Protoplasma*, Vienne, v.115, n.2/3, p.208-216, 1983.
- RAMOS, L. C. S.; YOKOO, E. Y.; GONÇALVES, W. **Direct embryogenesis is genotype specific in *coffee***. XV International Congress of “Assoc. Scientifique Internationale du Café”. Montpellier, France. *ASIC*, v.15, n.2, p.763-766, 1993.
- SMITH, M. A. L. ; PALTA, J.P.; McCOWN, B .H. **Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling, and greenhouse-grown Asian White Birch**. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.111, n.3, p.437-442, 1986.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos em plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH, 1990. 443p.
- WARDLE, K.; DOBBS, E. B.; SHORT, K. C. ***In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity**. *Journal of the American society for Horticultural Science*, Alexandria, v.108, n.3, p.386-389, 1983.
- ZAMARRIPA A.; DUCOS J. P.; BOLLON H.; DUFOUR, M., PETIARD, V. **Production d’embryons somatiques de cafeier en milieu liquide: effets densité d’inoculation et renouvellement du milieu**. *Café Cacao Thé*. Paris, v.35, p.233-244, 1991.

CAPÍTULO II - CULTURA *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE *Coffea arabica* E *Coffea canephora*.

1. RESUMO

Este trabalho avaliou o desenvolvimento das plântulas originadas a partir da cultura de embriões, oriundos de frutos armazenados em diferentes condições ambientais e o efeito do BAP (benzilaminopurina), em *Coffea arabica* 'Rubi', 'Topázio' e 'Acaiá Cerrado' e *Coffea canephora* 'Apoatã'. Embriões oriundos de frutos armazenados por 7 dias, em sacos de papel, em temperatura ambiente e sob refrigeração foram inoculados em meio MS solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e pH 5,8. Para avaliar o efeito do BAP, no desenvolvimento das plântulas, o meio MS foi acrescido com diferentes concentrações de BAP (0, 3, 6, 9, 12 mg.L⁻¹). Após a inoculação, os embriões foram mantidos em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, 25±1°C e intensidade luminosa de 13 μmol.s⁻¹.m⁻² durante 30 dias. Frutos de *Coffea arabica* 'Acaiá Cerrado', 'Rubi' e 'Topázio' e *Coffea canephora* 'Apoatã' podem ser armazenados em temperatura ambiente durante 7 dias. Maior comprimento da parte aérea é obtido com 7 dias de armazenamento para 'Apoatã' e 'Rubi' e por 3 dias, para 'Topázio'; maior comprimento de raiz é obtido por 7 dias para 'Apoatã' e por 5 dias para 'Topázio'; maior peso da matéria fresca é obtido por 7 dias para 'Apoatã' e 'Rubi' e por 4 dias para 'Topázio'. O BAP proporcionou maior número de folhas para 'Apoatã' e 'Topázio'; maior comprimento da parte aérea para 'Acaiá Cerrado' e 'Rubi' na concentração de 12 mg.L⁻¹; maior comprimento da parte aérea para 'Apoatã' e 'Topázio' na concentração de 9 mg.L⁻¹.

2. ABSTRACT

In vitro culture of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* embryos

This work evaluated the effect of BAP and the development of young plants obtained through the culture of embryos excised from fruits of *Coffea arabica* cultivars Rubi, Topázio and Acaiá Cerrado and *Coffea canephora* cultivar Apoatã, stored at different conditions. Embryos of fruits stored for 7 days in paper bags at room temperature and under refrigeration were inoculated in MS medium pH 5.8 supplemented with 7 g.L⁻¹ agar, 30 g.L⁻¹ sucrose and different concentrations of BAP (0; 3; 6; 9 and 12 mg.L⁻¹). After inoculation, the embryos were maintained in a growth room under a 16 hour photoperiod,

temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and light intensity of $13 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^2$ during 30 days. The results showed that fruits of *Coffea arabica* cultivars Rubi, Topázio and Acaia Cerrado and *Coffea canephora* cultivar Apatã can be stored at room temperature for 7 days. While higher shoot length is obtained storing fruits of cultivars Apatã and Rubi for 7 days and cultivar Topázio for 3 days, higher root length is obtained storing fruits of cultivar Apatã for 7 days and cultivar Topázio for 5 days. On the other hand, higher fresh matter weight is obtained storing fruits of cultivars Apatã and Rubi for 7 days and cultivar Topázio for 4 days. The use of $12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP promoted higher leaf number formation for the cultivars Apatã and Topázio and higher shoot length for Acaia Cerrado and Rubi. Higher shoot length was obtained for the cultivars Apatã and Topázio using $9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP.

3. INTRODUÇÃO

A forma mais utilizada de propagação do *Coffea arabica* é através de mudas oriundas de sementes. Em condições normais, o poder germinativo das sementes do cafeeiro reduz-se, após 6 meses de armazenamento, chegando a perdê-lo totalmente após um ano. Experimentos realizados com essa espécie têm indicado que a elevada umidade das sementes é um dos principais fatores, que asseguram boa germinação por tempo mais prolongado. A perda do poder germinativo das sementes do cafeeiro é um dos grandes problemas, no que se refere ao armazenamento e preservação dos estoques genéticos por mais de um ano. Como consequência da disponibilidade de sementes no mercado ocorrer somente a partir do mês de junho, e da lentidão com que a germinação dessas sementes se processam, em muitas situações as mudas acabam sendo levadas para o campo, em épocas menos favoráveis ao seu desenvolvimento.

A cultura de embriões é uma metodologia que pode auxiliar os programas de melhoramento do cafeeiro, pois, permite o resgate de embriões provenientes de cruzamentos interespecíficos e antecipação da época de plantio. Esse método baseia-se no fato de que os embriões podem ser retirados da semente e transferidos para um meio de cultura, contendo nutrientes

apropriados, em concentrações adequadas, onde sofrem posteriores diferenciações.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento das plântulas originadas da germinação *in vitro* de embriões de *Coffea arabica* 'Rubi', 'Topázio' e 'Acaiá Cerrado' e *Coffea canephora* 'Apoatã', oriundas de frutos armazenados em diferentes condições ambientais e avaliar o efeito do BAP (benzilaminopurina) no desenvolvimento das plântulas.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

Em vista do tamanho reduzido do embrião, a germinação se prolonga por mais de um mês, mesmo em ótimas condições de ambiente. Portanto, umas das características referentes às sementes de cafeeiro, é a lentidão com que se processa a retomada do crescimento e desenvolvimento do embrião ou germinação propriamente dita. Went (1957) afirmou que o processo pode ocorrer até 90 dias, chegando a 120 dias, no período frio do ano, fato de relevante importância, pois, é justamente no início dessa estação que as sementes começam a estar a disposição dos produtores e viveiristas, na maior parte da região Centro-Sul do Brasil.

O ponto marcante que permitiu a expansão da cultura de embriões foi a descoberta de que estes poderiam ser separados dos tecidos maternos e de reserva, e cultivados, assepticamente, em substrato artificial. Os embriões cultivados *in vitro*, usualmente não apresentam um período de repouso como ocorre em sementes intactas. O mais importante aspecto da cultura de embriões é a seleção do meio nutritivo correto, que estimule o desenvolvimento dos embriões. Com isso, têm-se buscado novas alternativas de meios nutritivos, que se aproximem da composição do endosperma ou do saco embrionário, possibilitando assim, o cultivo de embriões em vários estádios de

desenvolvimento. O cultivo de embriões imaturos, em alguns casos, exige técnicas mais refinadas e meios de cultura mais complexos (Andreoli, 1986).

É necessário que se determinem as concentrações ótimas dos componentes do meio de cultura, tais como: os macro e micronutrientes, sacarose e os reguladores de crescimento. Segundo Monnier (1978), a concentração ótima de sacarose para embriões imaturos é de 60 g/L, atingindo alta osmolaridade no meio MS. Se o meio estiver deficiente em sacarose, formam-se plântulas disformes, com baixa probabilidade de sobrevivência, ou não ocorre a germinação dos embriões.

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 a germinação, desenvolvimento e crescimento do embrião. Carvalho et al. (1997) observaram que o ácido giberélico não contribuiu para acelerar a germinação *in vitro* de sementes e o desenvolvimento final de mudas de cafeeiro. George (1993) observou que o desenvolvimento de embriões ocorre em baixas concentrações de auxinas. Dependendo da espécie, o embrião jovem pode ser estimulado a crescer pela adição de citocininas, auxinas ou giberelinas ao meio de cultura (King, 1976; Hsu, 1979).

Embriões imaturos, removidos da semente e cultivados em meio de cultura, não somente superam o estágio de repouso, como também cessam os processos normais de desenvolvimento embriogênico (Andreoli, 1986). O ABA (ácido abscísico), conhecido como inibidor da germinação de muitos embriões maduros, também inibe a germinação precoce *in vitro* (Black, 1983; King, 1982, citados por Andreoli, 1986).

Segundo Válio (1976), na cultura do cafeeiro, baixas concentrações de ácido giberélico e altas de citocininas promovem a germinação de embriões, enquanto que altas concentrações de ácido giberélico podem causar a morte do

embrião. Segundo George (1996), concentrações elevadas de auxinas inibem o desenvolvimento do embrião.

As soluções de sais inorgânicos e açúcares, que compõem os meios de cultura de tecidos, não possuem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese através de propriedades osmóticas (George, 1996).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Avaliação do desenvolvimento das plântulas originadas a partir da cultura de embriões de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, oriundas de frutos armazenados em diferentes condições ambientais

5.1.1. Obtenção e condições de armazenamento de frutos do cafeeiro

Foram utilizados como explantes, embriões retirados de frutos no estádio “verde-cana” de *Coffea arabica* ‘Acaíá Cerrado’, ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e *Coffea canephora* ‘Apoatã’, coletados no campo experimental do Setor de Cafeicultura da Universidade Federal de Lavras, que foram levados ao Laboratório de Cultura de Tecidos do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia/UFLA. Os frutos foram armazenados, em sacos de papel, sob temperatura ambiente e refrigeração (4°C). Os embriões foram retirados no dia de sua coleta no campo (controle) e a cada 24 horas, durante um intervalo de 7 dias.

5.1.2. Desinfestação dos frutos, retirada e inoculação dos embriões

Os frutos foram desinfestados em câmara de fluxo laminar, através da imersão em hipoclorito de sódio 70% (v/v), durante 30 minutos e, posteriormente, lavados três vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida à desinfestação, os embriões foram retirados e inoculados em 15 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 3 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 0,7% de ágar e pH ajustado em 5,8. Após a inoculação, os embriões foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2^oC e intensidade luminosa de 13 μmol.s⁻¹.m⁻², durante 30 dias, quando avaliou-se o comprimento da parte aérea, o comprimento de raiz e a matéria fresca das plântulas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento, sendo que cada repetição era composta por 1 embrião. Para avaliar o período de armazenamento foi realizada análise de regressão polinomial e o efeito da temperatura foi estudado, através do teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

5.2. Efeito do BAP no desenvolvimento de plântulas originadas a partir da cultura de embriões de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.

5.2.1. Obtenção e desinfestação dos frutos

Foram utilizados como explantes embriões retirados de frutos no estágio “verde-cana” de *Coffea canephora* ‘Apoatã’ e *Coffea arabica* ‘Acaiá Cerrado’, ‘Rubi’ e ‘Topázio’, coletados no campo experimental do Setor de Cafeicultura da Universidade Federal de Lavras. Posteriormente, foram levados ao Laboratório de Cultura de Tecidos, do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia/UFLA.

Os frutos foram desinfestados, em câmara de fluxo laminar, através da imersão em hipoclorito de sódio 70% (v/v), durante 30 minutos e em seguida lavados três vezes em água destilada e autoclavada.

5.2.2. Retirada e inoculação dos embriões

Os frutos foram transferidos para placas de Petri esterilizadas contendo papel de filtro, onde sofreram cortes para a retirada dos embriões (Figura 1).



Figura 1. Aspecto visual de embriões em frutos do cafeeiro no estágio “verde-cana”. UFLA, Lavras/MG, 2000.

Os embriões foram imersos em solução de ácido ascórbico 300 mg.L^{-1} por 5 minutos e em seguida inoculadas em 15 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 3 g.L^{-1} de sacarose, solidificado com 0,7% de ágar e suplementado com diferentes concentrações de BAP (0, 3, 6, 9 e 12 mg.L^{-1}). O pH do meio foi ajustado em 5,8 e o meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 15 minutos.

Após inoculados, os embriões foram mantidos em sala de crescimento a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e intensidade luminosa de $13 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ durante 30 dias. Após esse período, avaliou-se o número de folhas e o comprimento da parte aérea.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por 3 plântulas. As análises estatísticas foram realizadas através de regressão polinomial.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Avaliação do desenvolvimento das plântulas originadas a partir da cultura de embriões de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, oriundas de frutos armazenados em diferentes condições ambientais

De acordo com a análise de variância, a interação entre temperatura e período de armazenamento dos frutos não foi significativa.

O aspecto geral do crescimento de plântulas, formadas a partir de embriões retirados de frutos armazenados de *Coffea arabica* 'Rubi', por um período de 7 dias e em diferentes condições ambientais, pode ser visualizada na Figura 2.

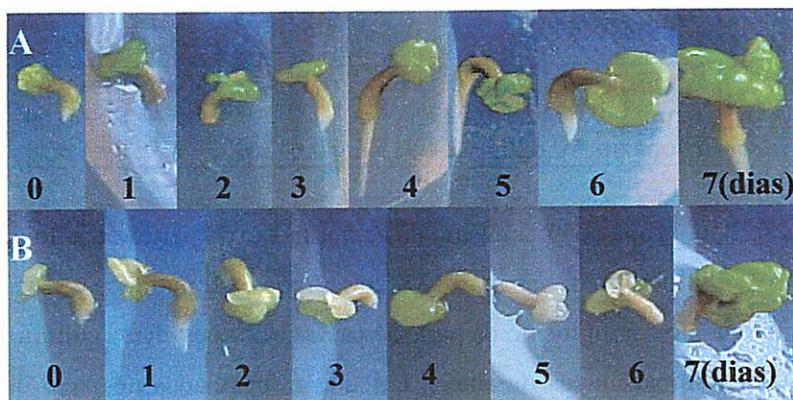


Figura 2. Aspecto geral do crescimento de plântulas de *Coffea arabica* 'Rubi', originadas de embriões retirados de frutos armazenados em temperatura ambiente (A) e sob refrigeração (B), por 7 dias. UFLA, Lavras/MG, 2001.

Comprimento da parte aérea

Através dos resultados apresentados na Figura 3, pode-se observar que com o aumento do tempo de armazenamento dos frutos de ‘Apoatã’ e ‘Rubi’, independente da condição de armazenamento, os embriões, originaram plântulas com maior comprimento da parte aérea.

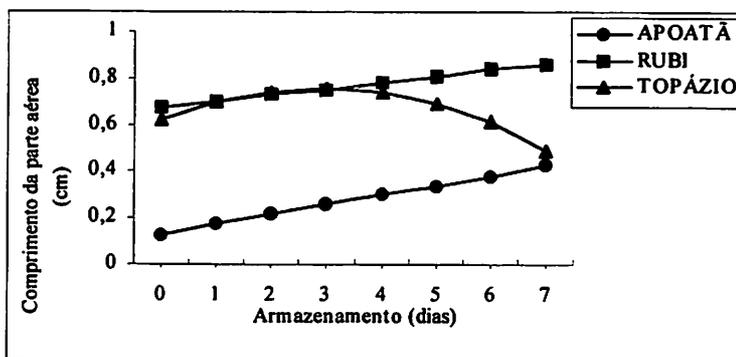


Figura 3. Efeito do armazenamento do fruto no comprimento da parte aérea de plântulas de *Coffea arabica* ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e *Coffea canephora* ‘Apoatã’ obtidas através da germinação *in vitro* de embriões. UFLA, Lavras/MG, 2001.

$$Y_{\text{ap oatã}} = 0,1342 + 0,418X$$

$$R^2 = 0,65$$

$$Y_{\text{rubi}} = 0,6742 + 0,0272X$$

$$R^2 = 0,64$$

$$Y_{\text{topázio}} = 0,6225 + 0,0915X - 0,0156X^2$$

$$R^2 = 0,71$$

Para ‘Topázio’, o aumento do comprimento da parte aérea, foi verificado até o 3º dia de armazenamento (0,8 cm). Após esse período, verificou-se um decréscimo do comprimento da parte aérea. Os embriões dessa cultura, retirados dos frutos armazenados durante 2 e 4 dias e inoculados no meio de cultura, originaram plântulas com o mesmo comprimento da parte aérea (0,7 cm).

Os menores resultados foram obtidos para ‘Apoatã’ (0,4 cm), e os maiores para ‘Rubi’ (0,9 cm), aos 7 dias de armazenamento. Essa diferença de comportamento entre as cultivares pode estar relacionada a fatores genéticos.

A 'Acaiá Cerrado' não apresentou diferença significativa, no comprimento médio da parte aérea, em função do período de armazenamento dos frutos.

Os embriões retirados dos frutos de *C. canephora* 'Apoatã', armazenados em temperatura ambiente, originaram plântulas com maior ganho de comprimento das partes aéreas (Tabela 1). Não foi observado o mesmo comportamento para plântulas de *C. arabica* 'Acaiá Cerrado', 'Rubi' e 'Topázio'.

Tabela 1. Efeito da condição de armazenamento dos frutos no comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de cafeeiro oriundas de embriões.

Cultivares	Condição de armazenamento	
	Temperatura ambiente	Refrigeração (4°C)
Apoatã	0,38 a	0,18 b
Acaiá Cerrado	0,55 a	0,46 a
Rubi	0,77 a	0,77 a
Topázio	0,70 a	0,64 a

Médias seguidas por letras iguais na horizontal não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Comprimento de raiz

Com o aumento do tempo de armazenamento dos frutos de 'Apoatã', pode-se observar que os embriões obtiveram plântulas com ganhos no comprimentos de raiz (Figura 4). Embriões excisados 7 dias após armazenamento originaram plântulas com maior comprimento de raiz (1,21cm), enquanto embriões excisados no dia da coleta no campo (tempo 0), originaram plântulas com menores comprimentos de raiz (0,21 cm).

Para as plântulas de 'Topázio', um aumento no comprimento de raiz foi observado para embriões armazenados até 5 dias (1,18cm), a partir do qual, as plântulas obtiveram decréscimo no comprimento das raízes. No entanto, com 7 dias de armazenamento dos frutos, os embriões originaram plântulas com

maiores comprimentos de raízes, em relação ao controle (embrião retirado do fruto, no dia da coleta no campo) (0,27 cm) (Figura 4).

Plântulas obtidas *in vitro*, de ‘Acaiá Cerrado’ e ‘Rubi’, não apresentaram diferenças significativas quanto ao comprimento de raiz durante o período de armazenamento.

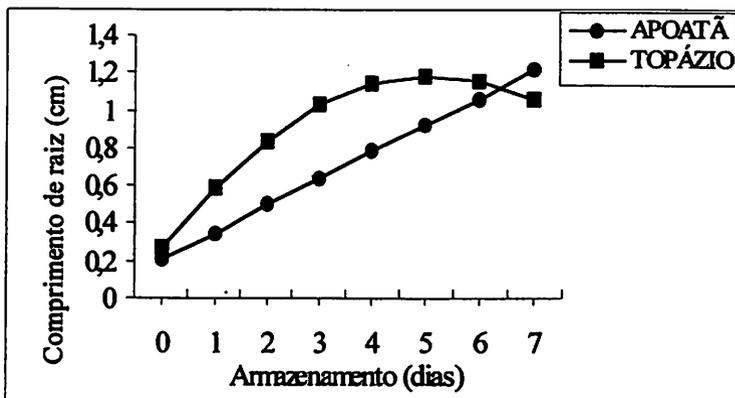


Figura 4. Efeito do armazenamento do fruto no comprimento de raiz de plântulas de *Coffea arabica* ‘Topázio’ e *Coffea canephora* ‘Apoatã’, obtidas através da germinação *in vitro* de embriões. UFLA, Lavras/MG, 2001.

$Y_{\text{apocatã}} = 0,2158 + 0,1415X$	$R^2 = 0,77$
$Y_{\text{topázio}} = 0,2719 + 0,3561X - 0,0348X^2$	$R^2 = 0,79$

Os embriões retirados dos frutos de *C. canephora* ‘Apoatã’, armazenados em temperatura ambiente, originaram plântulas com maior ganho de comprimento das partes aéreas (Tabela 1). Não foi observado o mesmo comportamento para plântulas de *C. arabica* ‘Acaiá Cerrado’, ‘Rubi’ e ‘Topázio’.

Tabela 2. Efeito da condição de armazenamento dos frutos no comprimento de raiz (cm) de plântulas de cafeeiro oriundas de embriões.

Cultivares	Condição de armazenamento	
	Temperatura ambiente	Refrigeração (4°C)
Apoatã	0,99 a	0,42 b
Acaia Cerrado	0,84 a	0,64 a
Rubi	0,94 a	0,77 a
Topázio	1,00 a	0,82 a

Médias seguidas por letras iguais na horizontal, diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Peso da matéria fresca das plântulas

Pode-se observar um aumento da matéria fresca das plântulas de 'Topázio', oriundos de frutos armazenados por até 4 dias (31,64mg) e inoculados no meio de cultura (Figura 5). Após esse período, houve decréscimo no peso da matéria fresca dessas plântulas. No entanto, o peso da matéria fresca originadas dos embriões retirados dos frutos, armazenados durante 7 dias (22,18mg), foram superiores ao tempo zero (20,85mg).

