

HISTOLOGIA DE CALOS PROVENIENTES DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Coffea arabica* L. – Embrapa Café¹

Patrícia Monah Cunha Bartos², Hugo Teixeira Gomes³, Allan Laid⁴, Sueli Maria Gomes⁵, João Batista Teixeira⁶

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café

² Estudante, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade de Brasília, monah.alice@gmail.com

³ Estudante, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade de Brasília, hugotgomes@hotmail.com

⁴ Estudante, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade de Brasília, allanlaid@gmail.com

⁵ Professora, Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, smgomes@unb.br

⁶ Pesquisador, Embrapa Cenargen, batista@cenargen.com.br

RESUMO: O objetivo do presente trabalho foi comparar a anatomia dos calos primários tipo 1 (de crescimento não persistente) e tipo 2 (de crescimento persistente), e dos calos embriogênicos, oriundos de explantes foliares de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Vermelho. Para tanto, os três tipos de calos foram fixados em FAA (formalina, ácido acético, álcool etílico), desidratados em série etanólica crescente, infiltrados em historresina e cortados em micrótomo rotativo. As secções foram coradas em azul de toluidina e os resultados foram registrados através de fotomicroscópio com sistema de captura de imagens. Verificou-se que os calos primários têm células maiores do que os embriogênicos, sendo que o tipo 1, com células de 39 a 48 µm de diâmetro, apresenta células parenquimáticas com paredes mais espessas (cerca de 3,1 µm), enquanto os do tipo 2 possuem células parenquimáticas alongadas (com 101 a 165 µm de diâmetro), espaços intercelulares mais amplos e 1,9 µm de espessura de parede celular. O calo embriogênico mostrou-se com regiões meristemáticas bem definidas, com células pequenas (de 15 a 25 µm de diâmetro), isodiamétricas, citoplasma denso e reduzido, paredes celulares mais estreitas (aproximadamente 0,9 µm), núcleo evidente e intensa divisão celular. A linearização das células em algumas regiões no calo embriogênico sugere a organização celular envolvida no processo de formação de embriões. Esta análise permitiu esclarecer anatomicamente as diferenças morfológicas entre os três tipos de calos.

Palavras-Chave: *Coffea arabica*; calos; anatomia.

HISTOLOGY OF THE CALLUS FROM SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *Coffea arabica* L. - Embrapa Café

ABSTRACT: The objective of the present work was to compare the anatomy of the type 1 primary callus (with no persistent growth), type 2 primary callus (with persistent growth), and embryogenic callus derived from *Coffea arabica* leaf explant, 'Catuaí Vermelho' cultivar. For this purpose the three types of calli were fixed in FAA solution (formalin, acetic acid, ethanol), dehydrated in an increasing ethanolic series, infiltrated by hystoresin and sectioned with the rotary microtome. The sections were stained with toluidine blue, and the results registered by a photomicroscope with image capture system. Cells from primary calli were bigger than embryogenic cells. The cells from type 1 primary calli present parenchymatic characteristics with thicker cell walls, while those from type 2 primary calli have bigger intercellular spaces. The embryogenic callus showed well defined regions with smaller isodiametric cells, with dense cytoplasm, prominent nuclei and intense cell division. The linear arrangement of embryogenic cells in some regions of the embryogenic calli may suggest the cell organization toward embryo regeneration. The present analysis has clarified the morphological differences between the three types of calli.

Key words: *Coffea arabica*; callus, anatomy.

INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma atividade de grande expressão no cenário agroindustrial brasileiro, colocando o Brasil como o maior produtor e maior exportador de café do mundo. Dentre as espécies produtoras de café, *Coffea arabica* (Rubiaceae) é responsável por 70% de todo o café produzido e comercializado no mundo. Esta espécie é uma planta perene de porte arbustivo, produtora de frutos do tipo drupa, contendo normalmente duas sementes que constituem seu produto econômico (Santos *et al.*, 2003).

