

ANTÔNIO TEIXEIRA CORDEIRO

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA E FUSÃO INTERESPECÍFICA  
DE PROTOPLASTOS EM *Coffea***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
FEVEREIRO - 1999

ANTÔNIO TEIXEIRA CORDEIRO

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA E FUSÃO INTERESPECÍFICA  
DE PROTOPLASTOS EM *Coffea***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do curso de Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 1 de outubro de 1998.

---

Prof. Wagner Campos Otoni

---

Prof. Alemar Braga Rena

---

Prof. Paulo Roberto Mosquim  
(Conselheiro)

---

Prof. Vincent Pétiard  
(Conselheiro)

---

Prof. Laércio Zambolim  
(Orientador)

A Deus.

A Nossa Senhora,

intercessora sempre presente

nesta nossa caminhada.

## AGRADECIMENTO

A Deus, pela fé e ínfima percepção da Sua criação.

À minha esposa, Bernadette, e aos meus filhos, Rodrigo e Rafael, pela abnegação e pelo carinho e incentivo durante todas as etapas do curso.

Aos meus pais, pela força moral e pelo apoio incondicional.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar este curso.

À Nestlé, pela oportunidade de realizar a pesquisa em seu Centro de Pesquisa Biotecnológica de Tours - França, durante dois anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores Laércio Zambolim, Moacyr Maestri e Alemar Braga Rena, pela amizade e orientação.

Ao diretor do Centro de Pesquisa da Nestlé - França, Prof. Vincent Pétiard, e aos pesquisadores Hélène Bollon, Alain Deshayes, Bruno Florin, Jean-Paul Ducos e Jérôme Spiral, pelas valiosas sugestões.

Aos professores Paulo Roberto Mosquim e Wagner Campos Otoni, pelo apoio e pelas valiosas sugestões.

Aos professores Eldo Monteiro da Silva, Everaldo Gonçalves de Barros e Maurílio Alves Moreira, pelo incentivo.

Aos professores do curso de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos.

A todos os funcionários do Centro de Pesquisa da Nestlé - Tours, que tornaram extremamente agradável e saudosa a nossa estada na França.

Às famílias Adair Regazzi, Antônio Alves Pereira, Charbel Gibrin, José Carlos Baffa, José Déulio Coutinho, Marcelo Ribeiro, Marco Aurélio Pedron e Silva e Reinaldo Cantaruti, pelos inesquecíveis apoio e amizade.

Aos colegas do curso de Pós-graduação, pela amizade e alegre convivência.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, pela amizade e apoio.

Às famílias dos meus irmãos e cunhados, e ao meu sogro, pelo apoio e pela amizade constantes.

## **BIOGRAFIA**

ANTÔNIO TEIXEIRA CORDEIRO, filho de Raymundo Hugo Malcher Cordeiro e Angélica Teixeira Cordeiro, nasceu em São João del-Rei, Estado de Minas Gerais, aos 23 dias de novembro de 1950.

Em 1974 ingressou na Universidade Federal de Viçosa, onde graduou-se em Engenharia Agrônômica em 1977.

Em 1981 obteve o título de *Magister Scientiae* em Fisiologia Vegetal, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em 1981 foi contratado pela Universidade Federal de Viçosa, como Técnico de Nível Superior, para o Departamento de Biologia Vegetal.

Em 1993 iniciou o curso de doutorado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa - Centro de Pesquisa Nestlé, Tours, França.

## CONTEÚDO

	<b>Página</b>
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	ix
EXTRATO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
CAPÍTULO 1 .....	8
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA VIA CULTURA LÍQUIDA EM <i>Coffea canephora</i> E <i>C. arabica</i> .....	8
1. INTRODUÇÃO .....	8
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	13
2.1. Material vegetal .....	13
2.2. Obtenção dos explantes foliares .....	13
2.3. Meios indutores .....	14
2.4. Estabelecimento e manutenção das culturas celulares .....	16
2.5. Indução da embriogênese .....	16
2.6. Desenvolvimento dos embriões .....	17

	<b>Página</b>
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
3.1. Calogênese em genótipo canéfora .....	18
3.2. Calogênese em genótipos arábicas .....	27
3.2.1. Diplóide DH <sub>3</sub> .....	27
3.2.2. Catimor .....	30
3.2.3. Catuaís vermelho e amarelo .....	34
3.3. Embriogênese somática indireta em meio líquido .....	39
4. CONCLUSÕES .....	42
CAPÍTULO 2 .....	43
ELETROFUSÃO INTERESPECÍFICA ENTRE PROTOPLASTOS DE <i>Coffea arabica</i> E DE <i>C. canephora</i> .....	43
1. INTRODUÇÃO .....	43
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	49
2.1. Material vegetal .....	49
2.2. Estabelecimento e manutenção de culturas líquidas embriogênicas ..	49
2.3. Obtenção de protoplastos da digestão enzimática dos agregados celulares .....	51
2.4. Eletrofusão interespecífica de protoplastos .....	54
2.5. Cultivo de protoplastos .....	55
2.6. Avaliação dos resultados .....	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	59
3.1. Crescimento das suspensões celulares .....	59
3.2. Rendimento protoplástico .....	62
3.2.1. Enzimas digestivas e tempo de digestão .....	63
3.2.2. Pré-plasmólise e dimensões dos agregados celulares .....	66
3.2.3. Cisteína .....	66
3.3. Homoeletrofusão .....	68
3.4. Densidade de plaqueamento .....	68
3.5. Seleção dos heterofusionados .....	70



	<b>Página</b>
3.5.1. Meio de cultura .....	70
3.5.2. Iodoacetamida .....	73
3.5.3. Rodamina .....	75
3.6. Eletrofusão interespecífica de protoplastos .....	77
4. CONCLUSÕES .....	85
2. RESUMO E CONCLUSÕES .....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90
APÊNDICE .....	108

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>.AIB</b>	Ácido indolbutírico
<b>.ANA</b>	Ácido naftalenoacético
<b>BAP</b>	6-Benzilaminopurina
<b>CIRAD</b>	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pou le Développement, Montpellier - France
<b>CPM</b>	Calo primário misto
<b>CPN</b>	Calo primário nodular
<b>CRN</b>	Centre de Recherche Nestlé, Tours – France
<b>2,4-D</b>	Ácido 2,4-dicloro fenoxiacético
<b>CV</b>	Coefficiente de variação
<b>D<sub>p</sub></b>	Densidade de plaqueamento
<b>E<sub>p</sub></b>	Eficiência de plaqueamento
<b>HFSE</b>	Embriogênese somática em alta frequência
<b>IAC</b>	Instituto Agrônômico de Campinas
<b>2iP</b>	2-Isopenteniladenina
<b>KIN</b>	Cinetina
<b>LFSE</b>	Embriogênese somática em baixa frequência
<b>Macro-MS</b>	Macroelementos do meio básico - MS
<b>Micro-MS</b>	Microelementos do meio básico - MS

<b>MES</b>	Ácido 2 - (N morfolino) etanossulfônico
<b>MF</b>	Matéria fresca
<b>min</b>	Minuto
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>Rc</b>	Regulador de crescimento
<b>R<sub>p</sub></b>	Rendimento protoplástico
<b>SCSE</b>	Embriogênese somática auto-controlada
<b>SEOP</b>	Solução enzimática para obtenção de protoplastos
<b>SF</b>	Solução de fusão
<b>V<sub>pp</sub></b>	Voltagem pico a pico
<b>φ</b>	Diâmetro

## EXTRATO

CORDEIRO, Antônio Teixeira, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 1999. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplastos em *Coffea***. Orientador: Laércio Zambolim. Conselheiros: Paulo Roberto Mosquim e Vincent Pétiard.

Esta pesquisa foi conduzida com o objetivo de verificar a exequibilidade da fusão protoplástica interespecífica como ferramenta no melhoramento parassexual em *Coffea*. Para tanto, pretendeu-se a introgressão das resistências aos nematóides *Meloidogyne incognita* e *M. exigua*, do cultivar canéfora Apoatã, nos genótipos arábicas diplóide DH<sub>3</sub> e tetraplóides Catimor e Catuaí Amarelo. Com vistas à obtenção dos protoplastos, foi dado início a suspensões celulares embriogênicas a partir de calos friáveis embriogênicos induzidos de explantes foliares. Posteriormente foram estudadas, nas suspensões celulares Apoatã e DH<sub>3</sub>, as cinéticas do crescimento e do rendimento protoplástico em função do tempo pós-subcultura, bem como as condições de digestão enzimática da parede celular de seus agregados celulares. Foram realizados, ainda, estudos para a seleção dos heterofusionados. Embora todos os genótipos testados tenham reagido favoravelmente à formação de tecido embriogênico friável, apenas os arábicas DH<sub>3</sub> e Catuaí Vermelho requereram a ação conjunta de auxina e

citocinina. Os demais Apatã, Catimor e Catuaí Amarelo reagiram mais favoravelmente quando o regulador de crescimento foi apenas a citocinina BAP. As maiores frequências de explantes com calos friáveis verificadas para os genótipos canéfora Apatã e arábicas DH<sub>3</sub>, Catimor, Catuaí Amarelo e Catuaí Vermelho foram, respectivamente, 80, 60, 40, 40 e 20%. A diferenciação embriogênica dos agregados celulares, em cultura líquida, rendeu cerca de 241.000, 72.870 e 121.760 embriões g<sup>-1</sup> MF de agregados celulares Apatã, Catimor e DH<sub>3</sub>, respectivamente. As suspensões celulares Apatã e DH<sub>3</sub> revelaram, imediatamente após a subcultura, uma fase exponencial de crescimento celular até um ponto de inflexão, a partir do qual as taxas de crescimento reduziram progressivamente para atingir um peso de matéria fresca dos agregados celulares assintótico. Coincidentemente, os menores rendimentos protoplásticos foram observados para tempos pós-subcultura superiores àquele do ponto de inflexão. A pré-plasmólise, a seleção dos agregados celulares de diâmetro inferior a 1 mm e a adição de cisteína 0,83 mM, durante a digestão enzimática, não interferiram no rendimento protoplástico das suspensões celulares Apatã e DH<sub>3</sub>, ao contrário das concentrações das enzimas pectinases e celulase. De maneira geral, o rendimento protoplástico Apatã, sempre inferior àquele DH<sub>3</sub>, foi maior quando as duas pectinases, pectoliase e macerozima, estiveram associadas à celulase, as três nas maiores concentrações testadas. Os 12 meios de cultivo de protoplastos testados não permitiram distinguir os protoplastos parentais Apatã e DH<sub>3</sub> em nível de crescimento dos microcalos. Alternativamente, os inibidores metabólicos iodoacetamida e rodamina, nas respectivas concentrações de 2 e de 0,9 mM, mostraram-se eficazes em inibir a regeneração dos protoplastos parentais em microcalos. Seu aproveitamento permitiu a realização de 23 ensaios de eletro fusão interespecífica, cujos produtos, aparentemente justificados pela complementação metabólica, encontram-se em desenvolvimento com vistas à diferenciação embriogênica e regeneração de plantas. Esta última permitirá análises para verificação do potencial da fusão protoplástica no melhoramento parassexual em *Coffea*.

## ABSTRACT

CORDEIRO, Antônio Teixeira, D.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 1999. **Indirect somatic embryogenesis and interspecific fusion of protoplasts in *Coffea***. Adviser: Laércio Zambolim. Committee Members: Paulo Roberto Mosquim and Vincent Pétiard.

The aim of the present work was to evaluate the feasibility of interspecific protoplast fusion as a tool in the parasexual improvement in *Coffea*. Introgression of nematode resistance from *Coffea canephora* cv. Apatã was attempted in diploid (DH<sub>3</sub>) and tetraploid (Catimor and Catuaí Amarelo) *C. arabica* genotypes by protoplast fusion. Protoplasts were isolated from embryogenic cell suspensions initiated from leaf explants-derived friable embryogenic calli. For Apatã and DH<sub>3</sub> cell suspensions the kinetics of growth and protoplast yield was evaluated as affected by the intervals of subcultures and the conditions of enzymatic digestion of the cell walls of their small cell aggregates. Investigations aiming at selection of protoplast heterofused-derived cell aggregates were also accomplished. All genotypes studied reacted favorably to the formation of friable embryogenic calli. *C. arabica* genotypes, DH<sub>3</sub> and Catuaí Vermelho, however, required the use of both auxin and cytokinin. Conversely, Apatã, Catimor and Catuaí Amarelo presented similar

morphogenetic responses when induction media were supplemented with BAP only. Frequencies of friable embryogenic calli of 80, 60, 40, 40 and 20% were obtained for Apatã, DH<sub>3</sub>, Catimor, Catuaí Amarelo and Catuaí Vermelho, respectively. Embryogenic differentiation from cell aggregates, in liquid culture, produced about 241 000, 72 870 and 121 760 embryos g<sup>-1</sup> FW for Apatã, Catimor and DH<sub>3</sub>, respectively. Immediately to the subculture, Apatã and DH<sub>3</sub> cell suspensions revealed a typical sigmoidal growth curve. Coincidentally, the lowest protoplast yields were observed for post-subculture intervals above the inflection point. The pre-plasmolysis, the size of the aggregates (smaller than 1 mm diameter) and the addition of cysteine 0.83 mM, during the enzymatic digestion, did not affect protoplast yield of Apatã and DH<sub>3</sub> cell suspensions, unlike the concentrations of the pectinases and cellulase enzymes. In general, protoplast yields of Apatã were always inferior to that DH<sub>3</sub>. High yields were achieved when the two pectinases (pectolyase and macerozyme) were combined to cellulase, at the highest tested concentrations. The twelve protoplast culture media tested did not allow any distinction between parental protoplasts Apatã and DH<sub>3</sub>, at microcalli growth stages. Alternatively, the metabolic inhibitors iodoacetamide and rhodamine, at the concentrations 2 and 0.9 mM, respectively, were effective in inhibiting microcalli formation from cultured parental protoplasts. Its use allowed the accomplishment of 23 independent interspecific electrofusion assessments whose products led to the development of embryogenic differentiation. Further work will be carried out in order to characterize the putative heterofused regenerants and to examine the potential of somatic hybridization as a tool for parasexual improvement in *Coffea*.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil, embora seja o principal produtor e exportador mundial de café, possui, atualmente, produtividade média situada na faixa de 8 a 10 sacas beneficiadas por hectare, uma das mais baixas entre os vários países produtores (GONÇALVES e MARTINS, 1993). A maior parte dos cultivares plantados no Brasil pertence à espécie *Coffea arabica* L., cujo produto possui aspecto e qualidade de bebida superiores àquele do genérico cafeeiro Robusta (*Coffea canephora* Pierre), que 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. Como as várias outras espécies de café, à exceção de *C. arabica*, *C. canephora* é diplóide ( $2n = 22$  cromossomos) e multiplica-se exclusivamente por fecundação cruzada (BERTHAUD, 1980; CONAGIN e MENDES, 1961). Sua auto-incompatibilidade foi determinada como sendo do tipo gametofítica (BERTHAUD e CHARRIER, 1985; FAZUOLI, 1986), controlada por um único locus S (LASHERMES et al., 1996a). Diferentemente, a espécie *C. arabica* é tetraplóide ( $2n = 44$  cromossomos) e multiplica-se predominantemente por autofecundação (FAZUOLI, 1986).

Inúmeros são os fatores que contribuem para a extremamente baixa produtividade brasileira. Dentre aqueles de natureza fitossanitária, destacam-se as doenças causadas por nematóides, principalmente aqueles do gênero



*Meloidogyne*, que têm sido responsáveis por 15% da redução total da nossa produção de café (CAMPOS et al., 1985). Os danos causados pelos nematóides do gênero *Meloidogyne* às raízes incluem, segundo CAMPOS et al. (1985), a formação de galhas e o fendilhamento e a escamação dos tecidos corticais, reduzindo, sobremaneira, o volume do sistema radicular. Tal redução promove franco declínio da parte aérea da planta em decorrência do desfolhamento precoce, da clorose foliar e da deficiência nutricional, podendo causar-lhe a morte em situação de estresse, como seca prolongada e frio (CAMPOS e LIMA, 1986). Assim, os prejuízos produzidos pelos nematóides das galhas vão desde a redução da produção e falta de resposta à adubação até a morte das plantas.

Levantamentos realizados para estudar a presença e a frequência com que as espécies de *Meloidogyne* ocorrem nos cafezais dos principais estados produtores têm revelado que *M. exigua* e, principalmente, *M. incognita*, são as espécies que mais limitam tanto a implantação como a manutenção da cultura (CAMPOS et al., 1985; GONÇALVES e MARTINS, 1993; LIMA, 1993). Essa maior agressividade de *M. incognita* tem sido atribuída por GONÇALVES e MARTINS (1993) à sua variação em patogenicidade e à intolerância de nossos cultivares de café tipo arábica. Quanto à variação em patogenicidade, quatro raças fisiológicas de *M. incognita* já foram caracterizadas (TAYLOR e SASSER, 1978), contudo, presume-se que no cafeeiro desenvolvem-se apenas as raças 2 e 3 (FAZUOLI et al., 1982). Embora o parasitismo de *M. exigua* cause danos ao cafeeiro, a convivência entre ambos torna-se economicamente viável desde que ocorra em solos de boa fertilidade e sem deficiência hídrica (GONÇALVES e MARTINS, 1993).

As principais estratégias utilizadas para o manejo de fitonematóides na cafeicultura têm sido a adoção de técnicas para evitar a sua disseminação e contaminação em solos, águas e culturas, e a identificação de germoplasmas de *Coffea* L. resistentes a *Meloidogyne* visando ao seu aproveitamento, a curto prazo, como porta-enxerto para o cafeeiro arábica e, a longo prazo, como fonte de resistência a ser transferida para cultivares de *Coffea arabica* L. É importante considerar que a erradicação de nematóides é prática impossível em cafezais

implantados em solos infestados, e que os diversos métodos de controle utilizados, incluindo-se aí o controle químico, a adubação verde, orgânica e química e as práticas conservacionistas do solo, atuam apenas no sentido de reduzir temporariamente a população desses parasitas (CAMPOS et al., 1985; GONÇALVES e MARTINS, 1993).

A atuação diligente da pesquisa para obtenção de germoplasmas resistentes às espécies de *Meloidogyne* identificou fontes de resistência a *M. exigua* em *C. canephora*, *C. congensis*, *C. euglenoides*, *C. racemosa*, *C. dewrevei* (CAMPOS et al., 1985) e em progênies de híbridos interespecíficos naturais e induzidos de *C. canephora* com *C. arabica*, como o Híbrido de Timor (BERTRAND et al., 1995; PEREIRA et al., 1980) e o Icatu (FAZUOLI et al., 1987), respectivamente. Com relação a *M. incognita*, os resultados indicam um número relativamente restrito de espécies de *Coffea* envolvidas, sendo as principais *C. canephora* e *C. arabica*. Esta última é representada por progênies etíopes semi-espontâneas, cujas resistências se tornaram conhecidas após inoculações das plantas com endoparasitas, sem raça definida, provenientes de solos contaminados de São Paulo (ANZUETO et al., 1993). Quanto à raça 3 de *M. incognita*, foram identificadas fontes em progênies de *C. canephora* (GONÇALVES et al., 1987; LIMA et al., 1987;1989), *C. congensis* e Híbridos de Timor (GONÇALVES et al., 1987) e, em relação à raça 2, em progênies de *C. canephora* (MAZZAFERA et al., 1989). Todavia, estas progênies têm sido observadas segregar para a resistência, o que pode ser atribuído às características inerentes da espécie *C. canephora*, como fecundação cruzada e auto-incompatibilidade, além do que a resistência a *M. incognita*, nessa espécie, é aparentemente uma exceção (CARNEIRO, 1993). Assim, com vistas aos acréscimos da frequência gênica para a resistência, ciclos de seleção foram e vêm sendo utilizados em progênies de cultivares de *C. 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 *C. canephora* cv. Robusta (BERTRAND et al., 1995; FAZUOLI, 1986). Atualmente, o cultivar Apoatã, resistente a *M. exigua* (FAZUOLI, 1986) e às

raças 2 (MAZZAFERA et al., 1989) e 3 (LIMA et al., 1987; 1989) de *M. incognita*, vem sendo recomendado como porta-enxerto para cultivares de *C. arabica* em áreas infestadas por *M. incognita* (CAMPOS, 1997; LIMA et al., 1989). A mesma segregação para a resistência (FAZUOLI et al., 1983b), para a produção (FAZUOLI et al., 1987) e para o porte da planta (FAZUOLI et al., 1984) é encontrada nas progênies originadas da reprodução sexual de híbridos interespecíficos como o Híbrido de Timor (FAZUOLI et al., 1983a; GONÇALVES et al., 1987; 1988) e o Icatu (CARNEIRO FILHO et al., 1989; FAZUOLI et al., 1984; 1987) com cultivares arábicos em trabalhos visando à transferência dos genes de resistência para a espécie *C. arabica*. A perda de vigor dos cafeeiros após quatro a seis produções é também uma constante, principalmente naquelas progênies derivadas do Híbrido de Timor (FAZUOLI et al., 1984). Essa dificuldade de obtenção de linhagens homogêneas reside, principalmente, na instabilidade cromossômica e genética própria dos híbridos interespecíficos (BOAVENTURA e CRUZ, 1987) e requer, a exemplo do ocorrido com o cultivar Apatã, ciclos de seleção para a fixação das características genéticas desejáveis. Cada ciclo, no caso específico do cafeeiro, consome aproximadamente 10 anos, desde o plantio da muda até a obtenção dos dados da sexta produção para a sua análise genética. Assim, as principais limitações à obtenção de cultivares arábicas portadores de resistência aos nematóides *M. incognita* e *M. exigua* decorrem da auto-incompatibilidade inerente a uma das principais fontes de resistência, à instabilidade genética e cromossômica originada da reprodução sexual entre cafeeiros de diferentes séries euplóides e ao tempo relativamente longo para se completar um ciclo de seleção. Tais restrições podem, contudo, ser superadas com o emprego de técnicas biotecnológicas, graças aos avanços ocorridos, durante a última década, nas áreas de biologia celular e biologia molecular. Essas ferramentas disponíveis aos programas de melhoramento genético, que incluem transferências de genes de resistência via transformação plasmídica, absorção direta e integração de DNA em protoplastos e hibridação somática de protoplastos (MIKI e IYER, 1990), permitem aumentar a variabilidade genética independentemente da reprodução

sexual. Além disso, é possível propagar genótipos que são normalmente instáveis pela reprodução sexual e reduzir o número, bem como a duração, dos ciclos de seleção requeridos para a obtenção de novos cultivares (GLIMELIUS et al., 1991).

A transformação parassexual da resistência, via métodos diretos e indiretos de transferência do DNA, pressupõe a identificação e o isolamento prévio do(s) gene(s). Contudo, apesar dos esforços intensos para clonagem de genes de resistência aos nematóides (BALLVORA et al., 1995; GANAL et al., 1995; KLEIN-LANKHORST et al., 1994), os primeiros resultados positivos surgiram, recentemente, do trabalho de CAI et al. (1997), com o gene Hs1<sup>pro-1</sup>, que confere a resistência ao nematóide *Heterodera schachtii* (BCN), causador de cisto em raízes de plantas de *Beta vulgaris* L. Esses autores verificaram, ainda, que a expressão do gene ocorre principalmente nas raízes, é aumentada pela infecção com o endoparasita, confere resistência a uma progênie de beterraba suscetível após transformação e codifica, para uma proteína de 282 aminoácidos, que contém imperfeitas repetições ricas em leucina e domínio hidrofóbico de 17 aminoácidos, aparentemente, transmembrana. Embora a resistência aos nematóides possa ser ampla (FASSULIOTIS, 1987; TRUDGILL, 1991; WILLIAMSON e HUSSEY, 1996), decorrente de um mesmo gene ou genes ligados, como em *Glycine max*, relativamente a *Heterodera glycines* e *Rotylenchulus reniformis* (REBOIS et al., 1970), e em *Solanum sparsipilum*, com relação a *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica* (GOMES et al., 1983), não existem registros de fontes genéticas comuns de resistência aos endoparasitas causadores de galhas e cistos. Além disso, a resistência verificada em diferentes espécies vegetais a *M. incognita* não é, aparentemente, condicionada pelo mesmo número de genes. Assim, embora em plantas de *Nicotiana tabacum* ocorra apenas um único gene dominante (FASSULIOTIS, 1987), naquelas de *Glycine max* e de *Solanum sparsipilum* apresenta-se um gene maior acrescido de pelo menos um gene modificador (BOQUET et al., 1976) e dois genes dominantes (GOMES et al., 1983), respectivamente. Todavia, em plantas de algodão e feijão, acredita-se que a resistência seja determinada por

dois ou três genes recessivos (FASSULIOTIS, 1987). No caso específico de *Coffea*, ANZUETO et al. (1993) verificaram, por meio da análise genética da geração F<sub>2</sub>, oriunda do cruzamento entre plantas arábicas de variedades sensíveis com progênes etíopes resistentes, que a resistência a *M. incognita* deve-se à presença de um gene dominante, complementado ou não de um gene modificador, ou dois genes dominantes complementares dependendo da progênie etíope utilizada. Em se tratando da resistência ao mesmo endoparasita em linhas canéforas, os mesmos autores sugeriram, da análise genética de suas descendências, a presença de genes menores ou modificadores associados, provavelmente, a um ou mais genes maiores. Conseqüentemente, o desconhecimento da identidade do(s) gene(s) responsável(eis) pela resistência a *M. incognita* em *Coffea*, aliado a sua(s) provável(is) natureza(s) poligênica(s), revelam a alternativa hibridação somática, via fusão protoplástica, como possibilidade ímpar para introgressão parassexual dos genes de resistência (JONES, 1988; WAARA e GLIMELIUS, 1995) em cultivares de *C. arabica*. Além de permitir a combinação completa (GAIKWAD et al., 1996; GROSSER et al., 1988a, 1988b; MORIKAWA et al. 1987; OHGAWARA et al., 1985; SATO et al., 1996) ou parcial (FAHLESON et al., 1997; KAO, 1977) de dois genomas nucleares, a fusão de protoplastos apresenta-se ainda como ferramenta permissiva à recombinação do DNA citoplasmático entre duas células parentais, haja vista que, na reprodução sexuada, a herança materna deste genoma é o caso mais freqüente entre as espécies cultivadas (GLIMELIUS et al., 1991; PELLETIER, 1991). Em *Coffea*, a hibridação somática oferece, então, possibilidades adicionais de obtenção de novas combinações genotípicas não permitidas pela via sexuada, uma vez que a análise de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (BERTHOU et al., 1983) e cloroplastídico (BERTHOU et al., 1983; CORRIVEAU e COLEMAN, 1988; LASHERMES et al., 1996b) de híbridos interespecíficos Arabusta revelou suas heranças estritamente maternas.