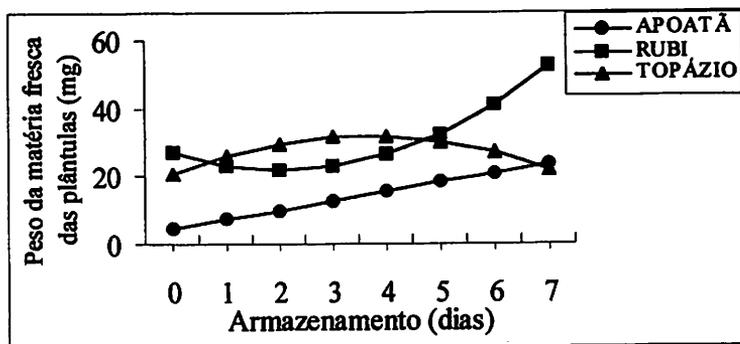


Figura 5. Efeito do armazenamento do fruto, no peso da matéria fresca de plântulas de *Coffea arabica* 'Rubi' e 'Topázio' e *Coffea canephora* 'Apoatã', obtidos através da germinação *in vitro* de embriões. UFLA, Lavras/MG, 2001.

$Y_{\text{apoaatã}} = 4,4917 + 2,7524X$	$R^2 = 0,64$
$Y_{\text{rubi}} = 27,3854 - 5,3116X + 1,2664 X^2$	$R^2 = 0,88$
$Y_{\text{topázio}} = 20,8479 + 6,0431X - 0,8360X^2$	$R^2 = 0,62$

Para 'Rubi', os embriões retirados dos frutos armazenados por 2 dias, originaram plântulas com menor peso da matéria fresca. Após esse período, observou-se um aumento no peso fresco dessas plântulas, com o aumento do armazenamento, chegando a um máximo de 52,26 mg (7 dias de armazenamento).

Para 'Apoatã' o efeito do armazenamento durante 7 dias, em relação ao tempo zero, obteve um ganho de 79,8% no peso da matéria fresca.

A cultivar Rubi, quando comparada às demais cultivares, obteve um melhor desenvolvimento aos 7 dias de armazenamento, como pode ser observado na Figura 5, mostrando maior peso da matéria fresca. A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* parece estar associada não apenas ao genótipo, mas à atividade fisiológica na planta matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos (Caldas et al., 1990).

Plântulas obtidas *in vitro* de 'Acaiá Cerrado' não apresentaram diferenças significativas quanto ao peso da matéria fresca das plântulas.

Embriões retirados dos frutos de *Coffea arabica* 'Topázio' e *C. canephora* 'Apoatã', armazenados em temperatura ambiente, originaram plântulas com maiores pesos da matéria fresca (Tabela 3). Em plântulas de *C. arabica* 'Acaiá Cerrado' e 'Rubi', não foi verificado efeito da temperatura de armazenamento.

Tabela 3. Efeito da condição de armazenamento dos frutos no peso da matéria fresca (mg) das plântulas oriundas de embriões.

Cultivares	Condição de armazenamento	
	Temperatura ambiente	Refrigeração (4°C)
Apoatã	20,89 a	7,36 b
Acaiá Cerrado	25,99 a	25,21 a
Rubi	30,69 a	31,22 a
Topázio	30,00 a	24,69 a

Médias seguidas por letras iguais na horizontal, diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

6.2. Efeito do BAP no desenvolvimento de plântulas originadas a partir da cultura de embriões de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.

Número de folhas

Para 'Topázio' e 'Apoatã', observou-se que, com o aumento das concentrações de BAP, ocorreu um aumento no número de folhas formadas (Figura 6).

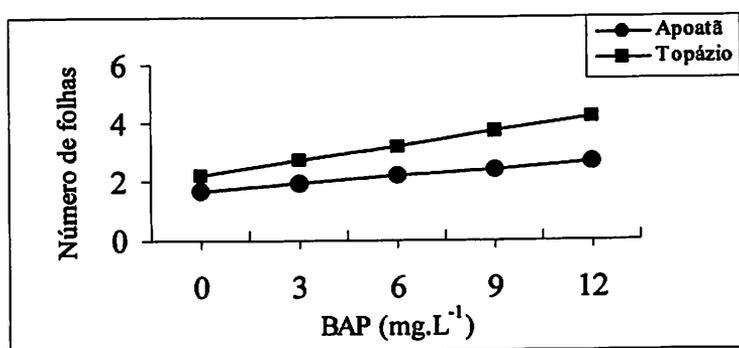


Figura 6: Número de folhas formadas em plântulas de 'Apoatã' e 'Topázio', obtidas a partir da cultura de embriões, em relação a diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras/MG, 2000.

$Y_{\text{apoaatã}} = 1,7056 + 0,078X$	$R^2 = 0,74$
$Y_{\text{topázio}} = 2,233 + 0,1656X$	$R^2 = 0,92$

A adição de BAP, na concentração de 12 mg.L⁻¹, ao meio de cultura, proporcionou um acréscimo de 35 e 47% no número de folhas (corresponde a 1 e 2 folhas), para 'Apoatã' e 'Topázio', respectivamente, em relação ao meio sem BAP. Esse aumento deve ser considerado, quando se deseja aumentar as fontes de explantes para futuros trabalhos em cultura de tecidos. Esses resultados diferem de Andrade (1998), o qual determinou que o maior número de folhas, foi formado utilizando-se BAP na concentração de 9 mg.L⁻¹.

‘Acaiá Cerrado’ e ‘Rubi’ não apresentaram diferenças significativas entre si, em relação ao número de folhas das brotações, 30 dias após inoculação dos embriões no meio de cultura.

Comprimento médio da parte aérea

Conforme é apresentado na Figura 7, não foram observadas grandes variações no comprimento médio da parte aérea de ‘Acaiá Cerrado’, quando utilizou-se concentrações inferiores a 9 mg.L⁻¹ de BAP.

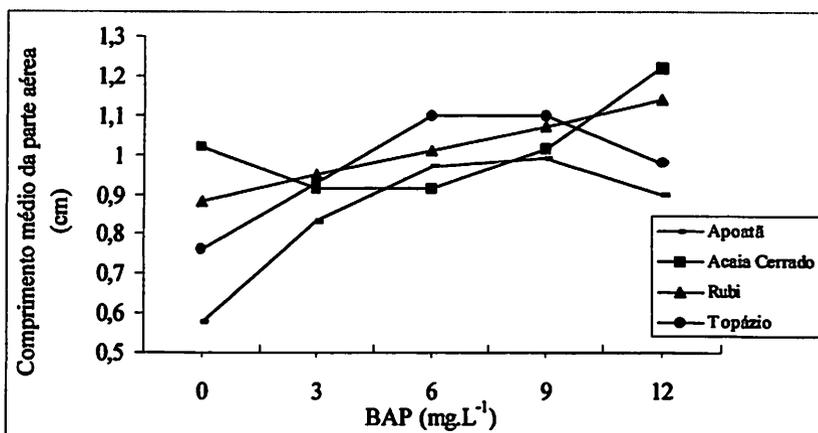


Figura 7. Comprimento médio da parte aérea de plântulas de ‘Apoiã’, ‘Acaiá Cerrado’, ‘Rubi’ e ‘Topázio’ obtido a partir da cultura de embriões, em diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras/MG, 2000.

$Y_{\text{apoiã}} = 0,5750 + 0,1051X - 0,0065X^2$	$R^2 = 0,88$
$Y_{\text{acaiá}} = 1,020 + 0,0518X + 0,0057X^2$	$R^2 = 0,95$
$Y_{\text{rubi}} = 0,8844 + 0,0211X$	$R^2 = 0,77$
$Y_{\text{topázio}} = 0,7647 + 0,0952X - 0,0065X^2$	$R^2 = 0,84$

A utilização de 12 mg.L⁻¹, proporcionou maior crescimento da parte aérea (1,22cm) nas plântulas de ‘Acaiá Cerrado’. Inúmeros trabalhos mostram que o sucesso na cultura de embriões está associado a diversos fatores, incluindo o comprimento do explante, que deve ser igual ou superior a 1 cm, permitindo

uma maior sobrevivência das plântulas (Colona, 1972; Krasnyanski et al., 1992; Raghuramulu, 1989; Sondahl et al, 1984).

Para 'Rubi', observou-se que o aumento da concentração de BAP, induziu um aumento linear no comprimento da parte aérea. Portanto, a adição de BAP na concentração de 12 mg.L⁻¹ ao meio de cultura, em relação ao controle, proporcionou um aumento de 22,8% (equivalente a 0,26 cm) no comprimento médio da parte aérea.

As cultivares 'Apoatã' e 'Topázio' apresentaram o mesmo comportamento. A adição de BAP, ao meio de cultura, promoveu um aumento no comprimento da parte aérea, até a concentração de 9 mg.L⁻¹, sendo de 0,99cm para 'Apoatã' e de 1,10cm para 'Topázio'. A partir dessa concentração, houve decréscimo no crescimento da parte aérea.

7. CONCLUSÕES

Frutos de *Coffea arabica* 'Acaiá Cerrado', 'Rubi' e 'Topázio' e *Coffea canephora* 'Apoatã' podem ser armazenados temperatura ambiente durante 7 dias.

Maior comprimento da parte aérea é obtido com 7 dias de armazenamento para 'Apoatã' e 'Rubi' e por 3 dias, para 'Topázio'; maior comprimento de raiz é obtido por 7 dias para 'Apoatã' e por 5 dias para 'Topázio'; maior peso da matéria fresca é obtido por 7 dias para 'Apoatã'; 'Rubi' e por 4 dias para 'Topázio'.

O BAP proporcionou maior número de folhas para 'Apoatã' e 'Topázio' e maior comprimento da parte aérea para 'Acaiá Cerrado' e 'Rubi', na concentração de 12 mg.L⁻¹ e maior comprimento da parte aérea para 'Apoatã' e 'Topázio' na concentração de 9 mg.L⁻¹.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, L.M.C.O. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Lavras: UFLA, 1998. 86p (Dissertação de mestrado em Agronomia).
- ANDREOLI, C. **Cultura de embriões**. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, I, Brasília, 1985. **Anais...** Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1986. p.25-28
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. **Meios nutritivos**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds). **Técnica e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.37-70.
- CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M. ANTUNES, L.E.C.; SIVA, A. T. da; SCARANTE, M.J. **Efeito do triadimenol e benzilaminopurina na desenvolvimento de brotos *in vitro* do cafeeiro cv. Catuaí**. **Revista Unimar**, Marília, v.19, n.3, p.767-775, set. 1997.
- COLONNA, J. P. **Contribution a letude de la culture *in vitro* d'embryos de cafeiers. Action de la cafeina**. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v.16, p. 193-203, 1972.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture. Part 1 The Technology**. 2.ed. Edington: Exejetics, 1993. 574p.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture. Part 2 The technology**. 2.ed. Edington: Exegetics, 1996. 361p
- HSU, F. C. **Abscisic acid accumulation in developing seeds of *Phaseolous vulgaris* L.** **Plant Physiology**, Bethesda, v.63,p.552-556, 1979.
- KING, R. W. **Abscisic acid in developing wheat and its relationship to grain growth and maturation**. **Planta**, New York, v.132, p.43-51, 1976.
- KRASNYANSKI, S.; POLGÁR, Z. NÉMETH, G. MENENZEL, L. **Plant regeneration for callus and protoplast of *Heliantus giganteus* L.** **Plant Cell Reports**, Berlin, v.11, p.7-10. 1992.

- MONNIER, M. Culture of zygotic embryos. In: THORPE, T. A. (ed), **Frontiers of plant tissue culture**. , Calgary, Canadá: International Association for Plant Tissue Culture. 1978. p.277-295.
- MURASHIGE, T. SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabaco tissue cultures. **Physiology Plantarum**. Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.
- RAGHURAMULU, Y. Anther and endosperm culture of Coffee. **Journal of Research**. v.19, n.2, p. 71-81, 1989.
- SONDAHL, M. R.; NAKAMURA, T.; MEDINA FILHO, H. P.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C.; COSTA, W. R. **Coffee**. In: AMMYRATO & MCMILLEN (eds). **Handbook of plant cell culture**. New York: P.V. Editores,1984. p.564-590.
- VALIO, I. F. M. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L.) cv. Mundo Novo. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.2, n.100, p.983-991, Oct./Nov. 1976.
- WENT, F. W. **The experimental control of plant growth**. New York: The Ronald, 1957. p. 164-168. (Chronica Botanica. International Biological and Agricultural Series, 17).

CAPÍTULO III. ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE BROTAÇÕES DE *Coffea arabica* e *Coffea canephora*

1. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de promover o enraizamento *in vitro* e *ex vitro*, em brotações de *Coffea arabica* 'Acaiá Cerrado', 'Rubi' e 'Topázio' e *Coffea canephora* 'Apoatã', obtidas a partir da cultura de embriões. Para o enraizamento *in vitro*, as brotações foram inoculadas em meio MS suplementado com 3% de sacarose e 0,65% de ágar, acrescido de diferentes concentrações de AIB (0, 2, 4, e 6 mg.L⁻¹). Para o enraizamento *ex vitro*, as brotações foram transferidas para caixa de gerbox, contendo vermiculita, envolvidas por sacos plásticos transparentes e mantidas sob sombrite, em sala de crescimento sob temperatura controlada de 25±1°C. As brotações foram mantidas sob sombrite 70%, em intervalos de 7 dias foi substituído por sombrite 50% e em seguida por sombrite 30%. Após esse período, a cobertura plástica e o sombrite foram retirados, permanecendo por mais 7 dias. A aplicação de AIB aumenta a percentagem de enraizamento das brotações de cafeeiro. Maior número de raízes é obtido usando 6 mg.L⁻¹ de AIB ao meio de cultura. Maiores comprimentos de raízes são obtidos na ausência do regulador de crescimento. É possível o enraizamento *ex vitro* de *Coffea canephora* 'Apoatã'. Baixas percentagens de enraizamento *ex vitro* são obtidos com *Coffea arabica* 'Acaiá Cerrado', 'Rubi' e 'Topázio'.

2. ABSTRACT

In vitro and *ex vitro* rooting of of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* shoots

The objective of this work was to promote *in vitro* and *ex vitro* rooting of *Coffea arabica* cultivars Acaiá Cerrado, Rubi and Topázio and *Coffea canephora* cultivar Apoatã shoots obtained from embryo culture. For the *in vitro* rooting, shoots were inoculated in MS medium supplemented with 3% sucrose, 0.65% agar and different concentrations of IBA (0; 2; 4 and 6 mg.L⁻¹). For the *ex vitro* rooting, shoots were transferred to gerbox containing vermiculite, covered with plastic bag and maintained in a growth room at 25 ±1°C under light screen (7 days under 70% followed by 7 days at 50%, 30% light). After this period, both the light screen and the plastic bag were removed with the shoots remaining at this condition for 7 more days. The use of IBA increased shoot rooting



percentage of all cultivars studied with higher root number formed when 6 mg.L^{-1} was used. In the absence of IBA, roots with higher length were observed. *Ex vitro* rooting of *Coffea canephora* cultivar Apoatã was obtained. Reduced *ex vitro* rooting percentage was obtained for *Coffea arabica* cultivars Acaia Cerrado, Rubi and Topázio shoots.

3. INTRODUÇÃO

Uma alternativa para a propagação de híbridos do cafeeiro, em escala comercial, e a manutenção de materiais de interesse, ainda em heterozigose, nos programas de melhoramento, é a propagação vegetativa via enraizamento de estacas. Contudo, várias tentativas têm sido feitas com o objetivo de propagar vegetativamente o cafeeiro arábica, sendo variável o sucesso entre os trabalhos, em razão do baixo percentual de enraizamento, provavelmente, por problemas de oxidação por fenóis. Embora, a propagação vegetativa de clones superiores de *Coffea canephora* seja uma realidade, para exemplificar - uma estaca pode produzir de 100 a 200 novas brotações, após dois anos de sua coleta e manutenção em recipientes de crescimento, enquanto que no cultivo *in vitro* de microestacas do cafeeiro só uma microestaca pode gerar, ao final de um ano, 20.000 plântulas e 5^{12} plântulas após dois anos.

A propagação vegetativa do cafeeiro em larga escala, através da cultura de tecidos, ainda depende do aprimoramento das técnicas utilizadas, uma vez que as perdas de material, por contaminação e oxidação são bastantes acentuadas.

O enraizamento de brotações obtidas na cultura de tecidos pode ocorrer *in vitro* (dentro do frasco de cultura), ou *ex vitro* (após a transferência da brotação do frasco de cultura e simultânea à aclimatização).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma metodologia para indução e crescimento de raízes *in vitro* e *ex vitro*, em brotações de *Coffea arabica*

‘Acaiá Cerrado’, ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e *Coffea canephora* ‘Apoatã’, obtidas *in vitro*, a partir da cultura de embriões.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

Essa etapa na micropropagação, caracteriza-se pela formação de raízes adventícias, nas partes aéreas, ou brotações provenientes da multiplicação *in vitro*, permitindo o posterior transplântio para condições *ex vitro*. Portanto, constitui uma etapa essencial e muitas vezes limitante, para a constituição da muda completa (Haissig, Davis e Riemenschneider, 1992).

Da mesma forma que ocorre no enraizamento convencional, muitas espécies enraízam facilmente *in vitro* e, freqüentemente, produzem raízes espontaneamente (Debergh e Maene, 1981). Em muitos casos, o tratamento usado para produção de brotos *in vitro*, não estimula à formação de raízes, sendo as brotações tratadas como estacas para serem enraizadas separadamente. Segundo George (1996), dois métodos podem ser adotados: (1) os brotos devem ser enraizados *in vitro* e, então, transferidos para o meio ambiente externo; (2) os brotos podem ser retirados do meio de cultura e enraizados como pequenas estacas convencionais.

Certas plantas, especialmente algumas espécies herbáceas, enraízam mais rapidamente e sobrevivem melhor e/ou têm alta taxa de crescimento, produzem mais raízes axilares se originadas *in vitro*, do que aquelas diretamente enraizadas *ex vitro*. Apesar do interesse para a aclimatização do enraizamento *in vitro*, tem-se observado que raízes formadas nesse ambiente não se tornam suficientemente desenvolvidas, para estimular o crescimento de plantas lenhosas (George, 1996).

Debergh e Maene (1981) observaram após 2 semanas de transplântio, morte das raízes produzidas em meio de cultura e, outras, iniciando o

desenvolvimento, indicando que para algumas espécies, as raízes produzidas *in vitro* não são funcionais, após transferidas para a condição *ex vitro*.

Segundo Grattapaglia e Machado (1990), plantas com parte aérea muito grande e sistema radicular pouco desenvolvido tendem a morrer, pois, o sistema radicular não irá suprir a taxa de transpiração.

Raízes que se desenvolvem *in vitro*, também, são prováveis de serem danificadas, quando as plântulas são removidas do meio de cultura, ou quando são transplantadas e isso aumenta as chances de infecção por doenças fúngicas e bacterianas (George, 1996).

Sabe-se que tanto em espécies herbáceas quanto lenhosas, com grande capacidade de enraizamento de estacas, o enraizamento *in vitro* pode ser eliminado sem causar prejuízos (Grattapaglia e Machado, 1990). Em alguns casos, o gasto extra do estádio de enraizamento *in vitro* pode ser justificado, se este resultar em plântulas de melhor qualidade final, ou se perdas durante a aclimatização puderem ser reduzidas (George, 1996).

A maioria dos princípios que controlam a formação de raízes *in vitro* é comum ao enraizamento de brotações *ex vitro*. Os fatores que devem ser observados, quando se deseja desenvolver metodologias de enraizamento *in vitro*, incluem a escolha e as condições de cultivo da planta-mãe, a composição do meio nutritivo, as condições de incubação, bem como as características do explante em si (Assis e Teixeira, 1998).

O controle do desenvolvimento de raízes adventícias é influenciado por substâncias reguladoras de crescimento, dentre as quais, algumas promovem o enraizamento e outras o inibem. Para todas há uma concentração ótima, que pode variar tanto entre espécies quanto entre populações ou clones (Assis e Teixeira, 1998). Segundo Haissig, Davis e Riumenschneider (1992), as auxinas são os únicos reguladores de crescimento, que aumentam consistentemente a

formação de primórdios radiculares, pelo menos em tecidos que naturalmente apresentam certa predisposição ao enraizamento.

O AIB (ácido indolbutírico) é a auxina sintética mais comumente utilizada na indução da enraizamento adventício e é citada por vários autores como promotora do enraizamento (Wang e Anderson, 1988). Por apresentar propriedade de promover a formação de primórdios radiculares, o AIB, tem sido utilizado para induzir o enraizamento de numerosas espécies vegetais (Awad e Castro, 1989).

No crescimento e desenvolvimento de plantas, a luz influi na regulação da morfogênese e atua como fonte de energia para a realização de fotossíntese (Hartmann e Kester, 1983). No enraizamento, embora, a fotossíntese realizada por explantes *in vitro* seja relativamente baixa, produtos fotoassimilados são importantes para a iniciação e crescimento radicular. Na rizogênese, as variáveis importantes são a intensidade luminosa, o fotoperíodo e a qualidade de luz (Economou e Read, 1987).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Enraizamento *in vitro* de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*

Foram utilizados como explantes, brotações de *Coffea arabica* 'Acaia Cerrado', 'Rubi' e 'Topázio' e *Coffea canephora* 'Apoatã', oriundas da cultura de embriões, com 90 dias de cultivo *in vitro*.

As brotações foram transferidas para tubos de ensaio, contendo 15 mL do meio MS suplementado com 3% de sacarose, 0,65% ágar e acrescido de diferentes concentrações de AIB (0, 2, 4 e 6 mg.L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e o meio foi autoclavado por 20 minutos a 120°C.