O sucesso dos programas de melhoramento genético do cafeeiro tem colocado à disposição dos cafeicultores cultivares mais adaptadas, produtivas, resistentes e que procuram atender às demandas dos consumidores. Entretanto o melhoramento genético do cafeeiro por métodos convencionais é um processo demorado, podendo levar mais de trinta anos para se obter uma nova cultivar. Dessa forma a propagação clonal da espécie é fundamental para possibilitar uma rápida difusão de novos genótipos de interesse (Pereira *et al.*, 2003).

A embriogênese somática é definida como o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios, dando origem a uma planta sem que ocorra a fusão de gametas, possibilitando a propagação acelerada de híbridos superiores (Pereira *et al.*, 2007).

Segundo Donato *et al.* (2000), a embriogênese somática *in vitro* apresenta dois padrões básicos de desenvolvimento de embriões: direto, na qual os embriões somáticos originam-se diretamente dos tecidos matrizes sem a passagem por estádios intermediários de calos; e indireto, na qual os embriões somáticos se formam a partir de calos primários, que são constituídos por uma massa de células com crescimento desorganizado.

Na embriogênese somática indireta do café, diferentes tipos de calos podem ser obtidos, que são os calos primários de crescimento não persistente (tipo 1), os calos primários de crescimento persistente (tipo 2) e os calos embriogênicos. Estes tipos de calos são fenotipicamente diferentes.

O calo primário tipo 1 tem início após duas a três semanas de cultivo no meio primário – PM (Teixeira *et al.*, 2004), forma-se em grânulos nos bordos do segmento de folha e permanece em crescimento ativo por mais algumas semanas no meio secundário – SM (Teixeira *et al.*, 2004). Inicialmente, apresenta coloração clara e crescimento ativo. Entretanto, após aproximadamente dois meses de cultivo no meio SM, observa-se um escurecimento gradativo e redução do crescimento.

Por sua vez, o calo primário tipo 2, embora tenha origem parecida ao calo primário tipo 1, apresenta coloração clara e crescimento persistente, mesmo após três a quatro meses de cultivo no meio SM.

O calo embriogênico tem origem basicamente a partir do calo primário tipo 1, após três a quatro meses de cultivo do segmento de folha no meio SM, apresenta coloração amarela intensa e constituição friável.

A anatomia vegetal é o ramo da botânica que estuda as estruturas internas do corpo das plantas, permitindo a descrição de células, tecidos e órgãos quanto a sua ontogênese, constituição e função. Diante disso, a anatomia vegetal pode auxiliar na compreensão de diversos fenômenos relacionados aos organismos vegetais, dentre os quais a embriogênese somática (Rodrigues *et al.*, 2004).

Diante desse contexto, o objetivo do trabalho foi o de comparar, por análises histológicas, calos primários tipo 1 e 2 e calos embriogênicos de *Coffea arabica*, cultivar Catuaí Vermelho.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade de Brasília e no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situados em Brasília-DF, durante setembro de 2010 e fevereiro de 2011.

Os estudos anatômicos foram realizados em amostras de calo primário tipo 1, calo primário tipo 2 e calo embriogênico, provenientes de explantes foliares de aproximadamente 1 cm² de *Coffea arabica*, cultivar Catuaí Vermelho, após um mês de cultivo no meio primário – PM (Teixeira *et al.*, 2004), seguido de quatro meses de cultivo no meio secundário – SM (Teixeira *et al.*, 2004). O meio básico utilizado foi o de MS (Murashige & Skoog, 1962) reduzido pela metade da concentração original, 10 mg.L⁻¹ de tiamina, 1 mg.L⁻¹ de piridoxina, 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico, 1 mg.L⁻¹ de glicina, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 100 mg.L⁻¹ de caseína, 400 mg.L⁻¹ de extrato de malte. Para o meio primário – PM, foram adicionados 20,0 µM de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), 9,84 µM de 6-dimetil-alil-amino-purina (2-iP), 4,92 µM de ácido indol butírico (IBA), 20g.L⁻¹ de sacarose e 2,4 g.L⁻¹ de phytigel. O meio secundário – SM foi igual ao meio primeiro – PM, exceto no que diz respeito à concentração de 2,4-D, a qual foi reduzida pela metade.