O sucesso final a ser alcançado com a hibridação somática depende de dois critérios básicos a serem satisfeitos, de acordo com WAARA e GLIMELIUS (1995): além de seus isolamentos em grandes quantidades, os

protoplastos devem ser totipotentes, isto é, possuir a habilidade para proliferar e, finalmente, regenerar plantas. Para tanto, as fontes mais comumente utilizadas são o mesofilo, axênico ou não, e os calos friáveis cultivados em meio semi-sólido e, principalmente, líquido (POTRYKUS e SHILLITO, 1986; ROEST e GILISSEN, 1993). Em *Coffea*, as tentativas realizadas no sentido de isolar protoplastos do mesofilo (OROZCO e SCHIEDER, 1984; SÖNDAHL e MARTINS, 1980) renderam protoplastos em pequenas quantidades, que não mostraram competência para diferenciação e regeneração de plantas. Todavia, a totipotência de protoplastos obtidos em grandes quantidades, de diferentes genótipos de *Coffea*, tem sido verificada após isolamento dos mesmos a partir da digestão enzimática de embriões somáticos (SCHOPKE et al., 1987) e de calos friáveis cultivados em meios semi-sólido (TAHARA et al., 1994) e líquido (SPIRAL e PETIARD, 1991; ACUÑA e DE PENA, 1991). As suspensões celulares, quando embriogênicas, são consideradas as fontes ideais para a produção de protoplastos totipotentes (POTRYKUS e SHILLITO, 1986), permitindo superar os problemas de baixa reprodutibilidade dos protocolos para o isolamento, a cultura de protoplastos e a regeneração de plantas (ROEST e GILISSEN, 1993). Para o estabelecimento de suspensões celulares embriogênicas, faz-se necessária a produção de tecido embriogênico friável cuja indução, em *Coffea*, tem variado intra-especificamente (BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE, 1996; BIEYSSE et al., 1993), principalmente com relação aos reguladores de crescimento (BIEYSSE et al., 1993; ZAMARRIPA, 1993).

Assim, com vistas à introgressão da resistência canéfora aos nematóides *Meloidogyne incognita* e *M. exigua* em cultivares arábicas pela fusão de protoplastos, isolados de suspensões celulares embriogênicas, foram testadas metodologias seqüentes que foram divididas em dois capítulos, a saber:

I - Embriogênese somática indireta via cultura líquida em *Coffea canephora* e *C. arabica*;

II - Eletro fusão interespecífica entre protoplastos de *Coffea arabica* e *C. canephora*.

## **CAPÍTULO 1**

### **EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA VIA CULTURA LÍQUIDA EM *COFFEA CANEPHORA* E *C. ARABICA***

#### **1. INTRODUÇÃO**

A embriogênese somática é o processo pelo qual células haplóides ou somáticas diplóides desenvolvem-se em plantas diferenciadas, pelos estádios embrionários característicos, sem a fusão de gametas (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986). Diferentes origens de explantes em *Coffea*, como fragmentos caulinares jovens, folhas, cotilédones, endosperma, embrião, perisperma, antera e óvulo, têm sido testados para a produção de embriões somáticos (NAKAMURA et al., 1992). Contudo, este processo de embriogênese e, posteriormente, a regeneração de plantas, têm sido verificados em seguida à cultura de fragmentos de entrenós (DUBLIN, 1980; STARITSKY, 1970), folhas (De PENA, 1983; DUBLIN, 1981; PIERSON et al., 1983; SÖNDAHL e SHARP, 1977; YASUDA et al., 1985; ZAMARRIPA et al., 1991), folhas cotiledonares (SÖNDAHL et al., 1985) e protoplastos derivados de embriões somáticos (SCHOPKE et al., 1987) ou de suspensões celulares (SPIRAL e PETIARD, 1991).

Em explantes foliares, tal via de multiplicação *in vitro* pode ser direta ou indireta (DUBLIN, 1981; WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986). Na via direta, os embriões somáticos surgem de calo apenas cicatricial, sem passar pela fase de calo indiferenciado. Originam-se, aparentemente, de células embriogênicas pré-determinadas que requerem apenas um regulador de crescimento ou condições favoráveis (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986) ou, alternativamente, síntese de substância indutora ou remoção de substância inibidora (SÖNDAHL et al., 1985) para a liberação da atividade mitótica e expressão da embriogênese. No sistema café, tal embriogênese somática direta, sem formação prévia de calos visíveis, é desencadeada por meios ricos em citocininas e desprovidos de auxinas (DUBLIN, 1981; HATANAKA et al., 1995).

Na embriogênese somática indireta os embriões surgem de calos primários não diferenciados, que são formações de coloração marrom, globulares e mais ou menos compactas situadas nos bordos dos explantes, ou de calos secundários de segunda geração, que são muito embriogênicos (DUBLIN, 1981; 1984). Enquanto os calos primários, com até 20 embriões por explante, correspondem aos calos-LFSE, os calos secundários, de estruturas granulosa e friável e de coloração amarelo-creme, correspondem aos calos-HFSE de SÖNDAHL e SHARP (1977; 1979). Esses calos secundários embriogênicos friáveis originam cerca de 100 a 300 embriões por explante cultivado em meio semi-sólido (SÖNDAHL e SHARP, 1977). Todavia, em cultura líquida, podem produzir cerca de 12.400 embriões g<sup>-1</sup> MF de agregados celulares (NORIEGA e SÖNDAHL, 1993; Van BOXTEL e BERTHOULY, 1996). Em se tratando de genótipos canéforas, esse rendimento tem variado de 120.000 (Van BOXTEL e BERTHOULY, 1996) a 400.000 (ZAMARRIPA et al., 1991) embriões g<sup>-1</sup> MF de biomassa. Além de permitirem rápida multiplicação em grande escala de genótipos, quer sejam provenientes de cruzamentos interespecíficos, de espécies alógamas ou de mutações conferindo melhor desempenho, as culturas celulares líquidas constituem, ainda, um sistema ideal para o estudo do processo de desenvolvimento vegetal associado à embriogênese somática (FUJIMURA e KOMAMINE, 1980). Adicionalmente, funcionam de maneira útil na seleção de



grupos de células exibindo resistência ou tolerância relativa aos estresses (KOCHBA et al., 1982) e como única fonte de protoplastos capazes de regenerar embriões somáticos e plântulas em gramíneas (KARLSSON e VASIL, 1986). Relativamente ao café, desde os primeiros estudos de SÖNDAHL et al. (1980), somente SCHOPKE et al. (1987), SPIRAL e PETIARD (1991), ACUÑA e De PENA (1991) e TAHARA et al. (1994) reportaram a regeneração de plantas a partir de protoplastos. À exceção de SCHOPKE et al. (1987) e TAHARA et al. (1994), cuja fonte de protoplastos foram embriões somáticos e calos embriogênicos, respectivamente, os demais autores utilizaram suspensões celulares.

Ao contrário da embriogênese somática direta, a indireta, que requer a redeterminação de células diferenciadas, a proliferação de calos e a indução de células embriogênicas determinadas, depende da ação de reguladores de crescimento, não só para a retomada da atividade mitótica mas também para a determinação do estado embriogênico (SÖNDAHL et al., 1985; WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986). Nesse aspecto, duas estratégias têm sido geralmente utilizadas para a obtenção de tecido embriogênico em *Coffea*: a primeira, unifásica, envolve o cultivo de explantes sobre um único meio, que pode conter como regulador de crescimento apenas citocinina (YASUDA et al., 1985) 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 (SÖNDAHL et al., 1985), que difere do primeiro por possuir menor razão auxina/citocinina (NORIEGA e SÖNDAHL, 1993; SÖNDAHL et al., 1985; ZAMARRIPA et al., 1991). Para ambas as espécies *C. arabica* e *C. canephora*, tecido embriogênico friável tem sido, também, isolado a partir desses dois tipos de cultivo de explantes foliares, em meio semi-sólido. Enquanto no unifásico o regulador de crescimento empregado é apenas a citocinina BAP (DUCOS, comunicação pessoal\*, YASUDA et al., 1985), no cultivo bifásico a reação

---

\* Jean Paul DUCOS - Centre de Recherche Nestlé, Tours, France.

calogênica primária inicia-se com a ação combinada de auxina/citocinina no meio de indução. No meio de condicionamento, a razão auxina/citocinina é reduzida (BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE, 1996; NORIEGA e SÖNDAHL, 1993; Van BOXTEL e BERTHOULY, 1996) ou substituída por apenas citocinina (DUBLIN, 1981; ZAMARRIPA et al., 1991). Em se tratando de suspensões celulares, o tecido embriogênico friável, uma vez isolado, é mantido em meio líquido em estado indiferenciado até o momento da diferenciação em embriões, o que se verifica, geralmente, com a redução da densidade celular associada à remoção e ao aumento da concentração de auxina e citocinina, respectivamente, no meio líquido de indução (NORIEGA e SÖNDAHL, 1993; Van BOXTEL e BERTHOULY, 1996; ZAMARRIPA, 1993). Para ambas as etapas de isolamento e de diferenciação de tecido friável, tem-se verificado que a competência para a embriogênese somática, além de variar intraespecificamente (BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE, 1996; BIEYSSE et al., 1993; MICHAUX-FERRIERE et al., 1989; Van BOXTEL e BERTHOULY, 1996), é maior em *C. canephora* relativamente a *C. arabica* (Van BOXTEL e BERTHOULY, 1996; ZAMARRIPA, 1993). Esses resultados, associados ao fato de que diferentes composições de meio, no que se refere aos reguladores de crescimento (BIEYSSE et al., 1993; ZAMARRIPA, 1993) e ao agente gelificante (BIEYSSE et al., 1993), combinadas com diferentes estados fisiológicos do desenvolvimento (BIEYSSE et al., 1993) e estádios de maturação do explante (BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE, 1996), alteram a recalcitrância à embriogênese somática, sugerem que uma maior expressão da competência de um determinado genótipo para esta via de propagação pode requerer condições experimentais particulares.

A modulação hormonal da indução de tecido embriogênico friável tem sido, também, observada variar entre e dentro das classes. Assim, embora a embriogênese somática em *Citrus*, a partir de nucelo, seja hormônio-autotrófica (GAVISH et al., 1991), aquela verificada para as espécies monocotiledôneas *Pennisetum americana* (VASIL e VASIL, 1982), *Zea mays* (VASIL et al., 1984; VASIL e VASIL, 1986) e *Triticum aestivum* (RAJYALAKSHMI et al., 1991)

requerem a adição exógena de 2,4-D num processo de indução/diferenciação bifásico. Diferentemente, as dicotiledôneas *Daucus carota* (FUJIMURA e KOMAMINE, 1980; TSUKAHARA e KOMAMINE, 1997), *Theobroma cacao* (ALEMANNO et al., 1996) e *Hevea brasiliensis* (ETIENNE et al., 1991) além da auxina 2,4-D, requerem, ainda, a ação exógena de citocinina em uma das fases do processo de indução/diferenciação.

Diante desses fatos, objetivou-se, neste trabalho, o estabelecimento de culturas celulares líquidas de quatro genótipos de *C. arabica* e um de *C. canephora*, que apresenta resistência aos nematóides *Meloidogyne exigua* e *M. incognita*, a fim de multiplicar em grande escala esses genótipos, obter protoplastos de boa qualidade para experimentação posterior de hibridação interespecífica assexuada e estudar a variação somaclonal dos produtos oriundos da embriogênese somática.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal**

Foram utilizadas como fontes de explantes foliares plantas mantidas em casa de vegetação e partes aéreas micropropagadas das espécies *Coffea canephora* e *C. arabica*. O genótipo canéfora foi o cultivar Apoatã IAC LC 2258, resultante da introdução C 2258 do cultivar Robusta após ciclos de seleção conduzidos no Instituto Agrônômico de Campinas, para a resistência a *Meloidogyne exigua* (FAZUOLI, 1986) e às raças 2 (MAZZAFERA et al., 1989) e 3 (LIMA et al., 1987; 1989) de *M. incognita*. Os arábicas testados, mantidos no CRN, foram o diplóide DH<sub>3</sub>, descendente partenogênético espontâneo de linhagem etíope, e os tetraplóides Catimor (CRN 8661), Catuaí Vermelho (CRN 5267) e Catuaí Amarelo (CRN 5268).

### **2.2. Obtenção dos explantes foliares**

Folhas jovens completamente expandidas, de ramos ortotrópicos (canéfora Apoatã) e plagiotrópicos (arábicas), após serem lavadas em água corrente, foram imersas em solução de hipoclorito de cálcio a 5% com o agente molhante Henkel a 0,04% contida em recipientes plásticos de volume de 500 mL.

Em seguida à desinfecção durante 20 min, sob agitação moderada, as folhas foram lavadas três vezes com água bidestilada e autoclavada. Esta última etapa e as seguintes, até a vedação das placas de Petri com parafilme, foram conduzidas em câmaras de fluxo de ar laminar. Folhas provenientes de partes aéreas micropropagadas não requereram desinfecção. Após eliminação da nervura principal, das extremidades laterais, apicais e basais das folhas doadoras de explantes, fragmentos nas dimensões de 7 x 7 mm foram obtidos, aproximadamente, e então distribuídos, com o lado adaxial em contato com a superfície de 10 mL do meio semi-sólido contidos em placas de Petri de poliestireno cristal de Ø 55 mm estéreis. Cada placa recebeu, inicialmente, cinco explantes, que foram repetidos um mínimo de cinco e um máximo de vinte vezes, conforme o ensaio. As placas de Petri contendo os explantes foram mantidas em sala de crescimento nas condições de obscuridade e de temperatura de  $25 \pm 1$  °C.

### **2.3. Meios indutores**

Os procedimentos experimentais utilizados a fim de obter calos embriogênicos friáveis para o estabelecimento de culturas celulares líquidas, necessárias à embriogênese somática indireta em grande escala, foram empreendidos em duas etapas que reuniram o uso de dois ou mais diferentes meios, em sucessão, ou o uso de um único meio contendo, geralmente, apenas citocinina como regulador de crescimento. Na primeira etapa, foram utilizados meios M1 a M3, M6 e M7 (Quadro 1), comumente empregados no CRN para a embriogênese somática indireta em genótipos canéforas. Na segunda etapa, foi mantida constante a maioria dos componentes dos meios utilizados para induzir calogênese em *Coffea*, sendo permitida a variação dos componentes regulador de crescimento e macronutrientes que são, aparentemente, os fatores do meio que mais influenciam a resposta calogênica (A1 a A4 e B1 a B6).

A primeira repicagem com substituição ou não do meio primário ocorreu aos 30 dias da indução, e as subseqüentes, a intervalos variando de 30 a 90 dias



entre si, dependendo da taxa de crescimento do calo. A primeira repicagem reduziu a dois o número de explantes por placa de Petri.

A reatividade dos explantes era avaliada à época da repicagem ou no máximo de dois em dois meses, quando eram contados os tipos diferentes de calos e fazia-se a remoção dos embriões somáticos por ventura existentes no estágio torpedado ou mais desenvolvido.

#### **2.4. Estabelecimento e manutenção das culturas celulares**

Os calos embriogênicos friáveis obtidos foram cultivados em meios líquidos, que correspondiam àqueles semi-sólidos de suas origens sem o agente gelificante, contidos em Erlenmeyers fechados com rolhas de celulose recobertas com papel-alumínio. O conjunto era deixado sobre agitador com movimento giratório excêntrico a 110 rpm e sujeito a um fotoperíodo de 12 h e irradiância de  $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A densidade inicial de biomassa (agregados celulares) foi mantida em  $10 \text{ g L}^{-1}$  de meio (ZAMARRIPA, 1993), e o estabelecimento envolveu uma sucessão de Erlenmeyers de volumes crescentes: 25, 50, 100 e 250 mL, que continham respectivamente 5, 10, 25 e 50 ou 100 mL de meio líquido. A transferência da biomassa, com renovação do meio líquido, para Erlenmeyer de volume imediatamente superior na série, ocorria a intervalos de 14 ou 21 dias dependendo de sua taxa de crescimento. Uma vez estabelecidas, as suspensões celulares eram subculturadas em 100 mL de meio contidos em Erlenmeyers de 250 mL, a intervalos de 14 dias.

#### **2.5. Indução da embriogênese**

Para a diferenciação de agregados celulares a embriões, foi utilizada a biomassa recuperada em filtro de náilon com poros de  $\phi$  de 100  $\mu\text{m}$  autoclavado, de suspensões celulares em fase de multiplicação, que foi transferida para os meios líquidos M3, M2 e, ou, M2<sub>m</sub> (M2-YAS+MS; Tabela 1; DUCOS,

comunicação pessoal\*), na densidade de  $1 \text{ g L}^{-1}$ . Após 21 dias, procedia-se à subcultura, na mesma densidade, em seguida à recuperação dos agregados celulares com  $\phi$  superior a  $100 \mu\text{m}$  e pesagem da sua MF. Aos 15 e 30 dias desta última repicagem, renovou-se o meio líquido após decantação da biomassa, seguida da vertedura do meio líquido velho. Cerca de nove semanas do início, aproximadamente, era recuperada a biomassa com embriões em filtros de náilon de  $\phi$  de  $100 \mu\text{m}$  autoclavados, e era obtido o peso da sua MF. Em seguida, eram efetuadas contagens de embriões em três amostras, por Erlenmeyer, de  $10^{-1} \text{ g}$  de biomassa imobilizada em meio semi-sólido, contendo macro-MS meia-força e Gelrite™ 0,3%.

## 2.6. Desenvolvimento dos embriões

Os embriões somáticos, independentemente da origem, embriogênese direta ou indireta, eram semeados em número de dez em placas de Petri Ø 55 mm, contendo 10 ml do meio semi-sólido M4 (ZAMARRIPA et al., 1991) constituído de macro e micro-MS, ambos  $\frac{1}{2}$  força,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$   $18,65 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $13,9 \text{ mg L}^{-1}$ , mio-inositol  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , ácido nicotínico  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , piridoxina-HCl  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , tiamina-HCl  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , biotina  $10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$ , pantotenato de cálcio  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , BAP  $1 \mu\text{M}$ , sacarose  $10 \text{ g L}^{-1}$  e Gelrite™  $3 \text{ g L}^{-1}$ , cujo pH era ajustado a 5,6 anteriormente à autoclavagem. Após quatro semanas de cultura, os embriões com as folhas cotiledonares eram transferidos para o mesmo meio anterior desprovido de BAP (M5, ZAMARRIPA et al., 1991). Uma vez surgido o primeiro par de folhas, as plântulas eram transferidas para o meio de cultivo de microestacas M6<sub>m</sub>, de composição semelhante ao meio M6 (Quadro 1) suplementado com sacarose  $40 \text{ g L}^{-1}$  e BAP  $1,3 \mu\text{M}$ .

---

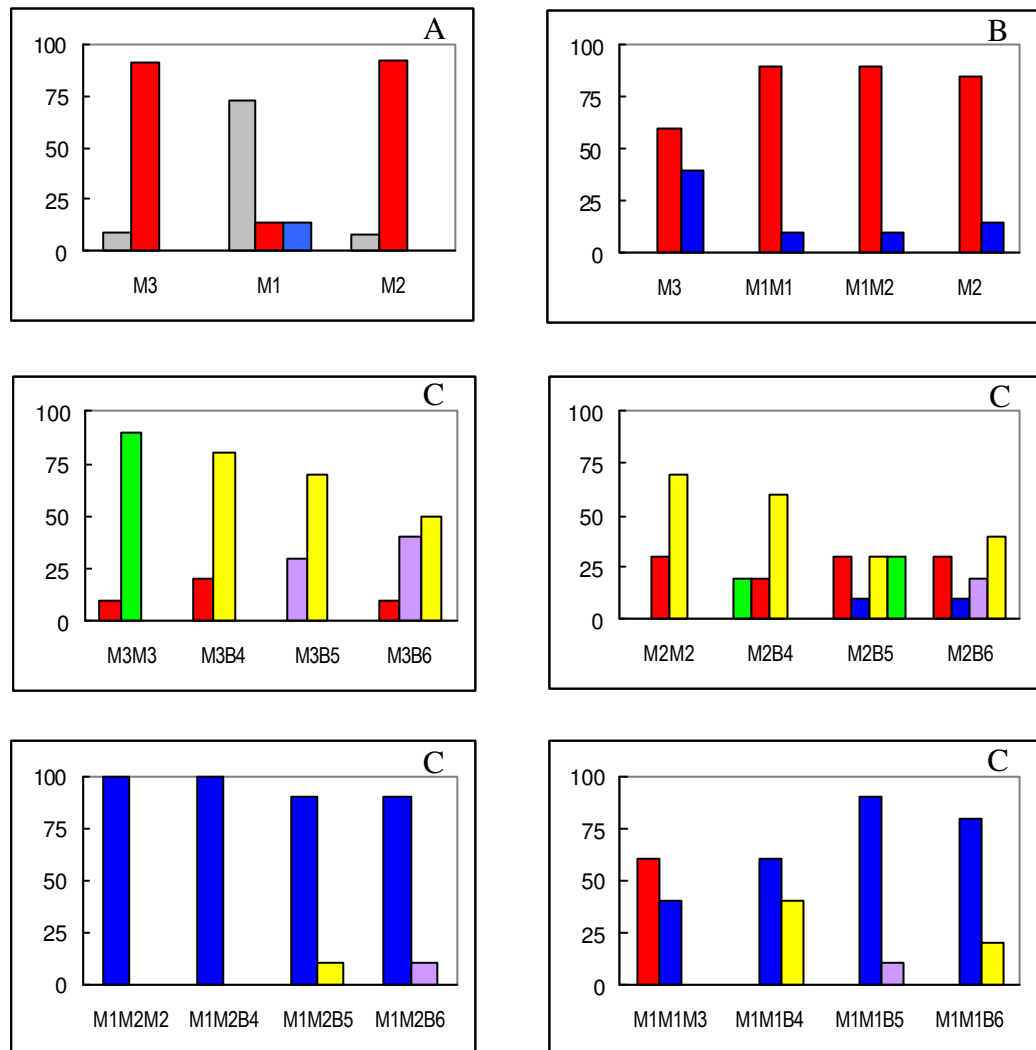
\* Jean Paul DUCOS - Centre de Recherche Nestlé, Tours, France.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Calogênese em genótipo canéfora

Aos trinta dias de indução de explantes foliares do canéfora Apoatã à calogênese, observou-se que os meios de cultura que continham como regulador de crescimento apenas citocinina, M2 e M3, induziram as maiores frequências de calos diferentes do cicatricial (Figuras 1(A) e 2(A)). Aos sessenta dias, contudo, a totalidade dos explantes foliares reagiu, verificando-se, de maneira geral, uma superioridade de calos primários nodulares (CPN's) relativamente aos calos primários mistos (CPM's) (Figura 1(B)). Em cerca de 30% dos explantes induzidos com o meio M2, foi observada, nas regiões de excisão desprovidas de calos primários, a presença de embrióides, o que caracterizou a competência desse genótipo para a embriogênese somática direta, à semelhança dos resultados de RAMOS et al. (1993) com o mesmo genótipo, de DUBLIN (1981), com Arabusta, e de HATANAKA et al. (1991, 1995) com outros canéforas. O efeito inibidor de auxinas sobre a embriogênese somática direta induzida com citocininas, em *Coffea*, tem sido observado (DUBLIN, 1981; HATANAKA et al., 1995).



Seqüência de meios de cultura indutivos

Figura 1 - Caracterização temporal (A=30, B=60 e C=240 dias pós-indução) da reação calogênica de explantes foliares do canéfora Apoatã submetidos a diferentes seqüências de meios de indução. Cada seqüência foi representada por dois explantes repetidos cinco vezes (■ calo cicatricial, ■ calo primário nodular, ■ calo primário misto, ■ calo embriogênico, ■ calo embriogênico friável, ■ calo friável).

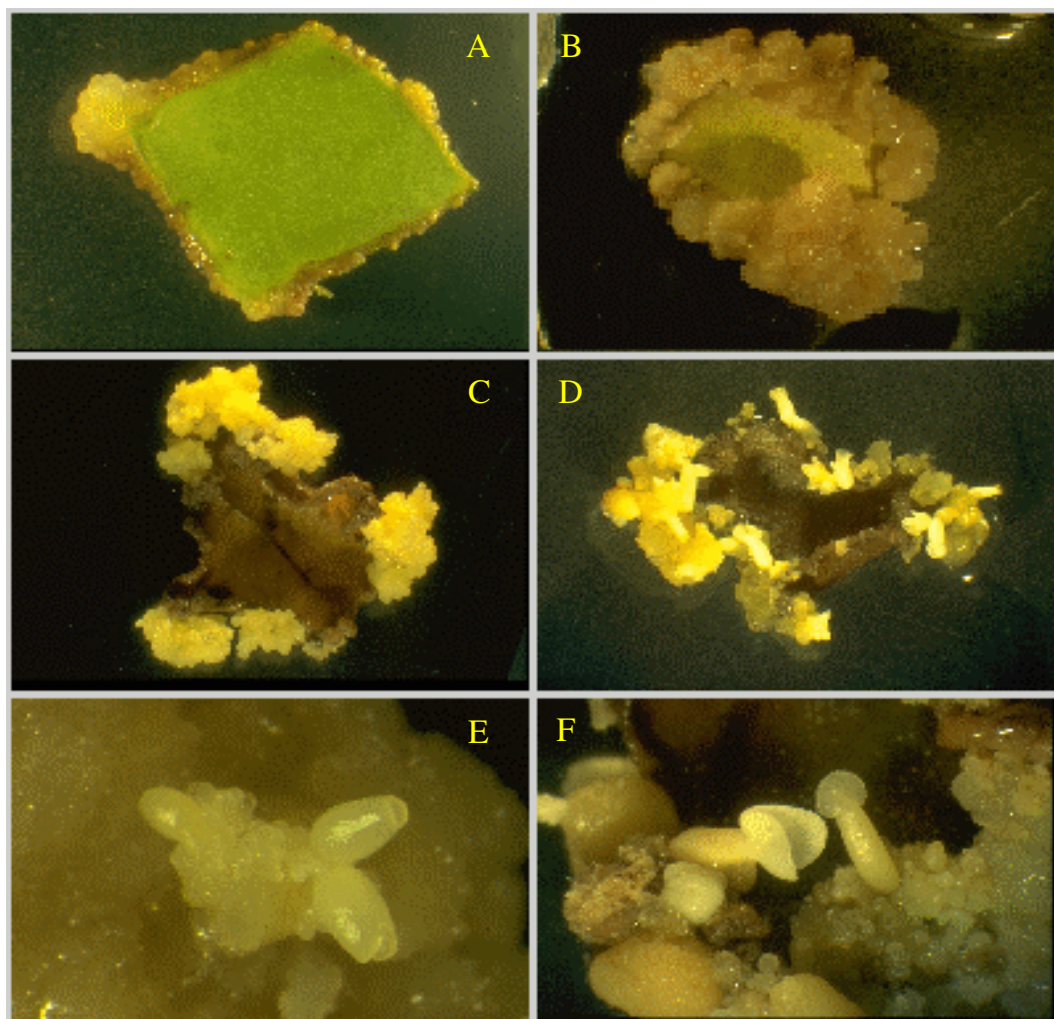


Figura 2 - Reação calogênica induzida em explantes foliares de genótipos de *Coffea*: **A**, calo cicatricial e calo primário apenas nodular em Catimor aos 35 dias; **B**, calo primário misto em Catuaí Vermelho aos 60 dias; **C**, calo embriogênico friável em Apoatã aos 180 dias; **D**, calo embriogênico tipo LFSE em Apoatã aos 150 dias; **E**, calo embriogênico tipo HFSE em Apoatã aos 150 dias com embriões globular e torpedo; e **F**, calo embriogênico tipo HFSE em Apoatã aos 180 dias com embriões globular e cotiledonar.