Inoculou-se, em câmara de fluxo laminar, uma brotação em cada tubo. Posteriormente, as brotações foram mantidas em sala de crescimento, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $13 \mu\text{mol.s}^{-1}\text{m}^{-2}$, durante 30 dias, quando foi avaliado a percentagem de enraizamento, número médio de raízes por brotação e o comprimento médio das raízes.

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento, sendo que cada tubo continha um explante. A análise estatística foi realizada por regressão polinomial.

5.2. Enraizamento *ex vitro* de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*

Brotações de *Coffea arabica* 'Acaia Cerrado', 'Rubi' e 'Topázio' e *Coffea canephora* 'Apoatã', oriundas da cultura de embriões com 90 dias de cultivo *in vitro*, contendo 1 par de folhas, foram transferidas para caixa tipo gerbox contendo vermiculita.

Após a transferência, as plântulas foram envolvidas por sacos plásticos transparentes, para manutenção de alta umidade relativa, no ambiente de aclimatização e mantidas em sala de crescimento sob temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Simultaneamente, ao controle da umidade relativa e da temperatura, foi realizado o controle da intensidade luminosa. Com esse objetivo, após a retirada dos explantes do frasco de cultivo *in vitro* e transplante para a caixa de gerbox, as brotações foram mantidas sob sombrite 70% ($14 \mu\text{mol.s}^{-1}\text{m}^{-2}$) por 7 dias. Para proporcionar um aumento gradual da intensidade luminosa, esse sombrite foi substituído por sombrite 50% ($25 \mu\text{mol.s}^{-1}\text{m}^{-2}$) e, posteriormente, para 30% ($75 \mu\text{mol.s}^{-1}\text{m}^{-2}$), em intervalos de 7 dias. Durante esse período, a cobertura plástica foi parcialmente aberta, para redução gradual da umidade relativa. Ao final desse período, a cobertura plástica e o sombrite foram retirados,

caracterizando o término do processo de enraizamento *ex vitro*, quando, então, avaliou-se o percentual de enraizamento.

As plântulas foram transplantadas para vasos contendo terra, areia e esterco, na proporção de 3:2:1, permanecendo nessas condições até que estivessem aptas à transferência para o campo.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Enraizamento *in vitro* de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*

Percentagem de enraizamento

Para ‘Acaiá Cerrado’ e ‘Topázio’ não foram observadas brotações enraizadas sem a adição de AIB ao meio de cultura (Figura 8).

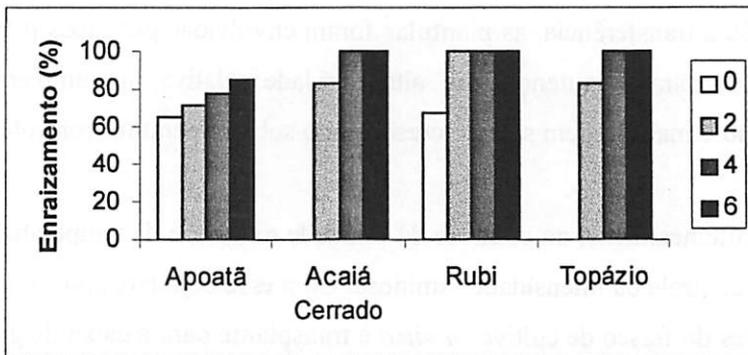


Figura 8. Percentual de enraizamento de *C. arabica* ‘Acaiá Cerrado’, ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e *C. canephora* ‘Apoatã’, em função da concentração de AIB (mg.L^{-1}). UFLA, Lavras/MG, 2001.

Geralmente o uso de reguladores de crescimento aceleram consideravelmente o processo de enraizamento e além disso, causam um aumento no número de raízes formadas. Algumas espécies, no entanto, induzem o enraizamento sem a necessidade da aplicação de reguladores de crescimento.

Por exemplo: brotações axilares de *Acacia aldiba* produziram raízes utilizando-se meio diluído sem adição de reguladores (George, 1996).

A cultivar Rubi apresentou 100% de enraizamento quando o AIB estava presente no meio de cultura e 67% no meio ausente desse regulador. Para 'Apoatã', observou-se que com o aumento da concentração de AIB, induziu aumento no percentual de enraizamento. Segundo Kulescha (1986), o nível das auxinas endógenas é o que determina a formação de raízes adventícias, ou seja, é o acúmulo de auxinas endógenas que induz à formação de raízes.

Número médio de raízes

Com o aumento nas concentrações de AIB, ocorreram aumentos nos números de raízes formadas (Figura 9). O número de raízes formadas no explante, normalmente aumenta de acordo com o aumento da concentração de auxinas, porém, quando concentrações elevadas são utilizadas, a formação de calos é verificada (George, 1996).

Os maiores números de raízes por brotação para as cultivares 'Apoatã' (5), 'Rubi' (4), 'Acaiá Cerrado' (3) e 'Topázio' (2), foram obtidos utilizando-se 6 mg.L⁻¹ de AIB. Resultado contrário foi observado por Decetti (2000), em que o maior número de raízes (2 raízes/explante) de *Annona glabra*, foi obtido sem a adição de AIB ao meio de cultura. Os resultados do presente trabalho coincidem com os obtidos por Tanuwidjaja, Webb e Sagawa (1998), em que o número de raízes em brotações de *Akia*, evoluiu em resposta ao aumento das concentrações de AIB no meio de cultura.

Segundo Pierik (1988), o número de raízes primárias é importante para a fixação das mudas, durante a aclimatização, embora, sua funcionalidade seja discutível, quando essas são emitidas em meio solidificado com ágar.

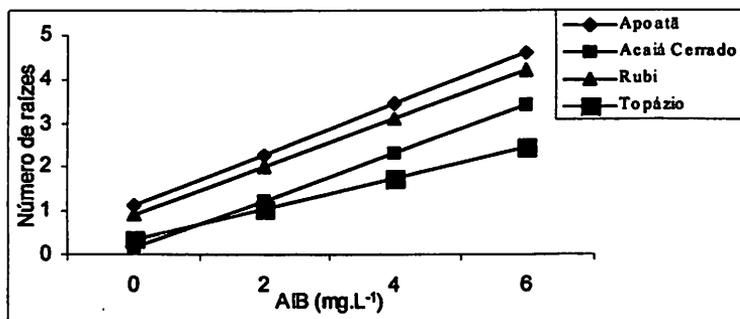


Figura 9. Número médio de raízes emitidas por brotações de *Coffea arabica* 'Acaia Cerrado', 'Rubi' e 'Topázio' e *Coffea canephora* 'Aipoatã', em função da concentração de AIB (mg.L⁻¹). UFLA, Lavras/MG, 2001.

Y Acaia Cerrado = 0,1667 + 0,5417X	R ² = 0,95
Y Rubi = 0,9333 + 0,55X	R ² = 0,95
Y Topázio = 0,3667 + 0,35X	R ² = 0,64
Y Aipoatã = 1,15 + 0,5750X	R ² = 0,71

Comprimento médio das raízes

Os maiores comprimentos médios de raízes para as cultivares 'Aipoatã' (1,21 cm) e 'Rubi' (1,48 cm) foram obtidos sem a adição de AIB ao meio de cultura, sendo que com o aumento na concentração de AIB proporcionou decréscimo no comprimento médio de raízes formadas (Figura 10).

Para as cultivares 'Acaia Cerrado' e 'Topázio', na presença de AIB, independente das concentrações adicionadas ao meio de cultura, não se observou diferenças significativas no comprimento de raízes, apresentando uma média de 0,36cm para essas cultivares. Na ausência do regulador, não foi observado indução de raízes.

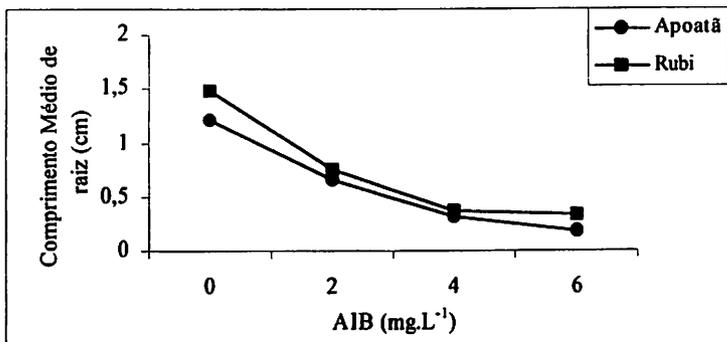


Figura 10. Comprimento médio de raízes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, em função da concentração de AIB (mg/L). UFLA, Lavras/MG, 2001.

$Y \text{ Rubi} = 1,4764X^2 - 0,4484X + 0,0428$	$R^2 = 0,99$
$Y \text{ Topázio} = 1,21X^2 - 0,3242X + 0,0254$	$R^2 = 0,99$

Esses resultados, são semelhantes ao relatado por Harbage, Stimart e Evert (1993), onde a presença de auxina, no meio de enraizamento, principalmente em altas concentrações, pode inibir o crescimento de raízes. Entretanto, segundo Gill et al. (1994), o número de raízes é mais importante que o tamanho das raízes durante a fase de aclimatização.

Em geral, a utilização de AIB causou aumento do número de raízes emitidas (Figura 9) e redução do comprimento dessas (Figura 10). O tipo de sistema radicular obtido no enraizamento *in vitro* influi no sucesso de transplântio. Segundo Grattapaglia e Machado (1990), raízes ainda curtas facilitam o transplântio e aceleram o pegamento, pois estão em fase de crescimento ativo.

O aspecto visual do enraizamento *in vitro* da cultivar Apoatã (*Coffea canephora*), em diferentes concentrações de AIB, pode ser visualizado na Figura 11.

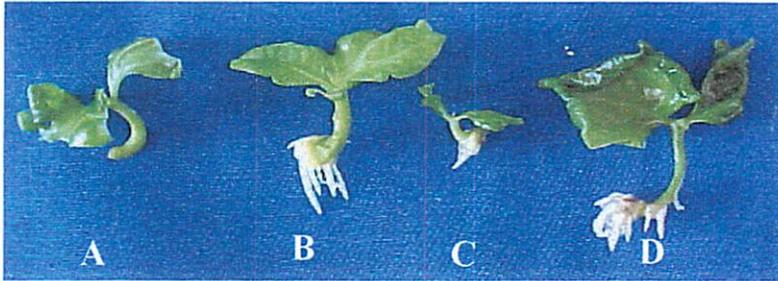


Figura 11. Aspecto visual de brotações de *C. canephora* ‘Apoatã’ inoculado *in vitro* na presença de A) 0; B) 2; C) 4 e D) 6 mg.L⁻¹ de AIB, aos 30 dias. UFLA, Lavras/MG, 2001.

6.2. Enraizamento *ex vitro* de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*

Brotações de *Coffea arabica* ‘Acaiá Cerrado’, ‘Rubi’ e ‘Topázio’ apresentaram 30, 40 e 50% de enraizamento *ex vitro* respectivamente (Figura 12).

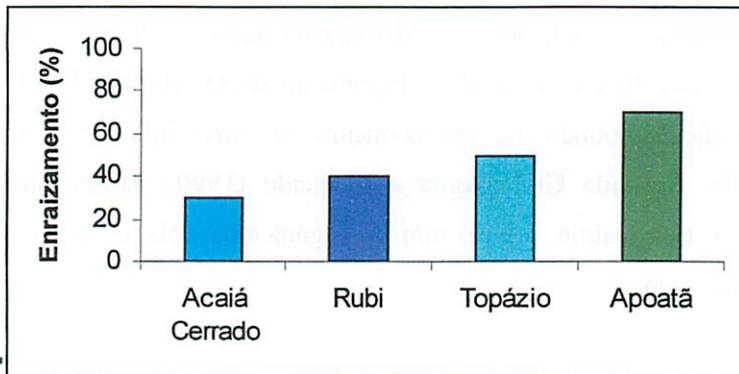


Figura 12. Percentagem de enraizamento *ex vitro* de *C. arabica* ‘Acaiá Cerrado’, ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e *C. canephora* ‘Apoatã’. UFLA, Lavras/MG, 2001.

Portanto, para essas cultivares, o enraizamento *ex vitro* não é uma alternativa viável para a propagação do cafeeiro arábica, em escala comercial, justificando a fase do enraizamento *in vitro*, devido à redução da perda das mudas produzidas.

Os baixos percentuais de enraizamento *ex vitro* dessas cultivares podem ser devidos à presença de compostos fenólicos endógenos. Rezende (1996), estudando o enraizamento *ex vitro* de *Coffea arabica* 'Mundo Novo', verificou que a imersão das brotações em água destilada no período de 24 horas, favoreceu o crescimento radicular. Esse resultado pode ser devido à lixiviação de compostos fenólicos, provocados pela permanência dos explantes em água destilada.

O processo de enraizamento também é fortemente influenciado por fatores ambientais e químicos, os quais necessitam ser otimizados, para favorecerem a uma maior formação de raízes, o sucesso dessa etapa garante a sobrevivência da plântula.

As brotações de 'Apoatã' apresentaram 70% das brotações enraizadas *ex vitro* (Figura 12).

Os resultados desses estudos indicam que o enraizamento *in vitro* de *C. canephora* pode ser eliminado, uma vez que, segundo Grattapaglia e Machado (1990), a regeneração de raízes diretamente no substrato, tende a produzir um sistema radicular mais completo e funcional.

O aspecto visual do enraizamento *ex vitro* da cultivar Apatã pode ser visualizado na Figura 13.



Figura 13. Aspecto visual de brotações de *Coffea canephora* 'Apatã' inoculadas *ex vitro* (A) antes e B) após 30 dias de cultivo em vermiculita. UFLA, Lavras/MG, 2001.

7. CONCLUSÕES

A aplicação de AIB aumenta a percentagem de enraizamento de brotações de cafeeiro.

Maior número de raízes é obtido usando 6 mg.L^{-1} de AIB ao meio de cultura.

Maiores comprimentos de raízes são obtidos na ausência do regulador de crescimento.

É possível o enraizamento *ex vitro* de *Coffea canephora* 'Apatã'.

Baixas percentagens de enraizamento *ex vitro* são obtidos com *Coffea arabica* 'Acaiá Cerrado', 'Rubi' e 'Topázio'.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSIS, T. F. TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: CENTRO BRASILEIRO ARGENTINO DE BIOTECNOLOGIA. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos**. 1998. v.1, p.261-297
- AWAD, M.; CASTRO, P. **Introdução à Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Nobel, 1989. 177p.
- DE FOSSARD, R.A.; BOURNE, R.A. Clonal propagation of *Eucalyptus* by nodal culture. In: WORLD CONSULTATION ON FOREST TREE BREEDING, 3., 1997, Canberra. **Proceedings...** Canberra: CSIRO, 1997. p.7.
- DEBERGH, P. C.; MAENE, L.J. A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, n.14, p.335-345, 1981.
- DECETTI, S.F.C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** Lavras: UFLA2000. 101p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- ECONOMOU, A.; READ, P. E. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. **HortScience**, Alexandria, v.22. n.5, p.751-754, 1987.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 2 The technology 2.ed. Edington: Exegetics, 1996. 361p
- GILL, M. I. S.; SINGH, Z.; DHILLON, B. S. GOSAL, S. S. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration on calluses derived from seedling explants of 'Kinnow' mandarin (*Citrus nobilis* x *Citrus deliciosa* Tenore). **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.69, p.231-236, 1994.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.99-170.
- HAISSIG, B. E.; DAVIS, T. D.; RIEMENSCHNEIDER, D. E. Researching the controls of adventitious rooting. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.84, p.310-317, 1992.

- HARBAGE, J. F.; STIMART, D. P.; EVERT, R. F. Anatomy of adventitious root formation in microcuttings of *Malus domestica* Borkh. 'Gala'. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.118, n.5, p.680-688, 1993.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Plant propagation principles and practices**. New Jersey: Prentice-Hall, 1983. 727p.
- KULESCHA, Z. Recherches sur l'élaboration de substances de croissance par les végétaux. **Revue de Génétique et Botanique**. v.59: p.92-111; 127-157; 195-208; 241-264, 1986.
- PIERIK, R.L.M. Handicaps for the large escale commercial application of micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.230, p.63-71, 1988.
- REZENDE, R.A. **Propagação in vivo e in vitro de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Lavras: UFLA, 1996. 72p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia).
- TANUWIDJAJA, C.; WEBB, D. T.; SAGAWA, Y. Micropropagation of Akia (*Wikstroemia uva-ursi* A. Gray). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.53, p.85-90, 1998.
- WANG, Q.; ANDERSON, A. S. Propagation of *Hibiscus rosa-sinensis*: realations between stock plant, age, environment and growth regulator treatments. **Acta horticulture**, Wageningen, n.227, p.167-169, 1988.

CAPÍTULO IV. ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE *Coffea arabica* E *Coffea canephora*

1. RESUMO

Este trabalho teve por objetivo testar uma metodologia para a aclimatização de plântulas de *Coffea arabica* 'Acaiá Cerrado', 'Rubi' e 'Topázio' e *Coffea canephora* 'Apoatã', obtidas *in vitro* por meio da cultura de embriões. As plântulas foram transferidas para caixa de gerbox, contendo vermiculita, envolvidas por sacos plásticos transparentes e mantidas sob sombrite, em sala de crescimento, sob temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. As brotações foram mantidas sob sombrite 70%, em intervalos de 7 dias esse foi substituído por sombrite 50% e, em seguida por sombrite 30%. Durante esse período a cobertura plástica foi parcialmente aberta, para redução gradual da umidade relativa. Após esse período a cobertura plástica e o sombrite foram retirados, permanecendo por mais 7 dias. É possível a aclimatização das plântulas de *Coffea arabica* 'Acaiá Cerrado', 'Rubi' e 'Topázio' e *Coffea canephora* 'Apoatã', utilizando-se sombrite 70, 50 e 30%, respectivamente, por período de 7 dias cada.

2. ABSTRACT

Acclimatization of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* plantlets

The objective of this work was to test a methodology for the acclimatization of *Coffea arabica* cultivars Acaiá Cerrado, Rubi and Topázio and *Coffea canephora* cultivar Apoatã plantlets obtained from *in vitro* embryo culture. Plantlets were transferred to gerbox containing vermiculite, covered with plastic bag and maintained in a growth room at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ under light screen (7 days under 70% followed by 7 days at 50%, 30% light). After this period, both the light screen and the plastic bag were removed with the shoots remaining at this condition for 7 more days. It was possible to promote the acclimatization of *Coffea arabica* cultivars Acaiá Cerrado, Rubi and Topázio and *Coffea canephora* cultivar Apoatã plantlets using respectively, 70%, 50% and 30% light screens for 7 days period each.

3. INTRODUÇÃO

Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a micropropagação tem apresentado excelentes resultados para inúmeras espécies. Entretanto, em algumas espécies, ocorrem elevadas perdas de plântulas durante a fase de aclimatização, ou seja, durante a transferência da planta da condição *in vitro* para a condição *ex vitro*. Esforços têm sido despendidos no sentido de contornar esse problema e técnicas alternativas têm sido estudadas, como a transferência de plântulas enraizadas, embebição de gemas em meio enraizante antes da transferência e, também, a transferência de brotações sem pré-indução do enraizamento.

A perda de vigor e a subsequente morte das plântulas, devido ao dessecamento, são dois sérios problemas, que ocorrem com as plântulas que são transferidas das condições *in vitro* e constituem o maior obstáculo à aplicação prática e ao uso extensivo do sistema de micropropagação. Sendo assim, a fase de aclimatização, caracterizada pelo controle das condições ambientais durante o processo de transferência, tem sido considerada crítica e essencial para que as plantas não sofram estresses em níveis que provoquem danos irreversíveis. Portanto, é fundamental para o desenvolvimento de um sistema de micropropagação bem sucedido.

O esclarecimento definitivo sobre como e quais fatores morfo-fisiológicos ou bioquímicos exercem influência na regulação dos mecanismos de tolerância aos estresses, provocando mudanças de ambiente para as plântulas produzidas *in vitro*, contribuirá para melhor aplicação tecnológica em maior número de espécies.

O objetivo desse estudo foi testar uma metodologia para a aclimatização de plântulas de *Coffea arabica* 'Acaia Cerrado', 'Rubi' e 'Topázio' e *Coffea canephora* 'Apoatã', obtidas *in vitro*, por meio da cultura de embriões.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

A aclimatização é o processo pelo qual as plântulas produzidas em condições controladas são transferidas para um ambiente com condições climáticas naturais. Essas novas condições devem ser passadas às plântulas, progressivamente, de forma que elas sofram menores estresses, evitando injúrias, ou até mesmo a morte (Brainerd e Fuchigami, 1981).

Após as mudas terem formado raízes, são freqüentemente aclimatizadas antes da transferência para o campo. Duas técnicas comumente utilizadas são a redução gradual da umidade relativa, ou da quantidade de nebulização (Hartmann, Kester e Davies, 1990) e a manutenção do nível de luz na casa-de-vegetação, a 50% de sombreamento, antes das plântulas serem transferidas para o campo (Welch, 1970).

O principal obstáculo encontrado na aclimatização é o baixo rendimento encontrado. Produz-se um número muito grande de plântulas micropropagadas em sala de crescimento, no entanto, com perdas significativas quando da transferência. Dessa forma, poucas estarão em condições de serem levadas ao campo. Em virtude disso, cada planta apta e em condições de plantio (devendo apresentar as características de uma muda padrão), apresentará um alto custo, que inevitavelmente será repassado para o consumidor final (Pierik, 1988).

Embora existam algumas regras gerais (manutenção de alta umidade e temperatura amena), a experiência individual, a familiarização com a cultura, a escala de trabalho e as facilidades disponíveis são os principais fatores que determinam a otimização desta fase (Grattapaglia e Machado, 1990).