Para a realização do estudo histológico, as amostras foram fixadas por um período mínimo de 24 h em FAA 50 (formaldeído 37-40%, ácido acético glacial e álcool etílico 50% 1:1:18, v/v) sob vácuo (Johansen, 1940), lavadas duas vezes e estocadas em etanol 50%. As amostras foram desidratadas em série etílica crescente e infiltradas em historresina (Leica®). Secções com 5 µm de espessura média foram obtidas em micrótomo rotativo manual Leica®, distendidas sobre água em uma lâmina de vidro, sobre placa aquecedora a 40°C. Os cortes foram corados com azul de toluidina 0,5% e analisados sob microscópio óptico. O registro dos resultados foi feito em fotomicroscópio com sistema de captura de imagens (Zeiss Axioskop).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra as diferenças na morfologia externa e na histologia dos três tipos de calos estudados.

Os calos primários tipo 1 (Figura 1A) são compactos, de cor levemente amarelada a creme, aquosos, com crescimento regular, podendo ou não dar origem a calos embriogênicos. Nos cortes histológicos (Figura 1B), foram observadas células parenquimáticas grandes, com 39 a 48 µm de diâmetro, vacuoladas, algumas das quais estavam em processo mitótico, indicando a multiplicação celular. Os espaços intercelulares são reduzidos e a parede celular é mais espessa (cerca de 3,1 µm) do que nas células dos demais tipos de calos.

Os calos primários tipo 2 (Figura 1C) têm aspecto compacto, aquoso, esbranquiçado, com crescimento desordenado e excessivo. Devido a esse tipo de desenvolvimento excessivo o mesmo podendo competir diretamente com o surgimento e estabelecimento de calos embriogênicos, essenciais para a regeneração de embriões. Anatomicamente, estes calos possuem células parenquimáticas alongadas, com 101 a 165 µm de diâmetro, com amplos

espaços intercelulares, 1,9 μm de espessura de parece celular e vacúolo bem desenvolvido (Figura 1D). Apresentam processo de multiplicação intenso, o que justifica seu crescimento demasiado. Foi observado por Pádua *et al.* (2010), em análise ultraestrutural de calos primários tipo 2 de *Coffea arabica* cv Catiguá, onde foi observada a presença de vacúolo autofágico ocupando toda a célula, presença de vesículas, espaço intercelular marcante e a ausência se outras organelas citoplasmáticas.

