

# ANÁLISE HISTOLÓGICA COMPARATIVA DA INDUÇÃO DE CALOS EM GENÓTIPOS DE *Coffea*

Wellington M. BARBOSA<sup>2</sup> E-mail: wbarbosa@hotmail.com, Renata M. S. A. MEIRA<sup>3</sup>, Antônio T. CORDEIRO<sup>3</sup>, Wagner C. OTONI<sup>3</sup> e Ney S. SAKIYAMA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Parte do trabalho de tese de D.S. do 1º autor no Deptº de Fitotecnia/UFV, <sup>2</sup>Bolsista Embrapa/café-Incaper, <sup>3</sup>Deptº Biologia Vegetal/UFV, <sup>4</sup>Deptº Fitotecnia/UFV.

## Resumo:

Neste trabalho foram avaliados os genótipos Catimor (híbrido UFV 395-141) e o cultivar Apoatã (*C. canephora*). A reação calogênica em explantes foliares de *C. canephora* cv. Apoatã foi induzida em cultivo unifásico com BAP como regulador de crescimento. Para o genótipo Catimor utilizou-se o sistema bifásico com citocinina e auxina. Foram confeccionadas lâminas de amostras dos explantes foliares que, depois de coletados e fixados foram incluídos em metacrilato, cortados em micrótomo rotativo, corados com azul de toluidina e submetidos aos testes histoquímicos para detecção de polissacarídeos neutros (P.A.S. – “Periodic Acid Schiff”) e de proteína (XP – “Xylidine Ponceau”). Sugere-se que as diferenças na resposta dos explantes a diferentes condições indutoras possam ser utilizadas como marcadores estruturais para seleção de cultivos de explantes potencialmente embriogênicos.

Palavras-chave: *Coffea* sp., embriogênese somática, análise estrutural, testes histoquímicos.

## COMPARATIVE HISTOLOGICAL ANALYSIS OF CALLUS INDUCTION IN *Coffea* GENOTYPES

### Abstract:

The genotypes Catimor (hybrid UFV 395-141) and Apoatã (*C. canephora*) were evaluated in this work. Callogenesis in leaf explants of *C. canephora* cv. Apoatã was induced by means of a monophasic culture with BAP as growth regulator. A biphasic system with cytokinin and auxin was used for the genotype Catimor. Slides were prepared from leaf explant samples, which were collected, fixed, embedded in historesin glycolmetacrylate, cut in a rotatory microtome, stained with toluidine blue and submitted to histochemical tests for starch (P.A.S. – “Periodic Acid Schiff”) and protein (XP – “Xylidine Ponceau”) detection. It may be suggested that the differences in the response of the explants to diverse inducer conditions could be used as structural markers to select potentially embryogenic explants cultures.

Key words: *Coffea* sp., somatic embryogenesis, structural analysis, histochemical tests.

### Introdução

O primeiro estudo histológico da embriogênese somática em calo de *Coffea arabica* utilizando explantes foliares descreveu que a proliferação dos calos é originada das células do mesofilo lacunoso, e que calos embriogênicos de alta e de baixa frequência originam-se de rotas alternativas de desenvolvimento (Söndahl et al., 1979a). A embriogênese de baixa frequência (embriogênese direta) ocorre a partir da diferenciação de algumas células localizadas nas bordas do explante. Já a embriogênese de alta frequência origina-se a partir da redeterminação de células diferenciadas, da proliferação de calos e da indução de células embriogênicas determinadas, dependente da ação de reguladores de crescimento para a retomada da atividade mitótica e para a determinação do estado embriogênico. Michaux-Ferriere et al. (1989) observaram que dois grupos de células embriogênicas aparecem sucessivamente no calo – um com células maiores, altamente vacuolizadas, e outro com células menores, isodiamétricas, com núcleo proeminente e citoplasma denso. As divisões celulares que resultariam na formação do calo têm início nas células perivasculares (Michaux-Ferriere et al., 1987; Bieysse et al., 1993).

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

Em *C. canephora*, Berthouly e Michaux-Ferriere (1996), utilizando sistema bifásico de cultivo, relataram que a indução das células embriogênicas correspondia à desdiferenciação celular que ocorreu durante a segunda fase de cultivo. O potencial embriogênico das células mostrou ser expresso por um curto período de tempo, dependendo das condições de cultura e estado fisiológico da célula. A presença de proteínas de reserva também foi relatada como sendo essencial para a formação do tecido embriogênico.