Segundo Sutter e Hutzell (1984), a remoção das plântulas das condições *in vitro* provoca estresse crítico, sendo então necessário manter a umidade alta e a temperatura amena.

Brainerd e Fuchigami (1981) relatam a necessidade da aclimatização das plântulas provenientes da cultura *in vitro*, visto de são sensíveis e tenras, não desenvolverem a cutícula, resultando em alta evapotranspiração; sua parede celular não apresenta rigidez suficiente para a sustentação; as folhas são delgadas e suaves, fotossinteticamente inativas, deixando a plântulas em franco heterotrofismo e os estômatos não operam eficientemente, provocando, assim, estresses nas primeiras horas após saírem dos tubos de ensaio.

A falta de um revestimento normal de cera é um fator que faz com que as plântulas cultivadas percam água rapidamente pela transpiração, quando são transferidas a um ambiente seco em condição *ex vitro* (Sutter, 1988).

Os fatores a serem considerados para o transplântio são: a infecção e a dessecação. A esterilização do solo elimina muitos dos problemas de infecção e a dessecação das plântulas após o transplântio é o grande problema, que dificulta o uso de cultura de embriões. Alta perda de água foi constatada nas folhas de plântulas, imediatamente após o transplante do frasco de cultura para o solo (Brainerd, e Fuchigami, 1981). Essa perda pode estar relacionada com a reduzida quantidade de cera epicuticular, com o grande volume do espaço intercelular do mesofilo e a lenta resposta dos estômatos ao estresse hídrico.

É no período de aclimatização que a plântula vai começar a ativar seus fotossistemas e a formação de cloroplastos, responsáveis pela transformação de energia luminosa em química, entre outros fatores fisiológicos, para que todo esse processo seja perfeito e a planta se constitua de suas estruturas funcionais, essenciais para seu desenvolvimento (Wetzstein et al., 1981).

Como resultado do estresse do transplântio, pode haver morte do meristema apical ou mesmo da plântula. Um período úmido de aclimatização é necessário, para as plântulas recém-transplantadas adaptarem-se ao ambiente externo. Durante a aclimatização, a umidade é gradualmente reduzida em um período de 2 a 3 semanas. Nesse período, as plântulas sofrem adaptações

morfológicas e fisiológicas que lhes permitem desenvolver o controle da perda de água, típica de plantas terrestres (Hu e Ferreira, 1998).

5. MATERIAL E MÉTODOS

As plântulas obtidas *in vitro* a partir da cultura de embriões de *Coffea arabica* ‘Acaia Cerrado’, ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e *Coffea canephora* ‘Apoatã’, com 90 dias de idade foram transferidas para caixas tipo gerbox, contendo vermiculita (Figura 14).

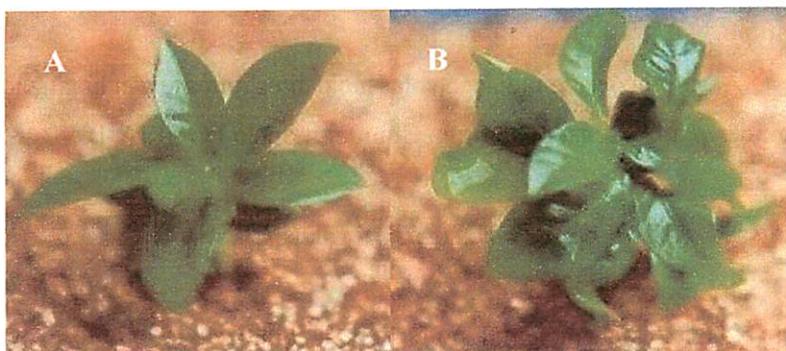


Figura 14. Aspecto visual de plântulas de *Coffea arabica* ‘Rubi’ (A) e *Coffea canephora* ‘Apoatã’ (B), obtidas *in vitro* e transferidas para caixas tipo gerbox. UFLA, Lavras/ MG, 2001.

Após a transferência, as caixas foram envolvidas por sacos plásticos transparentes, visando manutenção de alta umidade relativa, no ambiente de aclimatização e mantidas em sala de crescimento, sob temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Simultaneamente ao controle da umidade relativa e da temperatura, foi realizado o controle da intensidade luminosa. Com esse objetivo, nos primeiros 7 dias, após a retirada das plantas do frasco de cultivo *in vitro*, as mesmas foram mantidas sob um sombrite 70%, proporcionando uma intensidade luminosa de $14 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Após esse período, o sombrite 70% foi substituído por um de

50%, aumentando a intensidade luminosa para $25 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Após 7 dias nessa intensidade luminosa, o sombrite 50% foi substituído por um de 30%, proporcionando uma intensidade luminosa de $75 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$.

Simultaneamente, ao final de cada semana, foram feitas aberturas em uma das extremidades dos sacos plásticos, de forma a incrementar as trocas gasosas.

Após 7 dias, o sombrite 30% e os sacos plásticos foram retirados e as mudas foram transplantadas para vasos plásticos (3L) contendo terra, areia, esterco bovino, na proporção 3:2:1, onde permaneceram até o plantio definitivo no campo.

As condições de radiação solar incidentes durante a aclimatização foram originadas por um sensor Quantum Counter modelo FOGLIA-10.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O controle ambiental, no local de aclimatização durante 21 dias após a transferência das condições *in vitro*, favoreceu o crescimento e o desenvolvimento das plântulas de *Coffea arabica* 'Acaiá Cerrado', 'Rubi' e 'Topázio' e *Coffea canephora* 'Apoatã'. Os resultados estão de acordo com o proposto por Dunstan e Turner (1984), em que a aclimatização é constituída por dois fatores: enraizamento (*in vitro* ou *ex vitro*) e a transferência para condições não estéreis com temperatura e umidade controlada.

O aspecto visual das plântulas após a aclimatização e transferência para vasos pode ser visualizado na figura 15.



Figura 15. Aspecto visual das plântulas de *Coffea arabica* 'Rubi' (A) e *Coffea canephora* 'Apoatã' (B), após a aclimatização e transferência para vasos. Lavras/MG, 2001.

As cultivares de *Coffea arabica* 'Acaíá Cerrado', 'Rubi' e 'Topázio' apresentaram 80, 90 e 90% de sobrevivência após a aclimatização, respectivamente, e para *Coffea canephora* 'Apoatã', 80% (Figura 16).

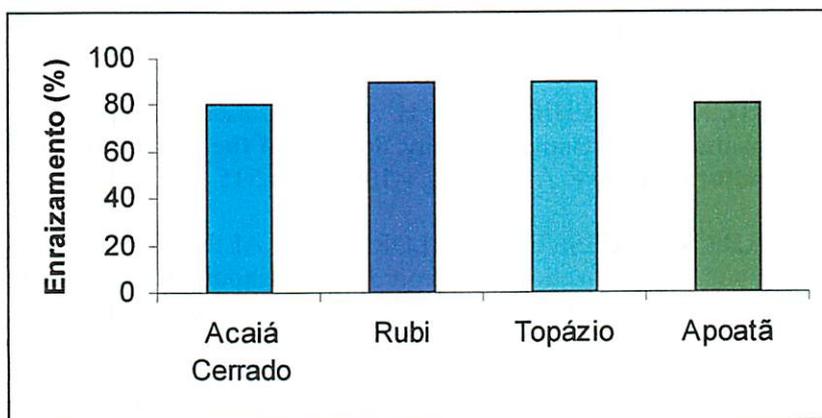


Figura 16. Percentagem de plântulas aclimatizadas de *C. arabica* 'Acaíá Cerrado', 'Rubi' e 'Topázio' e *C. canephora* 'Apoatã'. UFLA, Lavras/MG, 2001.

Após esse período, foi observado que as folhas apresentavam-se recobertas por ceras epicuticulares e, possivelmente, com o aparato fotossintético funcional.

Segundo Brassard et al (1996), essas características são fundamentais para a sobrevivência da plântula no ambiente *ex vitro*.

Decchetti (2000), concluiu que foi possível a aclimatização de mudas de *Annona glabra* L., obtidas por micropropagação, através do controle da umidade relativa, durante 21 dias, aliado ao controle da intensidade luminosa, com a utilização de sombrite 70, 50, 30%, respectivamente, durante 7 dias cada.

7. CONCLUSÕES

É possível a aclimatização das plântulas de *Coffea arabica* 'Acaiá Cerrado', 'Rubi' e 'Topázio' e *Coffea canephora* 'Apoatã', utilizando sombrite 70, 50 e 30%, respectivamente, por período de 7 dias cada..

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. Alexandria, v.106, n.4, p.515-518, 1981.
- BRASSARD, N.; BRISSETTE, L.; LORD, D.; LALIBETÉ, S. Elongation, rooting and acclimatization of micropropagated shoots from mature material of hybrid lard. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. Dordrecht, v. 44, p. 37-44, 1996.
- DECCHETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** Lavras: UFLA, 2000. 101p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).

- DUNSTAN, D. I.; TURNER, K. E. The acclimatization of micropropagated plants. In: VASIL, I.K. (ed.) **Cell culture and somatic cell genetics of plants-laboratory procedures and their applications**. Orlando: Academic Press, 1984. v.1, p.123-129.
- GRATTAPAGLIA, D. MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e Aplicações da cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.99-170.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T. Jr. **Plant propagation Principles and Practices**, 5.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990. 810p.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: CENTRO BRASILEIRO ARGENTINO DE BIOTECNOLOGIA. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.261-297
- PIERIK, R. L. M. Handicaps for the large scale commercial application of micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.230, p.63-71, 1988.
- SUTTER, E. G.; HUTZELL, M. Use of humidity tests and antitranspirant on the acclimatization of tissue cultures plant to the greenhouse. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.23, p.303-312, 1984.
- SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal *in vitro* culture. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n.2, p.234-238, Mar. 1988.
- WELCH, H. J. **Mist Propagation and Automatic Watering**. Faber and London: Faber, 1970.
- WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E.; BROWN, C. L.; VINES, H. M. Anatomical changes in tissue cultured sweet gum leaves during hardening off period. **HortScience**. Alexandria, v.16: p.290, 1981.

CAPÍTULO V. INDUÇÃO DE FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES E NODAIS DE *Coffea arabica* e *Coffea canephora*

1. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma metodologia para induzir à formação de calos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* através do uso de duas auxinas e a combinação entre auxina e citocinina. Para avaliar o uso de duas auxinas, segmentos foliares e nodais de plântulas das cultivares 'Rubi', 'Topázio' e 'Apoatã', obtidas *in vitro*, foram inoculados em meio de cultura MS 50%, suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar e diferentes combinações de 2,4-D e AIB. Para estudar o efeito entre auxina e citocinina, segmentos foliares das cultivares Rubi e Apoatã, de plântulas obtidas *in vitro*, foram inoculados em meio de cultura MS 50%, suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar e diferentes combinações de 2,4-D e BAP. Após a inoculação, os explantes, foram mantidos no escuro, em sala de crescimento à temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, por um período de 45 dias. Segmentos foliares e nodais inoculados em meio desprovido de 2,4-D, AIB ou BAP não apresentaram formação de calos. O uso de BAP, em condições isoladas não apresentou formação de calos em segmentos foliares. A produção máxima de calos em explantes foliares é obtida utilizando-se 1 mg.L^{-1} de 2,4-D para 'Rubi' e 'Topázio' (*C. arabica*) e $0,5\text{ mg.L}^{-1}$ e para Apoatã (*C. canephora*). O 2,4-D induziu a melhor formação de calos no explante nodal, independente de sua concentração em relação ao AIB.

2. ABSTRACT

Callus induction formation from nodal and leaf segments of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*

The objective of this work was to establish a methodology for the induction of callus formation of *Coffea arabica* cultivars Rubi and Topázio and *Coffea canephora* cultivar Apoatã through the use of auxins and the combination of auxin and cytokinin. To evaluate the effect of auxins, nodal and leaf segments of plantlets obtained *in vitro* of cultivars Rubi, Topázio and Apoatã were inoculated in 50% MS medium supplemented with 3% sucrose, 0.7% agar and different combinations of 2,4-D and IBA. In order to evaluate the effect of auxins and cytokinin, nodal and leaf segments of plantlets obtained *in vitro* of cultivars

Rubi and Apatã were inoculated in 50% MS medium supplemented with 3% sucrose, 0.7% agar and different combinations of 2,4-D and BAP. After inoculation, the explants were maintained in a growth room in the absence of light at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for 45 days. No callus formation was observed on nodal and leaf segments inoculated in the absence of 2,4-D, IBA and BAP. The use of BAP only had no effect on callus formation from leaf segments. While maximum callus formation is observed in leaf explants of cultivars Rubi and Topazio using 1.0 mg.L^{-1} 2,4-D, the cultivar Apatã showed higher callus production in the presence of 0.5 mg.L^{-1} 2,4-D. Independent of the concentration used, 2,4-D induced higher callus formation when compared with IBA.

3. INTRODUÇÃO

O calo, é um tecido que se desenvolve em resposta a uma injúria, podendo esta ser física ou química. Células do calo são diferenciadas, embora desorganizadas, sendo que as células diferenciadas apresentam-se altamente vacuolizadas, com citoplasma fino e células muito grandes. Os principais fatores que influenciam à formação de calos são o tipo de explante, a composição do meio nutritivo e as condições físicas de incubação, como luz e temperatura. Nessa fase, os melhores resultados são obtidos com o uso de tecidos jovens, cujas células possuem maior potencial de crescimento e divisão do que células adultas.

O desenvolvimento dos calos, partindo de um fragmento de tecido, pode ser dividido em três estágios: indução, divisão e diferenciação. Na fase de indução, durante a qual as células preparam-se para dividir-se, o metabolismo é ativado e as células permanecem com tamanho constante. A duração dessa fase varia com o estado fisiológico das células e as condições de cultura empregadas. Durante todo esse período ocorre síntese de proteína e DNA. A fase de divisão caracteriza-se pela síntese de compostos e decréscimo no tamanho inicial das células e pela ocorrência de divisão nas camadas periféricas do explante.

Durante essa fase, mudanças regressivas, envolvendo o retorno para um estado meristemático (desdiferenciação) ocorrem nas regiões mais externas dos calos, formando células pequenas, vacuoladas, que apresentam pouco citoplasma e são do tipo meristemáticas. Na fase de diferenciação ocorre a formação de meristemóides.

O presente trabalho teve por objetivo estabelecer uma metodologia para induzir a formação de calos, em segmentos foliares e nodais de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, tratado com duas auxinas e a combinação entre auxina e citocinina.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

Os trabalhos pioneiros em cultura de tecidos com café foram publicados por Staritsky (1970), que obteve êxito na indução de calos, a partir de folhas de várias espécies e produção de embriões somáticos na espécie *Coffea canephora*. Após esse período, muitos trabalhos foram realizados em diferentes países, usando métodos e espécies diversas. Sharp et al. (1973) usando diferentes tipos de explantes de *Coffea arabica* 'Mundo Novo' e 'Bourbon Amarelo', em um meio semelhante ao de Staritsky (1970), acrescido de leite de côco a 5%, observaram um desenvolvimento de calos precoce, em altas concentrações de auxina (4 ou 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D). Carvalho, Carvalho e Crócomo (1974), observaram que aumentando a concentração de sacarose para 40 g.L⁻¹ e utilizando caseína 2 g.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹ de cinetina e 2,4-D, houve a formação de calos no 13º dia, quando incubados no escuro a 24°C. Herman e Hass (1975), também, utilizando o mesmo meio, 0,1 mg.L⁻¹ de cinetina e 0,1 mg/L de 2,4-D, observaram baixo crescimento de calos.

Sondahl (1978) estudou os efeitos de cinetina associada a diferentes auxinas, na proliferação de calos de explantes foliares de *C. arabica* cv. Bourbon. Os resultados destes estudos indicam o 2,4-D, como a auxina mais efetiva na promoção da proliferação celular, seguida pelo ANA, AIB e AIA.

As auxinas e citocininas são os principais reguladores de crescimento utilizados para indução de crescimento de calos. A combinação desses dois reguladores promove diferenciação celular e também a organogênese (George e Sherrington, 1984). As auxinas, por estarem diretamente relacionadas com o crescimento e diferenciação celular, crescimento caulinar, foliar e de raízes, são amplamente utilizadas na micropropagação. As principais auxinas utilizadas são: ácido indol acético (AIA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indol butírico (AIB), e ácido naftaleno acético (ANA) (George, 1993).

As citocininas são substâncias importantes, na cultura de tecidos *in vitro*, para o crescimento e a morfogênese em inúmeras espécies. Elas atuam diretamente na diferenciação, alongamento celular, crescimento e senescência foliar, germinação, entre outros. Este fitohormônio influencia a divisão celular, sendo necessário na regulação da síntese de proteínas, que está diretamente relacionadas à formação das fibras do fuso mitótico (George e Sherrington, 1984). As principais citocininas utilizadas são: 6-benzilaminopurina (BAP), N-isopentenilaminopurina (2ip), e zeatina (George, 1993).

Os diferentes tipos de auxinas apresentam respostas diferentes quanto a sua ação, e mostram-se instáveis em relação à ocorrência da organogênese. Na cultura do cafeeiro, esse regulador de crescimento mostrou ser eficaz na formação de calos (Guevara, 1987).

Sondahl (1978) estudou os efeitos de cinetina com diferentes auxinas na proliferação de calos de explantes foliares de *C. arabica* cv. Bourbon. O 2,4-D foi a auxina mais efetiva na promoção da proliferação celular, seguida pelo ANA, AIB e AIA.

Stimart (1986), trabalhando com brotações ortotrópicas de três espécies de *Coffea*, em meio, contendo 1 mg/l de ANA, 0,1 mg/L de 2,4-D ou 0,1 mg/L de Cinetina, obteve rápida proliferação de calos nas espécies de *Coffea arabica*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Efeito de 2,4-D e AIB na indução de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea arabica* ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e *Coffea canephora* ‘Apoatã’

5.1.1. Obtenção dos explantes

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA/MG). Os explantes foram constituídos por segmentos foliares e nodais de aproximadamente 0,25 cm², retirados de plântulas originadas da germinação *in vitro* de embriões.

5.1.2. Inoculação dos explantes

Segmentos nodais e foliares de *Coffea arabica* ‘Topázio’ e ‘Rubi’ e *Coffea canephora* ‘Apoatã’ foram inoculados em 15mL do meio de cultura MS 50% (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar e adicionado de 2,4-D (0; 0,5 e 1 mg.L⁻¹) e AIB (0; 0,5 e 1 mg.L⁻¹) em todas as combinações possíveis.

O meio de cultura foi ajustado para um pH de 5,6 e autoclavado à 121°C por 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos no escuro, em

sala de crescimento, à $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, por um período de 45 dias. Após esse período, foi avaliada a área dos explantes coberta com calos, onde foram atribuídas notas de 0, 1, 2, 3 e 4 para os explantes que apresentavam, respectivamente, 0, 25, 50, 75 e 100% da área coberta com calos. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo que cada repetição foi composta por 1 tubo. Para a análise estatística foi utilizado contraste de médias.

5.2. Efeito de 2,4-D e BAP na indução de calos em segmentos foliares de *Coffea arabica* ‘Rubi’ e *Coffea canephora* ‘Apoatã’

5.2.1. Obtenção dos explantes

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA/MG). Os explantes, foram constituídos por segmentos foliares de aproximadamente $0,25\text{ cm}^2$, retirados de plântulas originadas da germinação *in vitro* de embriões.

5.2.2. Inoculação dos explantes

Segmentos foliares de *Coffea arabica* ‘Rubi’ e *Coffea canephora* ‘Apoatã’ foram inoculados em 15 mL do meio de cultura MS 50% (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar adicionando 2,4-D (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3 mg.L^{-1}) e BAP (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; e 3 mg.L^{-1}) em todas as combinações possíveis.

O meio de cultura foi ajustado para pH de 5,6 e autoclavado à 121°C por 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos no escuro, em sala de crescimento, à $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ por um período de 45 dias, quando foi avaliada a área

dos explantes cobertas com calos, atribuindo-se notas de 0, 1, 2, 3 e 4 para os explantes que apresentavam, respectivamente, 0, 25, 50, 75 e 100% da área coberta com calos. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo que cada repetição foi composta por 1 tubo. Para a análise estatística foi utilizada regressão polinomial.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Efeito de 2,4-D e AIB na indução de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea arabica* ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e *Coffea canephora* ‘Apoatã’

Não foi observada calogênese em explantes inoculados na ausência de 2,4-D e/ou AIB, independente das cultivares e do tipo de explante utilizado.

Efeito isolado de 2,4-D e AIB

Quando foi adicionada o 2,4-D ao meio de cultura, observou-se um aumento da produção de calos, no explante foliar de 81 e 26%, para as cultivares ‘Apoatã’ e ‘Topázio’, respectivamente, em relação ao AIB (Tabela 4). A produção no explante nodal apresentou um aumento de 46% para Apoatã e 41% para as cultivares ‘Rubi’ e ‘Topázio’.

Tabela 4. Contraste de médias para percentagem da cobertura de calos em explantes foliares e nodais de *Coffea arabica* 'Rubi e 'Topázio' e *C. canephora* 'Apoatã'. UFLA, Lavras/MG, 2000. (SF - segmento foliar e SN - segmento nodal).