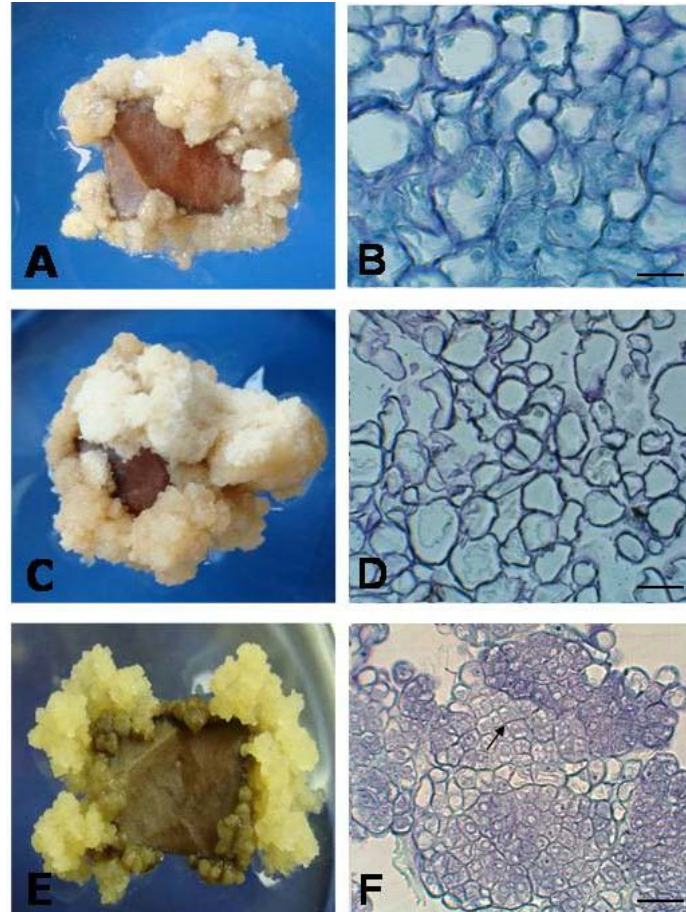


Figura 1. Aspectos morfológicos (A, C, E) e anômicos (B, D, F) dos calos primários tipo 1 (A-B) e tipo 2 (C-D) e dos calos embriogênicos (E-F): variação na cor dos calos e nas características de suas células constituintes; notar região com linearização das células (F, seta). Escalas: (B=25 μm ; D=100 μm ; F=50 μm).

Já os calos embriogênicos são friáveis, de coloração amarelo intenso, com crescimento reduzido (Figura 1E). Nas secções anômicas, foram observadas regiões meristemáticas com células pequenas, com 15 a 25 μm de diâmetro, isodiamétricas, com citoplasma denso, paredes celulares mais estreitas (aproximadamente 0,9 μm) e núcleo evidente. Várias células apresentaram dois núcleos num mesmo citoplasma, evidenciando a citocinese ainda não concluída no processo de divisão celular. Em algumas regiões, constatou-se o início da linearização das células, o que sugere a organização celular envolvida no processo de formação de embriões (Figura 1F, seta). O mesmo foi observado por Menéndez & Garcia (1997) em *Coffea arabica* cv "Catimor", por Pádua *et al.* (2010), com calos embriogênicos de *Coffea arabica* cv Catiguá, por Menéndez-Yuffá & de Garcia (1997) e por Nogueira *et al.* (2007), na análise ultraestrutural de calos embriogênicos de *Byrsonima intermédia*. Utilizando ANA (ácido naftaleno acético) para a indução dos calos embriogênicos de *Carya illinoensis*, Tomes (1985) também verificou nestes calos uma morfologia celular isodiamétrica. Segundo Appezato-da-Glória (2003), tal formato é característico de células meristemáticas.

CONCLUSÕES

Calos primários tipo 1, tipo 2 são anatomicamente distintos e calos embriogênicos apresentam células tipicamente meristemáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa - Editora UFV, 438p., 2003.
- DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; CABRAL, J. B.; ALVES, G. D. Embriogênese somática *in vitro* em couve-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.4, p.711-718, 2000.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill, New York, 1940.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- MENÉNDEZ-YUFFÁ, A, DE GARCIA, E. G.; Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "Catimor". **Protoplasma**, 199:208-214, 1997.
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; PORTO, J. M. P.; NICIOLI, P. M.; STEIN, V. C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.48-50, 2007.
- PÁDUA, M. S.; LIVRAMENTO, K. G.; PAIVA, L. V.; CASTRO, A. H. F.; ALVES, E. Comparação de características embriogênicas e não embriogênicas de calos de *Coffea arabica* cv Catiguá. CONGRESSO BRASILEIRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 19., Lavras, 2010.
- PEREIRA, A. R.; CARVALHO, S. P.; PASQUAL, M.; SANTOS, F. C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaia Cerrado: efeito de citocinina e ácido giberélico. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.31, n.2, p.332-336, 2007.
- PEREIRA, A. R.; PASQUAL, M.; CHAGAS, E. A.; FRÁGUAS, C. B.; DUTRA, L. F. Indução de embriões somáticos globulares e cordiformes de cafeeiro por BAP e sacarose. **Scientia Agraria**, v.4, n.1-2, p.77-80, 2003.
- RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.2, n.3-4, p.159-167, 2004.
- SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar Rubi. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.27, n.3, p.571-577, 2003.
- TEIXEIRA, J.B.; JUNQUEIRA, C.S.; PEREIRA, A.J.P.da C.; MELLO, R.I.S.; SILVA, A.P.D. & MUNDIM, D.A. Multiplicação clonal de café (*Coffea arábica* L.) via embriogênese somática. Brasília: Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39p. (Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, n. 121).
- TOMES, D. T. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. In: BRIGHT, S. W.; JONES, M. G. K. (Ed.) **Advances in agricultural biotechnology, cereal tissue and cell culture**. Boston, p.175-203, 1985.