Vários autores (Michaux-Ferriere et al., 1989; Zamarripa, 1991; Bieysse et al., 1993; Berthouly e Michaux-Ferriere, 1996; van Boxtel e Berthouly, 1996; Cordeiro, 1999) relataram que a resposta à indução da embriogênese somática no cafeeiro é genótipo-específica, sendo maior para os genótipos da espécie *C. canephora* em relação aos de *C.*

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

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

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

## Material e Métodos

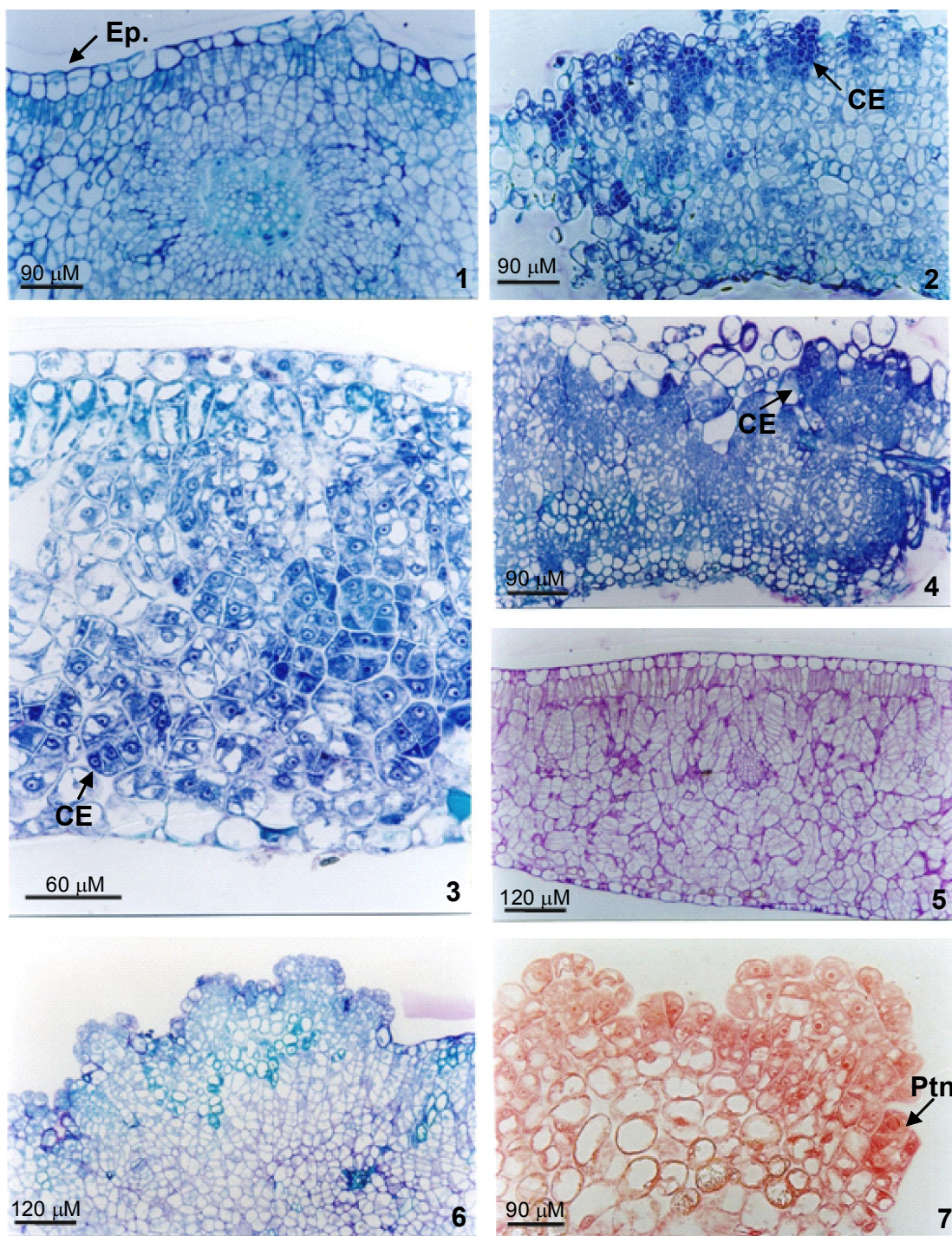
Os genótipos utilizados para o desenvolvimento desse trabalho foram o híbrido UFV 395-141 (Catimor geração F<sub>3</sub>) e o cultivar Apoatã (*C. canephora*). A indução calogênica do cultivar Apoatã foi feita utilizando cultivo unifásico apenas com 5 µM de BAP – meio B (Yasuda et al., 1985). Para o genótipo Catimor UFV 395-141 foram realizadas duas seqüências de meios no sistema bifásico de cultivo, utilizando-se apenas BAP (22 e 5 µM) para a primeira – meio M3 (Cordeiro, 1999) e 4,5 µM de 2,4-D + 18,6 µM de KIN e 0,54 µM de ANA + 4,6 µM de KIN para a segunda seqüência de meios – Meio MSI (Noriega e Söndahl, 1993). Os explantes foram coletados ao longo do tempo de indução, fixados em FAA<sub>50</sub> e armazenadas em etanol 70%. Amostras foram incluídas em metacrilato (HISTORESIN, LEICA) e cortadas com 5 µm de espessura em micrótomo rotativo. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina e submetidos aos testes histoquímicos para detecção de amido (P.A.S. – “Periodic Acid Schiff”) e de proteína (XP – “Xylidine Ponceau”).