CONTRASTE	APOATÃ		RUBI		TOPÁZIO	
	SF	SN	SF	SN	SF	SN
2,4-D X AIB	-81,25 *	-45,87 *	-17,19 ns	-41,25 *	-26,56 *	-40,62 *
0,5 mg.L ⁻¹ de 2,4-D X 1,0 mg.L ⁻¹ de 2,4-D	-25,00 *	-3,12 ns	75,00 *	0,0 ns	31,25 *	12,50 ns
0,5 mg.L ⁻¹ de AIB X 1,0 mg.L ⁻¹ de AIB	0,00 ns	28,12 *	40,62 *	-97,50 *	3,12 ns	56,25 *

* significativo a nível de 1% de probabilidade pelo teste de média de contraste

Para o explante foliar da cultivar 'Rubi', não foi observada diferença significativa entre o uso de 2,4-D ou AIB.

Variando-se as concentrações de 2,4-D, os explantes foliares das cultivares 'Rubi' (75%), 'Topázio' (31%) apresentaram melhores calogênese, utilizando-se 1 mg.L⁻¹, enquanto a cultivar 'Apoatã' (25%) apresentou melhor calogênese, utilizando a concentração de 0,5 mg.L⁻¹. A produção de calos no explante nodal não apresentou diferença significativa para as diferentes concentrações de 2,4-D utilizadas (Tabela 4).

Em relação às concentrações de AIB utilizadas, a concentração de 1 mg.L⁻¹ proporcionou maior formação com calos, para o explante foliar da cultivar Rubi (41%), em relação a concentração de 0,5 mg.L⁻¹. Para as demais cultivares não foi verificado diferença significativa. Para o explante nodal, o uso de AIB na concentração de 1 mg.L⁻¹ promoveu maior formação de calos nas cultivares 'Apoatã' (28%) e 'Topázio' (56%). Para a cultivar 'Rubi', a maior produção de calos (97%) no explante nodal foi obtida usando 0,5 mg.L⁻¹.

Efeito combinado de 2,4-D e AIB

A combinação AIB (independente de sua concentração) com 2,4-D, na concentração de 1 mg.L⁻¹ permitiu um aumento de 19% na produção de calos em explante foliar de 'Apoatã'. Resultado semelhante foi observado na formação de calos em explante nodal de 'Topázio', em relação à concentração de 0,5 mg.L⁻¹ (Tabela 5).

Tabela 5. Contraste de médias para percentagem da cobertura de calos em explantes foliares e nodais de *Coffea arabica* 'Rubi e 'Topázio' e *C. canephora* 'Apoatã'. UFLA, Lavras/MG, 2000. (SF - segmento foliar e SN - segmento nodal).

CONTRASTE	APOATA		RUBI		TOPAZIO	
	SF	SN	SF	SN	SF	SN
0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D + (0,5 e 1 mg.L ⁻¹) AIB X 1,0mg.L ⁻¹ 2,4-D + (0,5 e 1mg.L ⁻¹)AIB	18,75 *	0,00 ns	3,12 ns	0,0 ns	-9,37 ns	18,75 *
0,5 mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.L ⁻¹ AIB X 0,5 mg.L ⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg.L ⁻¹ AIB	3,12 ns	3,12 ns	31,25 *	0,0 ns	3,12 ns	-6,25 ns
1,0 mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg/L AIB X 1,0 mg.L ⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg.L ⁻¹ AIB	-3,12 ns	9,37 ns	0,00 ns	0,0 ns	15,62 ns	0,00 ns

* significativo a nível de 1% de probabilidade pelo teste de média de contraste

Quando fixou-se a concentração de 2,4-D para 0,5 mg.L⁻¹ e estudou-se o efeito combinado com as diferentes concentrações de AIB, foi observado um aumento de 31% na formação de calos em explante foliar da cultivar 'Rubi' na presença de 1 mg/L de AIB. Para os demais tratamentos não foram observadas diferenças significativas para os tipos de explantes e cultivares utilizadas.

Fixando-se a concentração de 2,4-D para 1 mg.L^{-1} , a adição de AIB (independente da concentração) não apresenta efeito significativo na formação de calos.

6.2. Efeito de 2,4-D e BAP na indução de calos em segmentos foliares de *Coffea arabica* 'Rubi' e *Coffea canephora* 'Apoatã'

Não foi observada calogênese em explantes inoculados na ausência de reguladores, independente das cultivares.

Efeito isolado de 2,4-D e BAP

Não foram observados calogênese nos tratamentos com BAP, em condições isoladas, independente do tratamento e das cultivares. Vietez e San-José (1996), também não observaram formação de calos em explantes de *Fagus sylvatica*, quando BAP foi utilizado isoladamente. Resultado contrário foi encontrado por Cordeiro (1999), que obteve melhores resultados, utilizando explantes foliares de *Coffea arabica*, induzidos com apenas BAP.

A cultivar Rubi apresentou as maiores produções de calos (69%) na presença de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, seguida pelas concentrações de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (67%) e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (61%) (Figura 17).

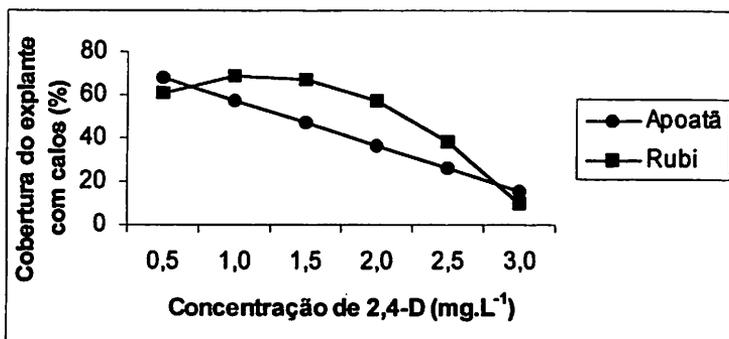


Figura 17. Efeito da concentração de 2,4-D, sobre a produção de calos, formados a partir de segmentos foliares da cultivar Apoatã e Rubi. UFLA, Lavras/MG, 2000.

$Y_{\text{ap oatã}} = 88,59 - 10,48X$	$R^2 = 0,71$
$Y_{\text{rubi}} = 44,50 + 42,0714X - 17,8571X^2$	$R^2 = 0,79$

A utilização de concentrações superiores às citadas, reduziram a produção de calos, podendo chegar à inibição. As auxinas são muito usadas em micropropagação e são incorporadas ao meio de cultura, para promover a formação e crescimento de calos (Pasqual et al., 1998).

Para a cultivar 'Apoatã', a maior produção foi obtida, utilizando-se 0,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D (68%), sendo que o aumento na concentração, reduziu a produção de calos nos explantes foliares, podendo chegar também a uma inibição.

Efeito combinado de 2,4-D e BAP

A interação de 2,4-D e BAP, não apresentou efeito significativo para a cultivar 'Rubi', independente das concentrações. Estes resultados discordam de Carvalho, Carvalho e Crócomo (1974), os quais concluíram que o 2,4-D, combinado com uma citocinina são essenciais à proliferação de calos de explantes foliares e nodais. Resultado contrário, também, foi encontrado por Gomes (1999) e Cunha e Ferreira (1996), que observaram a necessidade de

interação entre auxina e citocinina, para a eficiente indução de calos, em explantes de *Maclura* e *Linum usitatissimum* L. respectivamente.

Para a cultivar 'Apoatã', observou-se que o uso de BAP, na concentração de 1 mg.L⁻¹, apresentou interação com as diferentes concentrações de 2,4-D. Conforme é demonstrado na Figura 18, o uso de 0,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D, proporcionou maior formação de calos em explantes foliares da cultivar 'Apoatã'. Concentrações acima de 0,5 mg.L⁻¹ e inferior a 2,5 mg.L⁻¹ não induziram formação de calos. Concentrações acima de 3 mg.L⁻¹ induziram pequeno aumento na produção de calos.

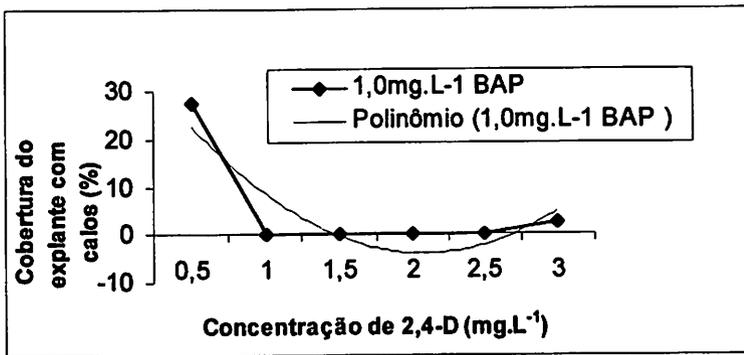


Figura 18. Efeito da interação 2,4-D x BAP sobre a produção de calos formados a partir de segmentos foliares da cultivar 'Apoatã'. UFLA, Lavras/MG, 2000.

$$Y_{\text{BAP}} (1 \text{ mg.L}^{-1}) = 42,50 - 44,6428X + 10,7143X^2 \quad R^2 = 0,80$$

7. CONCLUSÕES

Segmentos foliares e nodais inoculados em meio desprovido de reguladores não apresentaram formação de calos.

O uso de BAP, em condições isoladas, não apresentou formação de calos em segmentos foliares.

A produção máxima de calos em explantes foliares é obtida utilizando-se 1 de 2,4-D para 'Rubi' e 'Topázio' (*C. arabica*) e 0,5 mg.L⁻¹ e para Apoatã (*C. canephora*).

O 2,4-D induziu a melhor formação de calos no explante nodal, independente de sua concentração, em relação ao AIB.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, F. J. P. C., CARVALHO, P. C. T., CRÓCOMO, O. J. Cultura de tecidos de explantes de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA CAFEEIRAS, Poços de Caldas. Resumos..., Rio de Janeiro, 1974. v.2, p.299-300
- CORDEIRO, A. T. Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplasto em *Coffea*. Viçosa: UFV, 1999. 111p. (Tese- Doutorado em Fisiologia Vegetal).
- CUNHA, A. C. G.; FERREIRA, M. F. Somatic embryogenesis, organogenesis and callus growth Kinectis of flax. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.47, p.1-8, 1996.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture; Part 1 The Technology**. 2.ed. Edington: Exejetics, 1993. 574p.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Handbook and directory of commercial laboratories. (Grande-Bretane): Exegetics, 1984. 709p

- GOMES, G. A. C. Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*). Lavras: UFLA, 1999. 91p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- GUEVARA, E. B. Reguladores de crescimento. In: _____ Curso de cultivo de tejidos, Costa Rica: Turrialba 1987. p.58-79.
- HERMAN, E. B.; HASS, G. J. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *HortScience*, Alexandria, v.10, n.6, p.588-589, 1975.
- MURASHIGE, T. SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabaco tissue cultures. *Physiology Plantarum*. Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.
- PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMANN, A.; CARVALHO, G. R. Meios de Cultura. In: _____ Cultura de tecidos Vegetais: Tecnologia e Aplicações, Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 127p. (Especialização) Curso de Pós-Graduação “Latu Sensu” a distância:
- SHARP, W. R.; CALDAS, L. S.; CROCOMO, O. J.; MONACO, L. C.; CARVALHO, A. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. *Phyton*, Buenos Aires, v.31, n.2, p.67-74, 1973.
- SONDAHL, M. R. Interações de citoquininas e auxinas no crescimento e embriogênese de explantes foliares de *Coffea* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, Resumos..., Ribeirão Preto, 1978. p. 67
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus culture tissue of *Coffea*. *Acta Botanica Neerlandica*, Netherlands, v.19, n.4, p.509-514, 1970.
- STIMART, D. P. Commercial micropropagation of florist flower crops. In: Zimmerman et al. (eds.), 1986. p. 301-315.
- VIETEZ, A.M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. *In Vitro Cellular Development Biology*, Columbia, v.32, p.140-147, July-Sept.1996.

CAPÍTULO VI. CURVA DE CRESCIMENTO, ANÁLISE BIOQUÍMICA E PADRÃO PROTEICO DE CALOS OBTIDOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES E NODAIS DE *Coffea arabica* E *Coffea canephora*.

1. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar a curva de crescimento e analisar bioquimicamente calos originados de segmentos foliares e nodais de plântulas de *Coffea arabica* 'Rubi' e 'Topázio' e *Coffea canephora* 'Apoatã', obtidas *in vitro*, a partir da cultura de embriões. Explantes foliares e nodais com aproximadamente 0,25 cm² foram inoculados em meio MS 50%, suplementado com 3% de sacarose e 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, na ausência de luz, sob temperatura controlada de 25± 1°C. Para obtenção da curva de crescimento, os calos foram pesados a intervalos de 7 dias. A curva de crescimento de calos formados a partir de explantes foliares de 'Apoatã' apresenta crescimento tipo sigmóide, com cinco fases distintas de 'Rubi' e 'Topázio' 3 fases. As curvas de crescimento de calos, formados a partir de explantes nodais de 'Apoatã' e 'Rubi', apresentam um crescimento tipo sigmoide, com cinco fases distintas e 'Topázio' 3 fases. O teor máximo de proteína total, em calos originados de explante foliar, ocorrem com 63 dias de cultivo para 'Apoatã', e calos originados de segmento nodal apresenta teores máximos aos 63 dias de cultivo para 'Rubi' e entre 42 e 63 dias para 'Apoatã'. Os teor máximo de açúcar redutor em calos originados de explante foliar, ocorrem no dia de sua inoculação, para 'Apoatã' e 'Rubi' e com 21 dias de cultivo para 'Topázio', e calos originados do segmento nodal, no dia de sua inoculação para 'Apoatã' e 'Topázio' e com 63 dias para 'Rubi'. Diferenças quantitativas (intensidade das bandas) e qualitativas (presença ou ausência de bandas) são observadas entre o período de desenvolvimento de calos de 'Apoatã' e 'Rubi', originados de explante foliar e nodal.

2. ABSTRACT

Growth curve, biochemical analysis and protein pattern of callus obtained from leaf and nodal segments of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*

The objective of this work was to determine the growth curve and to biochemically analyze callus formed from leaf and nodal segments of plantlets of *Coffea arabica* cultivars Rubi and Topázio and *Coffea canephora* cultivar Apatã obtained *in vitro* through embryo culture. Nodal and leaf segments with approximately 0.25 cm² were inoculated in 50% MS medium supplemented with 3% sucrose and 1.0 mg.L⁻¹ 2,4-D. After inoculation, the explants were maintained in a growth room in the absence of light at 25 ± 1°C. The results showed that while callus formation from leaf explants of the cultivar Apatã presented a sigmoidal type growth with 5 distinct phases, callus formation from leaf explants of the cultivars Rubi and Topázio presented 3 growth phases. While callus formation from nodal explants of the cultivars Apatã and Rubi presented a sigmoidal type growth with 5 distinct phases, callus formation from nodal explants of the cultivar Topázio presented 3 growth phases. While maximum level of total protein of callus formed from leaf explants is observed within 63 days culture for the cultivar Apatã, it is observed between 42 to 63 days for the cultivar Apatã. Maximum levels of reducing sugars is observed in callus obtained from leaf explants at the day of inoculation for the cultivars Apatã and Rubi and with 21 days of culture for the cultivar Topázio. While maximum levels of reducing sugars are observed in callus obtained from nodal explants at the day of inoculation for the cultivars Apatã and Topázio, it is observed with 63 days of culture for the cultivar Rubi. The protein pattern showed quantitative (intensity of bands) and qualitative (presence or absence of bands) differences during callus formation from nodal and leaf segments of Apatã and Rubi cultivars.

3. INTRODUÇÃO

O conhecimento das mudanças bioquímicas e fisiológicas, que ocorrem durante o crescimento *in vitro* de tecidos vegetais, pode fornecer importantes informações relacionadas ao processo de estabelecimento e, conseqüentemente, propiciar a otimização das condições para seu cultivo. As células vegetais são

laboratórios bioquímicos, onde são produzidas muitas substâncias com menor ou maior grau de complexidade.

As determinações quantitativas e qualitativas de macro e micromoléculas, que constituem os tecidos vegetais, podem auxiliar na determinação das diferentes fases da vida de um vegetal, de acordo com o aumento ou diminuição dos níveis de compostos essenciais.

Para a detecção dos grupos de substâncias presentes nos tecidos vegetais como proteínas, aminoácidos e açúcares redutores existem diversos métodos, os quais são baseados em reações químicas específicas do reagente com a estrutura de componentes desses grupos, reações essas que podem ser quantificadas através de métodos colorimétricos.

As fases de crescimento de cultura de calos têm sido caracterizadas no crescimento celular, cujos parâmetros incluem peso da matéria fresca da célula, número de células e proteína celular total, atividades metabólicas e concentrações de nutrientes nos meios de cultura. As diversas etapas que compõem o crescimento do calos são: 1) fase Lag: caracteriza-se pelo número estacionário de células, pelo início da imobilização de metabólitos sem qualquer divisão celular, síntese de proteínas e síntese de metabólitos específicos; 2) fase exponencial: a divisão celular é máxima, o número de células aumenta e as células são pequenas, formando agregados com mais de dez células; 3) fase linear: ocorre a redução na taxa de crescimento de divisão celular; 4) fase de desaceleração progressiva: a divisão celular diminui e ocorre a expansão da célula 5) fase estacionária: não ocorre divisão celular, não há síntese de biomassa ou aumento do número de células.

Após algumas semanas de cultivo, Constabel e Vasil (1989) observaram que os calos de fumo apresentaram sinais de desaceleração do crescimento, seguido de necrose, coloração marrom e finalmente, dessecação. Esse fato ocorreu, em função de fatores como a exaustão de nutrientes, inibição da difusão de nutrientes,

evaporação de água acompanhada pelo aumento na concentração de alguns nutrientes do meio e acúmulo de metabólitos, os quais segundo Remashire (1997), podem ser tóxicos.

Mesquita (1999) observou que as curvas de crescimento de calos, obtidas a partir de explantes foliares de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn), inoculados na presença de 2,0 e 6,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, na presença e ausência de luz, apresentaram crescimento sigmoidal.

A curva de crescimento de matéria fresca de calos formados a partir de explantes foliares de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) apresenta um crescimento sigmoide, com cinco fases distintas: lag (entre 0 – 30 dias de inoculação), exponencial (30 – 53 dias), linear (53 – 60 dias) e estacionária (67 – 90 dias) (Serra, 1999).

O objetivo deste trabalho foi determinar a curva de crescimento de calos originados de segmentos foliares e nodais de plântulas de *Coffea arabica* ‘Rubi’ e ‘Topázio’ e *C. canephora* ‘Apoatã’, obtidas *in vitro*, a partir da cultura de embriões, estudar bioquimicamente e caracterizar, através do padrão proteico, o crescimento destes calos.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

Segundo Passos (1996), a determinação dos níveis de carboidratos, revela a reserva prontamente disponível ao crescimento da planta e possui várias aplicações em estudos fisiológicos. Os carboidratos, são acrescentados ao meio de cultura, como fonte de energia, para o desenvolvimento do explante, um vez que esses tecidos apresentam uma taxa fotossintética bastante reduzida, tornando-os praticamente heterotróficos.

As proteínas são macromoléculas, que podem apresentar funções enzimáticas ou estruturais. Estudos fisiológicos e bioquímicos, envolvendo a

quantificação, localização e determinação de atividade enzimática *in vivo* e *in vitro* têm sido conduzidos. Calos obtidos a partir de segmentos foliares de fumo, inoculados com meio MS, suplementado com 2 mg.L⁻¹ de AIA + 2 mg.L⁻¹ de cinetina, apresentaram ou não formação de parte aérea. Os níveis de proteínas solúveis e aminoácidos livres foram mais altos em calos que regeneraram do que em calos que não regeneraram parte aérea (Yadav, Maherchandani e Yadav, 1995). Segundo Serra (1999), calos obtidos a partir de explantes foliares de Castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), analisados quantitativamente, reduziram os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores, ao longo do período de inoculação. O mesmo comportamento não foi observado para os teores de aminoácidos e proteínas, os quais foram reduzidos a partir do 30^o dia após a inoculação.

A eletroforese é uma técnica relativamente simples, rápida e de alto valor informativo. Sua aplicação, na evidenciação de proteínas tem sido crescentemente ampliada para estudos de fisiologia e genética de plantas. Consiste na migração de moléculas ionizadas, de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares em um campo elétrico. Moléculas com carga negativa migram para o polo positivo (ânodo) e moléculas com carga positiva migram para pólo negativo (cátodo). A carga líquida das moléculas de proteína é função do somatório dos aminoácidos que as constituem. As proteínas são substâncias anfóteras, capazes de adquirir carga positiva ou negativa em função do pH. Torna-se, portanto, importante manter o pH constante, durante a eletroforese pelo uso de soluções tampão, o qual consiste de duas partes: o tampão do gel e o tampão do tanque, onde se encontram os eletrodos (ânodo e cátodo) (Alfenas et al., 1981).

Para a eletroforese são empregados extratos proteicos de folhas, raízes, sementes, dentre outras, que são aplicados no gel e submetidos à eletroforese. Posteriormente os géis são imersos em uma solução corante, que pode ser azul

brilhante de comassie, para proteínas e soluções específicas, contendo os componentes necessários para revelação das bandas de atividade enzimática (Ausubel, 1998).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Obtenção da curva de crescimento de calos

Para a obtenção da curva de crescimento da formação de calos, utilizou-se segmentos foliares e nodais de plântulas de *Coffea arabica* 'Rubi' e 'Topázio' e *Coffea canephora* 'Apoatã', obtidos *in vitro* a partir da cultura de embriões. Os explantes com aproximadamente 0,25 cm² foram inoculados em meio MS 50%, pH 5,6 e suplementado com 3% de sacarose e 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, na ausência de luz, sob temperatura controlada de 25± 1°C.

As avaliações da formação de calogênese, para fins de obtenção da curva de crescimento, foram feitas a partir do dia da inoculação (tempo 0) até o 84º dia, com intervalos de coleta de 7 dias. Em cada coleta, os calos foram cuidadosamente limpos com papel absorvente e pesados em balança de precisão.