Os CPN's citados anteriormente referem-se às formações globulares compactas surgidas em parte ou, menos freqüentemente, na totalidade dos bordos dos explantes (Figura 2(A)). Aqueles CPM's, além da reação globular mais ou menos compacta dos CPN's, apresentavam, também, formações amorfas de células alongadas moles ao tato, com aspecto de algodão, e que se caracterizavam por crescimento visivelmente mais rápido (Figura 2(B)). Todavia, a coloração de ambos os tipos de calos primários era inicialmente branca ou creme-clara, tornando-se marrom após quatro a sete semanas de seus aparecimentos. Essa coloração marrom, que se revelou geralmente mais cedo em calos de explantes cultivados com 2,4-D, tem sido atribuída à presença de quinonas, produtos da oxidação de ácidos fenólicos (LOOMIS e BATTAILE, 1966; MONACO et al., 1977). Concentrações celulares elevadas de compostos fenólicos, tais como os ácidos clorogênico, cafeico, ferúlico, p-coumárico e trans-cinâmico, são características de *Coffea* (SÖNDAHL e SHARP, 1977). Quanto à origem, os calos primários têm sido associados às células perivasculares (BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE, 1996; BIEYSSE et al., 1993; MICHAUX-FERRIERE et al., 1989; 1987) e às do parênquima lacunoso (PIERSON et al., 1983; SÖNDAHL et al., 1979) do mesófilo. De acordo com BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE (1996) e SÖNDAHL et al. (1985), as células mesofílicas, ao retomarem a divisão celular, originam os calos primários, que podem conter duas distintas populações de células, uma consistindo de células alongadas e vacuolizadas e a outra de pequenas células cilíndricas com citoplasma denso, as células embriogênicas. Ao final da cultura primária, essas células embriogênicas perdem suas características ao tornarem-se vacuolizadas. Após a subcultura em meio secundário, um processo de desdiferenciação origina regiões localizadas de células embriogênicas sobre o calo primário. Essas células friáveis são capazes de se dividir em novas células embriogênicas ou se diferenciar em embriões globulares. Ambos os tipos de células, alongadas e esféricas, foram também observadas por VASIL e VASIL (1982) e FUJIMURA e KOMAMINE (1980) em suspensões celulares de milho e cenoura, respectivamente. Estes últimos autores verificaram, por observações

microscópicas seriadas, que embriões se formaram somente de células esféricas e densas em citoplasma, não daquelas alongadas e vacuolizadas.

Coerentemente, seis meses após as últimas observações, foram verificados calos embriogênicos, calos embriogênicos friáveis e calos friáveis principalmente para as seqüências iniciadas com os meios M3 e M2 (Figura 1(C)). Para aquelas seqüências iniciadas com o meio de cultura M1, foi verificada a produção de calos embriogênicos friáveis em seguida à repicagem dos calos primários para meios de diferenciação contendo BAP, principalmente quando esta se realizou aos 60 dias de indução. Resultados semelhantes foram observados por ZAMARRIPA et al. (1991) cinco meses após submeterem explantes foliares de plantas micropropagadas do genótipo canéfora R2 (origem CIRAD) às mesmas condições experimentais. Além da causa variabilidade genética, o menor tempo verificado por esses autores para a obtenção de calos embriogênicos friáveis pode ser explicado pelo declínio da competência para a organogênese com a maturação (HUANG et al., 1990), haja vista que folhas de plantas micropropagadas são consideradas mais juvenis que folhas de plantas em casa de vegetação (NOZERAN, 1978). A variabilidade genotípica envolvendo a capacidade embriogênica tem sido documentada, podendo-se encontrá-la entre variedades de *Medicago sativa* (FUENTES et al., 1993), entre genótipos de diferentes grupos de origem de cacau (ALEMANNO et al., 1996), entre variedades e genótipos (BIEYSSE et al., 1993; SÖNDAHL e SHARP, 1979; VAN BOXTEL e BERTHOULY, 1996) e clones (BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE, 1996; RAMOS et al., 1993) de café.

Os calos embriogênicos referidos acima são calos primários contendo até 20 embriões somáticos por explante. Quando esses calos apresentam agregados celulares granuloso, de aproximadamente 1mm de diâmetro, facilmente destacáveis e de coloração amarelo-creme, são então caracterizados como calos embriogênicos friáveis (Figura 2(C)). Tais agregados celulares granuloso, adequados ao estabelecimento de suspensões celulares, podem originar embriões somáticos numa freqüência tão elevada quanto  $400.000\text{ g}^{-1}$  MF. Os calos embriogênicos e embriogênicos friáveis correspondem, respectivamente, aos

calos LFSE (Figura 2(D)) e HFSE (Figuras 2(E) e 2(F)) de SÖNDAHL e SHARP (1977; 1979). Aqueles calos embriogênicos friáveis desprovidos de embriões são os calos friáveis.

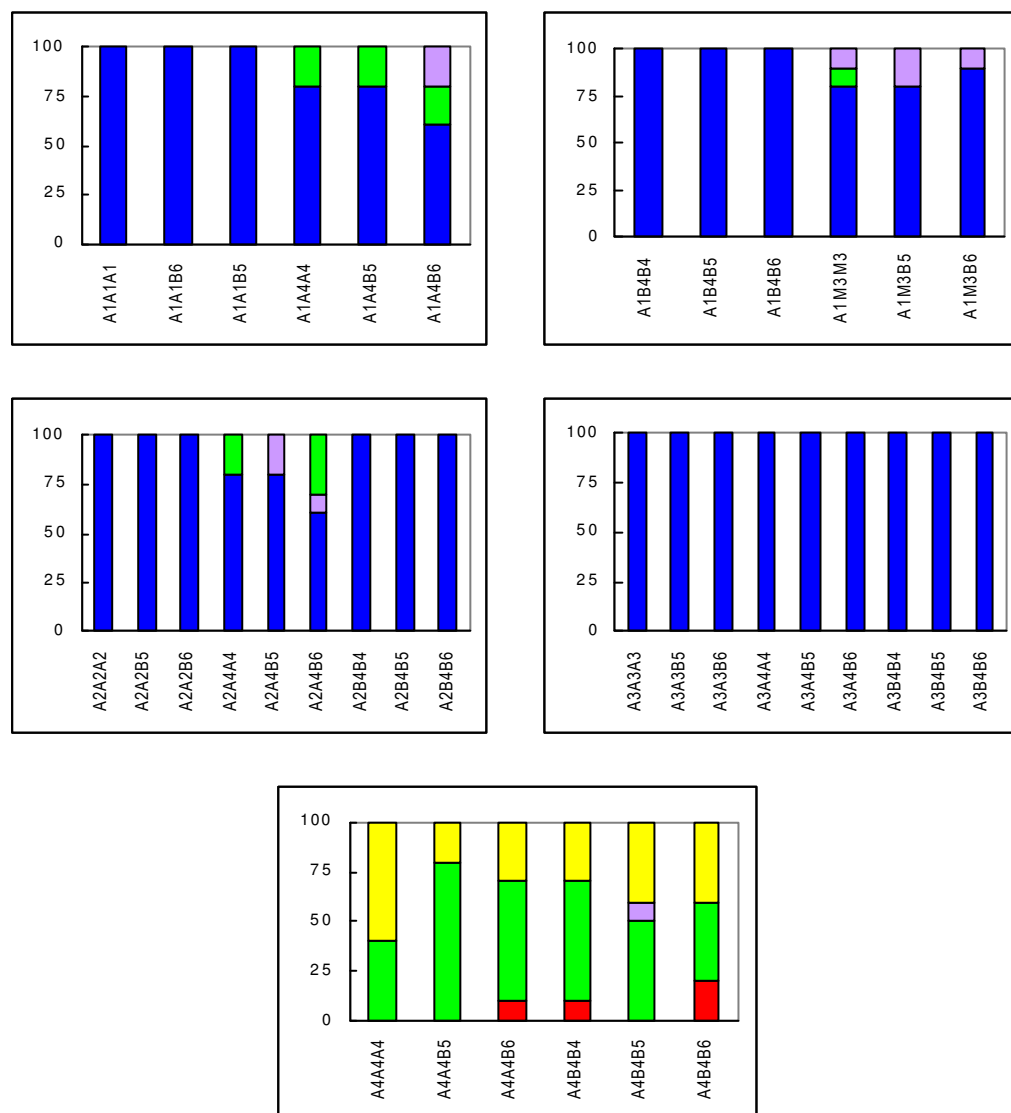
A repicagem dos calos primários iniciados no meio de cultura M3 (22  $\mu$ M BAP), para outros meios como B4 (5  $\mu$ M BAP), B5 (1,5  $\mu$ M BAP) e B6 (1,5  $\mu$ M BAP + 0,15  $\mu$ M 2,4-D), promoveu o aparecimento de calos friáveis. Levando-se em conta apenas o componente regulador de crescimento nos meios M3, B4 e B5, pode-se, aparentemente, verificar uma proporcionalidade direta entre a frequência de calos embriogênicos e a concentração da citocinina. Todavia, com relação à friabilidade dos calos, essa associação entre a frequência e a concentração de BAP foi inversa, sugerindo, de acordo com BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE (1996), que BAP acima de 1,5  $\mu$ M favorece mais a diferenciação das células embriogênicas que a sua multiplicação, possivelmente por alterar a polaridade e o plano de divisão da célula (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986). A adição de 2,4-D 0,15  $\mu$ M aumentou em cerca de 20% a frequência de calos friáveis, em detrimento daqueles embriogênicos friáveis, o que está de acordo com BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE (1996), que verificaram inibição à produção de embriões globulares na presença de 2,4-D. Reação diferente foi observada para as seqüências cujo meio de iniciação foi o M2, em que a repicagem causou aumento na frequência de calos apenas embriogênicos e apenas friáveis, em detrimento dos calos embriogênicos friáveis. Estes resultados consubstanciam a embriogênese somática indireta em genótipos canéforas sem o estímulo exógeno de auxina, como já verificado por DUCOS (comunicação pessoal\*).

Mantendo-se constantes os vários componentes do meio de cultura como os macro e micronutrientes, vitaminas etc., e variando-se apenas o balanço e a concentração dos reguladores de crescimento auxina (2,4-D) e citocinina (KIN e BAP) nos meios A1, A2, A3 e A4, foi possível reconfirmar, na ausência de auxina exógena, a embriogênese somática e a produção de calos friáveis em explantes foliares do canéfora Apoatã (Figura 3).

---

\* Jean Paul DUCOS - Centre de Recherche Nestlé, Tours, France.

Frequência calogênica (%)



Seqüência de meios de cultura indutivos

Figura 3 - Reação calogênica aos sete meses de indução de explantes foliares do canéfora Apoatã a diferentes seqüências de meios de cultura. Cada seqüência foi representada por dois explantes repetidos cinco vezes (■ calo primário nodular, ■ calo primário misto, ■ calo embriogênico, ■ calo embriogênico friável, ■ calo friável).

Independentemente da(s) época(s) e do(s) regulador(es) de crescimento utilizado(s) na(s) repicagem(ns), a razão 2,4-D/KIN 5 (A3), no meio primário, não promoveu o aparecimento de calos embriogênicos ou friáveis, como sugerido por SÖNDAHL e SHARP (1979) para *C. canephora* cv. Conilon. Em contraste, as razões 2,4-D/KIN 1/5 e 1, respectivamente meios A1 e A2, quando substituídas por BAP na primeira repicagem aos 30 dias de indução, resultaram na produção de calos apenas embriogênicos e, ou, apenas friáveis. Todavia, suas frequências foram sempre menores que aquelas verificadas na ausência de auxina, condição esta que promoveu, também, o aparecimento de calos embriogênicos friáveis. Semelhante indução de calos HFSE foi verificada com outras razões 2,4-D/citocinina próximas a 1/5, como aquelas alcançadas com 2,4-D 2,3  $\mu\text{M}$  + AIB 5  $\mu\text{M}$ /2-iP 9,8  $\mu\text{M}$  (BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE, 1996; Van BOXTEL e BERTHOULY, 1996) e 2,4-D 1,4  $\mu\text{M}$ /KIN 7  $\mu\text{M}$  (ZAMARRIPA et al., 1991) que foram sucedidas, respectivamente, por 2,4-D 4,5  $\mu\text{M}$  + BAP 17,8  $\mu\text{M}$  e BAP 4,4  $\mu\text{M}$ , no meio secundário. Verifica-se, portanto, que a competência para a embriogênese somática indireta via HFSE, em *C. canephora*, apresenta certa plasticidade relativamente aos reguladores de crescimento auxina e citocinina e suas concentrações. Considerando-se ainda a modulação dessa competência por componentes do meio, a Figura 4 revela que o agente gelificante Gelrite<sup>TM</sup> foi mais eficiente que ágar para induzir reações embriogênicas e embriogênicas friáveis, principalmente aos quatro e cinco meses de indução, em explantes foliares de partes aéreas de Apoatã micropropagadas. Resultados semelhantes foram verificados por GARCIA e MENENDEZ (1987) com embrióides de Catimor, por BIEYSSE et al. (1993), que conseguiram obter embrióides em calos de um genótipo recalcitrante à embriogênese somática somente quando associaram Gelrite<sup>TM</sup> com explantes foliares de plantas micropropagadas, e por ICHI et al. (1986), com relação ao crescimento de calos de fumo e à propagação de microestacas de alface e de pepino. De acordo com os últimos autores, a maior eficiência do Gelrite<sup>TM</sup> pode estar relacionada à presença de substâncias inibitórias ao crescimento celular no ágar ou, alternativamente, à presença de substâncias, no Gelrite<sup>TM</sup>, cujo estímulo ao crescimento pode ou não



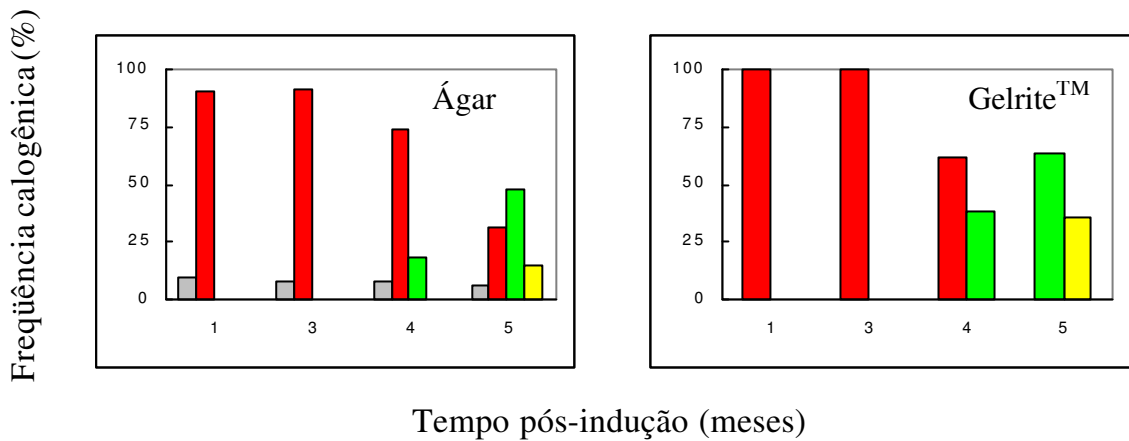


Figura 4 - Caracterização temporal da reação calogênica de explantes foliares do canéfora Apoatã no meio de cultura M2, tendo como agente gelificante ágar ou Gelrite™. Cada tratamento foi testado com 50 explantes removidos de partes aéreas micropropagadas (■ calo cicatricial, ■ calo primário nodular, ■ calo embriogênico, ■ calo embriogênico friável).

ser dependente de ativação mediante o processo de autoclavagem. Especulativamente, respaldados na forte inibição ao aparecimento de tecido embriogênico em calo de *Hevea brasiliensis* em resposta à redução do potencial hídrico (ETIENNE et al., 1991), BIEYSSE et al. (1993) sugeriram que o efeito positivo do Gelrite™ pode estar relacionado à maior disponibilidade de água e elementos nutritivos para o explante e o tecido embriogênico.

Os explantes foliares de partes aéreas micropropagadas, além de requererem menor tempo para a produção de calos embriogênicos, fizeram-no numa frequência maior relativamente aos explantes foliares retirados de plantas mantidas em casa de vegetação (Figuras 1(C) e 4). Sua frequência em calos embriogênicos friáveis foi, entretanto, menos favorável, aproximadamente a metade. Essa maior reatividade decorrente do estado fisiológico do desenvolvimento foi também verificada por BIEYSSE et al. (1993), com genótipos arábicas. O estágio fisiológico maturação tem sido também observado por BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE (1996) afetando a reatividade de explantes foliares. Esses autores observaram que a maior frequência de calos

HFSE, em dois genótipos canéforas, coincidia com os estádio de floração e de frutos chumbinhos.

### **3.2. Calogênese em genótipos arábicas**

#### **3.2.1. Diplóide DH<sub>3</sub>**

Após três meses do início da indução de explantes foliares do arábica diplóide DH<sub>3</sub>, com três meios diferentes de cultura (M6, M3 e M2) contendo como regulador de crescimento apenas a citocinina BAP, e dois meses da primeira repicagem, quando foram introduzidos os meios A4 e B4, verificou-se que as maiores freqüências de explantes com apenas calo cicatricial ocorreram para as seqüências iniciadas com o meio M3, que contém a maior concentração de BAP (22 µM) (Figura 5). Para todas as combinações de meios, entretanto, os CPN's foram praticamente a única reação calogênica diferente daquela cicatricial. Quatro meses após essas observações, intervalo de tempo no qual foram feitas duas repicagens com a introdução na primeira delas dos meios B5 e B6, foi verificada, para as seqüências M2, M2B4B4B4, M2A4A4A4, M3M2M2M2 e M3B4B4B4, a formação de calos embriogênicos em freqüência de cerca de 10% (dados não apresentados). Estes resultados sugerem que a competência embriogênica expressa com apenas citocinina não é afetada pela variação da concentração dos macro-MS, embora o seja pela concentração de BAP.

Ao serem fixados os demais componentes do meio de cultura, permitindo-se variar apenas o balanço e a concentração dos reguladores de crescimento 2,4-D, KIN e BAP em associação à concentração dos macro-MS, força total e meia-força, foi possível constatar que a embriogênese somática neste diplóide pode ocorrer aos seis meses do início da indução, tanto na presença quanto na ausência de auxina (Figura 6). Todavia, a produção de calos friáveis para o estabelecimento de suspensões celulares somente foi possível quando a auxina 2,4-D foi adicionada ao meio primário.

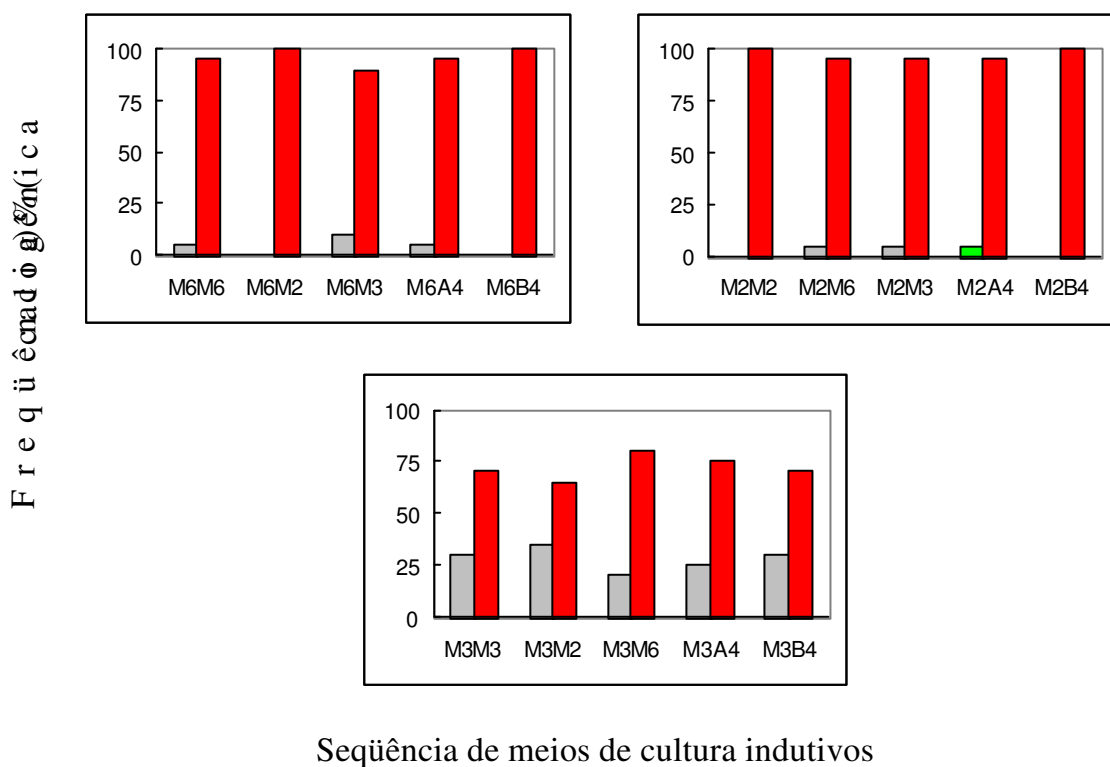
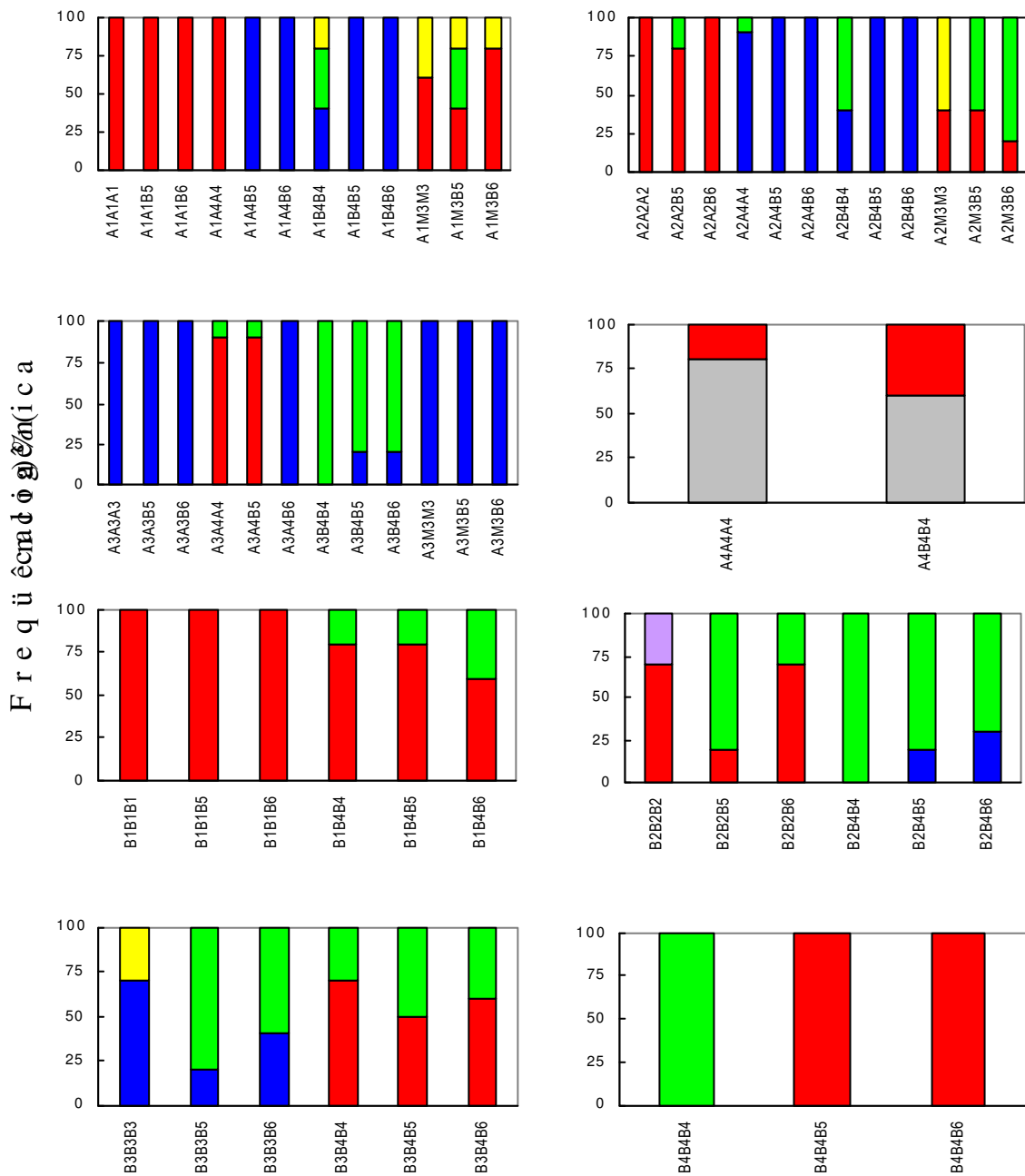


Figura 5 - Reação calogênica aos três e dois meses de indução e da primeira repicagem, respectivamente, de explantes foliares do arábica diplóide DH<sub>3</sub> submetidos a diferentes seqüências de meios de indução. Cada seqüência foi representada por quatro explantes repetidos cinco vezes (■ calo cicatricial, ■ calo primário nodular, ■ calo embriogênico).