## Resultados e Discussão

Calos embriogênicos e calos embriogênicos friáveis foram formados apenas no genótipo Apoatã. No genótipo Catimor UFV 395-141, cultivado apenas com citocinina, houve a formação de calos embriogênicos, enquanto que aquele cultivado com auxina e citocinina houve a formação de calos mistos (não embriogênicos). A primeira modificação estrutural visualizada nas células dos explantes em cultivo foi o aumento do volume celular do parênquima lacunoso. Este aumento não foi observado nas células do parênquima paliçádico nem da epiderme. Tal fato pode ser atribuído à organização destes tecidos que apresentam espaços intercelulares insuficientes ao aumento celular. A proliferação do calo a partir de células do parênquima lacunoso parece ser comum. Söndahl et al. (1979b) e Menéndez-Yuffá e García (1997) relataram que a proliferação do calo se origina a partir destas células.

Já as células perivasculares são as primeiras que iniciam o processo de divisão celular. A presença de amidos e de proteínas foi verificada nestas células em divisão. O início de divisão celular nas células perivasculares já foi relatado por vários autores (Michaux-Ferriere et al., 1987, 1989; Berthouly e Michaux-Ferriere, 1996; Bieysse et al., 1993). Como as células perivasculares são menos diferenciadas a reação ocorre mais rapidamente em função da indução pelos reguladores de crescimento.

No 6º dia de cultivo, divisões unidirecionais nas células do parênquima paliçádico foram verificadas apenas no genótipo Catimor UFV 395-141 cultivado com auxina e citocinina. Nestas condições de cultivo, a intensidade de divisão celular e a desorganização do mesofilo são maiores. Tal fato também foi relatado por Nakamura et al. (1992), que verificaram um crescimento mais lento do calo cultivado apenas com citocinina, em relação ao cultivado com auxina e citocinina. Nos genótipos Catimor UFV 395-141 e Apoatã, cultivados apenas com citocininas, observou-se um dimorfismo nas células que formam o calo - o primeiro com células maiores, vacuolizadas e sem reservas (amido e proteína), e outro formando grupos de células com características meristemáticas, menores, isodiamétricas, com pequenos grânulos de amido, núcleo proeminente e citoplasma denso, com grande quantidade de proteína – as quais são denominadas células embriogênicas (Figuras 1 a 4). Estas células são responsáveis pela formação dos pré-embriões. No genótipo arábica, cultivado em meio com 2,4-D e KIN, observou-se que as divisões celulares foram unidirecionais (Figura 5), sendo que as células apresentaram características meristemáticas, limitadas apenas nas extremidades do calo. Também se apresentaram com tamanhos semelhantes às demais células que formam o calo e não formaram estruturas organizadas em grupos de células, advindas de divisões periclinais e anticlinais (Figuras 6 e 7). As características citadas quanto às divisões em um mesmo plano (unidirecionais) e em maior intensidade, observadas no cultivo do genótipo Catimor UFV 395-141 em meio MSI, pode ser útil na seleção de meios indutores para culturas não embriogênicas, devendo ser confirmada em estudos posteriores. A utilização de marcadores para selecionar condições potencialmente indutoras de embriões no início do cultivo seria de grande importância, principalmente para a indução de genótipos arábicas. Nesta espécie, a indução de calos embriogênicos e friáveis, do tipo alta frequência, pode levar de quatro (Söndahl et al., 1979b; van Boxtel, 1994) a oito meses de cultivo (Cordeiro, 1999).