O percentual de crescimento dos calos foi determinado, segundo Lameira (1997), através da equação:

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

Onde: Pi = Peso inicial e Pf = Peso final de calos

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, contendo 4 repetições, cada uma composta por 2 tubos.

5.2. Análise bioquímica

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal da EMBRAPA (CNPMS), Sete Lagoas/MG.

Para a obtenção das análises bioquímicas, utilizou-se intervalos de 21 dias para as coletas de calos (300 mg), durante um período de 84 dias de inoculação. Os calos foram imersos em nitrogênio líquido e armazenados em freezer à temperatura de -80°C , para, posteriormente, procederem-se as análises bioquímicas.

Para a obtenção do extrato enzimático bruto, pesaram-se 300mg de calos, que foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido, adicionando-se 300mL de tampão de extração (Borato 12,5mM; pH 10; SDS 1%, β -mercaptoetanol 100%, PVPP (100mg), PMSF 1Mm e DTT 2mM). As amostras foram transferidas para microtubos *ependorf*, de 1,5mL e centrifugadas à 16.000g em microcentrífuga, por 20 minutos, sob refrigeração (4°C). O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, o qual foi armazenado à 4°C .

5.2.1. Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo Método do Ácido Bicinconínico. Sob condições alcalinas o cobre (Cu^{+2}) forma um complexo com ligações peptídicas, sendo reduzido a Cu^{+} . Esse Cu^{+} bem como os resíduos de tirosina, triptofano e cisteína, reagem com o ácido bicinconínico, formando um complexo de coloração púrpura. A concentração de proteína é diretamente proporcional à leitura da absorbância em 562nm.

Para determinar a concentração de proteína total, 2 μL do extrato proteico foi diluído 500 vezes. Adicionou-se 2 ml do reagente de determinação de proteína (Solução Ácido Bicinconínico acrescido de Sulfato de cobre, 1:50

v/v). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 562nm, sendo os valores expressos em μg proteína. g^{-1} de embrião, utilizando-se o BSA (soroalbuminabovina) para a determinação da curva padrão.

5.2.2. Quantificação de açúcares redutores

Para a obtenção do teor de açúcares redutores, foi empregada a metodologia descrita por Miller (1959), utilizando-se ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Alíquotas de 500 μL do sobrenadante, foram adicionadas em 1000 μL de água destilada e 1000 μL do reagente DNS. Esta mistura foi homogeneizada em agitador e colocada em água fervente (100°C), por 5 minutos, sendo, posteriormente, resfriada à temperatura ambiente. Após o resfriamento, foram realizadas as leituras, em espectrofotômetro, a 540nm, sendo a quantificação baseada em curva padrão para glicose.

5.3. Eletroforese da proteína total em gel de poliacrilamida

As análises de eletroforese foram realizadas no Laboratório do Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA (CNPMS), Sete Lagoas/MG.

Para separação das proteínas em gel de poliacrilamida, adicionou-se 30 μL de corante-tampão da amostra – DYE (0,2% de azul de bromofenol (p/v), tris-HCl 25mM, glicerol 50%) a 30 μL do extrato proteico. Essa solução foi aquecida, durante 5 minutos, antes de ser aplicada no gel de gradiente de poliacrilamida.

Os géis de poliacrilamida foram preparados em sistema desnaturante descontínuo (Laemmli, 1970), consistindo de dois sistemas: o gel concentrador e o gel separador. O primeiro possuía TRIS, 1,5M pH 6,8, SDS 20% e acrilamida 30%, enquanto o segundo foi constituído de TRIS 0,5M, pH 8,8, SDS 20% e

acrilamida 30%. A separação eletroforética foi realizada em cuba vertical Biorad, em tampão de corrida (TRIS 0,5M; pH 8,8; glicina 1,92M; pH 8,3 e SDS 0,1%), com voltagem de 100 volts. Aplicou-se 30 μ L de amostra por canaleta de gel para proteína total, num equivalente a 300 mg dos calos macerados.

Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue (Coomassie Brilliant Blue R-250, 0,15% p/v, etanol 50%, ácido acético 10%) over-night, sob leve agitação e descorados em solução contendo etanol 5% e ácido acético 10%, para visualização das bandas. Após a descoloração, as proteínas foram visualizadas com o auxílio de um transluminador.

A estratégia utilizada para o ordenamento das amostras nos géis de poliacrilamida, foi de colocar as proteínas extraídas de calos nas canaletas, obedecendo-se o período de desenvolvimento e o explante em que foi originado. Essa ordem foi obedecida para todas as cultivares. Nesses géis foram utilizados marcadores de alto peso molecular, com as respectivas faixas de peso molecular de 29 a 205 kD.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Obtenção da curva de crescimento de calos

Curva de crescimento de calos originados a partir de explantes foliares

O padrão de crescimento dos calos formados a partir de segmentos foliares das cultivares 'Rubi', 'Topázio' e 'Apoatã' estão apresentados na Figura 19.

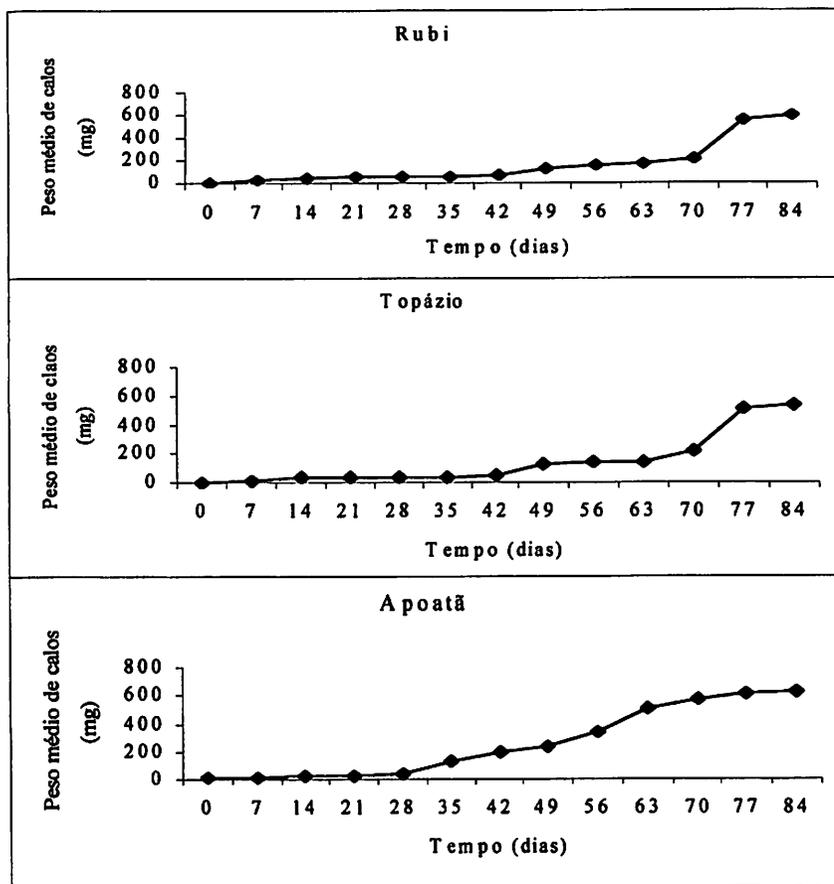


Figura 19. Curva de crescimento de calos formados a partir de segmentos foliares de *Coffea arabica* 'Rubi' e 'Topázio' e *C. canephora* 'Apoatã' inoculados em meio MS suplementado com 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, durante 84 dias. UFLA, Lavras/MG, 2001.

Para *Coffea canephora* 'Apoatã' observou-se a presença de um crescimento sigmoidal, com tendência de ganho de matéria fresca, em função do aumento do tempo de cultivo, indicando a presença distintas de 5 fases de crescimento distintas. Para *Coffea arabica* 'Rubi' e 'Topázio' observou-se somente a presença de 3 fases. Isso ocorreu, possivelmente, devido à menor velocidade de crescimento dessas duas cultivares.

A fase Lag, na qual células do explante preparam-se para divisão celular e produção de energia, acumulando matéria fresca e seca, ocorreu até o 28^o dia de inoculação, com 39% de crescimento para 'Apoatã'. Essa fase ocorreu até o 42^o dia de inoculação para 'Rubi' e 'Topázio', com 64 e 66% de crescimento respectivamente. Landa (1999) verificou que para calos obtidos a partir de segmentos foliares de pequiizeiro, a fase Lag ocorre até o 7^o dia após à inoculação. Mezzetti, Conte e Rosati (1991), avaliando o crescimento de calos obtidos a partir de segmentos foliares de *Actinidia deliciosa*, observaram um acúmulo de matéria fresca e seca até o 30^o dia após à inoculação.

A fase de crescimento exponencial, período em que ocorre máxima divisão celular, ocorreu entre o 28^o e o 63^o dia após a inoculação, com o maior percentual de crescimento observado (92%) para 'Apoatã'. Essa fase ocorreu entre o 42^o até 77^o dia de inoculação, para 'Rubi' e 'Topázio', com 87 e 91% de crescimento, respectivamente. Santos (1998) observou ocorrências dessa fase, entre o 16^o e 35^o dia de inoculação, em calos obtidos a partir de segmentos foliares de *Annona glabra*. Em segmentos foliares de pequiizeiro essa fase foi observada entre o 7^o e o 35^o dia após à inoculação (Landa, 1999).

O período de crescimento linear, em que os calos diminuem a divisão celular e aumentam a área celular, foi observado entre o 63^o e o 70^o dia de inoculação, com 9% de crescimento para 'Apoatã'. Esta fase ocorreu entre 77^o até 84^o dia, para 'Rubi' e 'Topázio', com 6 e 5% de crescimento respectivamente. Santos (1998), estudando a curva de crescimento de japecanga

(*Smilax japecanga*), indica que a fase linear dessa espécie ocorreu entre o 18^o e 26^o dia após à inoculação.

O intervalo de desaceleração do crescimento se deu entre 70^o e o 77^o dia de inoculação, com apenas 7% de crescimento para 'Apoatã'. Segundo Smith (1992), as culturas, nesse período, devem ser transferidas para um novo meio de cultura, devido à redução de nutrientes, secagem do ágar e acúmulo de substâncias tóxicas. Dessa forma, a repicagem de calos provenientes de folhas de 'Apoatã' para um novo meio de cultura, deve ser feita no início da fase de desaceleração, ou seja, aos 70 dias de cultivo. Landa (1999) verificou a ocorrência dessa fase, entre o 46^o e o 49^o dias de cultivo, em calos obtidos de segmentos foliares de pequizeiro.

O crescimento dos calos chegou à fase estacionária entre 77^o e o 84^o dia de inoculação, sendo observado, nesse período 2% de crescimento para 'Apoatã'. Landa (1999) verificou a ocorrência dessa fase, entre o 46^o e o 49^o dia, em calos obtidos de segmentos foliares de pequizeiro. Segundo Mesquita (1999) o período de desaceleração ocorreu entre o 63^o e o 77^o dia após à inoculação, para calos formados a partir de segmentos foliares de lechieira.

Curva de crescimento de calos originados a partir de explantes nodais

O padrão de crescimento dos calos formados a partir de segmentos nodais de 'Rubi', 'Topázio' e 'Apoatã' estão apresentados na Figura 20.

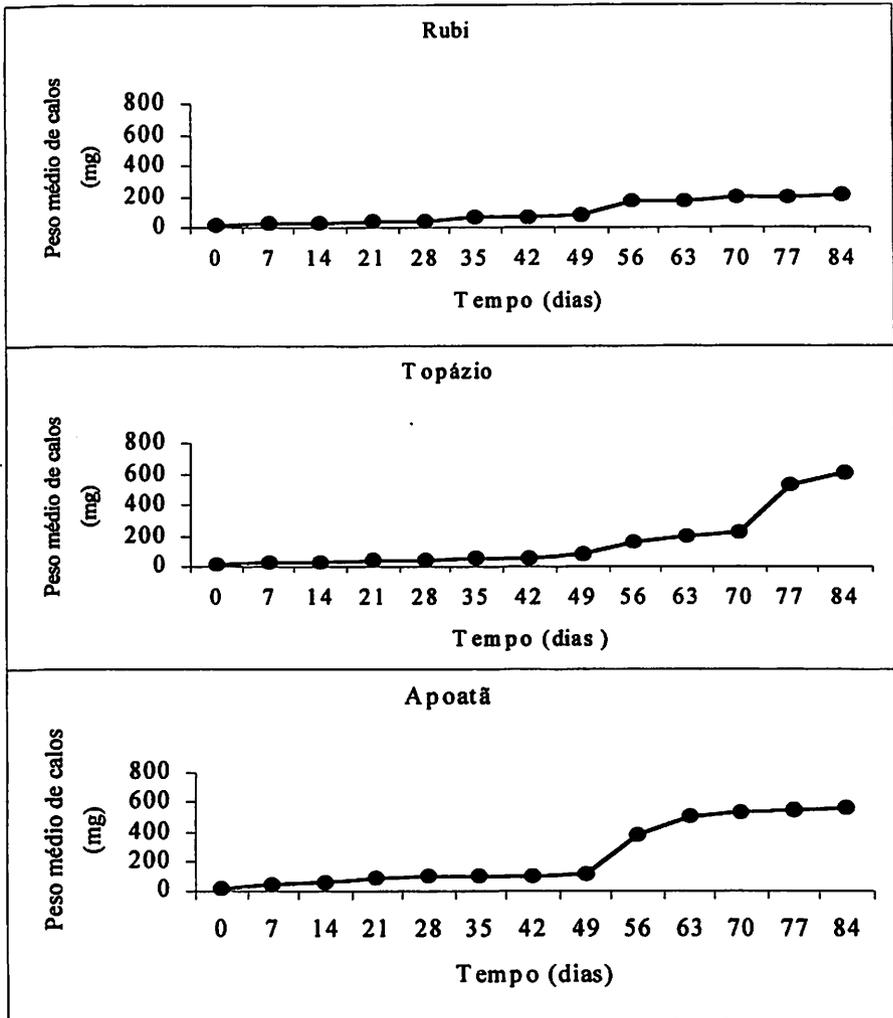


Figura 20. Curva de crescimento de calos formados a partir de segmentos nodais de *Coffea arabica* 'Rubi' e 'Topázio' e *C. canephora* 'Apoatã' inoculados em meio MS suplementado com 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, durante 84 dias. UFLA, Lavras/MG, 2001.

Observou-se diferentes velocidades de crescimento dos calos originados à partir de segmento nodal. 'Rubi' e 'Apoatã' apresentaram 5 fases de crescimento distintas e 'Topázio' 3 fases, num período de 84 dias. Segundo Scragg e Allan (1993), a fase Lag pode ser considerada como produtora de energia. Esta fase ocorreu até o 28^o dia de inoculação, com 39% de crescimento para 'Rubi'; 42^o dia de inoculação, com 52% de crescimento para 'Topázio' e até o 49^o dia de inoculação, com 67% de crescimento para 'Apoatã'.

A fase de crescimento exponencial, considerada por Scragg e Allan (1993) como fase biossintética, ocorreu entre o 28^o e o 56^o dia após a inoculação do explante nodal de 'Rubi' ao meio de cultura, com 78% de crescimento. Para 'Apoatã' esta fase ocorre entre o 49^o e o 63^o dia de cultivo, apresentando 79% de crescimento e para Topázio entre o 42^o e o 77^o dia, com 91% de crescimento.

O período de crescimento linear, foi observado entre o 56^o e o 63^o dia de inoculação, com 1% de crescimento para 'Rubi'; entre 63^o até 70^o dia, para 'Apoatã', com 5% de crescimento e entre o 77^o e o 84^o dia, com 12% de crescimento para 'Topázio'. Segundo Smith (1992), o crescimento e desenvolvimento celular nesta fase são mais evidentes.

O intervalo de desaceleração do crescimento observado para 'Rubi', deu-se entre 63^o e o 77^o dia de inoculação, com apenas 14% de crescimento. Para a 'Apoatã' esta fase ocorreu entre o 70^o e o 77^o dia, com 4% de crescimento.

A quinta fase, correspondente à fase estacionária, foi observada entre 77^o e o 84^o dia de inoculação para 'Rubi' e 'Apoatã', sendo observado, neste período, 4 e 2% de crescimento respectivamente.

Lameira (1997), estudando a curva de crescimento *in vitro* de calos obtidos a partir de segmentos nodais de erva-baleeira (*Cordia verbenaceae*) observou, também, cinco fases de crescimento, sendo as fases lag, exponencial,

linear, desaceleração e estacionária observadas, respectivamente, nos intervalos 0-6; 6-18; 18-21; 21-27 e a partir de 27 dias após à inoculação.

Comparando-se os resultados das curvas de crescimentos citadas anteriormente com os da curva de crescimento de calos do cafeeiro, originadas à partir de segmentos foliares e nodais, podemos observar que o crescimento desses tecidos na espécie em estudo é bastante lento, o que pode estar relacionado a um ciclo celular, também, lento. O ciclo celular é composto por várias fases, sendo a interfase (fase onde ocorre a duplicação do DNA), a mais demorada. A seqüência das fases do ciclo celular é governada por um sistema-controle em que participam complexos de proteínas.

Esses resultados sugerem que o crescimento de calos originados à partir de segmentos foliares de *Coffea canephora* 'Apoatã' foram maiores do que de *C. arabica* 'Rubi' e 'Topázio', quando utilizou-se 1 mg.L^{-1} de 2,4-D ao meio de cultura, mantidos na ausência de luz.

Num período de 84 dias, observou-se o mesmo padrão de crescimento, independente do explante utilizado para 'Apoatã' (5 fases) e 'Topázio' (3 fases). 'Rubi' apresentou velocidade mais lenta no crescimento de calos formados à partir do explante foliar em relação ao explante nodal.

A repicagem dos calos originados de explante nodal para um novo meio deve ser feita com 63 e 70 dias de cultivo para 'Rubi' e 'Apoatã' respectivamente.

6.2. Análise bioquímica

6.2.1. Quantificação de proteínas totais

Os teores de proteínas do explante e de calos de 'Apoatã', obtidos a partir de explantes foliares e nodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg.L^{-1} de 2,4-D e mantidos na ausência de luz, são apresentados na Figura 21.

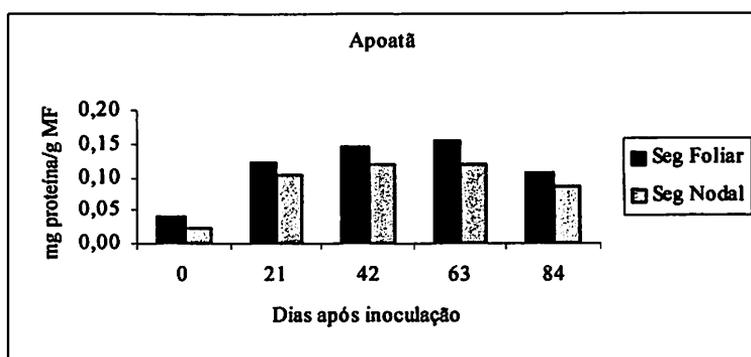


Figura 21. Teores de proteínas totais do explante e de calos de *Coffea canephora* 'Apoatã' formados a partir de segmentos foliares e nodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, durante 84 dias. UFLA, Lavras/MG, 2001.

Os maiores teores de proteínas totais para 'Apoatã' foram observados, quando utilizaram-se segmentos foliares como explantes, para o crescimento de calos, em comparação com o segmento nodal. Observa-se um acúmulo nos teores de proteínas até o 63^o dia, a partir da qual iniciou-se uma redução. Esse aumento inicial e posterior redução no teor de proteína, também foi detectada por Sachi, Morgutti e Abruzzese (1995) em calos de *Actinidia deliciosa*. Esse aumento no teor de proteína pode ser devido a uma absorção considerável do íon amônio e de glicina do meio de cultura. Segundo George, Puttock e George (1988), a presença de amônio, no meio de cultura, resulta no aumento da síntese de aminoácidos e proteínas, os quais são produzidos, utilizando-se energia

liberada no catabolismo dos carboidratos. Serra (1999) observou um acúmulo nos teores de proteínas e aminoácidos até o 30^o dia de inoculação, período em que se iniciou a redução.

Os teores de proteínas do explante e de calos de 'Rubi', obtidos a partir de explantes foliares e nodais, inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, na ausência de luz são apresentados na Figura 22.

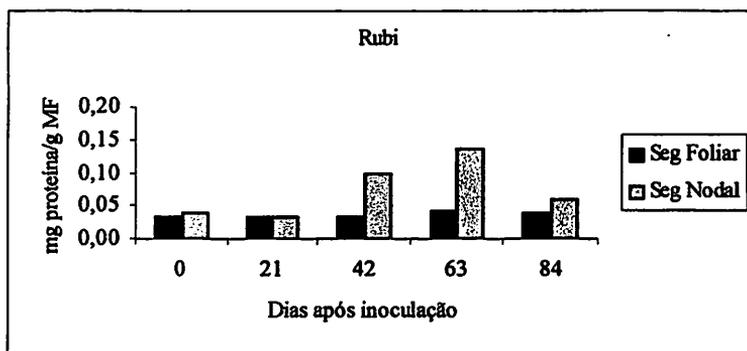


Figura 22. Teores de proteínas totais do explante e de calos de *C. arabica* 'Rubi' formados a partir de segmentos foliares e nodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, durante 84 dias. UFLA, Lavras/MG, 2001.