Seqüência de meios de cultura indutivos

Figura 6 - Reaçã calogênica aos seis meses de induçã de explantes foliares do diplóide arábico DH<sub>3</sub> submetidos a diferentes razões dos reguladores de crescimento 2,4-D, KIN e BAP, combinadas com macro-MS força original e meia-força. Cada seqüência foi representada por dois explantes repetidos cinco vezes (■ calo cicatricial, ■ calo primário nodular, ■ calo primário misto, ■ calo embriogênico, ■ calo embriogênico friável, ■ calo friável).

Quando os macro-MS foram supridos em sua força total, grupo A, a produção de calos friáveis ocorreu quando a razão 2,4-D/KIN no meio primário foi 1/5 ou 1, associada a uma repicagem para um segundo meio sem auxina. Contudo, com a diluição dessa concentração de macro-MS à metade, calos friáveis foram observados para as razões 2,4-D/KIN 1 e 5 sem necessidade de repicagem para um segundo meio diferente do inicial. Diferentemente da resposta observada na Figura 5, a concentração dos macro-MS afetou a reatividade embriogênica dos explantes quando estes foram induzidos com apenas citocinina.

O estudo temporal da reação calogênica de explantes foliares DH<sub>3</sub>, removidos de partes aéreas micropropagadas, revelou que, aos três meses da indução, praticamente 100% dos explantes eram embriogênicos, e que cerca de 35% deles eram também friáveis (Figura 7). A diminuição da razão 2,4-D/KIN de 5 para 1, aos quatro meses do início da indução, aumentou a frequência de calos friáveis em cerca de 20% quatro meses mais tarde. Esses resultados e aqueles da Figura 6 confirmam a modulação da reatividade calogênica, em seus aspectos qualitativos e quantitativos, pelo estado fisiológico do desenvolvimento verificado com o genótipo canéfora Apatã, neste trabalho, e com outros genótipos arábicas (BIEYSSE et al., 1993).

### **3.2.2. Catimor**

Explantes foliares do genótipo Catimor (Caturra x Híbrido de Timor), ao serem submetidos a diferentes associações de meios de indução à calogênese, que possuíam como reguladores de crescimento 2,4-D e KIN 18 µM (M7), BAP 4,4 µM (M2), 5 µM (M6, A4 e B4) e 22 µM (M3), exibiram, aos oito meses de indução, reação cicatricial em frequência de cerca de 20%, apenas quando não foi utilizada auxina no meio de cultura (Figura 8). Na sua presença prevaleceram, de maneira geral, os CPM's. A repicagem para um segundo meio, contendo BAP 5 µM ao invés de 2,4-D e KIN, associado a macro-MS meia-força, resultou na produção de calo friável em frequência de 20%, aproximadamente. Para os

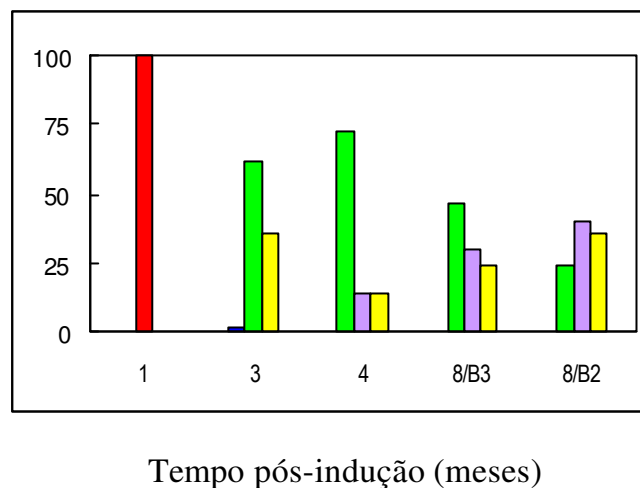
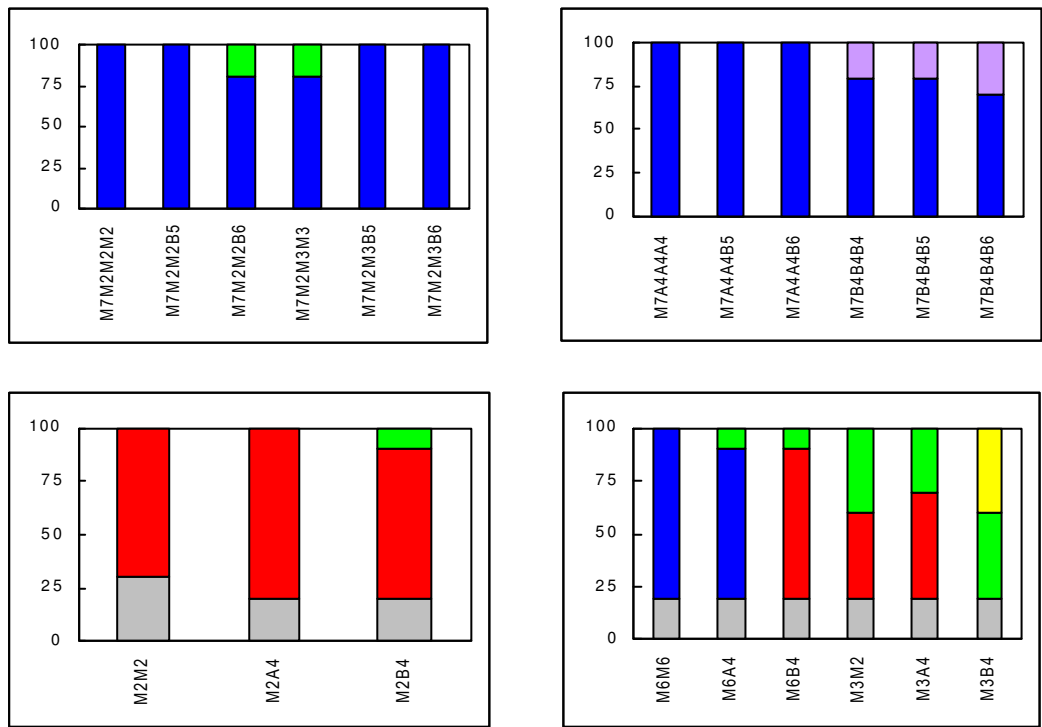


Figura 7 - Caracterização temporal da reação calogênica de 100 explantes foliares de partes aéreas micropropagadas do arábica diplóide DH<sub>3</sub>, no meio primário de indução B3, repicados aos quatro meses do início sobre B3 e B2 (■ calo primário nodular, ■ calo primário misto, ■ calo embriogênico, ■ calo embriogênico friável, ■ calo friável).

explantes foliares induzidos primariamente com apenas a citocinina BAP, foram verificados também, além da predominância dos CPN's, calos embriogênicos, principalmente quando a concentração de BAP foi diminuída de 22  $\mu$ M, no meio primário, a 5  $\mu$ M, no meio secundário. Esta condição, combinada com macro-MS meia-força, produziu cerca de 40% de calos embriogênicos friáveis. Quando foram fixados todos os demais componentes do meio, à exceção do regulador de crescimento e de macro-MS, como já experimentado para os genótipos Apoatã e DH<sub>3</sub>, verificou-se, aos seis meses de indução, que a associação auxina-citocinina no meio primário promoveu apenas o aparecimento de CPM's (dados não apresentados). Todavia, quando os explantes foram cultivados em meio no qual o regulador de crescimento foi unicamente a citocinina BAP, prevaleceram CPN's e, em menor frequência, calos embriogênicos, cuja reação foi mais favorável com macro-MS meia-força (Figura 9). As maiores frequências de calos embriogênicos e friáveis verificadas em resposta a apenas citocinina, como regulador de crescimento no meio, são contrárias à assertiva de SÖNDAHL e SHARP (1977) de que a ação combinada de auxina-citocinina, principalmente no meio primário,



Seqüência de meios de cultura indutivos

Figura 8 - Reação calogênica aos oito meses da indução de explantes foliares do arábica Catimor submetidos a diferentes seqüências de meios de cultura representados, no mínimo, por dois explantes repetidos cinco vezes (■ calo cicatricial, ■ calo primário nodular, ■ calo primário misto, ■ calo embriogênico, ■ calo embriogênico friável, ■ calo friável.)

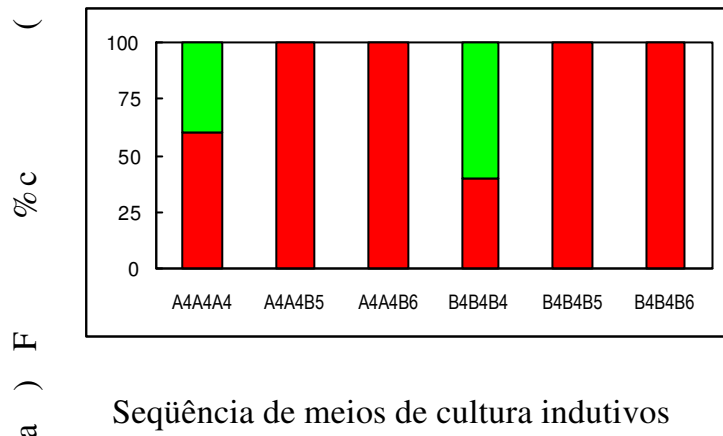


Figura 9 - Reação calogênica aos seis meses de indução de explantes foliares do arábica Catimor a diferentes seqüências de meios de cultura. Cada seqüência foi representada por dois explantes repetidos cinco vezes (■ calo primário, ■ calo embriogênico).

é essencial à obtenção de calos HFSE no sistema *Coffea*, o que foi posteriormente corroborado por GARCIA e MENENDEZ (1987) com explantes foliares de Catimor. Estes últimos autores verificaram que a ação combinada de 2,4-D + KIN ou BAP, no meio primário, seguida de sua substituição por ANA + KIN, no meio secundário de diferenciação, resultaram numa produção quase nula de calos embriogênicos quando 2,4-D esteve ausente no meio primário. Observaram, ainda, que a associação 2,4-D + BAP, relativamente à 2,4-D + KIN, induziu mais calos embriogênicos, e que BAP 18  $\mu$ M promoveu embriogênese direta em muito baixa frequência. Em evidente contraste com essa dependência auxínica, APONTE ACUÑA (1993), ao avaliar a reatividade calogênica de dois genótipos Catimor em resposta à indução com citocininas, verificou, em explantes foliares de ambos os genótipos, que o meio contendo 2iP 5  $\mu$ M foi mais eficiente para a produção de tecido embriogênico friável que o meio com BAP 4,4  $\mu$ M, à semelhança dos resultados de HATANAKA et al. (1991) em *C. canephora*.



Ao submeterem-se explantes foliares de partes aéreas micropropagadas ao meio M3 (BAP 22  $\mu\text{M}$ ), foi verificado, aos trinta dias de indução, predomínio de CPN's e embriogênese direta em cerca de 8% dos calos (Figura 10). Aos três meses de indução, 54% dos explantes apresentavam calo embriogênico. Cinco meses mais tarde, embora essa frequência tenha permanecido praticamente inalterada, verificou-se a presença de calo embriogênico friável em aproximadamente 3% dos explantes. Tal frequência poderia, contudo, ter sido maior em resposta às diminuições das concentrações de BAP e de macro-MS, no meio de cultura, aos 30 dias de indução, como sugerido pelos resultados da Figura 7, ou desde o início. Neste aspecto, BIEYSSE et al. (1993) verificaram que a recalitrância à embriogênese no progenitor arábica Caturra do híbrido interespecífico Catimor, em resposta aos meios de DUBLIN (1981), de PIERSON et al. (1983) e de YASUDA et al. (1985), todos com gelose, foi eliminada com o meio de YASUDA et al. (1985) contendo Gelrite<sup>TM</sup>, principalmente quando os explantes foliares eram originados de partes aéreas micropropagadas. Os meios referidos acima contém os respectivos reguladores de crescimento 2,4-D 1,4  $\mu\text{M}$  + KIN 9,3  $\mu\text{M}$  seguidos de BAP 4,4  $\mu\text{M}$ , AIB 25  $\mu\text{M}$  + BAP 4,4  $\mu\text{M}$  e BAP 4,4  $\mu\text{M}$ .

### **3.2.3. Catuaís vermelho e amarelo**

Permitindo-se variar somente os componentes regulador de crescimento 2,4-D, KIN e BAP e macro-MS, força total e meia-força, verificou-se que explantes foliares do genótipo Catuaí Vermelho produziram calos embriogênicos aos sete meses de indução, tanto na ausência quanto na presença de auxina exógena (Figura 11). Contudo, as maiores frequências desses calos foram observadas quando a auxina esteve presente na cultura primária juntamente com KIN, seguida da repicagem para meio com a citocinina BAP associada (A2A4B6) ou não (A3A3B4, A3A3B5, B2B4B4) a 2,4-D 0,15  $\mu\text{M}$ . Ao serem comparadas as razões 2,4-D/KIN testadas, verifica-se que a razão 1 foi a única e a mais eficiente delas com relação às respectivas produções de calo friável e calo

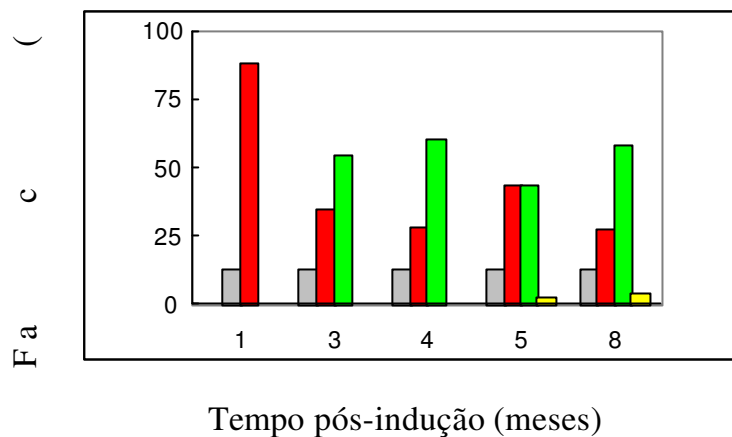


Figura 10 - Caracterização temporal da reação calogênica de 100 explantes foliares, removidos de partes aéreas micropropagadas do genótipo arábica Catimor, no meio de indução M3 (■ calo cicatricial, ■ calo primário nodular, ■ calo embriogênico, ■ calo embriogênico friável).

embriogênico (LFSE), quando os explantes foram repicados para meios contendo apenas BAP nas concentrações 5  $\mu\text{M}$  e 1,5  $\mu\text{M}$  e, ou, ambos os reguladores de crescimento BAP 1,5  $\mu\text{M}$  e 2,4-D 0,15  $\mu\text{M}$ . Essa mesma razão 2,4-D/citocinina 1, com BAP ao invés de KIN, combinada à macro-MS força total no meio primário durante três meses, seguida do meio secundário com os reguladores ANA 0,27  $\mu\text{M}$ , KIN 2,3  $\mu\text{M}$  associados à macro-MS meia força, permitiu a NEUENSCHWÄNDER e BAUMANN (1992) a obtenção de calos HFSE em explantes de Catuaí Vermelho. Todavia, esse tecido proembriônico, como aquele verificado com o mesmo meio secundário associado ao primário contendo 2,4-D 4,5  $\mu\text{M}$  e KIN 18,5  $\mu\text{M}$ , não se diferenciou em embriões maduros.

Ao reduzir o tempo de exposição dos explantes ao meio primário citado para dois meses, esses mesmos autores perceberam, após cinco meses no meio de cultura secundário líquido, produção elevada e sincronizada de embriões Catuaí sem formação de calos HFSE, num processo por eles denominado SCSE. Com o mesmo meio primário durante dois meses, seguido do meio secundário semi-sólido ANA 0,54  $\mu\text{M}$  e KIN 4,6  $\mu\text{M}$ , NORIEGA e SÖNDAHL (1993)

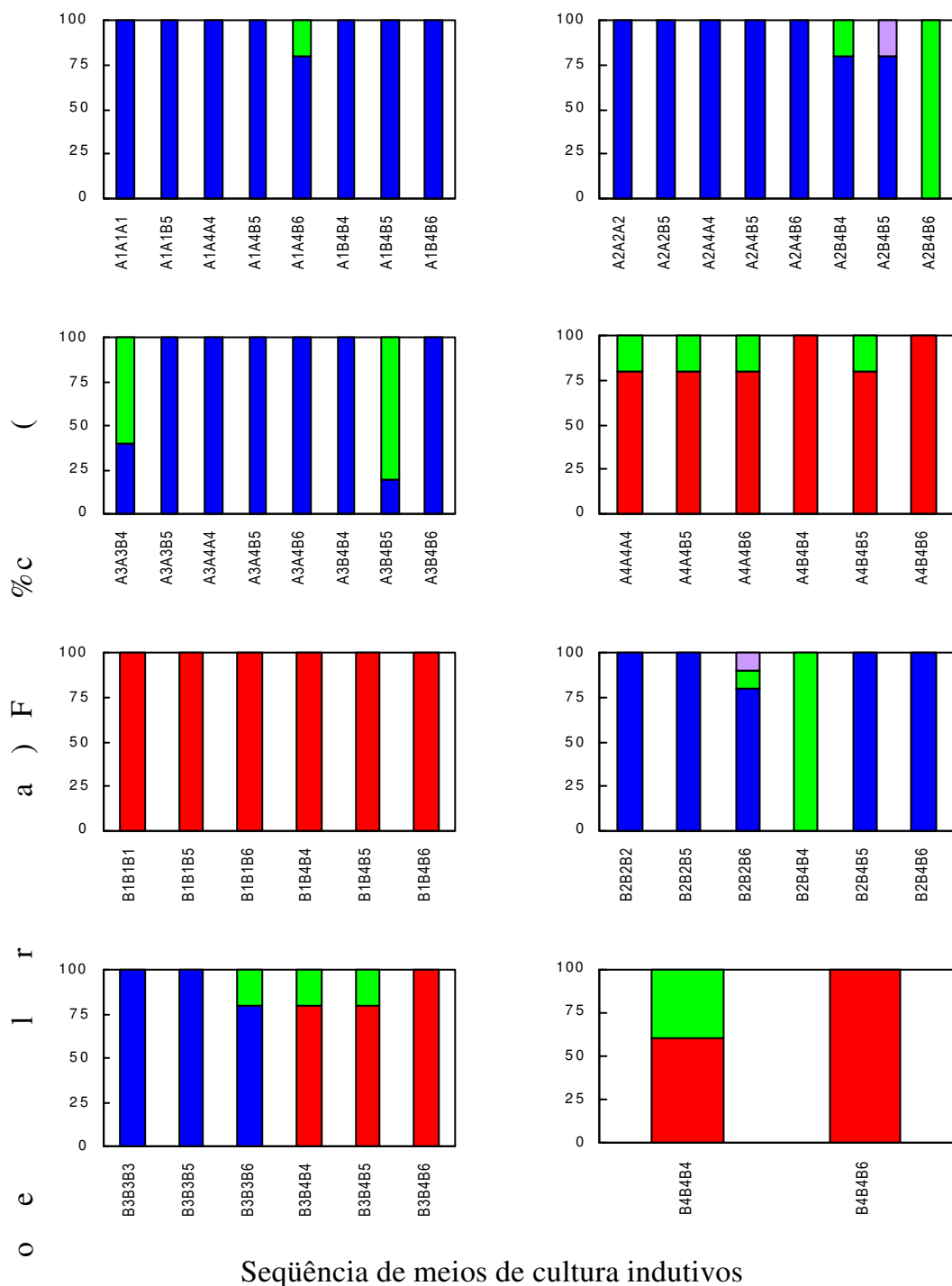
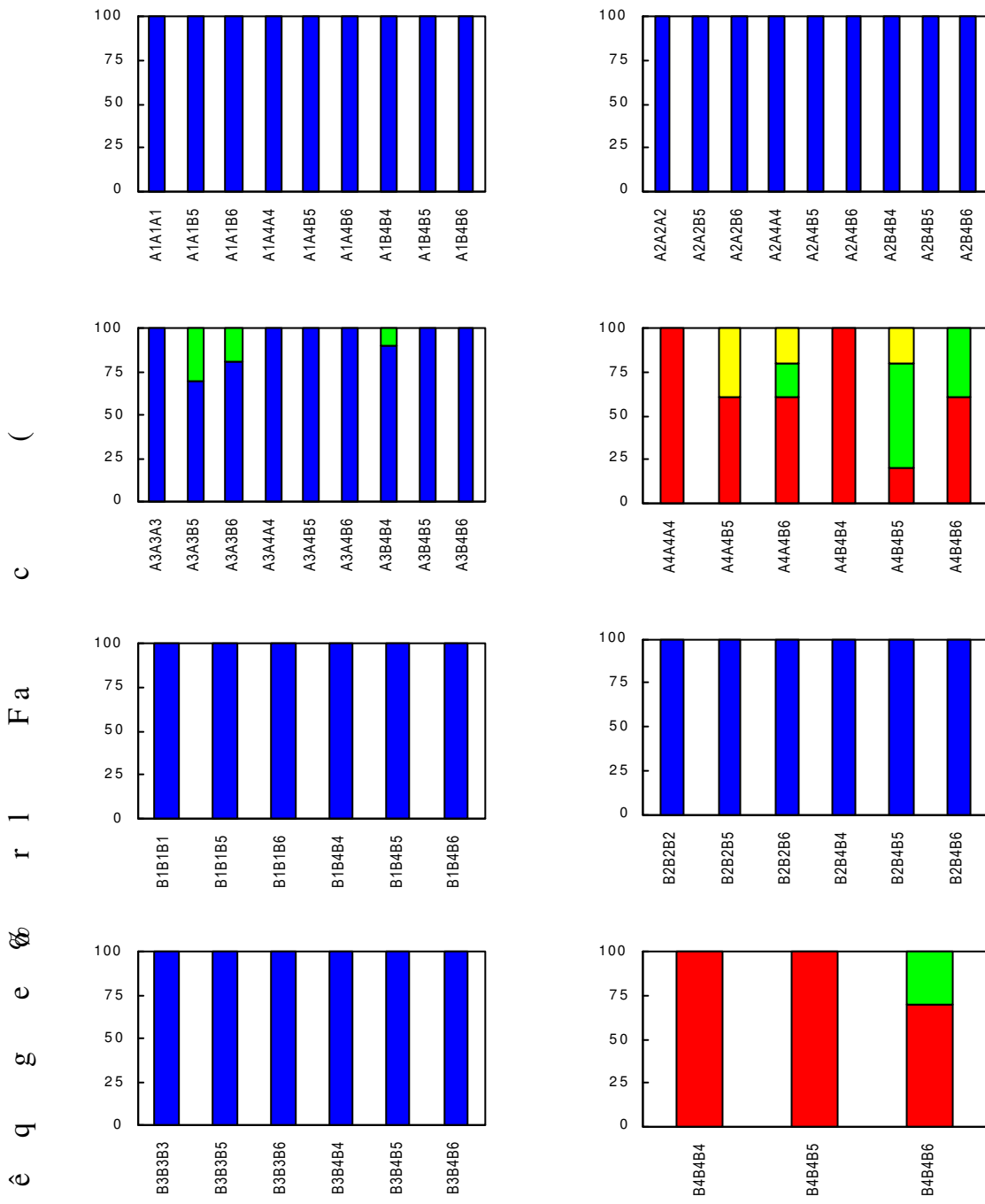


Figura 11 - Reação calogênica, aos sete meses de indução, de explantes foliares do genótipo arábica Catuaí Vermelho submetidos a diferentes seqüências de meios de cultura. Cada seqüência foi representada, no mínimo, por dois explantes repetidos cinco vezes (■ calo primário nodular, ■ calo primário misto, ■ calo embriogênico, ■ calo friável).

detectaram, entre 6 e 8 meses de indução, tecido embriogênico friável em explantes foliares de Catuaí Vermelho. Todavia, nem sempre esse procedimento indutivo em duas etapas, envolvendo a ação combinada de auxinas e citocininas, tem resultado em calos HFSE. Neste aspecto, ZAMARRIPA (1993) obteve uma frequência quase nula de calos LFSE, sem mencionar aqueles HFSE, ao submeter explantes foliares de Catuaí Vermelho aos meios primário e secundário sugeridos por SÖNDAHL e SHARP (1977) para o sistema *Coffea*. Sem especificar a linhagem Catuaí utilizada, Van BOXTEL e BERTHOULY (1996) obtiveram calos HFSE em cerca de 6% dos explantes foliares após cinco meses de indução consecutiva com os meios primário e secundário, que continham como reguladores de crescimento, respectivamente, 2,4-D 2,3  $\mu\text{M}$  + IBA 4,9  $\mu\text{M}$  + 2iP 9,8  $\mu\text{M}$  e 2,4-D 4,5  $\mu\text{M}$  + BAP 18  $\mu\text{M}$ .

Quando as mesmas condições experimentais que envolveram o estudo da influência dos fatores regulador de crescimento e macro-MS sobre a reatividade embriogênica de explantes foliares dos genótipos Apoatã, DH<sub>3</sub>, Catimor e Catuaí Vermelho foram testadas com os mesmos explantes de Catuaí Amarelo, observou-se, aos sete meses de indução, que o desenvolvimento de calos embriogênicos ocorreu principalmente quando a auxina 2,4-D esteve ausente do meio primário (Figura 12), em evidente contraste com CROCOMO et al. (1979). Sem precisar a linhagem Catuaí utilizada, estes autores concluíram que a auxina 2,4-D e a citocinina cinetina são essenciais à proliferação de calos de explantes foliares e de entrenós.