Figuras 1 a 7 – Secções transversais de folhas cultivadas *in vitro* do genótipo Catimor UFV 395-141 e do *C. canephora* cv. Apoatã. **1:** Apoatã no 10º dia de cultivo no meio B, corado com Azul de Toluidina. Ep: epiderme. **2:** Apoatã no 15º dia de cultivo no meio B, corado com Azul de Toluidina. CE: células embriogênicas. **3 e 4:** Catimor UFV 396-141, respectivamente no 10º e 15º dia de cultivo em meio M3, corado com Azul de Toluidina. CE: células embriogênicas. **5:** Catimor UFV 395-141 no 10º dia de cultivo no meio MSI, submetido ao teste histoquímico P.A.S. **6:** Catimor UFV 395-141 no 15º dia de cultivo no meio MSI, corado com Azul de Toluidina. **7:** Catimor UFV 395-141 no 15º dia de cultivo no meio MSI, submetido ao teste histoquímico XP. Ptn: proteína.

## Referências bibliográficas

- BERTHOULY, M., MICHAUX-FERRIERE, N. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 44, p. 169-176, 1996.
- BIEYSSE, C., GOFFLOT, A., MICHAUX-FERRIERE, N. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Can. J. Bot.**, v. 71, p. 1496-1502, 1993.
- CORDEIRO, A. T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplastos em Coffea**. Viçosa, Minas Gerais, Universidade federal de Viçosa. Dissertação de Doutorado. 111 p. 1999.
- MENÉNDEZ-YUFFÁ, A., GARCÍA, E. G., NIETO, M. S. Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv. Catimor. **Plant Cell Rep.**, v. 13, p.197-202, 1994.
- MENÉNDEZ-YUFFÁ, A., GARCÍA, E. G. Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "Catimor". **Protoplasma**, v. 199, p. 208-214, 1997.
- MICHAUX-FERRIERE, N., DUBLIN, P.S., SCHWENDIMAN, J. Etude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explantés foliaires de *Coffea arabica* L. **Café Cacao Thé.**, v. 31, p. 103-111, 1987.
- MICHAUX-FERRIERE, N., BIEYSSE, D., ALVARD, D., DUBLIN, P. Étude histologique de l'embryogenèse somatique chez *Coffea arabica*, induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de génotypes différents. **Café Cacao Thé.**, v. 33, p. 207-217, 1989.
- NAKAMURA, T., TANIGUCHI, T., MAEDA, E. Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. **Jpn. J. Crop Sci.**, v. 61, n. 3, p. 476-486, 1992.
- NORIEGA, C., SONDAHL, M. R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. **Colloque Scientifique International sur le Café**, 15, Montpellier. ASIC (Paris), p. 73-81, 1993.
- SANTOS, A. C. P. **Embriogênese somática indireta em genótipos de Coffea arabica e de C. canephora**. Viçosa, Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Doutorado. 90 p. 2002.
- SÖNDAHL, M.R.; SALISBURY, J.L.; SHARP, W.R. SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 94, p. 185-188, 1979a.
- SÖNDAHL, M.R., SPAHLINGER, D.A., SHARP, W.R. A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 94, p. 101-108, 1979b.
- TAHARA, M., NAKANISHI, T., YASUDA, T., YAMAGUCHI, T. Histological and biological aspects in somatic embryogenesis of *Coffea arabica*. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 16, 1995. **Annales...** Kyoto: ASIC, 1995. p.860-867.
- van BOXTEL, J.H.J. **Studies on genetic transformation of coffee by using electroporation and the biolistic method**. Wageningen: [s.n.], 1994. 125 f. Thesis (Ph.D.).
- van BOXTEL, J., BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 44, p. 7-17, 1996.
- YASUDA, T., FUJII, Y., YAMAGUCHI, T. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. **Plant Cell Physiol.**, v. 26, p. 595-597, 1985.
- ZAMARRIPA, A., DUCOS, J. P., BOLLON, H., DUFOUR, M., PETIARD, V. Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. **Café Cacao Thé**, v. 35, p. 233-244, 1991.