Observa-se que os teores de proteínas totais de calos, originados à partir de segmentos foliares, mantiveram-se constantes e em baixas concentrações durante o período de crescimento de 'Rubi'. Foi verificado que essa cultivar apresentou velocidade menor no crescimento de calos, formados à partir do explante foliar em relação ao segmento nodal. Com relação ao calos originados de segmentos nodais, observou-se um acúmulo nos teores, até o 63^o dia de inoculação, a partir da qual iniciou-se uma redução.

Os teores de proteínas do explante e de calos de 'Topázio', obtidos a partir de explantes foliares e nodais, inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, na ausência de luz são apresentados na Figura 23.

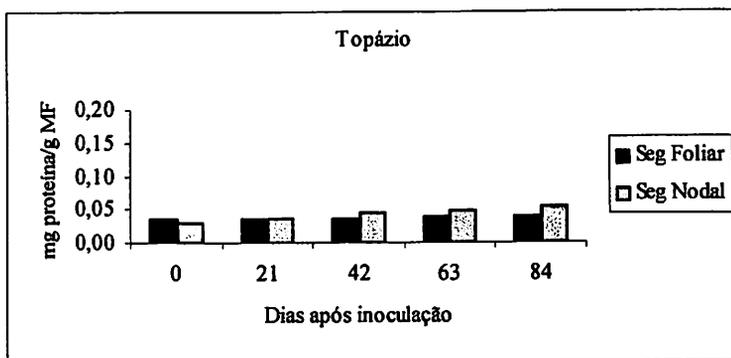


Figura 23. Teores de proteínas totais do explante e de calos de *Coffea arabica* 'Topázio' formados a partir de segmentos foliares e nodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, durante 84 dias. UFLA, Lavras/MG, 2001.

Os teores de proteínas totais, dos explantes foliares e nodais e dos calos formados a partir destes, mantiveram-se constantes, não observando acúmulo em nenhuma fase de crescimento.

6.2.2. Quantificação de açúcares redutores

Os teores de açúcares redutores do explante e de calos de 'Apoatã', obtidos a partir de explantes foliares e nodais, inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, na ausência de luz, são apresentados na Figura 24.

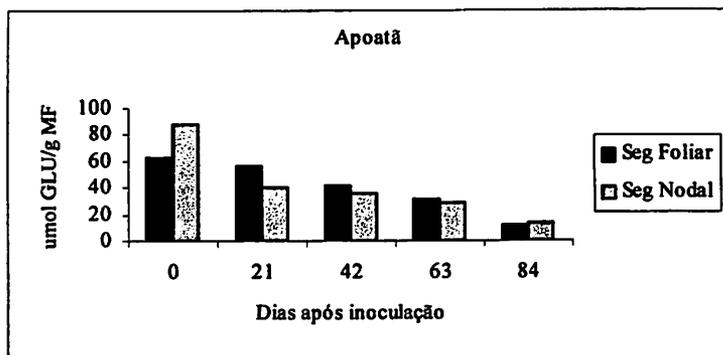


Figura 24. Teores de açúcares redutores de do explante e de calos de *Coffea canephora* 'Apoatã' formados a partir de segmentos foliares e nodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D durante 84 dias. UFLA, Lavras/MG, 2001.

O teor máximo de açúcares redutores foi observado no dia da inoculação dos explantes e o teor mínimo no 84^o dia. Esses resultados coincidem com os resultados obtidos por Serra (1999), o qual demonstrou que o teor máximo de açúcares redutores de calos de castanha-do-brasil, formados a partir de segmentos foliares, foi observado no dia da inoculação dos explantes e o teor mínimo no último dia da avaliação (84^o dia).

A redução dos açúcares redutores, no período compreendido entre 0 e 21 dias após a inoculação, coincide com a fase Lag (até o 28^o dia) de crescimento dos calos, o que, possivelmente, ocorreu para produzir energia a ser utilizada na fase exponencial. Os resultados indicam uma preparação para o início da fase exponencial de crescimento, em que ocorre um aumento na divisão celular, resultando no maior percentual de crescimento.

Os períodos compreendidos entre o 42^o e 84^o dia de inoculação, os teores de açúcares redutores continuam apresentando redução, porém, de uma forma menos acentuada por um esgotamento natural desses nos tecidos.

Os teores de açúcares redutores do explante e de calos de 'Rubi', obtidos a partir de explantes foliares e nodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, na ausência de luz, são apresentados na Figura 25.

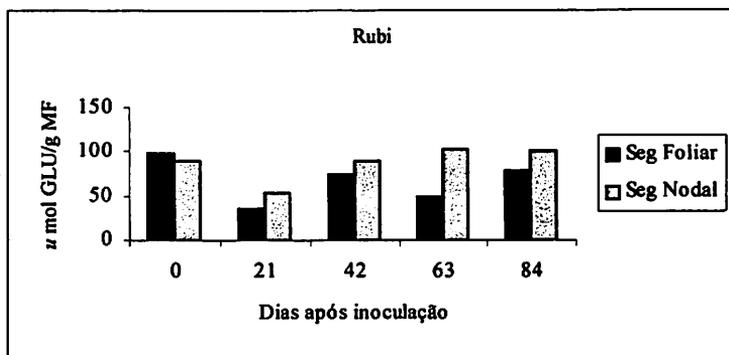


Figura 25. Teores de açúcares redutores do explante e de calos de *Coffea arabica* 'Rubi' formados a partir de segmentos foliares e nodais, inoculados em meio MS, suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D durante 84 dias. UFLA, Lavras/MG, 2001.

Os maiores teores de açúcares redutores foram observados em calos formados a partir do segmento nodal. Observou-se uma redução do teor de açúcares redutores no 21^o dia de inoculação dos calos originados de segmentos foliares e nodais, observando a partir dessa fase um aumento desse teor. Paiva Neto (1996) observou em segmentos foliares de moreira, cultivados em meio MS, acrescidos de $2,88 \mu\text{M}$ de 2,4-D, uma redução nos teores de açúcares redutores, no período que sucedeu a inoculação, seguido de um aumento até o 12 dias após a inoculação e posterior redução até o 30 dia após à inoculação.

Os teores de açúcares redutores do explante e de calos de 'Topázio', obtidos a partir de explantes foliares e nodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, na ausência de luz, são apresentados na Figura 26.

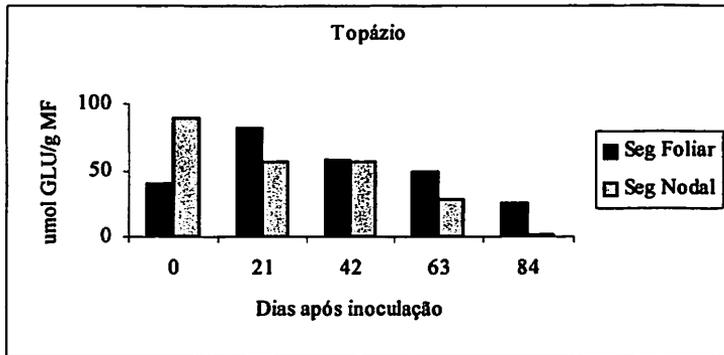


Figura 26. Teores de açúcares redutores do explante e de calos de *Coffea arabica* 'Topázio' formados a partir de segmentos foliares e nodais, inoculados em meio MS, suplementado com 1 mg/L de 2,4-D durante 84 dias. UFLA, Lavras/MG, 2001.

O teor máximo dos açúcares redutores foi observado no dia da inoculação dos explantes nodais, apresentando uma constante redução durante todo o período de avaliação. Esse fato sugere que os explantes não absorvem a fonte de carboidratos (sacarose) presente no meio de cultura, a qual pode assim ser eliminada.

O teor de açúcares redutores atingiu o seu valor máximo em calos formados a partir de segmentos foliares com 21 dias após a inoculação e, posteriormente, apresentou redução durante 84 dias de crescimento. Serra (1999), estudando calos, originados de segmentos foliares de castanha-do-brasil, verificou redução nos teores de açúcares redutores, após à inoculação, possivelmente, para produção de energia a ser utilizada na fase de crescimento.

6.3. Eletroforese da proteína total em gel de poliacrilamida

Diferenças quantitativas (intensidade das bandas) e qualitativas (presença ou ausência de bandas) foram observadas durante o período de desenvolvimento de calos.

Na Figura 27 são apresentados os padrões proteicos da curva de crescimento de calos de 'Apoatã'.

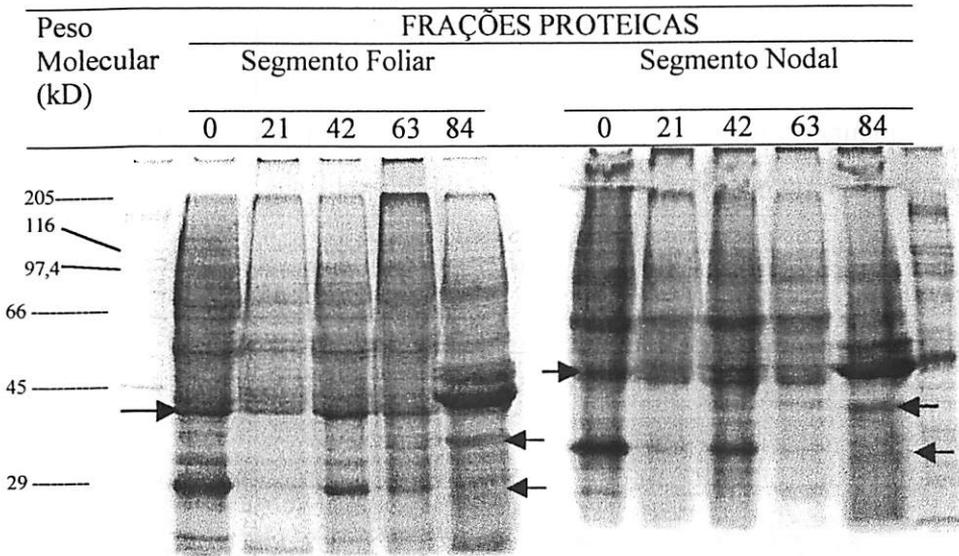


Figura 27. Padrões de eletroforese das proteínas extraídas de explante foliar e nodal e de calos de 'Apoatã', durante 84 dias de crescimento, UFLA/MG, 2001.

Foi observada a presença de polipeptídeos de tamanho, variando entre 29 a 66 kD, nos explantes foliares e nodais em todo período de crescimento dos calos.

Polipeptídeos de peso molecular de 42 kD foi observado em toda a fase de crescimento dos calos originados de explante foliar e nodal, no entanto aos 84 dias após o cultivo, verificou-se maior intensidade da banda.

Aos 84 dias após o cultivo dos calos à partir de segmentos foliares e nodais, observou-se a presença de polipeptídeos com tamanho de 36 kD. Esse período corresponde à fase estacionária na curva de crescimento de calos.

Quando os dois tipos de explantes foram inoculados no meio de cultura, observou-se a presença de polipeptídeos de peso molecular de 31 kD com alta intensidade de banda. Com 21 dias de cultivo, a banda desse polipeptídeo diminuiu de intensidade, para os calos originados nos dois tipos de explantes, apresentando, posteriormente (aos 42 dias de cultivo), um aumento na sua intensidade, a partir do qual a intensidade diminui gradativamente.

Na Figura 28 são apresentados os padrões obtidos por eletroforese de proteínas totais da curva de crescimento de calos da cultivar Rubi.

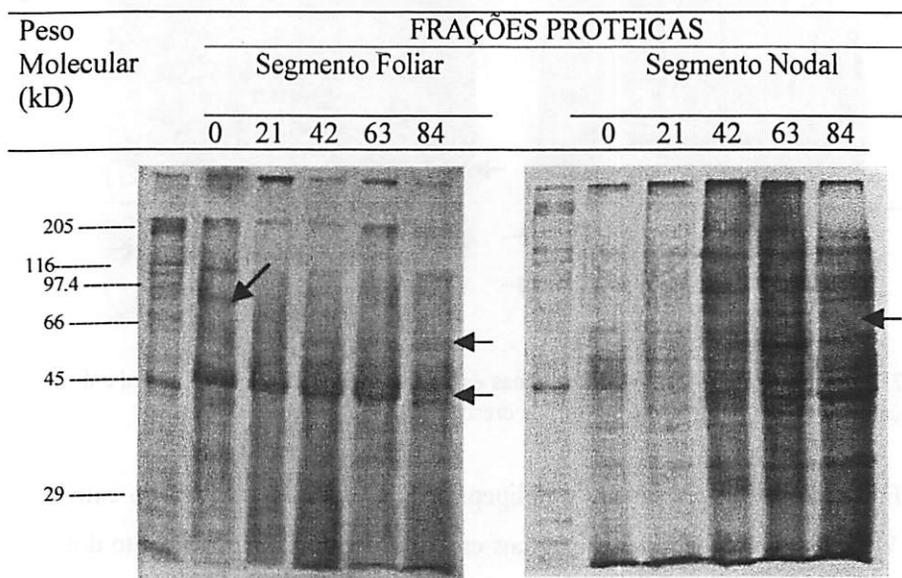


Figura 28. Padrões de eletroforese das proteínas extraídas de segmento foliar e nodal e de calos de 'Rubi', durante 84 dias de crescimento, UFLA/MG, 2001.

Observou-se a presença de polipeptídeos, de peso molecular de 85 kD, apenas no explante foliar, sendo que esses polipeptídeos não foram detectados no calos durante o processo de crescimento. Observou-se ainda bandas com

peso molecular de 60 kD no explante foliar e durante toda a fase de crescimento dos calos. Porém, até os 21 dias de inoculação a intensidade foi baixa. Essa fase corresponde ao término do período Lag na curva de crescimento. Com 42 dias de inoculação, início do período exponencial, essa banda teve um aumento na intensidade. Polipeptídeos de peso molecular de 45 kD apareceram com grande intensidade durante todo o período de crescimento de calos.

Observou-se bandas com peso molecular próximo a 66 kD no explante nodal durante toda a fase de crescimento dos calos. Porém com baixa intensidade até os 21 dias de inoculação e após 42 dias observou-se um aumento na intensidade.

7. CONCLUSÕES

A curva de crescimento de calos, formados a partir de explantes foliares de 'Apoatã', apresenta crescimento tipo sigmóide, com cinco fases distintas e em *C. arabica* 'Rubi' e 'Topázio' com 3 fases de crescimento.

As curvas de crescimento de calos formados a partir de explantes nodais de *C. canephora* 'Apoatã' e *C. arabica* 'Rubi' apresentam um crescimento tipo sigmoide, com cinco fases distintas e em *C. arabica* 'Topázio' com 3 fases de crescimento.

O teores máximos de proteínas totais em calos originados de explante foliar ocorrem com 63 dias de cultivo para 'Apoatã' e originados do segmento nodal com 63 dias para 'Rubi' e entre 42 e 63 dias para 'Apoatã'.

O teores máximos de açúcares redutores em calos originados de explante foliar ocorrem no dia de sua inoculação para 'Apoatã' e 'Rubi' e com 21 dias de cultivo para 'Topázio' e originados do segmento nodal, no dia de sua inoculação, para 'Apoatã' e 'Topázio' e com 63 dias para 'Rubi'.

Diferenças quantitativas (intensidade das bandas) e qualitativas (presença ou ausência de bandas) são observadas entre o período de desenvolvimento de calos de 'Apoatã' e 'Rubi', originados de explante foliar e nodal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1981. 242p.
- AUSUBEL, M. F. et al. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley, 1998. v.3
- CONSTABEL, F.; VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Flórida: Academic Press,. 1989. v. 4, p. 597-614
- GEORGE, E. F.; PUTTOCK, J. M. GEORGE, H. J. **Plant culture media: commentary and analysis**. England: Exegetics, 1988. 420p.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v.227, n.5259, p.680-684, Aug. 1970.
- 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.)**. Lavras: UFLA, 1997. 88p (Tese – Doutorado em Fitotecnia).
- LANDA, F. S. L. **Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.)** Lavras: UFLA, 1999. 73p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- MESQUITA, A. C. **Estabelecimento *in vitro* de lechieira (*Lichi chinensis* Sonn.) através do cultivo de segmentos foliares e nodais e análise bioquímica de calos**. Lavras: UFLA, 1999. 67p (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- MEZZETTI, B.; CONTE, L. S.; ROSATI, P. ***Actinidia deliciosa in vitro*: II. Growth and exogenous carbohydrates utilization by explants**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Berlin, v.26,p.153-160, 1991.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry*, New York, v.31, p.426-428, 1959.
- PAIVA NETO, V. B. de. **Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud)**. Lavras: UFLA, 1996. 33p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).

- PASSOS, L. P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. 233p.
- REMASHIREE, A. B. *In vitro* organogenesis in *Aristolochia indica*. **Phytomorphology**, Delhi, v.47, n.2, p. 161-165, 1997.
- SACCHI, G. A.; MORGUTTI, S.; ABRUZZESE, A. Changes in some physiological and biochemical parameters during two subcultures in kiwi (*Actinidia deliciosa*) callus. **Plant Science**, Berkeley, v.106, n.1, p.107-113. Mar. 1995.
- SANTOS, M. R. A. **Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach**. Lavras: UFLA, 1998 (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- SCRAGG, A. H.; ALLAN, E. J. *Picrasma quassioides* Bennet (Japanese quassia tree): *in vitro* culture and production of quassin. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants IV**. Berlim: Springer-Verlag, , 1993. v.21, p.249-268
- SERRA, A. G. P. **Análise bioquímica de calos e estudo da divergência genética em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**. Lavras: UFLA, 1999. 72p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- SMITH, R.M. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic Press, 1992. 171p.
- YADAV, N. R.; MAHERCHANDANI, N.; YADAV, R. C. Regeneration in tobacco callus and some correlated changes in protein and carbohydrate metabolism. **Crop Improvement**, v.22, n1, p. 1-6, 1995.

CAPÍTULO VII. CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS DO TECIDO FOLIAR DURANTE OS PROCESSOS DE CULTIVO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE *Coffea arabica* e *Coffea canephora*

1. RESUMO

Neste estudo objetivou-se determinar as características anatômicas do tecido foliar, durante os processos de cultivo *in vitro* e *in vivo* de *Coffea arabica* 'Rubi' e *Coffea canephora* 'Apoatã'. Folhas completamente expandidas, de ramos do terço superior de plantas mantidas no campo e de plântulas cultivadas *in vitro*, oriundas da cultura de embriões foram utilizados. As folhas foram fixadas em FAA 70% e conservadas em álcool etílico 70%. Os cortes anatômicos foram efetuados à mão. As estruturas foliares desenvolvidas *in vitro* e *in vivo* apresentaram organizações anatômicas diferentes. Os parênquimas paliádico e lacunoso apresentam-se mais espessos no cultivo *in vivo* em relação ao cultivo *in vitro*. Não é observada a presença de esclerênquima no cultivo *in vivo*. O sistema vascular *in vivo* é mais desenvolvido que o *in vitro*.

2. ABSTRACT

Anatomic characteristics of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* leaf tissues during *in vitro* and *in vivo* plant culture

The objective of this work was to determine the anatomical characteristics of *Coffea arabica* cultivar Rubi and *Coffea canephora* cultivar Apoatã leaf tissues during *in vitro* and *in vivo* plant culture. Fully expanded leaves from the third upper plant part were collected from field cultivated plants and from plantlets obtained through *in vitro* embryo culture. The leaves were fixed in 70% FAA and maintained in 70% alcohol. Anatomical cuts were hand made. Microscopical observations showed that leaf structures developed *in vitro* and *in vivo* presented different anatomical organizations. Palisade and spongy parenchyma are thicker in tissues cultured *in vitro* compared with those *in vivo*. No sclerenchyma is observed on tissues cultivated *in vivo*. The *in vivo* vascular system is more developed than *in vitro*.

3. INTRODUÇÃO

Em geral, o desenvolvimento dos protocolos de micropropagação são centralizados nas taxas de regeneração e multiplicação e pouca atenção tem sido dada à integridade da muda produzida por esse sistema de cultivo.

As condições da cultura de tecidos, embora promovam um aumento na proliferação de brotações e crescimento de plântulas, são antagonistas à formação normal das folhas.

Um número bastante elevado de plântulas micropropagadas não sobrevive, quando transferidas das condições *in vitro* para a casa-de-vegetação ou para o campo. A baixa umidade relativa, alto nível de luz e condições ambientais não assépticas constituem-se em fatores estressantes para as plântulas micropropagadas, quando comparadas às cultivadas *in vivo*. Muitas espécies desenvolvidas *in vitro* requerem um processo de aclimatização em casa-de-vegetação para assegurar que um suficiente número de plântulas sobreviva e cresça quando transferida para o solo.

Alterações na morfologia foliar podem influenciar processos metabólicos e fisiológicos, associados, principalmente, à fotossíntese e transpiração. Muitas dessas evidências indicam que o estado da água e a fase gasosa, durante os vários estágios da cultura, são a chave dos fatores envolvidos na desorganização morfológica *in vitro*. O ambiente de cultivo pode afetar e conduzir a diferentes atividades enzimáticas, resultando em várias mudanças nos processos metabólicos na planta. Algumas respostas, comumente, assemelham-se às de plantas cultivadas sob condições de estresse.



A aclimatização é um dos principais fatores que limitam a produção comercial através de cultura de tecidos. As características das folhas oriundas do cultivo *in vitro*, especialmente no que se refere à sua anatomia, tem reflexo sobre a elevada perda de água, quando da aclimatização.

A avaliação da mudança estrutural que ocorre durante a aclimatização, é um pré-requisito para o desenvolvimento de um eficiente protocolo para plântulas micropropagadas. Portanto, faz-se necessário estudar as mudanças anatômicas de órgãos vegetativos, influenciados pelo ambiente da cultura de tecidos.