De maneira geral, as razões 2,4-D/KIN testadas no meio primário de indução promoveram a formação de calos secundários, ao contrário de apenas BAP, que promoveu o desenvolvimento de calos primários. A diminuição da concentração de BAP de 5  $\mu\text{M}$ , no meio primário, para 1,5  $\mu\text{M}$ , no meio secundário, causou o aparecimento de calos embriogênico e embriogênico friável. A inclusão de 2,4-D 0,15  $\mu\text{M}$  teve efeito negativo sobre a frequência de calos embriogênicos friáveis, à semelhança do efeito inibidor do ANA para com calos embriogênicos friáveis induzidos em explantes foliares da variedade arábica *Typica*, com meio contendo BAP 5  $\mu\text{M}$  (YASUDA et al., 1985). Calos



Seqüência de meios de cultura indutivos

Figura 12 - Reação calogênica, aos sete meses de indução, de explantes foliares do genótipo arábica Catuaí Amarelo submetidos a diferentes seqüências de meios de cultura. Cada seqüência foi representada, no mínimo, por dois explantes repetidos cinco vezes (■ calo primário nodular, ■ calo primário misto, ■ calo embriogênico, ■ calo embriogênico friável).

HFSE induzidos com o mesmo meio contendo BAP 5  $\mu\text{M}$ , em explantes desse mesmo genótipo arábico, foram também comprovados posteriormente por TAHARA et al. (1994).

### 3.3. Embriogênese somática indireta em meio líquido

Calos embriogênicos friáveis (HFSE) obtidos da reação calogênica de explantes foliares de diferentes genótipos de *Coffea* foram cultivados, na densidade de 10 g de MF de agregados celulares  $\text{L}^{-1}$  (ZAMARRIPA et al., 1991), em 100 mL de meio líquido contidos em Erlenmeyer de 250 mL.

Dentre os cinco genótipos estudados, só não foi possível estabelecer suspensão celular do cultivar Catuaí Vermelho, haja vista que os calos friáveis obtidos degeneraram rapidamente. As avaliações do potencial embriogênico das suspensões celulares (Quadro 2), com idade variando de 4 a 14 meses, foram realizadas cultivando-se os agregados celulares, na densidade de 1g MF  $\text{L}^{-1}$  (ZAMARRIPA et al., 1991), em 100 mL do meio utilizado por YASUDA et al., (1985), cujo regulador de crescimento é a citocinina BAP 4,4  $\mu\text{M}$  (Figura 13). Uma variante desse meio foi a substituição de macro-MS  $\frac{1}{4}$  de força, à exceção de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $\frac{1}{2}$  força, por macro-MS força total.

As diferenças genótípicas relativas ao rendimento embriogênico confirmam a maior reatividade à embriogênese somática de genótipos canéforas que de arábicas, como já observado por VAN BOXTEL e BERTHOULY (1996) e ZAMARRIPA (1993). Contudo, uma comparação entre os resultados do presente estudo e aqueles de outras referências sugere que parte dessa maior reatividade canéfora deve-se a uma melhor adequação das condições experimentais permissivas à expressão máxima do potencial para a embriogênese somática indireta em genótipos canéforas que em arábicas. Nesse caso, ambas as espécies poderiam agrupar genótipos possuindo o mesmo potencial de reatividade, cujas máximas expressões requereriam diferentes condições experimentais.



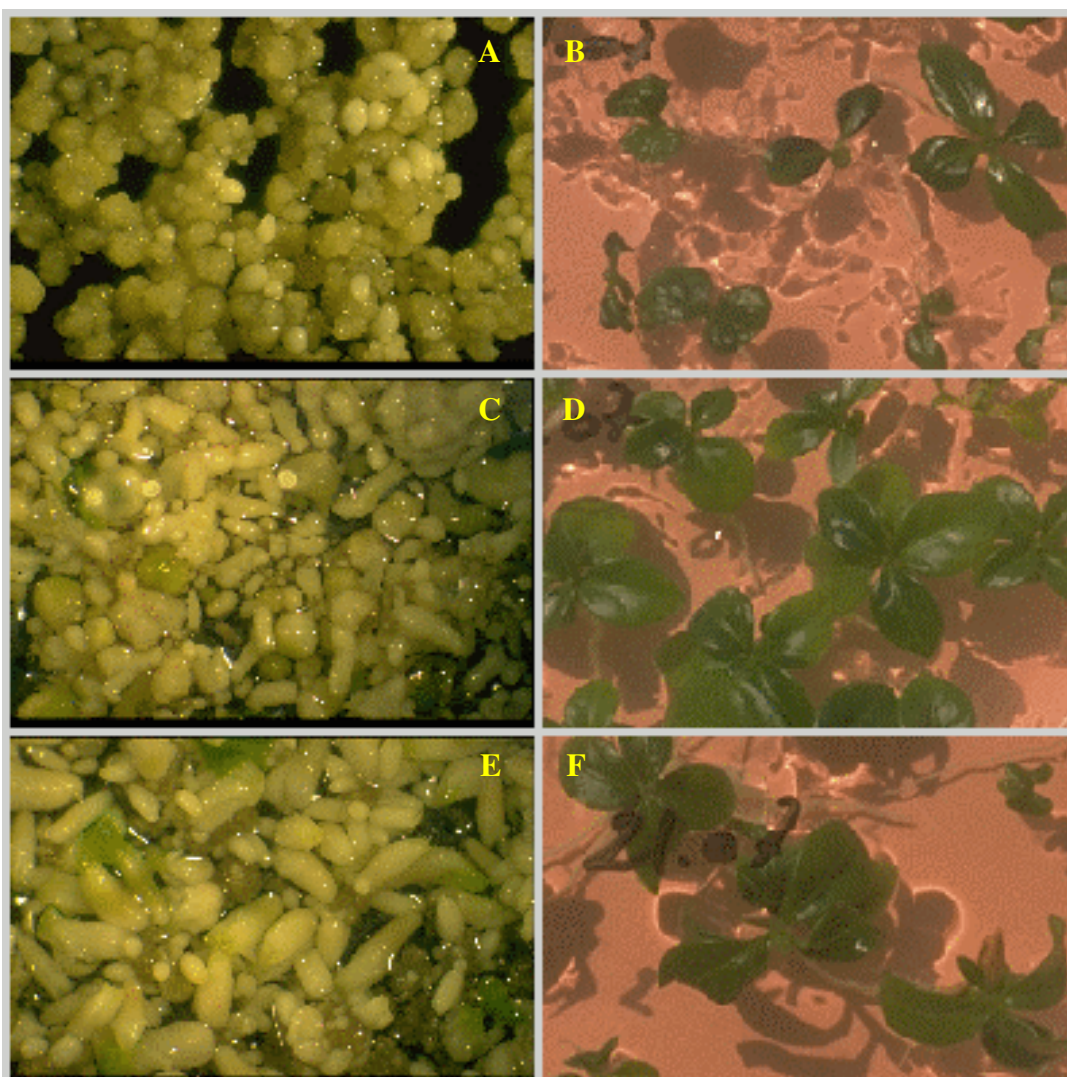


Figura 13 - Embriogênese somática indireta em genótipos de *Coffea*: embriões tipo globular de Apoatã (A) e tipo torpedo de Catimor (C) e de DH<sub>3</sub> (E) aos 60 dias do início da diferenciação dos agregados celulares cultivados em meio líquido. Partes aéreas e plântulas de Apoatã (B), Catimor (D) e DH<sub>3</sub> (F) aos 160 dias do início da germinação dos embriões tipo torpedo.



#### 4. CONCLUSÕES

Todos os genótipos testados reagiram favoravelmente à formação de tecido embriogênico friável, embora apenas os arábicas DH<sub>3</sub> e Catuaí Vermelho requisassem a ação combinada de auxina e citocinina. Os demais genótipos – Apatã, Catimor e Catuaí Amarelo – reagiram mais favoravelmente quando o regulador de crescimento foi apenas a citocinina BAP. A indução de calos embriogênicos e embriogênicos friáveis foi antecipada em dois meses quando os explantes foliares de Apatã, DH<sub>3</sub> e Catimor eram originados de cultura *in vitro*. Nessas condições, o agente gelificante Gelrite™, comparativamente ao ágar, foi mais favorável à indução de calos embriogênicos, friáveis ou não. As maiores frequências de explantes com calos friáveis verificadas para os genótipos canéfora Apatã e arábicas DH<sub>3</sub>, Catimor, Catuaí Amarelo e Catuaí Vermelho foram, respectivamente, 80 (M3/B4), 60 (A2/M3), 40 (M3/B4), 40 (A4/B5) e 20% (A2/B4/B5). Dentre esses cinco genótipos estudados, só não foi possível estabelecer culturas líquidas do cultivar Catuaí Vermelho. A diferenciação embriogênica dos agregados celulares, em cultura líquida, rendeu cerca de 241.000, 72.870 e 121.760 embriões por grama de peso da matéria fresca de agregados celulares Apatã, Catimor e DH<sub>3</sub>, respectivamente.

## **CAPÍTULO 2**

### **ELETROFUSÃO INTERESPECÍFICA ENTRE PROTOPLASTOS DE *COFFEA ARABICA* E DE *C. CANEPHORA***

#### **1. INTRODUÇÃO**

As células diplóides vegetais desprovidas enzimaticamente de suas paredes podem ser conduzidas à fusão, química ou elétrica, rendendo híbridos somáticos de espécies reprodutivamente compatíveis ou incompatíveis, que podem encerrar combinações genéticas sexualmente impossíveis (GLIMELIUS et al., 1991; JONES, 1988; KUMAR e COCKING, 1987; WAARA e GLIMELIUS, 1995). Tais híbridos somáticos podem ser simétricos, por meio da produção de alopoliplóides em uma só etapa (GAIKWAD et al., 1996; SATO et al., 1996), ou assimétricos (FAHLESON et al., 1997; KAO, 1977). A assimetria resulta da eliminação dos cromossomos ao acaso (FAHLESON et al., 1997; WAARA e GLIMELIUS, 1995), que pode ser espontânea (FAHLESON et al., 1988; PIJNACKER et al., 1987; SUNDBERG e GLIMELIUS, 1991) ou induzida por irradiação dos protoplastos doadores com raios-X (BELARMINO et al., 1996; KISAHARA e KAMEYA, 1994) ou raios gama (O'CONNELL e HANSON, 1987; VARDI et al., 1987) e por micronucleação das células-fontes (RAMULU

et al., 1995; VERHOEVEN et al., 1991) anteriormente à fusão. A eliminação espontânea tem sido atribuída à distância taxonômica (BABYCHUK et al., 1992) e aos diferentes níveis de ploidia (SUNDBERG e GLIMELIUS, 1991) e atividade mitótica (GLIMELIUS et al., 1991) dos protoplastos parentais fusionados. Embora BABYCHUK et al. (1992) tivessem sugerido que híbridos intergenéricos e, excepcionalmente, mesmo aqueles intersubfamílias, pudessem conservar ambos os genomas parentais sem sinalizar eliminação cromossômica, FAHLESON et al. (1988) verificaram híbridos assimétricos intergenéricos férteis entre *Brassica napus* e *Eruca sativa*. Posteriormente, SUNDBERG e GLIMELIUS (1991) obtiveram uma correlação positiva entre a frequência de híbridos somáticos com cromossomos eliminados e a distância genética entre as espécies envolvidas nas combinações híbridas em *Brassicaceae*. Os mesmos autores verificaram, ainda, que cromossomos de genomas diplóides eram preferencialmente eliminados em híbridos somáticos de espécies alotetraplóides com espécies diplóides, que apresentaram maior eliminação cromossômica relativamente aos híbridos entre espécies de mesmo nível de ploidia. No caso de híbridos assimétricos, os protoplastos recipientes, ao receberem somente parte do genoma doador contendo a característica desejável, resultam em genótipos requerendo menor número de etapas de retrocruzamento para remover características indesejáveis co-introduzidas (WAARA e GLIMELIUS, 1995). A competência desses protoplastos recipientes, transformados para a expressão da totipotência é modulada, principalmente, por fatores inerentes ao genótipo, ao estado ontogenético do tecido-fonte dos protoplastos e às condições experimentais, como o cultivo da fonte de protoplastos e dos mesmos e a digestão enzimática da parede (OCHATT et al., 1992; POTRYKUS e SHILLITO, 1986; ROEST e GILISSEN, 1993).

O gênero *Coffea*, no que se refere aos fatores genótipo e estado ontogenético, tem revelado competência para a regeneração de plantas a partir de protoplastos obtidos de calos friáveis embriogênicos de progênies de *C. canephora* e de híbridos interespecíficos Arabusta e de cultivares de *C. arabica* cultivados em meios semi-sólido (TAHARA et al., 1994) ou líquido

(ACUÑA e DE PENA, 1991; NORIEGA e SÖNDAHL, 1993; SPIRAL e PETIARD, 1991; Van BOXTEL e BERTHOULY, 1996; ZAMARRIPA et al., 1991). De maneira geral, as culturas líquidas embriogênicas, além da uniformidade, da reprodutibilidade de resultados (OCHATT et al., 1992) e da geração de protoplastos mais resistentes às manipulações de fusão que aqueles de folhas (TEMPELAAR e JONES, 1985), são consideradas as fontes ideais de protoplastos totipotentes (POTRYKUS e SHILLITO, 1986). Concomitantemente, são muito sensíveis às variações das condições de cultivo, como o intervalo de subcultura e a geometria do recipiente de cultivo (POTRYKUS e SHILLITO, 1986), e contêm dois distintos tipos celulares: células maiores altamente vacuoladas e aquelas menores densamente citoplasmáticas (KARLSSON e VASIL, 1986; VASIL e VASIL, 1982; 1986). VASIL e VASIL (1980) comprovaram que protoplastos de células maiores e vacuoladas de *Pennisetum americanum*, embora refizessem a parede celular, não possuíam competência para proliferar como o tipo celular densamente citoplasmático, que foi verificado por VASIL e VASIL (1986) ser embriogênico em *Zea mays*. Esses mesmos autores observaram, ainda, que o tipo celular altamente vacuolado, não-embriogênico, origina-se do tipo embriogênico e caracteriza-se pela perda da atividade mitótica e de amido. Tal perda da atividade mitótica contribui, também, para reduzir as chances de fusão nuclear em híbridos somáticos (NAGATA, 1989). A esse respeito, OKADA et al. (1986) verificaram que protoplastos de *Nicotiana tabacum*, obtidos de células nos diferentes estádios do ciclo celular, apresentaram maior atividade da acetiltransferase do cloranfenicol (CAT), em seguida à eletroporação com plasmídeos quiméricos, quando provenientes de células na fase M, o que atribuíram à ausência de membrana nuclear.

Nos dois procedimentos fusógenos mais utilizados, químico e elétrico, os protoplastos são submetidos, respectivamente, ao tratamento com polietilenoglicol (PEG) em condições salinas (KAO e MICHYLUK, 1974; WALLIN et al., 1974) e à seqüência de campos de corrente alternada, de alta freqüência, e de corrente contínua, com pulsos curtos de alta voltagem (TEMPELAAR e JONES, 1985; ZIMMERMANN e SCHEURICH, 1981). Ambos os processos promovem

a redistribuição de cargas elétricas na plasmalema tornando-a mais hidrofóbica e, após lavagem do PEG com altas concentrações de cálcio e aplicação de pulsos elétricos nos respectivos processos químico e eletrofusão, mais porosa (HAHN-HÄGERDAL et al., 1986; ZACHRISSON e BORNMAN, 1986). Contudo, maiores freqüências de fusões têm sido relatadas quando os protoplastos são eletromanipulados relativamente ao tratamento químico. BATES (1985), em *Nicotiana*, e posteriormente, ZACHRISSON e BORNMAN (1986), em *Brassica*, obtiveram-nas em números de 37 e 17 e 20 e 5 a 10%, respectivamente. Comparando os efeitos do PEG e da eletrofusão sobre algumas propriedades da plasmalema de protoplastos isolados do pecíolo de uma linha dihaplóide de *Brassica napus*, HAHN-HÄGERDAL et al. (1986) verificaram vazamento de aminoácidos, proteínas e DNA de protoplastos tratados com PEG, o que não observaram em protoplastos-controle e naqueles eletromanipulados. Esses resultados sugeriram aos autores que os poros induzidos com PEG são maiores e, ou, que os seus fechamentos, e conseqüente restauração da plasmalema, não são tão rápidos e eficientes relativamente aos dos protoplastos eletromanipulados. De acordo com ZACHRISSON e BORNMAN (1986), outras vantagens da eletrofusão sobre a fusão química incluem a maior reprodutibilidade experimental decorrente da determinabilidade das características elétricas, o controle sincronizado da fusão, o controle do número de protoplastos envolvidos na fusão bem como da posição dos poros na plasmalema e a ausência de efeitos tóxicos colaterais dos agentes químicos promotores de fusão. Neste aspecto, CHAND et al. (1988) verificaram que a eletroporação estimulou a calogênese e a morfogênese em calos de *Solanum dulcamara* oriundos de protoplastos eletromanipulados.

Seguindo-se à manipulação de fusão entre duas populações distintas de protoplastos tem-se, finalmente, protoplastos parentais não fusionados, homofusões e heterofusões. Estes últimos produtos, que representam geralmente menos que 10% da mistura total fusionada (WAARA e GLIMELIUS, 1995), devem ser separados de uma população inicial de aproximadamente  $5 \times 10^5$  protoplastos. Considerando-se, ainda, a natureza probabilística da obtenção da combinação genética desejada, a necessidade de aumento da população de

heterofusionados com vistas ao incremento das chances de sucesso para a produção do recombinante, mediante a multiplicação das manipulações de fusão, requer uma metodologia rápida e eficiente para a seleção dos híbridos somáticos. Tais procedimentos, que se baseiam na complementação genética e fisiológica, na identificação visual e na restauração da capacidade de crescimento dos híbridos após fusão de células inativadas, podem ou não ser combinados entre si. A seleção por complementação genética pressupõe a fusão de células parentais que sejam deficientes em atividades enzimáticas, como a redutase do nitrato (GUPTA et al., 1982; LÁZÁR et al., 1983), e em clorofila (LÁZÁR et al., 1981), e resistentes a drogas como cicloheximida (LÁZÁR et al., 1981) e 6-azauracil (GLEDDIE et al., 1986). Todavia, sua aplicação generalizada é limitada pela existência escassa e pela difícil produção de cultivares mutantes (WAARA e GLIMELIUS, 1995). Também limitada é a complementação fisiológica baseada na capacidade das células híbridas de sobreviverem e se multiplicarem em condições de cultura que são inaceitáveis para o crescimento e, ou, diferenciação das células parentais, como em *Petunia* (POWER et al., 1977) e *Rutaceae* (GROSSER et al., 1988a; 1988b; OHGAWARA et al., 1985). A identificação visual de híbridos somáticos explora diferenças morfológicas existentes entre os protoplastos progenitores (WAARA e GLIMELIUS, 1995), bem como a utilização de marcadores fluorescentes, tais como clorofilas (BROMOVA e KNOFF, 1991; WAARA et al., 1991), diacetato de fluoresceína (WAARA et al., 1991), isocianatos de fluoresceína e de rodamina (AUSTIN et al., 1993; GALBRAITH e MAUCH, 1980) e Hoechst 33258 (MEADOWS e POTRYKUS, 1981), que não interferem no desenvolvimento posterior dos protoplastos (GALBRAITH e MAUCH, 1980; REICH et al., 1986). As células híbridas podem então ser isoladas manualmente com pipeta capilar acoplada a micromanipulador (PATNAIK et al., 1982; WAARA et al., 1991) ou eletromecanicamente, por citometria de fluxo celular, quando do emprego de marcadores fluorescentes (BROMOVA e KNOFF, 1991; FAHLESON et al., 1988). Este último procedimento permite isolar 2.000 heterocários h<sup>-1</sup> (GLEBA e SYTNIK, 1984a), eficiência nitidamente superior àquela manual, que é de 20 a

30 heterocários h<sup>-1</sup> (PATNAIK et al., 1982). Alternativamente, a inativação irreversível das células tem sido realizada no nível nuclear, mediante a utilização de irradiação ionizante (SIDOROV et al., 1981; VARDI et al., 1990), no nível citoplasmático, por meio do tratamento com os inibidores enzimáticos iodoacetato (AVIV et al., 1984; NEHLS, 1978; VARDI et al., 1987) e iodoacetamida (BELARMINO et al., 1996; KAMEYA et al., 1989; MATIBIRI e MANTELL, 1994) e no nível mitocondrial, por meio do inibidor da fosforilação oxidativa rodamina (AVIV et al., 1986; NEHLS, 1978). A fusão de protoplastos inativados metabolicamente com protoplastos irradiados (SIDOROV et al., 1981; VARDI et al., 1990) ou também inativados metabolicamente, mas com inibidor de atividade distinta do primeiro (BÖTTCHER et al., 1989; NEHLS, 1978), permite a seleção por complementação metabólica, que libera apenas os heterofusionados do impedimento ao desenvolvimento. Todavia, a dupla inativação com irradiação tem produzido mais cíbridos que híbridos (BÖTTCHER et al., 1989).

Independentemente da estratégia de seleção utilizada, os híbridos somáticos podem ser confirmados posteriormente por análises citológica (GROSSER et al., 1992; MORIKAWA et al., 1987; TUSA et al., 1990), morfológica (LOUZADA et al., 1992; TUSA et al., 1992), de isoenzimas (BERTHAUD e CHARRIER, 1985; HANDLEY et al., 1986; GROSSER et al., 1988b) e de marcadores moleculares tipo RFLP (KAMEYA et al., 1989; SUNDBERG e GLIMELIUS, 1991), RAPD (OTONI et al., 1995) e seqüências repetitivas de DNA (FAHLESON et al., 1997).

Assim, objetivou-se, neste trabalho, a introgressão das resistências a *Meloidogyne incognita* e *M. exigua*, encontradas na progênie Apoatã de *Coffea canephora*, em cultivares arábicas diplóide e tetraplóides mediante a fusão de protoplastos. Sua exequibilidade está consolidada no sucesso alcançado com a transferência parassexual, via fusão protoplástica, das resistências à mela da batata (HELGESON et al., 1986), à podridão de *Erwinia* (AUSTIN et al., 1986) e aos nematóides *Meloidogyne chitwood* (AUSTIN et al., 1993) e *M. incognita* (Gleddie et al., 1985 citados por FASSULIOTIS, 1987) para cultivares sensíveis em *Solanum*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal**

Foram utilizadas como fontes de explantes foliares plantas mantidas em casa de vegetação e partes aéreas micropropagadas das espécies *Coffea canephora* e *C. arabica*. O genótipo canéfora foi o cultivar Apoatã IAC LC 2258, resultante da introdução C 2258 do cultivar Robusta após ciclos de seleção conduzidos no Instituto Agronômico de Campinas, para a resistência a *Meloidogyne exigua* (FAZUOLI, 1986) e às raças 2 (MAZZAFERA et al., 1989) e 3 (LIMA et al., 1987; 1989) de *M. incognita*. Os arábicas testados, mantidos no CRN, foram o diplóide DH<sub>3</sub>, descendente partenogênético espontâneo de linhagem etíope, e os tetraplóides Catimor (CRN 8661) e Catuaí Amarelo (CRN 268).

### **2.2. Estabelecimento e manutenção de culturas líquidas embriogênicas**

Para a indução de calos embriogênicos friáveis, folhas jovens completamente expandidas de ramos ortotrópicos (canéfora Apoatã) e plagiotrópicos (arábicas), após serem lavadas em água corrente, foram imersas em solução de hipoclorito de cálcio 5% com o agente molhante Henkel



0,04% (v/v) contida em recipientes plásticos de volume 500 mL. Em seguida à desinfecção durante 20 min sob agitação moderada, as folhas foram lavadas três vezes com água bidestilada autoclavada. Esta última etapa e as seguintes, até a vedação das placas de Petri com parafilme, foram conduzidas em câmaras de fluxo de ar laminar. Folhas provenientes de partes aéreas micropropagadas não requereram desinfecção. Após eliminação da nervura principal, das extremidades laterais, apicais e basais das folhas doadoras de explantes, foram obtidos fragmentos nas dimensões de 7 x 7 mm, aproximadamente, os quais foram distribuídos, então, com o lado adaxial em contato com a superfície de 10 mL do meio semi-sólido contidos em placa de Petri de Ø 55 mm estéreis. Cada placa recebeu inicialmente cinco explantes, que foram repetidos cinco a vinte vezes. As placas de Petri contendo os explantes foram mantidas em condições de obscuridade à temperatura de  $25 \pm 1$  °C. Os calos friáveis e embriogênicos induzidos, em função do genótipo, com um ou mais diferentes meios semi-sólidos, em sucessão ou com um único meio contendo apenas citocinina como regulador de crescimento (Quadros 1 e 2), foram, em seguida, utilizados para estabelecer culturas líquidas contidas em Erlenmeyers. Estes, fechados com rolhas de celulose recobertas com papel alumínio e contendo agregados celulares e meio líquido, que geralmente correspondia ao semi-sólido de origem do calo friável sem o agente gelificante (Quadros 1 e 2), foram deixados sobre agitador com movimento giratório excentrado a 110 rpm e sujeito a fotoperíodo de 12 h e irradiância de  $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A densidade inicial de biomassa (agregados celulares) foi mantida em  $10 \text{ g L}^{-1}$  de meio (ZAMARRIPA, 1993), e o estabelecimento envolveu uma sucessão de Erlenmeyers de volume crescente: 25, 50, 100 e 250 mL, que continham, respectivamente, 5, 10, 25 e 50 ou 100 mL de meio líquido. A transferência da biomassa com renovação do meio líquido, para Erlenmeyer de volume imediatamente superior na série, ocorria a intervalos de 14 ou 21 dias, dependendo da sua taxa de crescimento. Uma vez estabelecidas, as suspensões celulares eram subculturadas em 100 mL de meio contidos em Erlenmeyers de 250 mL, a intervalos de 14 dias. O intervalo foi estabelecido

Quadro 1 - Meios de cultivo semi-sólidos indutores de calos friáveis e embriogênicos e meios líquidos mantenedores das suspensões celulares dos diferentes genótipos

Espécie	Genótipo	Meio de Cultivo	
		Indutor	Mantenedor
<i>Coffea canephora</i>	Diplóide Apoatã IV-D	M1	M2
	Diplóide Apoatã IV-C	M3/B6*	B6 ou B11
<i>Coffea arabica</i>	Diplóide DH <sub>3</sub>	M8	M8** ou B6 ou B12
		B2	B2
		B3	B3
	Tetraplóide Catimor	B4	B4 ou B6
	Tetraplóide Catuaí Amarelo	A4/B4/B5	B5

\* (/) indica sucessão de meios replicados a cada 30 dias. As replicagens para os mesmos meios ocorreram a intervalos de 30 a 90 dias.

\*\* Suspensão celular estabelecida e cedida pelo Centro de Pesquisa da Nestlé para avaliação do rendimento protoplástico em função do tempo pós-subcultura e da pré-plasmólise, e a eficiência de plaqueamento em função da densidade de plaqueamento.

após estudo preliminar das cinéticas do crescimento e do  $R_p$ , em resposta ao tratamento tempo pós-subcultura, com oito níveis espaçados de 4 a partir de 4 dias, das suspensões celulares M2 e B6 de Apoatã, e M8 de DH<sub>3</sub> (Quadro 1). Em razão da insuficiência de material vegetal que permitisse o emprego de volumes de 100 mL por unidade experimental repetida três vezes, optou-se pelo uso dos volumes 50 e 25 mL para estudar o efeito das respectivas diferenças interespecíficas e aquelas intraespecíficas, relativas aos meios indutor e mantenedor dos calos friáveis, no crescimento e  $R_p$  das culturas líquidas.

### 2.3. Obtenção de protoplastos da digestão enzimática dos agregados celulares

Os protoplastos foram obtidos mediante digestão enzimática de agregados celulares supridos pelas culturas celulares, cujo último subcultivo ocorrera entre 10 e 14 dias antes. À exceção de quando se estudou o  $R_p$  em



resposta ao tempo de digestão de 3, 6, 9 e 12 h e à concentração das enzimas celulase e pectinases (Quadro 3), utilizou-se sempre uma SEOP que continha celulase Onozuka R-10 2%, macerozima R-10 1%, pectoliase Y-23 0,2%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  6 mM, tampão de mMES 3 mM e manitol 0,445 M (SPIRAL e PETIARD, 1991). A pressão osmótica dessa solução, bem como de todas aquelas utilizadas com protoplastos, foi fixada em - 1,537 MPa (SÖNDAHL et al., 1980) com auxílio de um osmômetro baseado no ponto de congelamento, ao se permitir que apenas a concentração de manitol variasse. O pH das SEOP's foi corrigido para 5,6 com KOH ou HCl, anteriormente a suas esterilizações por filtração a 0,20  $\mu\text{m}$ .

Quadro 3 - Concentração percentual (% p/v) das enzimas na solução enzimática para obtenção de protoplastos (SEOP)

SEOP	Celulase R-10	Macerozima R-10	Pectoliase Y-23
A*	2,0	1,0	0,2
B	2,0	0,5	0,2
C	1,0	0,5	0,2
D	2,0	0,5	0,0
E	1,0	0,0	0,2

\* SPIRAL e PETIARD (1991). Todas as SEOP's possuem  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  6 mM e MES 3 mM. As SEOP's A, B, C, D e E contém manitol nas concentrações 0,445, 0,471, 0,494, 0,489, e 0,516 M, respectivamente.

A digestão enzimática ocorria em placas de Petri de  $\varnothing$  90 mm autoclavadas, contendo cerca de 250 a 500 mg de MF de agregados celulares, filtrados ou não em filtro de náilon de  $\varnothing$  de 1 mm, e 12 mL da SEOP, acrescida de cisteína nas concentrações de 0 ou 100 mg  $\text{L}^{-1}$ . A pré-plasmólise em SF durante 1 h, anteriormente à digestão, constituiu objeto de estudo. O conjunto era deixado sobre agitador rotatório a 50 rpm durante quatro a seis horas, sob temperatura ambiente de 25°C. Na experimentação envolvendo os inibidores metabólicos rodamina (0 a 600  $\mu\text{M}$ ) e iodoacetamida (0 a 20 mM), estes eram adicionados quando faltavam 30 min para o término da digestão. Suas soluções

foram esterilizadas por filtração a 0,20  $\mu\text{m}$ . Após o tempo de digestão, a SEOP, contendo restos celulares, protoplastos e agregados celulares não digeridos, era filtrada através de filtro de náilon com poros de  $\varnothing$  de 25  $\mu\text{m}$ , autoclavado. O filtrado era, então, coletado em tubos de poliestireno estéreis de 12 mL com tampa e centrifugado a 750 rpm durante cinco minutos, seguindo-se a lavagem dos protoplastos. Esta era realizada uma vez com solução contendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 mM,  $\text{KNO}_3$  1 mM,  $\text{MgSO}_4$  1 mM,  $\text{CaCl}_2$  6 mM, KI 1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuSO}_4$  0,1  $\mu\text{M}$  e manitol 0,548 M (FREARSON et al., 1973), seguida por duas lavagens com a mesma solução utilizada durante o processo de eletrofusão de protoplastos, SF, que continha  $\text{CaCl}_2$  0,2 mM e manitol 0,566 M. Ambas as soluções de lavagem eram esterilizadas em autoclave após correção do pH para 5,6 com NaOH. Em seguida à centrifugação da última lavagem, o precipitado era dissolvido novamente em um volume da SF, após o que se retirava uma amostra para contagem dos protoplastos em lâmina de Malassez, com auxílio de um microscópio invertido Olympus.

#### **2.4. Eletrofusão interespecífica de protoplastos**

A câmara de fusão consistiu num sistema multieletrodo contendo 14 filamentos de cobre, revestidos com ouro, em paralelo e espaçados em 2 mm, conectado a um gerador de corrente alternada com amplitude de 41 Vpp a 0,38–1,08 Mhz, e de pulsos quadrados de corrente contínua, de comprimento variando de 0 a 100  $\mu\text{s}$  e com amplitudes até 300 V, à semelhança do aparelho utilizado por SIHACHAKR et al. (1988). Para a eletrofusão interespecífica, visualizada com microscópio invertido Olympus, reuniam-se em uma placa de Petri de  $\varnothing$  de 60 mm, estéril, duas populações de protoplastos, na densidade de  $1,4 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ , contidas cada uma em 250  $\mu\text{L}$ . Os eletrodos, previamente esterilizados com etanol absoluto durante 15 min, eram colocados sobre uma suspensão de 500  $\mu\text{L}$  de protoplastos, ao que se seguia a aplicação de um campo de corrente alternada de  $125 \text{ V cm}^{-1}$  a 1 Mhz, durante 15 s, para alinhamento dos protoplastos. Uma vez alinhadas, as cadeias de protoplastos eram submetidas a 1, 2 ou 3 pulsos

quadrados de 35  $\mu\text{s}$  de corrente contínua de 1.200  $\text{V cm}^{-1}$ . Durante o processo de eletroporação o campo de corrente alternada era removido automaticamente. O efeito da aplicação dos campos elétricos, para a eletrofusão, foi avaliado sobre a regeneração de protoplastos Apoatã e DH<sub>3</sub>.

## 2.5. Cultivo dos protoplastos

Imediatamente após a eletrofusão ou contagem dos protoplastos, nos demais ensaios, adicionava-se aos 500  $\mu\text{L}$  da suspensão protoplástica ( $7 \times 10^5$  protoplastos em SF) 3 mL do meio E (Quadro 4), previamente autoclavado e conservado no estado líquido em banho de água a 38 °C. Seguindo-se a uma rápida mistura, distribuía-se o volume final de 3,5 mL entre seis placas de Petri de  $\varnothing$  de 55 mm estéreis. Após a gelatinização da agarose, adicionava-se 3 mL do meio líquido F3, que é o meio F (Quadro 4) associado aos reguladores de crescimento 2,4-D 0,15  $\mu\text{M}$  e BAP 1,5  $\mu\text{M}$  (associação 3 no Quadro 5). Neste aspecto, os meios E e F foram combinados com as associações de reguladores de crescimento (Quadro 5) com vistas à possível seleção dos produtos da eletrofusão interespecífica. Assim, os protoplastos encontravam-se dispersos na fase semi-sólida do meio E e imersos na fase líquida do meio F3 (Figura 1).

Uma vez vedadas com duas voltas de parafilme e, em seqüência, com duas voltas de filme plástico, para reduzir a perda evaporativa de água, as placas de Petri eram conduzidas à obscuridade, onde permaneciam durante 21 dias sob a temperatura de 25 °C. Decorrido esse tempo, substituía-se 1 mL do meio líquido, sobre a fase semi-sólida, por igual volume do meio F3, mas com os carboidratos glucose e sacarose suprimido e aumentado para 30  $\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. As placas eram, então, transferidas para ambiente com luz difusa, na mesma temperatura de 25 °C, e a intervalos subseqüentes de 21 dias renovava-se 1 mL do meio líquido utilizando o meio F3 modificado.

Quadro 4 - Composição dos meios de cultura de regeneração dos protoplastos

Componentes	E	F
Macroelementos	YAS*	YAS
Microelementos	YAS	YAS
Na <sub>2</sub> EDTA (mg L <sup>-1</sup> )	37,3	37,3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (mg L <sup>-1</sup> )	27,8	27,8
Pantotenato de Cálcio (mg L <sup>-1</sup> )	1 <sup>M</sup>	-
Mio-inositol (mg L <sup>-1</sup> )	100 <sup>M</sup>	100 <sup>G</sup>
Ácido nicotínico (mg L <sup>-1</sup> )	1 <sup>M</sup>	1 <sup>G</sup>
Piridoxina-HCl (mg L <sup>-1</sup> )	1 <sup>M</sup>	1 <sup>G</sup>
Tiamina-HCl (mg L <sup>-1</sup> )	1 <sup>M</sup>	10 <sup>G</sup>
Biotina (mg L <sup>-1</sup> )	0,01 <sup>M</sup>	-
Cisteína (mg L <sup>-1</sup> )	20	20
Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	20	20
Glucose (g L <sup>-1</sup> )	84,6	84,6
Agarose (g L <sup>-1</sup> )	16	-

\* YASUDA et al. (1985), <sup>M</sup>-vitaminas de MOREL e WETMORE (1951) e <sup>G</sup>-vitaminas de GAMBORG et al. (1968). Todos os meios foram preparados com água bidestilada. O pH era corrigido para 5,6 com HCl ou NaOH, posteriormente à adição (E) ou não (F) do agente gelificante, após o que os meios eram autoclavados durante 20 min, à temperatura de 115 °C e pressão de 12 psi (1,5 atm), e filtrados a 0,20 µm.

Quadro 5 - Associações de auxinas (µM) e de citocininas (µM) testadas nos meios E e F de regeneração dos protoplastos

Associação*	Auxina			Citocinina	
	2,4-D	ANA	AIB	BAP	KIN
1	-	-	-	1,50	-
2	-	-	-	5,00	-
3	0,15	-	-	1,50	-
4	2,26	2,69	-	-	2,32
5	-	2,50	-	-	10,00
6	-	-	4,92	22,20	-

\* (1) B5, (2) YASUDA et al. (1985), (3) B6, (4) SCHÖPKE et al. (1987), (5) SÖNDAHL et al. (1980) e (6) M8/Centre de Recherche Nestlé.

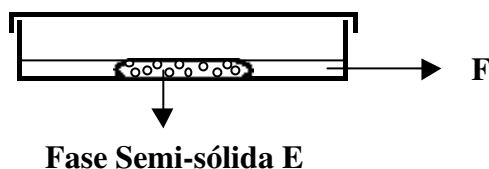


Figura 1 - Cultura de protoplastos ( ◦ ) dispersos na fase semi-sólida E e imersos na fase líquida F.

## 2.6. Avaliação dos resultados

De maneira geral, as respostas aos tratamentos induzidos às unidades experimentais, distribuídas em blocos ao acaso, foram avaliadas mediante contagem, com auxílio de um microscópio invertido Olympus, de protoplastos ou de microcalos regenerados dos protoplastos plaqueados. A contagem de microcalos foi parcial ou total. No primeiro caso, os resultados por unidade experimental referem-se ao número médio de microcalos contados em um mínimo de três campos microscópicos distintos. No segundo caso, as contagens abrangeram todos os microcalos regenerados de populações plaqueadas, da ordem de  $3$  a  $7 \times 10^5$  protoplastos.

Para avaliação dos ensaios de eletrofusão, foram contados todos os microcalos regenerados de protoplastos parentais, inativados e não-inativados metabolicamente (controles), e de protoplastos parentais inativados metabolicamente que foram expostos à eletrofusão. Os calos emergentes foram induzidos à diferenciação embriogênica com o meio semi-sólido B6 (Quadro 2) acrescido de asparagina 10 mM (NISHIBATA et al., 1995). Os embriões estão sendo cultivados, seqüencialmente, nos meios M4 e M5 de ZAMARRIPA et al. (1991), para o seu desenvolvimento.

Nos casos em que os fatores em estudo eram qualitativos, os efeitos principais e as interações foram testados pelo teste F, a 5% de probabilidade. Para os fatores quantitativos, os dados foram avaliados por meio de regressão linear, Rp função de rodamina e função do tempo de digestão, e por meio da



regressão não linear: sigmoidal (ALDER e ROESSLER, 1964), para o acúmulo de matéria fresca em função do tempo pós-subcultura, e exponencial, para microcalos regenerados em função de rodamina. Com o objetivo de verificar se as equações estimadas, para os diferentes genótipos ou SEOP's, poderiam ser representadas por uma equação comum, aplicou-se um teste para identidade de modelos (REGAZZI, 1993; Apêndice).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Crescimento das suspensões celulares

A cinética do crescimento de culturas líquidas dos genótipos arábica diplóide DH<sub>3</sub> e canéfora Apatã foi estudada a fim de identificar o tempo pós-subcultura quando a maioria dos agregados celulares encontrar-se-ia em divisão celular. Além da importância das condições e da idade da suspensão celular no isolamento protoplástico (OCHATT e POWER, 1992; ORDAS et al., 1991), os protoplastos na fase M do ciclo celular aceitam mais facilmente DNA em razão da ausência de membrana nuclear (NAGATA, 1989). Ambos os genótipos revelaram, imediatamente após a subcultura, uma fase exponencial de crescimento celular até um ponto de inflexão ( $t_i$ ), a partir do qual as taxas de crescimento reduziram progressivamente para atingir um peso de matéria fresca de agregados celulares assintótico (Figura 2). Essas curvas, cujas equações ajustadas pelo modelo logístico  $MF=k/(1+b.e^{-at})$  de ALDER e ROESSLER (1964) e testadas para a identidade de modelos (REGAZZI, 1993) encontram-se no Quadro 6, revelaram uma diferença aproximada de quatro dias entre os  $t_i$ 's ( $\ln b/a$ ) das suspensões celulares DH<sub>3</sub> e Apatã IV-D. Os parâmetros  $b$  e  $a$  foram significativamente diferentes entre os modelos pelo teste de  $t$  a 10 e 1% de probabilidade, respectivamente.

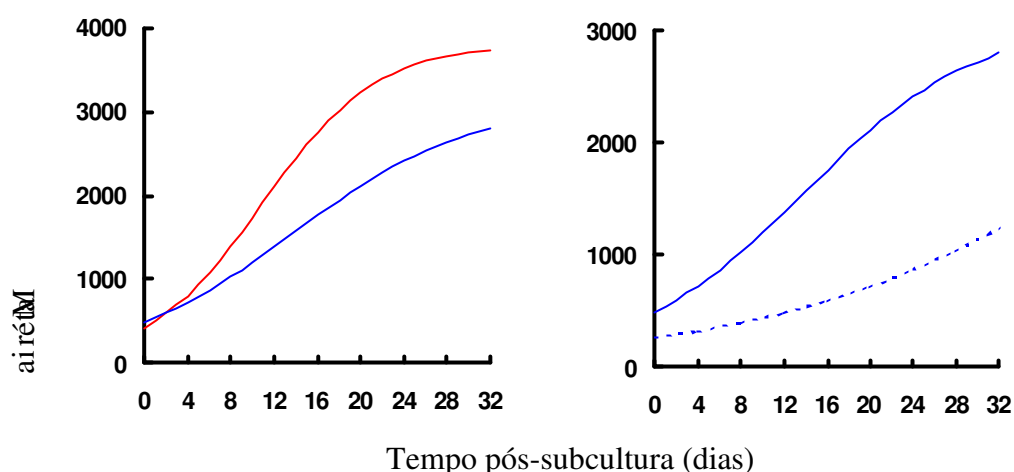


Figura 2 - Acúmulo de matéria fresca de agregados celulares dos genótipos arábica diplóide DH<sub>3</sub> (—) e canéfora Aboatã (—) em resposta ao tempo pós-subcultura. Os agregados celulares foram cultivados em meio líquido na densidade inicial 10g L<sup>-1</sup>, em volumes de 50 (—, IV-D) e 25 mL (....., IV-C) contidos em Erlenmeyers de volumes de 250 e 100 mL, respectivamente.

Quadro 6 - Equações de regressão ajustadas para a produção de matéria fresca (MF) de suspensões celulares cultivadas em diferentes volumes de meio líquido, em função do tempo pós-subcultura (t) e do tempo gasto para atingir o ponto de inflexão (t<sub>i</sub>)

Genótipo	Volume do meio líquido (mL)	Equações ajustadas	R <sup>2</sup>	t <sub>i</sub> (dias)
Diplóide DH <sub>3</sub>	50	MF=3806,58/(1+7,9789.e <sup>-0,1903t</sup> )	0,994	10,9
Aboatã IV-D	50	MF=3098,83/(1+5,3780.e <sup>-0,1227t</sup> )	0,995	13,7
Aboatã IV-C	25	MF=5825,28/(1+21,4399.e <sup>-0,055t</sup> )	0,995	55,8
Aboatã IV-C*	50	MF=15018,27/(1+27,8603.e <sup>-0,059t</sup> )	0,999	56,4

\* estimativa realizada apenas com os níveis 0, 8, 20 e 32 do fator tempo.

Diferença maior entre os  $t_i$ 's foi verificada, contudo, entre as duas cepas de Apoatã, IV-D e IV-C, embora apenas o parâmetro a diferisse pelo teste de  $t_{(0,1\%)}$ , provavelmente em decorrência de variações entre os meios líquidos, respectivamente M2 e B6. A redução do volume do meio de cultura de 50 para 25 mL não é, aparentemente, responsável pela diferença entre os  $t_i$ 's das duas cepas de Apoatã, haja vista que o  $t_i$  estimado com apenas quatro níveis do fator tempo para a cepa IV-C, cultivada em um volume de 50 mL, foi praticamente o mesmo que aquele verificado com 25 mL. Considerando-se apenas os reguladores de crescimento, M2 contém BAP 4,4  $\mu$ M e B6 encerra BAP 1,5  $\mu$ M + 2,4-D 0,15  $\mu$ M. Neste caso, a redução da concentração de citocinina e, ou, a inclusão de auxina aumentaram a duração da fase exponencial por meio de uma provável interferência na duração do ciclo celular e, ou, na proporção de células embriogênicas:células não-embriogênicas. Semelhantemente, ao estudar a produção de matéria fresca de uma suspensão celular de genótipo arábica em função do tempo pós-subcultura, GRÈZES et al. (1994) verificaram uma fase *lag*, nos três primeiros dias, que foi sucedida por um crescimento exponencial nos sete dias subseqüentes. Durante esta segunda fase exponencial, o metabolismo avaliado pela respiração e síntese protéica foi máximo. Após o décimo dia, quando não foi verificado nenhum aumento do peso da matéria fresca, o  $R_p$  e a atividade mitótica decresceram.

A fase inicial exponencial, neste trabalho, parece sugerir que apenas uma fração das células participa do crescimento da suspensão celular, em concordância com as observações de VASIL e VASIL (1982, 1986). Estes autores verificaram, em suspensões celulares de milho e milheto, a presença de dois tipos principais de células: as embriogênicas e as não-embriogênicas. As primeiras são caracteristicamente pequenas, com citoplasma denso, parede celular delgada e vacúolos pequenos, e ricas em pequenos grãos de amido que dão origem às segundas, numa proporção de 10 a 20% em milho (VASIL e VASIL, 1986). Ao alongarem-se rapidamente, concomitantemente aumentam em espessura da parede celular e perdem amido e a habilidade para divisão celular. SCHÖPKE et al. (1987) também obtiveram dois tipos de protoplastos de uma

suspensão celular canéfora: os menores ( $\emptyset$  10-25  $\mu\text{m}$ ), com citoplasma denso, e os maiores ( $\emptyset$  30-50  $\mu\text{m}$ ), bastante vacuolados. Em *Pennisetum americanum*, os protoplastos maiores, bastante vacuolados, embora refizessem a parede celular, não possuíam competência para proliferar como o tipo celular densamente citoplasmático (VASIL e VASIL, 1980), que foi verificado embriogênico em *Zea mays* (VASIL e VASIL, 1986). Em decorrência, subculturas realizadas a intervalos de tempo próximos aos  $t_i$ 's tenderiam a maximizar a razão células embriogênicas:células não-embriogênicas.

Além do ponto de inflexão, algum fator, provavelmente um componente integrante do meio líquido ou liberado para este pelas células em cultivo, começou a limitar o crescimento das culturas celulares. Coincidentemente, menores rendimentos protoplásticos ( $R_p$ 's) a partir de suspensões celulares dos dois genótipos foram também observados para tempos pós-subcultura superiores ao  $t_i$ , embora a amplitude entre esses dois tempos tenha sido maior para o genótipo arábica (Figura 3). De maneira geral, o  $R_p$  nesse genótipo foi cerca de dez vezes maior que naquele do canéfora Apoatã IV-D. Independentemente do genótipo e das condições metodológicas utilizadas para a obtenção de protoplastos em *Coffea*, rendimentos da ordem de  $10^5$  (ACUÑA e DE PENA, 1991; SCHÖPKE et al., 1987; SÖNDAHL et al., 1980) e  $10^7$  (TAHARA et al., 1994) têm sido relatados.

### **3.2. Rendimento protoplástico**

Para obtenção de maiores quantidades de protoplastos de boa qualidade e conseqüente diminuição de restos celulares, foi estudado o efeito de duas pectinases, pectoliase e macerozima, de diferentes concentrações enzimáticas, do tempo de digestão, da pré-plasmólise, das dimensões dos agregados celulares e da ação da cisteína durante a etapa digestiva de agregados celulares das suspensões celulares Apoatã IV-D e DH<sub>3</sub>.

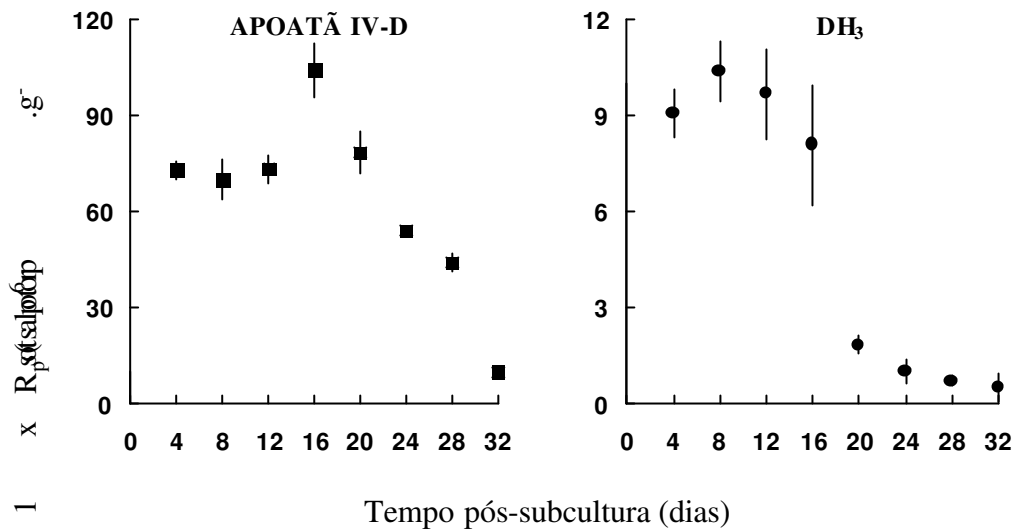


Figura 3- Rendimento protoplástico ( $R_p$ ) de suspensões celulares dos genótipos arábica diplóide  $DH_3$  (■) e canéfora Apoatã IV-D (●) em função do tempo pós-subcultura. As barras indicam o erro padrão da média de três repetições.

### 3.2.1. Enzimas digestivas e tempo de digestão

Em confirmação aos resultados anteriores, o  $R_p$  da suspensão celular do diplóide arábica, independentemente das enzimas testadas, foi sempre maior relativamente àquele do canéfora Apoatã (Figura 4, Quadro 7). Para ambos os genótipos, as curvas-respostas das associações enzimáticas no período de doze horas revelaram-se distintas quando testadas para a identidade de modelos (REGAZZI, 1993). Assim, considerando-se o final das três primeiras horas de digestão dos agregados celulares Apoatã, a ação conjunta das enzimas celulase, macerozima e pectoliase, nas maiores concentrações, promoveu o maior  $R_p$ , revelando, ainda, um sinergismo entre as pectinases. Os tratamentos  $C_2M_{0,5}$ , menor  $R_p$  e  $C_1P_{0,2}$  sugerem que a pectoliase foi mais eficiente que a macerozima para obtenção de protoplastos Apoatã. A utilização de duas pectinases, além da celulase, para obtenção de protoplastos a partir de suspensões celulares em *Coffea*, tem sido prática comum entre os pesquisadores (Quadro 8).