O presente trabalho teve como objetivo comparar os aspectos morfológicos e anatômicos de folhas de *Coffea arabica* 'Rubi' e *Coffea canephora* 'Apoatã', em cultivo *in vivo* e *in vitro*.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

A alta umidade relativa do ar, no interior do recipiente de cultivo e a baixa irradiância, são os principais fatores que provocam alterações significativas na estrutura e no funcionamento dos tecidos, levando à incapacidade das mudas produzidas *in vitro*, de controlar a perda de água, quando submetidas às condições adversas do ambiente natural (Sciutti e Morini, 1995). A excessiva perda de água, que contribui para a dessecação das plantas, tem sido atribuída a anormalidades induzidas *in vitro*, como: pobre formação de cêra epicutilar (Sutter, 1988); alteração na composição química das cêras, com o aumento na proporção de componentes hidrofóbicos (Sutter, 1983); deficiência no mecanismo de fechamento estomático (Shackel, Novello e Sutter, 1990); aumento na frequência de estômatos (Lee, Wetzstein e Sommer, 1988); localização mais superficial dos estômatos na epiderme da folha e a presença de hidatódios (Capellades et al., 1990); reduzida diferenciação do mesófilo das

folhas, com alta proporção de espaços intercelulares (Dimassi-Theriou e Bosabalidis, 1997).

A capacidade de alterar a estrutura das folhas, em resposta a diferentes níveis de luz, é um atributo comum das espécies que apresentam amplo potencial de aclimatização (Bjorkman, 1981).

Ostendorf (1962) relata numerosos trabalhos, que abordam o problema da intensidade de radiação solar no cafeeiro em nível agrônomo. Contudo, são poucas as informações referentes a aspectos anatômicos e fisiológicos, em resposta à intensidade de irradiância (Fahl, 1989). Deddeca (1957) descreveu a anatomia e o desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. *typica*. Posteriormente, poucos trabalhos em anatomia têm sido desenvolvidos com essa espécie.

Plantas lenhosas propagadas *in vitro* são freqüentemente afetadas por excessiva presença de fatores do meio de cultura, que conduzem à degeneração metabólica e morfológica. Desordens anatômicas, morfológicas e fisiológicas, nos tecidos de plantas cultivadas *in vitro*, tem sido descritas sob diversas terminologias: vitrificação, translucidez, hiperhidratação, suculência e transparência. A vitrificação é uma mistura desses termos, por se referir a processos físicos e não biológicos, dando uma aparência vitrificada aos explantes. As modificações manifestadas, principalmente, nas folhas, afetam os dois principais processos executados por estas, isto é, a fotossíntese e as trocas gasosas (Deberg e Maene, 1984). As desordens anatômicas são menos extensas no caule e raízes. Essas modificações impedem o estabelecimento *ex vitro* de plantas micropropagadas.

A desorganização no desenvolvimento de meristemas e folhas resulta em plantas frágeis, vitrificadas e hiperhidratadas. Muito do mesofilo não organizado consiste de parênquima esponjoso, rico em espaços intercelulares. Na macieira cultivada *in vivo*, o sistema lacunar estava hiperdesenvolvido, com

volume aumentado em mais de cinco vezes, quando comparado a folhas normais (Pasques e Boxus, 1987). Em *Liquidambar styraciflua* muitos dos cloroplastos não apresentam uma organização normal dos grana no estroma (Wetzstein e Sommer, 1983).

Folhas persistentes de morangueiro tornaram-se mais espessas devido à camada de células paliçádicas (Fabbri, Sutter e Dunston, 1986), entretanto, não ocorre mudança no seu número, ou na quantidade dos espaços do mesofilo. Folhas formadas durante a aclimatização apresentavam várias camadas paliçádicas e, no decorrer do tempo, folhas mais jovens tornaram-se similares àquelas de plantas crescidas no campo. O desenvolvimento de novas folhas, depois da remoção do meio de cultivo, foi considerado como sendo importante para o crescimento vigoroso das plantas. Durante a aclimatização, folhas primordiais *in vitro*, assumiram características intermediárias entre folhas desenvolvidas *in vitro*, e folhas desenvolvidas em casa-de-vegetação e no campo. Apenas novas folhas, que se formam completamente depois da remoção do cultivo *in vitro*, assemelham-se às folhas crescidas em casa-de-vegetação (Grout e Aston, 1978).

A desordem estrutural nas plantas *in vitro*, relacionadas anteriormente, é resultado de complexos e múltiplos fatores no meio de cultura, que induzem à desordem estrutural e funcional das folhas. A consequência é uma baixa taxa de sobrevivência das plantas, quando transferidas para condições *ex vitro*. A compreensão dos vários fatores do meio de cultura é importante e o conhecimento desses pode fornecer informações para o controle da morfogênese de plantas *in vitro*, anteriormente, à transferência para casa-de-vegetação (Short et al., 1985; Ziv, 1988).

5. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras/Lavras, MG.

Folhas completamente expandidas de *Coffea arabica* 'Rubi' e *Coffea canephora* 'Apoatã' foram coletadas ao acaso, de ramos do terço superior de plantas mantidas no campo experimental da Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG e de plântulas cultivadas *in vitro*, oriundas da cultura de embriões durante 5 meses. As folhas foram fixadas em FAA 70% e conservadas em álcool etílico 70%, segundo a metodologia descrita por Johansen (1940).

Os cortes anatômicos foram efetuados à mão, com o auxílio de uma lâmina e inclusão do material em parafina e posterior clarificação em solução de hipoclorito de sódio à 20%, do produto comercial, por um período de 3 a 5 minutos e três lavagens em água destilada. O material foi, em seguida, neutralizado com solução de ácido acético à 1% por um minuto, repetindo-se as lavagens com água destilada (Johansen, 1940; Sass, 1951). A coloração dos cortes anatômicos foi efetuada pelo processo de dupla coloração com safranina-azul de astra (Bukatsh, 1972). Posteriormente, foram montadas lâminas semi-permanentes com água glicerinada, lutagem com esmalte, observação em microscópio e fotomicrografadas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se verificar que em um corte transversal, a epiderme das lâminas, *in vitro* e *in vivo* apresentam-se uniestratificadas, o mesofilo é dorsiventral (com organização do parênquima, no lado dorsal lacunoso e no ventral paliçádico) (Figura 29 e 30). Porém, a organização anatômica dos tecidos *in vitro* é diferente daquelas *in vivo*.

Nota-se, em plântulas micropropagadas da cultivar Rubi (Figura 29A), que o mesofilo apresenta parênquima paliçádico constituído de uma camada de células; o parênquima lacunoso apresenta 5-6 camadas de células.

Nas plantas propagadas no campo, da cultivar Rubi (Figura 29B), o mesofilo apresenta o parênquima lacunoso, constituído de uma camada de células, com uma espessura maior e mais alongadas, em direção perpendicular, células mais organizadas e unidas do que *in vitro*. O parênquima paliçádico apresenta-se com oito camadas de células.

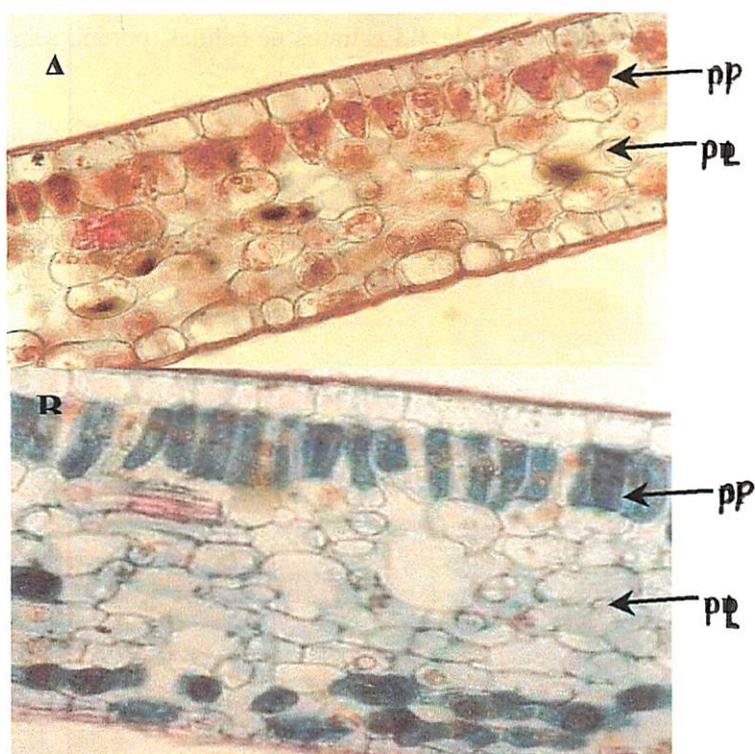


Figura 29. Seção transversal da lâmina foliar de *Coffea arabica* 'Rubi' cultivadas (A) *in vitro* e (B) *in vivo*, evidenciando o parênquima paliçádico (pp) e o parênquima lacunoso (pl). UFLA, Lavras/MG, 2001.

As diferentes condições ambientais *in vivo* e *in vitro* podem ter contribuído para as diferenças observadas na estrutura foliar da cultivar Rubi. As

condições de campo apresentam mais baixa umidade relativa, mais alto nível de luz e condições ambientais não assépticas, quando comparadas às condições *in vitro*.

Em relação ao microcultivo de 'Apoatã' (Figura 30A), o mesofilo apresentou-se com um estrato de parênquima paliçádico, sendo que suas células são mais curtas do que as células *in vivo* e o formato muito semelhante ao do parênquima lacunoso, que mostra-se constituído por 4 estratos. Fidelis (1998), observou que o mesofilo de mama-cadela (*Brosimum guadichaudii* Tréc.) cultivada *in vivo* apresentava de 3-4 estratos de células, porém, sem diferenças no formato.

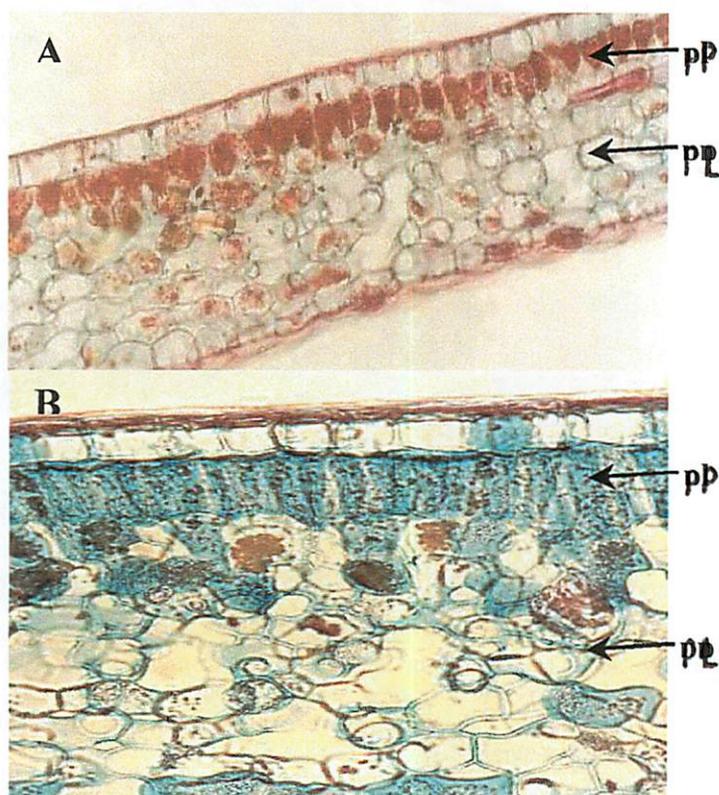


Figura 30. Seção transversal da lâmina foliar de *Coffea canephora* 'Apoatã' cultivadas (A) *in vitro* e (B) *in vivo*, evidenciando o parênquima paliçádico (pp) e o parênquima lacunoso (pl). UFLA, Lavras/MG, 2001.

Para plantas propagadas no campo de 'Apoatã' (Figura 30B), o mesofilo apresentou 1 a 2 estratos de parênquima paliçádico, sendo a sua espessura bem maior do que a verificada *in vitro* e o parênquima lacunoso, constituído de 9 a 10 estratos. Fidelis (1998), estudando mama-cadela cultivada *in vivo*, verificou que o mesofilo apresentava uma camada de células no parênquima paliçádico e duas no parênquima lacunoso.

Para 'Rubi', observou-se na região mediana da nervura central, diferenças no sistema vascular nos dois ambientes de cultivo. Em condições *in vitro* (Figura 31B) observou-se um número bem menor de células nos vasos do xilema, sendo que nas condições *in vivo* (Figura 31A) houve um aumento de células em altura e largura na seção dos feixes vasculares.

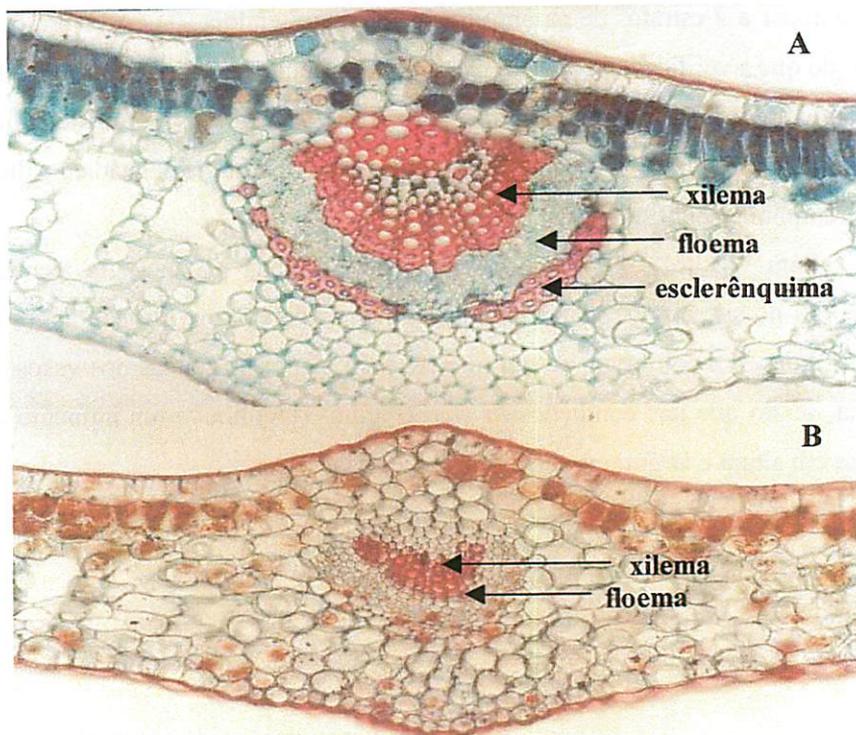


Figura 31. Seção transversal da nervura principal (A) *in vivo* e (B) *in vitro* da cultivar Rubi *C. arabica*. UFLA/MG, Lavras, 2001.

Resultados semelhantes foram obtidos em várias outras espécies. Em folhas de brotos micropropagados de ameixeira constatou-se apenas uma camada de células paliçádicas, com 2 a 3 camadas e um grande espaço de ar no tecido do mesofilo, comparadas às folhas de plantas de casa-de-vegetação ou crescidas no campo (Brainerd e Fuchigami, 1981). Em framboesa (Donnelly e Vidaver, 1984) e morango (Fabbri, Sutter e Duston, 1986) uma camada de células paliçádicas foi formada *in vitro*. Em geral a camada paliçádica foi mais curta e as células careciam de aparência alongada, característica de células paliçádicas em casa-de-vegetação ou crescidas no campo.

James e Newton (1977), também, citam que folhas de soja cultivadas em intensidade de luz mais alta ($850 \mu\text{einsteins.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e à baixa intensidade ($250 \mu\text{einsteins.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) diferiam, significativamente, na anatomia foliar. Folhas desenvolvidas a mais alta intensidade de luz eram mais espessas, apresentando duas camadas de tecido paliçádico. Além de maior espessura do mesofilo, causado pela alongação ou adição de células paliçádicas, notaram-se diferenças nos fatores limitantes da fotossíntese.

Volcan, Fohl e Carelli (1992), estudando a anatomia foliar de cafeeiros submetidos a diferentes intensidades luminosas, observaram que as espessuras dos parênquimas paliçádicos e lacunoso decresceram com aumento do nível de irradiância nas cultivares Mundo Novo, Bourbon-vermelho, Catuaí-Vermelho, Icatu Amarelo e Apotã. Com isso, a menor intensidade luminosa do cultivo *in vitro*, em relação àquela *in vivo* ao campo, podem ter contribuído para as menores espessuras dos parênquimas paliçádicos e lacunoso do cultivo *in vitro* em relação ao *in vivo*.

Não foi observada a presença de esclerênquima, acompanhando os tecidos condutores, em folha de cafeeiro cultivado *in vitro*. Como o esclerênquima possui função de sustentação, observa-se que essas folhas são mais delicadas e flexíveis em comparação ao cultivo *in vivo*.

7. CONCLUSÕES

As estruturas foliares desenvolvidas *in vitro* e *in vivo* apresentaram organizações anatômicas diferentes: os parênquimas paliçádico e lacunoso são mais espessos no cultivo *in vivo*, em relação ao *in vitro*.

Não é observada a presença de esclerênquima no cultivo *in vitro*.

O sistema vascular *in vivo* é mais desenvolvido que o *in vitro*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BJORKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O.L.; NOBEL, P.S.; OSMOND, C.B. ; ZIEGLER, H. (eds). **Encyclopedia of Plant Physiology – Physiological Plant Ecology Ecology I**. New York, Springer-Verlag, 1981, v.12a, p.57-107. (New series)
- BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal American Society Horticulture Science**, Alexandria, v.106, n.4, p.515-518, July 1981.
- BUKATSH, F. Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina. **Microkosmos**, v.61, p.255, 1972.
- CAPELLADES, M.; VANDERSCHAEGHE, A.; LEMUER, R.; DEBERGH, P. How important is photosynthesis in micropropagation? In: SANGWAN R.S.; SANGWAN-NORREEL, B. S. (eds.). **The Impact of Biotechnology in Agriculture**. Kluwer Dordrecht: Academic Publs, 1990.
- DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. Pathological and physiological problems related to *in vivo* culture of plant, **Parasitica**, Gembloux, , v.40, p.69-75. 1984.
- DEDDECA, D. M. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. *typica* Cramer. **Bragantia**, Campinas, 16:315-366, 1957.

- DIMASSI-THERIOU, K. BOSABALIDIS, A.M. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in kiwifruit cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.47, p.127-134, 1997.
- DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil, **Journal of American Society for Horticulture Science**, Alexandria, v.109, n.2, p.172-176, Mar. 1984a.
- FABBRI, A.; SUTTER, E. DUNSTON, S. K. Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured stawberry plants after removal from culture, **Sciencia Horticulture**, Amsterdam, v.28. p.331-337, 1986.
- FAHL, J. I. **Influência da irradiância e do nitrogênio na fotossíntese e crescimento de plantas jovens de café (*Coffea arabica* L.)**. Campinas, UNICAMP, 1989. 84p. (Tese Doutorado Fisiologia Vegetal)
- FIDELIS, I. **Micropropagação de *Brosimum guadichaudii* Tréc. (Mama-Cadela) uma espécie considerada medicinal**. Lavras: UFLA, 1998. 109p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- GROUT, B. W. W.; ASTON, M. J. Modified leaf anatomy of cauleflower plantlets regenerated from meristm culture, **Annal Botany**, London, v.42, p. 993-995, 1978.
- JAMES, D. J. NEWTON, B. Auxin; cytokinin interactions in the *in vitro* micropropagation of strawberry. **Acta Horticulture**, Leuven, n.78, p.321-331, 1977.
- JOHANSEN, B. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Grawn-Hill, 1940. 433 p.
- LEE, N.; WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER H. E. Quantum flux density effects on anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed sweetgum leaves. **Journal of The American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.113, n.1, p.167-171, 1988.
- OSTENDORF, F. W. The Coffee shade problem. A review article. **Tropical abstract**, amsterdam, v.17, 577-581, 1962.
- PASQUES, P. S.; BOXUS, P. Vitrification: a phenomenon related to tissue water content, **Acta Horticulture**, Leuven, v.212, p.245-252, 1987.

SASS, J. **Botanical microtechnique** – Iowa: Iowa College Press, 1951. 228p.

SCIUTTI, 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.10, n.2, p.221-228, 1995.

SHACKEL, K. A.; NOVELLO, V.; SUTTER, E. G. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. **Journal of The American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, n.3, p.468-472, 1990.

SHORT, K. C.; WARDLE, K.; GROUT, B. W. W.; SIMPKINS, I. *In vivo* physiology and acclimatization of aseptically cultured plantlets. In: NOVAK, F.J.; HAVEL, T.; DOLEZEL, K. (eds.) **Proc Intl Symp Plant Tissue Culture Application for Crop Improvement**. Olomouc: Czechoslovakia, 1985. p.475-486.

SUTTER, E. G. Chemical composition of epicuticular wax in cabbage plants grown *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.62, p.74-77, 1983.

SUTTER, E.G. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of The American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.113, n.2, p.234-238, 1988.

VOLTAN, R. B. Q.; FAHL, J.I.; CARELLI, M. L. C. Variação na anatomia foliar de cafeeiros submetidos a diferentes intensidades luminosas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.4,n.2, p. 99-105, 1992.

WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Scanning electron microscopy of *in vivo* – cultures *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization, **Journal American Society Horticulture Science**, Alexandria, v.108, n.3, p.475-480, May 1983.

ZIV, M. ARIEL, T. The relationship between cell wall deformity and stomatal malfunction in the leaves of carnation *in vivo*. In: **Proc Intl Soc Plant Molecular Biol**, Congress, Jerusalem: 425, 1988.