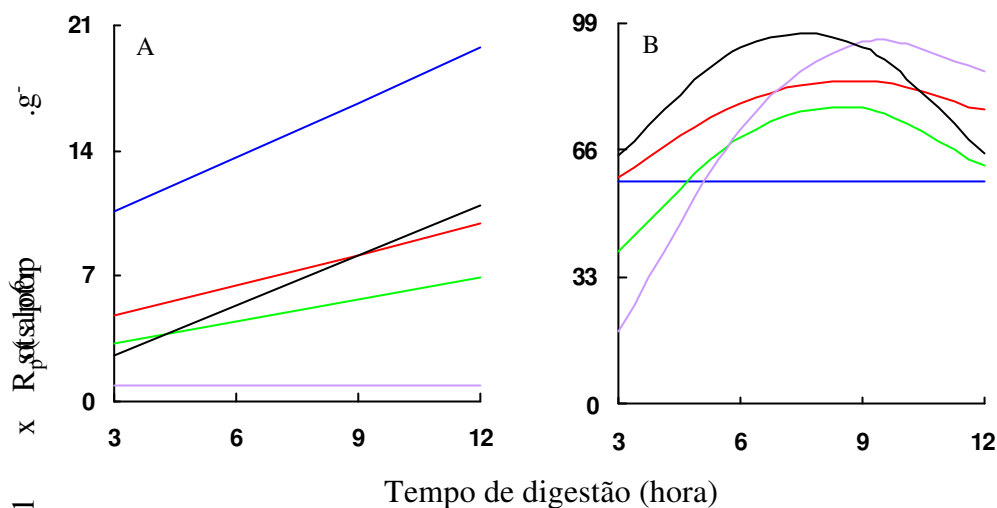


Figura 4 - Rendimento protoplástico ( $R_p$ ) a partir de suspensões celulares de Apoatã IV-D (A) e  $DH_3$  (B) em função do tempo de digestão e da concentração enzimática de celulase C (2 e 1%), de macerozima M (1; 0,5 e 0%) e de pectoliase P (0,2 e 0%) ( $C_2M_1P_{0,2}$  — ;  $C_2M_{0,5}P_{0,2}$  — ;  $C_1M_{0,5}P_{0,2}$  — ;  $C_2M_{0,5}$  — ;  $C_1P_{0,2}$  — ).

Quadro 7- Equações de regressão ajustadas para o rendimento protoplástico ( $R_p$ ,  $\times 10^6$  protoplastos  $g^{-1}$  MF) a partir de suspensões celulares do canéfora Apoatã IV-D e do arábica  $DH_3$  em função do tempo de digestão ( $t_d$ ) e da concentração enzimática

Genótipo	Enzimas	Equações ajustadas	$R^2$
Apoatã IV-D	$C_2M_1P_{0,2}^*$	$R_p = 7,50 + 1,02 \cdot t_d$	0,758
	$C_2M_{0,5}P_{0,2}$	$R_p = 3,05 + 0,57 \cdot t_d$	0,884
	$C_1M_{0,5}P_{0,2}$	$R_p = 1,95 + 0,41 \cdot t_d$	0,855
	$C_2M_{0,5}$	$R_p = 0,85$	-
	$C_1P_{0,2}$	$R_p = -0,25 + 0,93 \cdot t_d$	0,866
Diplóide $DH_3$	$C_2M_1P_{0,2}$	$R_p = 57,70$	-
	$C_2M_{0,5}P_{0,2}$	$R_p = 26,9 + 13,00 \cdot t_d - 0,74 \cdot t_d^2$	0,967
	$C_1M_{0,5}P_{0,2}$	$R_p = -12,88 + 21,26 \cdot t_d - 1,25 \cdot t_d^2$	0,908
	$C_2M_{0,5}$	$R_p = -63,63 + 32,50 \cdot t_d - 1,66 \cdot t_d^2$	0,989
	$C_1P_{0,2}$	$R_p = 8,90 + 23,29 \cdot t_d - 1,55 \cdot t_d^2$	0,993

\* C celulase (2 e 1%), M macerozima (1; 0,5 e 0%), P pectoliase (0,2 e 0%).

Quadro 8 - Enzimas digestivas, tempo de digestão e rendimento protoplástico ( $R_p$ ,  $\times 10^6$  protoplastos  $g^{-1}$  MF) de suspensões celulares de genótipos de *Coffea*

Genótipo	Enzimas digestivas*	$R_p$	Tempo de digestão (h)	Referência
Arábica Caturra	$C_2D_{0,2}P_{0,2}$	0,6	4-6	ACUÑA e PENA (1991)
Arábica Catimor <i>C. canephora</i> <i>C. racemosa</i> <i>C. salvatrix</i>	$C_1D_1Pe_{0,2}$	0,4-0,8	3-6	SCHÖPKE et al. (1987)
<i>C. arabica</i>	$C_1D_{0,5}M_{0,8}$	nm**	15	GRÈZES et al. (1993)
Arábica Caturra <i>C. canephora</i> Híbrido Arabusta	$C_2M_1P_{0,2}$	nm	6	SPIRAL e PETIARD (1991)

\* C celulase (2 e 1%), D driselase (0,2 – 3,5%), Pe pectinase (0,2 e 2,5%), P pectoliase (0,2%) e M macerozima (0,8 e 1%); \*\* nm não mencionado.

Dentre esses autores, apenas GREZES et al. (1993) não relataram a regeneração de plântulas a partir de protoplastos, à semelhança de SÖNDAHL et al. (1980) ao submeterem calos friáveis de *C. arabica*, cultivados em meio semi-sólido, à ação digestiva de driselase 3,5% e pectinase 2,5%. Todavia, TAHARA et al. (1994), utilizando apenas a pectinase pectoliase, na concentração de 0,2%, associada à celulase 1%, obtiveram, após 2-3 h de digestão,  $R_p$  de  $90 \times 10^6$  protoplastos  $g^{-1}$  MF, dos quais alguns protoplastos regeneraram plântulas somáticas seis meses mais tarde. Considerando-se ainda o genótipo canéfora e excetuando-se o tratamento  $C_2M_{0,5}$ , cujo  $R_p$  manteve-se inalterado após três horas de digestão, o  $R_p$  para as demais associações enzimáticas aumentou linearmente ao longo do tempo de digestão. O sinergismo entre pectinases e a supremacia pectolítica verificados para a obtenção de protoplastos Apoatã foram substituídos, no caso de protoplastos DH<sub>3</sub>, por antagonismo e eficácias similares entre as pectinases testadas. Os maiores  $R_p$ 's ( $\times 10^6$  protoplastos  $g^{-1}$  MF) foram alcançados com  $C_2M_{0,5}$  (95) e  $C_1P_{0,2}$  (97) após 9,8 e 7,5 h de digestão, respectivamente. De maneira geral, o  $R_p$  de todas as associações enzimáticas



estudadas, à exceção de  $C_2M_1P_{0,2}$ , que se manteve inalterado ao longo das 12 h de digestão, aumentou com o tempo de digestão até um valor máximo, depois do qual diminuiu. Esses resultados contrastantes em seguida à digestão enzimática dos agregados celulares Apoatã e DH<sub>3</sub> sugerem diferenças genótípicas quanto a estrutura de parede e, ou, membrana celular.

### 3.2.2. Pré-plasmólise e dimensões dos agregados celulares

A pré-plasmólise e a filtração dos agregados celulares com peneira de 1000  $\mu\text{m}$  não influenciaram o  $R_p$  das suspensões celulares dos genótipos arábica DH<sub>3</sub> e canéfora Apoatã (Quadro 9). O único efeito significativo foi o genotípico, que confirmou um maior  $R_p$  arábica ( $95 \times 10^6$  protoplastos  $\text{g}^{-1}$  MF) relativamente ao canéfora ( $23 \times 10^6$  protoplastos  $\text{g}^{-1}$  MF). A pré-plasmólise, que também não influenciou o  $R_p$  de folhas de *Theobroma cacao* (THOMPSON et al., 1987), tem sido sugerida por GRÈZES et al. (1993) e SCHÖPKE et al. (1987) para aumentar o  $R_p$  de boa qualidade a partir de suspensões celulares de *C. arabica* e embriões somáticos de *C. canephora*, respectivamente. GRÈZES et al. (1994) concluíram que a pré-plasmólise anterior à digestão enzimática, além de reduzir o volume protoplástico, desfaz as conexões plasmodesmata entre células adjacentes e reduz o efeito tóxico de pectinases, prevenindo o estouro dos protoplastos. Segundo ISHII (1988), o efeito tóxico de pectinases está associado, aparentemente, à produção de espécies ativas de  $O_2$ , que causariam a peroxidação de lipídios de membranas, tornando-as mais permeáveis.

### 3.2.3. Cisteína

A adição de cisteína 0,83 mM durante a etapa de digestão enzimática dos agregados celulares não aumentou o número de microcalos regenerados de protoplastos dos genótipos arábica DH<sub>3</sub> e canéfora Apoatã (Figura 5).

Ao relatar uma função linear positiva entre as eficiências de plaqueamento ( $E_p = n^\circ$  de microcalos  $\times 100/n^\circ$  de protoplastos em cultivo) de

Quadro 9 - Resumo da análise de variância para o efeito das dimensões dos agregados celulares e da pré-plasmólise no rendimento protoplástico dos genótipos arábica DH<sub>3</sub> e canéfora Apoatã

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio
Genótipo (G)	1	31.755,3751*
Dimensões agregados celulares (D)	1	133,4817
GxD	1	17,0016
Pré-plasmólise (P)	1	2,2817
GxP	1	54,6016
DxP	1	17,0017
GxDxP	1	3,6817
Blocos	2	2.325,6380
Resíduo	14	209,3684
C.V. (%)	24,5	

\* significativo a 0,005 de probabilidade pelo teste F.

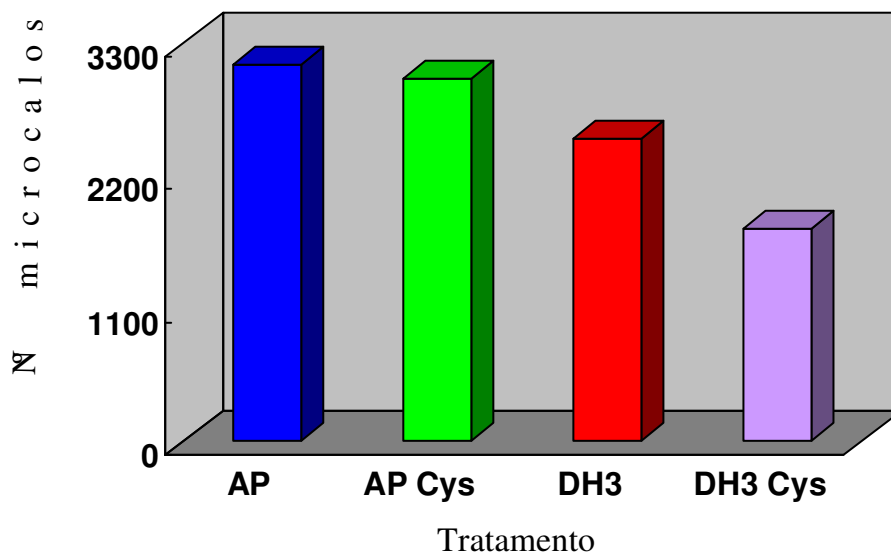


Figura 5 - Microcalos regenerados de  $4 \times 10^5$  protoplastos cultivados dos genótipos arábica DH<sub>3</sub> e canéfora Apoatã quatro meses após serem tratados com cisteína, 0 e 0,83 mM, durante a etapa de digestão enzimática.

protoplastos de café e concentração de cisteína no meio de cultura, de 0 a 1,66  $\mu\text{M}$ , GRÈZES et al. (1993) justificaram-na pela ação benéfica do aminoácido para a conservação da viabilidade celular. Neste caso, a duração e as condições de digestão dos agregados celulares para a obtenção de protoplastos de café não os inviabilizam para o desenvolvimento posterior, o que pode ser relevante na experimentação de eletrofusão, cujo alinhamento dieletrorético dos protoplastos requer meios relativamente não-condutivos (JONES, 1988). Curiosamente, a  $E_p$ , ao contrário do  $R_p$ , foi maior para o genótipo Apoatã (0,77%), relativamente ao arábica  $DH_3$  (0,54%).

### **3.3. Homoeletrofusão**

Protoplastos dos genótipos canéfora Apoatã e arábica diplóide  $DH_3$  foram submetidos às condições experimentais de eletrofusão, com o objetivo de verificar se o processo físico interfere no desenvolvimento posterior dos protoplastos. A análise de variância dos resultados mostrou que aquele processo em si não afeta o desenvolvimento pós-fusão dos protoplastos (Quadro 10), e que o número de microcalos regenerados de protoplastos Apoatã, 2.604, foi maior que aqueles  $DH_3$ , 1.817. Considerando a densidade de plaqueamento inicial de  $3 \times 10^5$  protoplastos  $\text{mL}^{-1}$ , as  $E_p$ 's foram de 0,87 e 0,61, respectivamente.

### **3.4. Densidade de plaqueamento**

O número de microcalos regenerados de protoplastos do genótipo arábica diplóide  $DH_3$  aumentou quase exponencialmente com incrementos na  $D_p$  até  $17 \times 10^4$  protoplastos  $\text{mL}^{-1}$ , após o que permaneceu inalterado (Figura 6). Esses resultados são coerentes com a habilidade limitada das células vegetais de crescerem em baixas densidades populacionais.

Tem-se verificado, para a maioria das espécies, densidades celulares ótimas na faixa de  $10^4$  a  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  (GLEBA e SYTNIK, 1984; OCHATT et al., 1992). Essa habilidade limitada, de acordo com KAO e MICHAYLUK

Quadro 10 - Resumo da análise de variância para o efeito das condições de eletrofusão na regeneração protoplástica dos genótipos arábica DH<sub>3</sub> e canéfora Apoatã

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio
Genótipo (G)	1	1.859.681,0*
Eletrofusão (E)	1	229.633,3
GxE	1	322.752,0
Bloco	2	494.274,1
Resíduo	6	180.669,3
C.V. (%)		19

\* significativo a 0,025 de probabilidade pelo teste F.

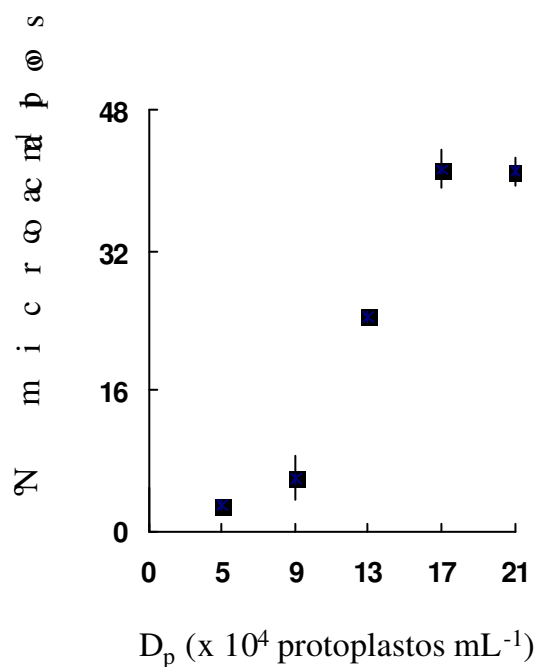


Figura 6 - Número de microcalos (média de nove campos) regenerados de protoplastos DH<sub>3</sub>, aos quatro meses de cultivo, em resposta a sua densidade de plaqueamento (D<sub>p</sub>). A barra indica o erro padrão da média de três repetições, CV 12%.

(1975), não está associada, aparentemente, com quaisquer interações celulares específicas, mas sim com a perda de alguns metabólitos essenciais pelas células individuais. Em *Coffea*, as densidades de cultivo têm variado de  $10^5$  (ACUÑA e PENA, 1991; SCHÖPKE et al., 1987; SÖNDAHL et al., 1980) a  $2 \times 10^5$  (GRÈZES et al., 1993; SPIRAL e PETIARD, 1991), embora GRÈZES et al. (1993) tenham verificado aumentos praticamente lineares na  $E_p$  inicial, de 15 dias, em resposta aos incrementos na densidade de cultivo até  $8 \times 10^5$  protoplastos  $\text{mL}^{-1}$ . Em *Citrus*, VARDI et al. (1975) relataram que colônias obtidas com  $D_p$  de  $4 \times 10^5$  protoplastos  $\text{mL}^{-1}$  eram muito pequenas e logo paravam de crescer.

O aumento da  $D_p$  para níveis maiores, como  $3, 5$  e  $7 \times 10^5$ , embora não tenha praticamente afetado a  $E_p$  de protoplastos DH<sub>3</sub>, elevou-a para protoplastos Apoatã, que revelaram a maior e a menor  $E_p$  nas  $D_p$ 's de  $5$  e  $7 \times 10^5$  protoplastos  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente (Figura 7). À exceção da  $D_p$  de  $7 \times 10^5$  protoplastos  $\text{mL}^{-1}$ , que promoveu igualdade entre as  $E_p$ 's dos dois genótipos, nos outros dois níveis,  $3$  e  $5 \times 10^5$ , a  $E_p$  Apoatã foi sempre maior que aquela verificada para o arábica DH<sub>3</sub>. Eficiências de plaqueamento de no mínimo 30 dias, de 0,25 a 1,25 (GRÈZES et al., 1993), 0,25 a 1,8 (TAHARA et al., 1994) e 10% (ACUÑA e PENA, 1991), têm sido relatadas para protoplastos de genótipos de café arábica. Esta última  $E_p$  significou a obtenção de 35 plantas (0,0175%) enraizadas do cultivar Caturra. Em outros gêneros, têm-se obtido  $E_p$ 's variando de 3,6 a 9, como em *Citrus* (VARDI et al., 1975), e de 0,23 a 0,56, como em *Passiflora* (OTONI, 1994).

### **3.5. Seleção dos heterofusionados**

#### **3.5.1. Meio de cultura**

Resultados preliminares envolvendo o cultivo de protoplastos parentais, DH<sub>3</sub> e Apoatã, e aqueles provenientes de eletrofusão no meio de YASUDA et al. (1985), sem controle para impedir a regeneração de protoplastos parentais e

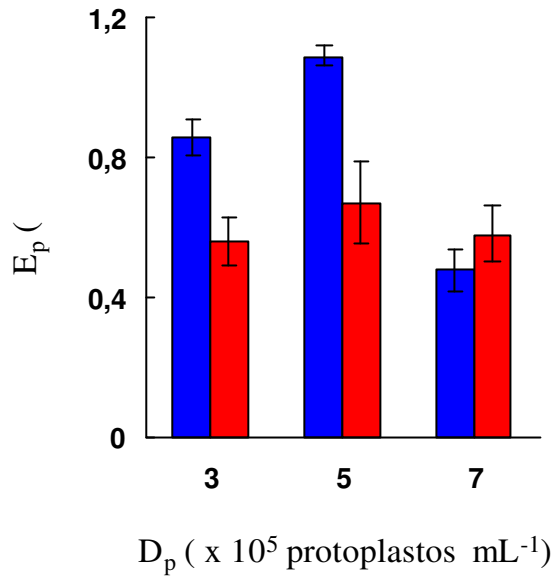


Figura 7 - Eficiência de plaqueamento ( $E_p$ ) de protoplastos dos genótipos arábica diplóide DH<sub>3</sub> (■) e canéfora Apoatã (■) após três meses de cultivo, em função da densidade de plaqueamento ( $D_p$ ). As barras indicam o erro padrão da média obtida com 7, 2 e 9 repetições para as respectivas  $D_p$ 's em ordem crescente.

homofusionados, revelaram, ao contrário dos protoplastos parentais DH<sub>3</sub> e aqueles provenientes do ensaio de fusão, desenvolvimento pobre dos protoplastos parentais Apoatã (Figura 8). Resultados semelhantes já foram observados por OHGAWARA et al. (1985), ao obterem o primeiro híbrido parassexual em *Rutacea*, e por POWER et al. (1977), com protoplastos de *Petunia*. Os primeiros autores verificaram que protoplastos foliares de *Poncirus trifoliata* eram incapazes de reassumir a divisão celular nas mesmas condições de cultivo que o faziam protoplastos de *Citrus sinensis*. Diferentemente, os últimos autores, ao testarem várias combinações de  $R_c$ 's, desenvolveram um meio no qual somente protoplastos de híbridos sexuais interespecíficos poderiam se desenvolver. Todavia, ao se estudar o efeito fatorial de diferentes concentrações e associações de  $R_c$ 's com as vitaminas de MOREL e WETMORE (1951) e de GAMBORG et al. (1968) no cultivo de protoplastos DH<sub>3</sub> e Apoatã, não foi possível confirmar os resultados preliminares nem identificar outra possibilidade de seleção de protoplastos com os meios de cultura testados (Quadro 11). Para ambos os

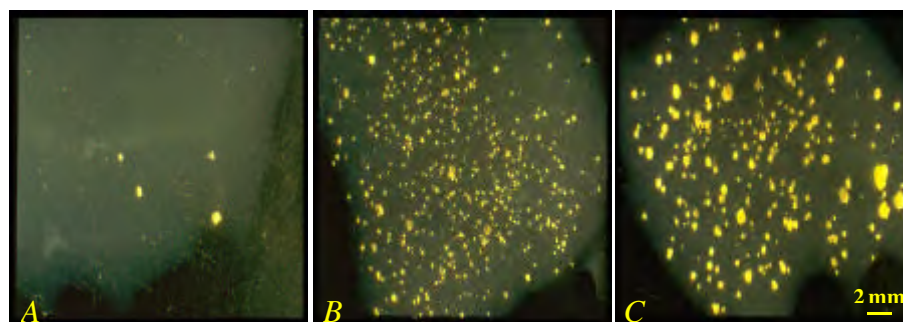


Figura 8 - Microcalos regenerados após 90 dias de cultivo de protoplastos Apoatã (A), protoplastos DH<sub>3</sub> (B) e uma mistura de populações iguais de protoplastos Apoatã e protoplastos DH<sub>3</sub> eletrofusionada (C).

Quadro 11 - Resumo da análise de variância para o efeito de diferentes meios de cultura na regeneração protoplástica dos genótipos arábica DH<sub>3</sub> e canéfora Apoatã

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio
Genótipo (G)	1	316,68078
Reg. Crescimento (Rg)	5	104,71393
GxRg	5	13,5138
Vitamina (V)	1	1.005,0141*
GxV	1	13,3470
RgxV	5	118,8471
GxRgxV	5	47,7806
Bloco	2	522,889
Resíduo	46	204,99033
C.V. (%)	64	

\* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

protoplastos, DH<sub>3</sub> e Apoatã, as vitaminas de Morel induziram a um maior número de microcalos campo<sup>-1</sup> que as vitaminas de Gamborg (26 vs. 18) cerca de dois meses após o início do cultivo, sugerindo efeito benéfico de pantotenato de cálcio e, ou, de biotina, ou efeito tóxico de tiamina-HCl na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>.

### 3.5.2. Iodoacetamida

Aos 30 dias de cultivo de protoplastos submetidos, durante os últimos 30 minutos da digestão enzimática dos agregados celulares, à ação do reagente sulfidrílico iodoacetamida (WRIGHT, 1978) nas concentrações de 0; 2,5; 5; 7,5 e 10 mM, foi verificada a ocorrência de algumas divisões celulares nos níveis 10 e 7,5 para os genótipos DH<sub>3</sub> e Apoatã, respectivamente (dados não apresentados). Contudo, 30 dias após essas observações, a presença de microcalos foi verificada somente para aqueles protoplastos que não foram tratados com iodoacetamida. Diferentemente, ao testarem a faixa de 0 a 20 mM desse inibidor, BELARMINO et al. (1996) reportaram a presença de microcalos de dois genótipos de *Ipomoea* em até 5 mM e sua ausência em resposta às concentrações igual e superiores a 10 mM. Concentrações mais elevadas como 16, 30 e 50 mM têm sido utilizadas para inibir os respectivos protoplastos parentais de *Nicotiana* (MATIBIRI e MANTELL, 1994), *Daucus carota* (LÁZÁR et al., 1981) e *Volvariella bombycina* (ZHAO e CHANG, 1997).

A maior sensibilidade à ação de iodoacetamida em *Coffea*, relativamente às espécies referidas acima, foi confirmada com os genótipos arábicas DH<sub>3</sub> e Catimor e canéfora Apoatã, cujos protoplastos foram totalmente impedidos ao desenvolvimento celular com 2 mM do inibidor (Figura 9). Contudo, essa sensibilidade parece variar entre os genótipos de *Coffea*, diferentemente dos resultados verificados por BELARMINO et al. (1996) com dois cultivares de *Ipomoea*, haja vista que o aumento da concentração de iodoacetamida de 0 a 0,5 mM promoveu uma inibição de cerca de 45 e 100% na regeneração de protoplastos DH<sub>3</sub> (Figura 10) e naqueles do genótipo tetraplóide Catuaí Amarelo (dados não apresentados), respectivamente.



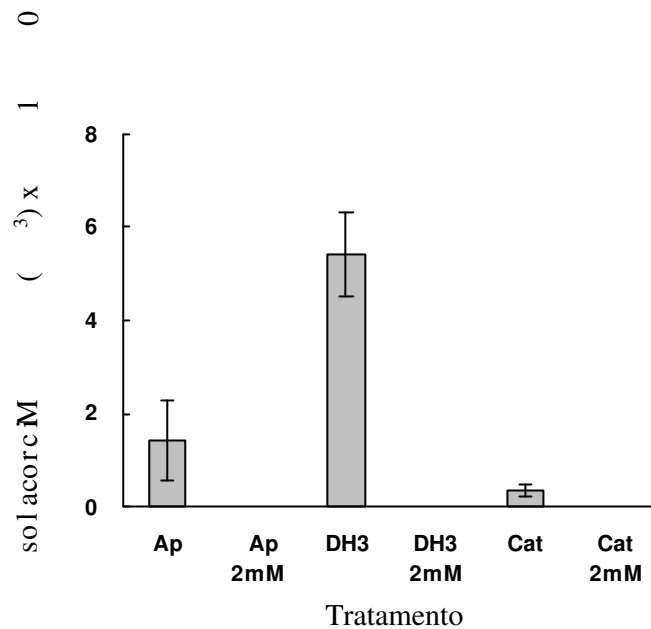


Figura 9 - Número de microcalos regenerados de protoplastos dos genótipos canéfora Apoatã (Ap) e arábicas diplóide DH3 e tetraplóide Catimor (Cat), três meses após terem sido submetidos às concentrações 0 e 2 mM de iodoacetamida, durante os 30 min finais da digestão enzimática dos agregados celulares. As barras indicam o erro padrão da média de três repetições.

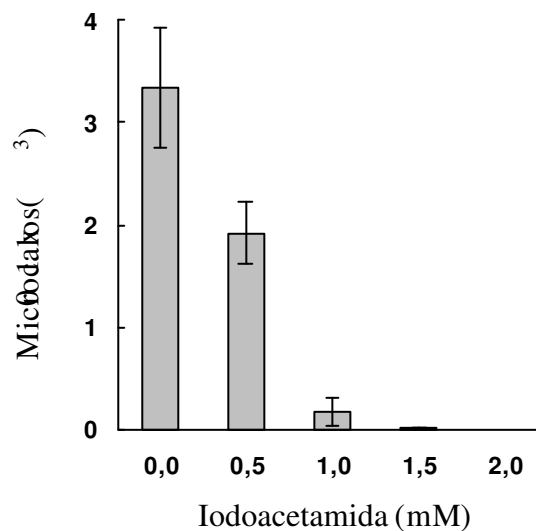


Figura 10 - Número de microcalos do arábica diplóide DH<sub>3</sub>, regenerados após dois meses de tratamento de protoplastos com concentrações crescentes de iodoacetamida, durante os 30 min finais da digestão enzimática dos agregados celulares. As barras indicam o erro padrão da média obtida de duas repetições.

### 3.5.3. Rodamina

O aumento da concentração de rodamina, de 0 a 100  $\mu\text{M}$ , diminuiu linearmente, sem inibir totalmente, o número de células em divisão originadas de protoplastos dos genótipos Apoatã e  $\text{DH}_3$ , aos 21 e 60 dias de cultivo (Figura 11 e Quadro 12). Embora os parâmetros do efeito linear nos modelos ajustados para os dois genótipos não tenham diferido entre si aos 21 dias, aos 60 dias esse parâmetro foi menor na curva-resposta  $\text{DH}_3$  pelo teste de  $t_{(0,05)}$ , revelando maior sensibilidade relativa de protoplastos deste genótipo arábica à ação inibitória de rodamina. Concentrações deste inibidor metabólico, de 11  $\mu\text{M}/12$  h (BÖTTCHER et al., 1989), 33  $\mu\text{M}/18$  h (AVIV et al., 1986) e 73  $\mu\text{M}$  durante cinco minutos (MATIBIRI e MANTELL, 1994) e 30 min (BÖTTCHER et al., 1989), têm tido eficiência verificada para inibir totalmente a divisão de protoplastos parentais sem afetar o desenvolvimento de protoplastos híbridos interespecíficos em *Nicotiana*.

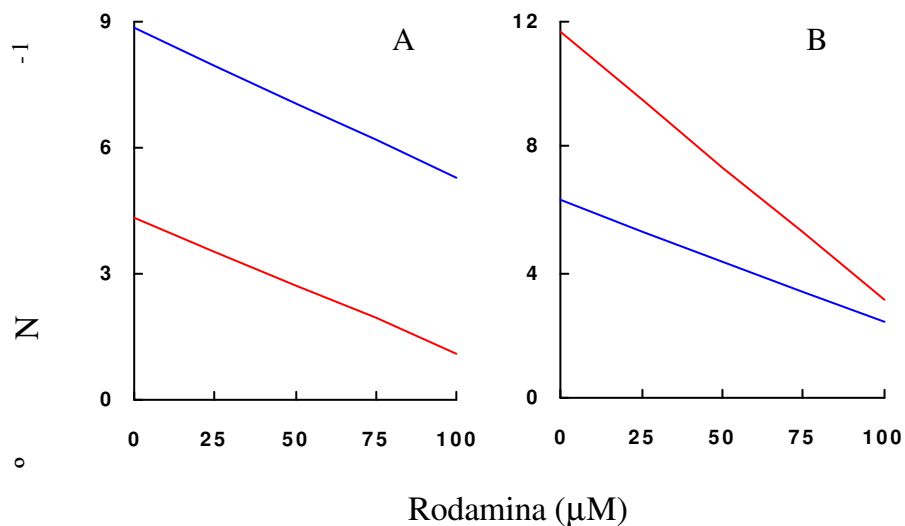


Figura 11 - Número de células em divisão regeneradas de protoplastos dos genótipos canéfora Apoatã ( — ) e arábica diplóide  $\text{DH}_3$  ( — ) tratados com concentrações crescentes de rodamina. As contagens por campo microscópico foram realizadas aos 21 (A) e 60 (B) dias de cultivo.

Quadro 12 - Equações de regressão ajustadas para o número de células ( $N_c$  campo<sup>-1</sup>) regeneradas de protoplastos dos genótipos canéfora Aboatã e arábica DH<sub>3</sub>, aos 21 e 60 dias de cultivo, em função da concentração de rodamina (Rho)

Genótipo	Dias de Cultivo	Equações Ajustadas	R <sup>2</sup>
Aboatã DH <sub>3</sub>	21	$N_c = 8,8667 - 0,0360 \text{ Rho}$	0,880
		$N_c = 4,3333 - 0,0320 \text{ Rho}$	0,770
Aboatã DH <sub>3</sub>	60	$N_c = 6,3200 - 0,0389 \text{ Rho}$	0,751
		$N_c = 11,6667 - 0,0855 \text{ Rho}$	0,946

A maior sensibilidade à ação de rodamina dos protoplastos DH<sub>3</sub>, relativamente àqueles do canéfora Aboatã, foi também confirmada com protoplastos de outros cultivares arábicas, Catimor e Catuaí Amarelo, cerca de três meses após suas exposições aos níveis 0 e 100 do inibidor (Figura 12). Todavia, ao aumentar-se a magnitude do espaço experimental até 600  $\mu\text{M}$ , as curvas de resposta lineares foram substituídas por curvas decrescentes de tendência exponencial que revelaram uma maior sensibilidade de protoplastos Aboatã, relativamente àqueles DH<sub>3</sub>, aos 100 e 140 dias da exposição ao inibidor (Figura 13 e Quadro 13). Aos 75 dias, as curvas-respostas do número de células em divisão ao aumento da concentração de rodamina não diferiram quando testadas para a identidade de modelos (REGAZZI, 1993), e indicaram que o aparecimento de apenas um microcalo campo<sup>-1</sup> poderia ser controlado com 248  $\mu\text{M}$  de rodamina. Aos 100 dias, contudo, as curvas estimadas revelaram que tal escape verificar-se-ia com 323  $\mu\text{M}$  para protoplastos DH<sub>3</sub> e 218  $\mu\text{M}$  para protoplastos Aboatã. Quando todos os microcalos foram contados, aos 140 dias de cultivo, essas concentrações aumentaram para 883 e 462  $\mu\text{M}$ , respectivamente, sugerindo que avaliações parciais da resposta de protoplastos à ação de rodamina subestimam aquelas concentrações do inibidor necessárias ao controle do desenvolvimento de protoplastos parentais.

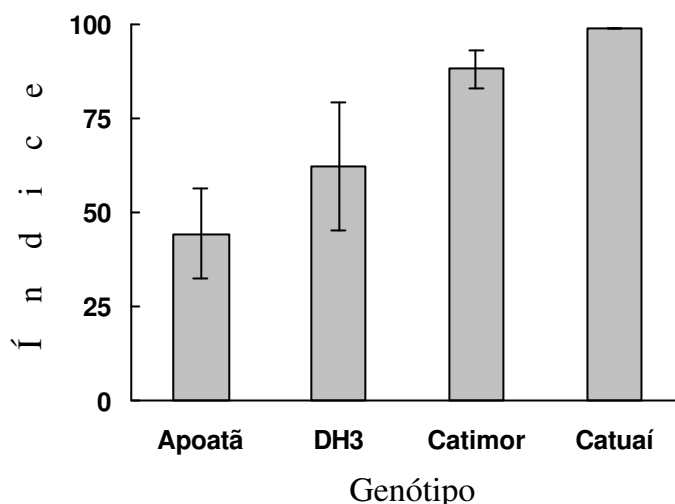


Figura 12 - Índice percentual de inibição verificado em microcalos regenerados de protoplastos dos genótipos canéfora Aboatã e arábicas DH<sub>3</sub>, Catimor e Catuaí Amarelo, após cerca de três meses de suas exposições a rodamina 0 e 100 µM. As barras indicam o erro padrão da média obtida de quatro repetições, à exceção de Catuaí, obtida com duas repetições.

### 3.6. Eletro fusão interespecífica de protoplastos

Foram realizados 96 ensaios de eletro fusão interespecífica, envolvendo os genótipos parentais Aboatã com os arábicas parentais diplóide DH<sub>3</sub> (Figura 14(F)) e tetraplóides Catuaí Amarelo (Figura 14(G)) e Catimor. Dentre estes, 42 (44% de 96) foram causa de insucesso, em razão da concentração inadequada de rodamina no controle do desenvolvimento de protoplastos parentais, principalmente DH<sub>3</sub> e Aboatã, e 23 (24% de 96) causa de sucesso, atribuível em grande parte à sensibilidade diferencial dos arábicas face à ação inibitória de rodamina (Quadro 14 e Figura 12). Assim, a maior sensibilidade dos arábicas tetraplóides a esse inibidor metabólico significou os maiores percentuais de sucesso dentre as três combinações parentais testadas. As concentrações adequadas dos inibidores no controle do desenvolvimento de protoplastos, principalmente no que se refere à rodamina, somente puderam ser conhecidas no período final da parte experimental, quando já não havia tempo hábil para a realização de novas

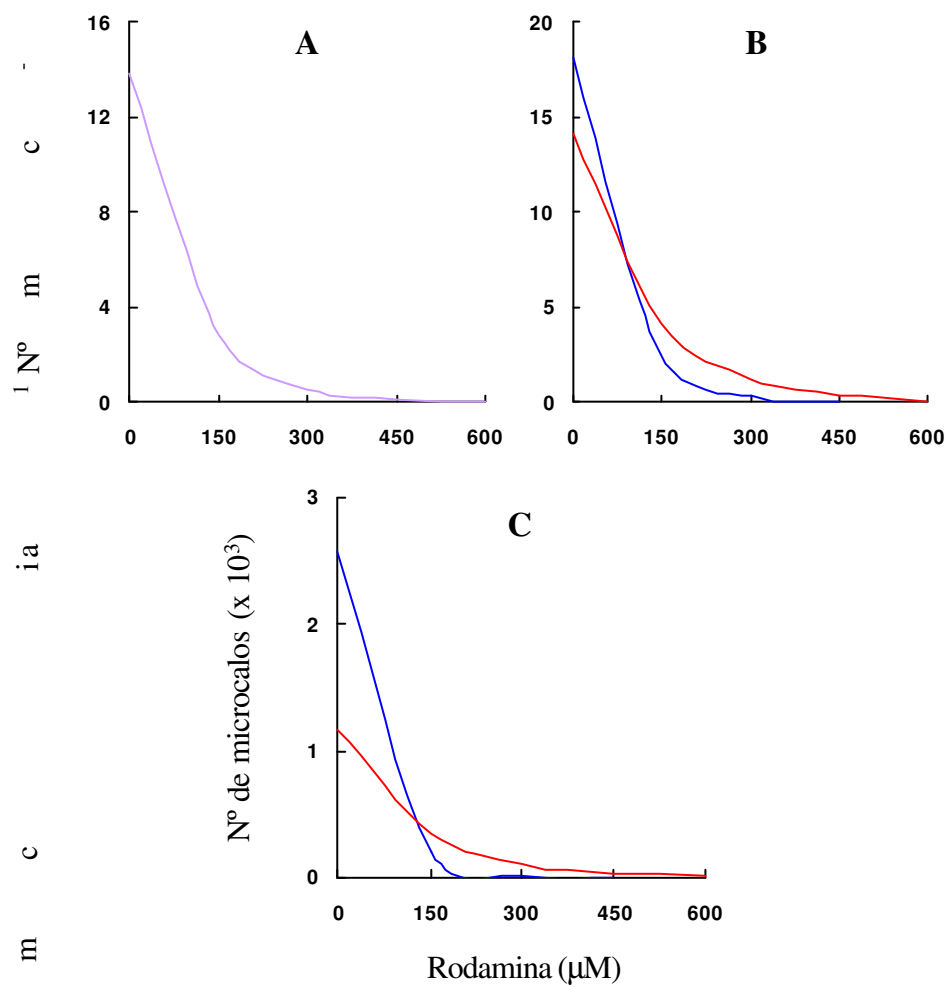


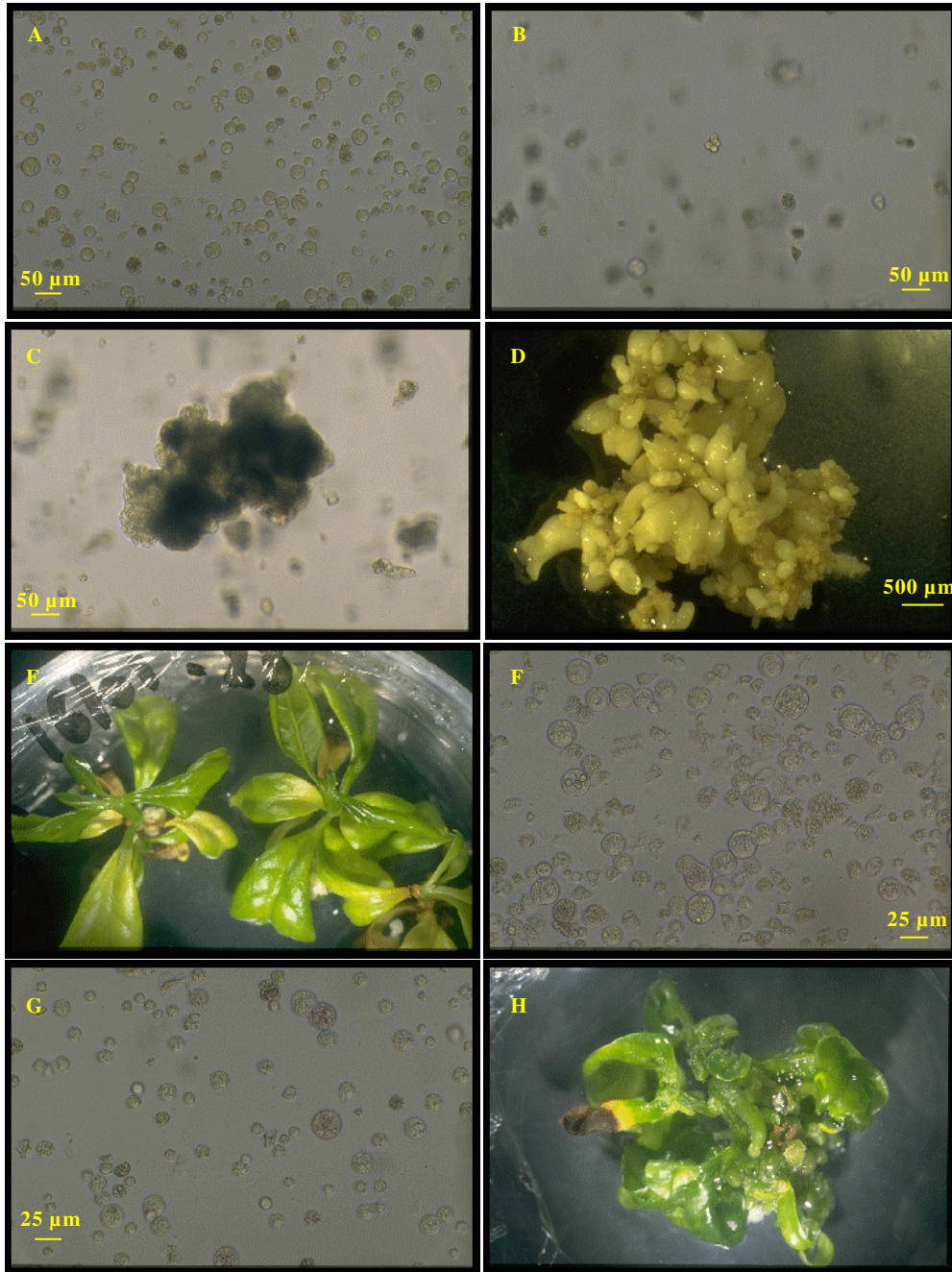
Figura 13 - Número de microcalos regenerados de protoplastos dos genótipos canéfora Apoatã ( — ) e arábica diplóide DH<sub>3</sub> ( — ) tratados com concentrações crescentes de rodamina. Contagens parciais de microcalos foram realizadas aos 75 (A), quando os modelos estatísticos não diferiram entre si ( — ), 100 dias (B) e de microcalos totais aos 140 dias (C).

Quadro 13 - Equações de regressão ajustadas para o número de microcalos ( $\mu\text{C}$ ) regenerados de protoplastos dos genótipos canéfora Apoatã e arábica  $\text{DH}_3$  submetidos a concentrações crescentes de rodamina (Rho). Os microcalos foram contados aos 75 ( $\mu\text{C campo}^{-1}$ ), 100 ( $\mu\text{C campo}^{-1}$ ) e 140 dias ( $\mu\text{C} \times 10^3$ ) de cultivo

Genótipo	Dias de cultivo	Equações ajustadas	R <sup>2</sup>
Apoatã $\text{DH}_3$	75	$\mu\text{C} = 13,835 e^{-0,011\text{Rho}}$	0,996
Apoatã $\text{DH}_3$	100	$\mu\text{C} = 18,082 e^{-0,013\text{Rho}}$ $\mu\text{C} = 14,118 e^{-0,008\text{Rho}}$	0,997 0,984
Apoatã $\text{DH}_3$	140	$\mu\text{C} = 2.572,586 e^{-0,017.\text{Rho}}$ $\mu\text{C} = 1.168,846 e^{-0,008\text{Rho}}$	0,996 0,989

eletrofusões. Somente o seu conhecimento seria suficiente para elevar a frequência de ensaios com sucesso no controle do desenvolvimento de protoplastos parentais e daqueles provenientes de homofusões de 23 (24%) a 65 (~ 70%).

Cerca de 19 e 14% dos ensaios perderam-se em razão das respectivas contaminação posterior de microcalos regenerantes e má qualidade de protoplastos, evidenciada durante e após as eletrofusões (Quadro 14). Além da boa qualidade das suspensões celulares, e conseqüentemente bons protoplastos, o sucesso na experimentação de eletrofusão parece ser também muito dependente do caráter embriogênico das culturas líquidas. Assim, as várias tentativas feitas no sentido de promover a diferenciação embriogênica de calos regenerantes de protoplastos obtidos de culturas líquidas do diplóide  $\text{DH}_3$ , aparentemente não-embriogênicas, foram infrutíferas, confirmando que a competência de uma suspensão celular para a divisão contínua não inclui automaticamente a competência para a diferenciação e regeneração de plantas (POTRYKUS e SHILLITO, 1986). Neste aspecto, suspensões celulares embriogênicas do cultivar Apoatã produziram protoplastos que regeneraram posteriormente calos embriogênicos (Figura 14(D)).



Quadro 14 - Caracterização numérica dos ensaios de eletrofusão envolvendo diferentes combinações parentais relativamente aos sucessos e insucessos e suas causas: contaminação, concentração inadequada do inibidor metabólico rodamina (CIMR) e má qualidade dos protoplastos (MQP)

Genótipos Parentais	Sucesso	Insucesso		
		Contaminação	CIMR	MQP
Apoatã + diplóide DH <sub>3</sub>	6	14	31	1
Apoatã + <i>Catuaí Amarelo</i>	6	2	5	12
Apoatã + Catimor	11	2	6	-
Total	23	18	42	13

Os resultados dos 23 ensaios que se destacaram pelo aparente sucesso no controle do desenvolvimento de protoplastos parentais e daqueles provenientes de homofusões encontram-se na Figura 15. Sua eficiência e a inferioridade numérica dos microcalos regenerantes de protoplastos parentais tratados com os inibidores metabólicos, relativamente aos microcalos regenerantes dos mesmos protoplastos eletrofundidos, sugerem que esta diferença em microcalos é decorrente da fusão interespecífica de protoplastos, que se desenvolveram graças à complementação metabólica.

Essa complementação permitiu a BÖTTCHER et al. (1989), após a fusão de protoplastos de *Nicotiana tabacum*, tratados com iodoacetato, com aqueles da linha híbrida entre *N. sylvestris* e *N. undulata*, tratados com rodamina, a obtenção de híbridos e cíbridos somáticos. Dentre os dois inibidores iodoacetamida e rodamina, este último foi o que permitiu, de maneira geral, o maior número de escapes, que são aqueles microcalos regenerados de protoplastos parentais, tratados com os inibidores metabólicos, que foram cultivados individualmente (**A** a **H**) ou em mistura em partes iguais sem passar por eletrofusões (**F** a **H**).

Aos 13 meses da identificação dos 23 ensaios de eletrofusão interespecífica de protoplastos, que se destacaram pelo aparente sucesso no controle do desenvolvimento dos protoplastos parentais, foram avaliadas suas



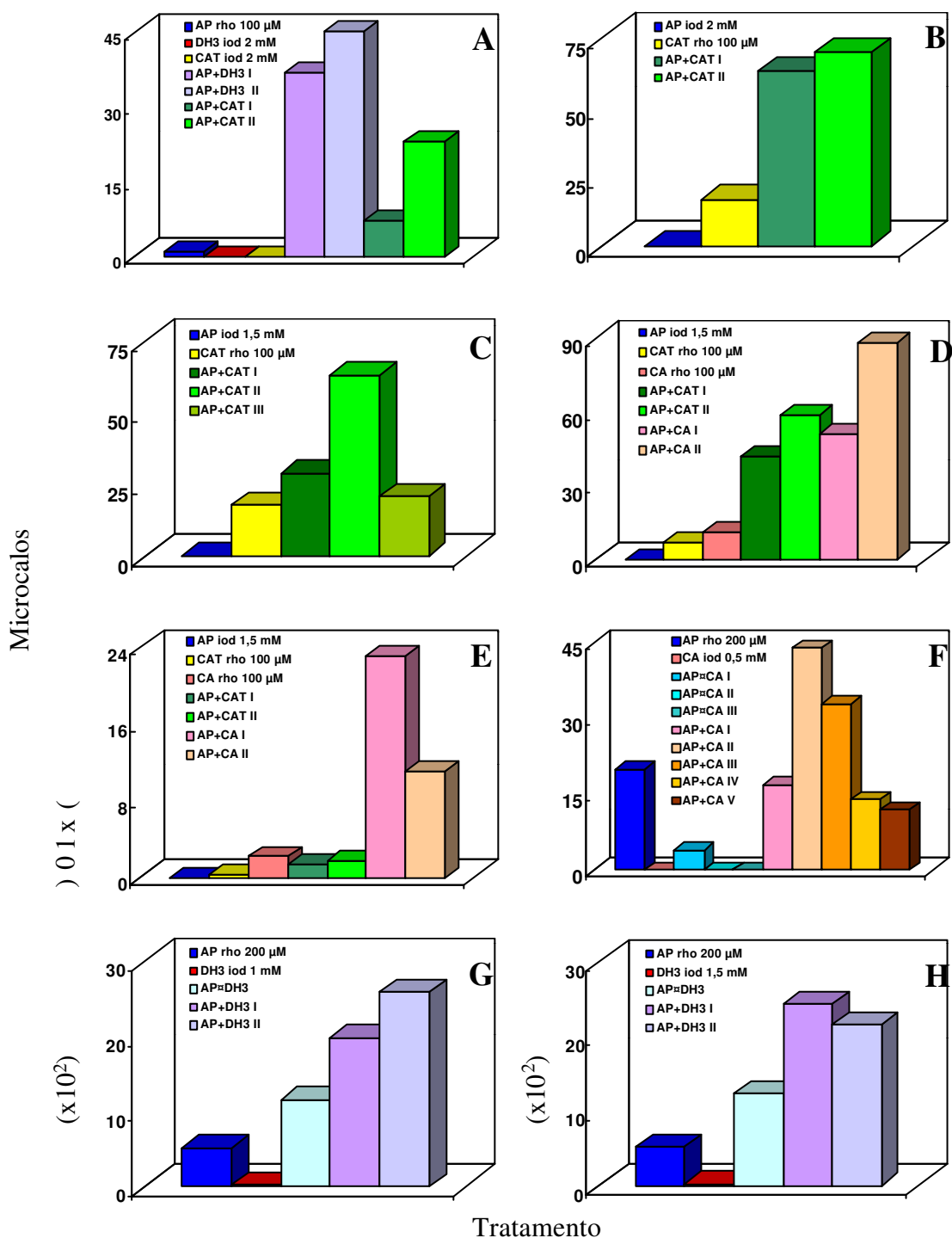


Figura 15 - Microcalos regenerados de protoplastos parentais dos genótipos *C. canephora* cv. Apatã (AP) e *C. arabica* DH<sub>3</sub>, Catimor (CAT) e Catuaí Amarelo (CA), tratados com os inibidores metabólicos rodamina (rho) e iodoacetamida (iod) seguidos (+) ou não (□) de eletrofusão. Os microcalos foram contados com auxílio de microscópio luminoso após 2 (F,G e H), 2 e meio (C, D e E) ou 3 (A e B) meses de cultivo.

capacidades calogênica e embriogênica. Dentre esses 23 ensaios, 13 revelaram sobrevivência de calos (Quadro 15). Esta sobrevivência foi, contudo, maior quando o parental arábica utilizado foi o Catimor (64%) relativamente aos outros arábicas DH<sub>3</sub> e Catuaí Amarelo (50%). No que se refere à capacidade embriogênica, cerca de 45% dos ensaios envolvendo protoplastos Catimor, como parental arábica, revelaram-se embriogênicos (Quadro 15 e Figura 16). Para os arábicas DH<sub>3</sub> e Catuaí Amarelo, estas frequências foram de 33 e 0%, respectivamente.

Quadro 15 - Capacidade calogênica, aos três e 16 meses da eletrofusão, e embriogênica, aos 16 meses da eletrofusão, avaliada nos calos emergentes dos 23 ensaios de eletrofusão interespecífica de protoplastos, que se destacaram pelo aparente sucesso no controle do desenvolvimento dos protoplastos parentais

Genótipos parentais	Capacidade Calogênica		Capacidade Embriogênica
	3 meses	16 meses	16 meses
Apoatã + diplóide DH <sub>3</sub>	6	3	2
Apoatã + Catuaí Amarelo	6	3	0
Apoatã + Catimor	11	7	5
Total	23	13	7

No momento, os calos regenerantes vivos que não ainda expressaram sua capacidade embriogênica vêm sendo repicados com vistas àquela diferenciação. Os embriões produzidos vêm sendo transferidos, seqüencialmente, para os meios M4 e M5, utilizados por ZAMARRIPA et al. (1991) para regeneração de plantas. Essas plantas permitirão caracterizar a eficiência do método de seleção utilizado, bem como o potencial da fusão protoplástica para a produção de híbridos somáticos em *Coffea*.

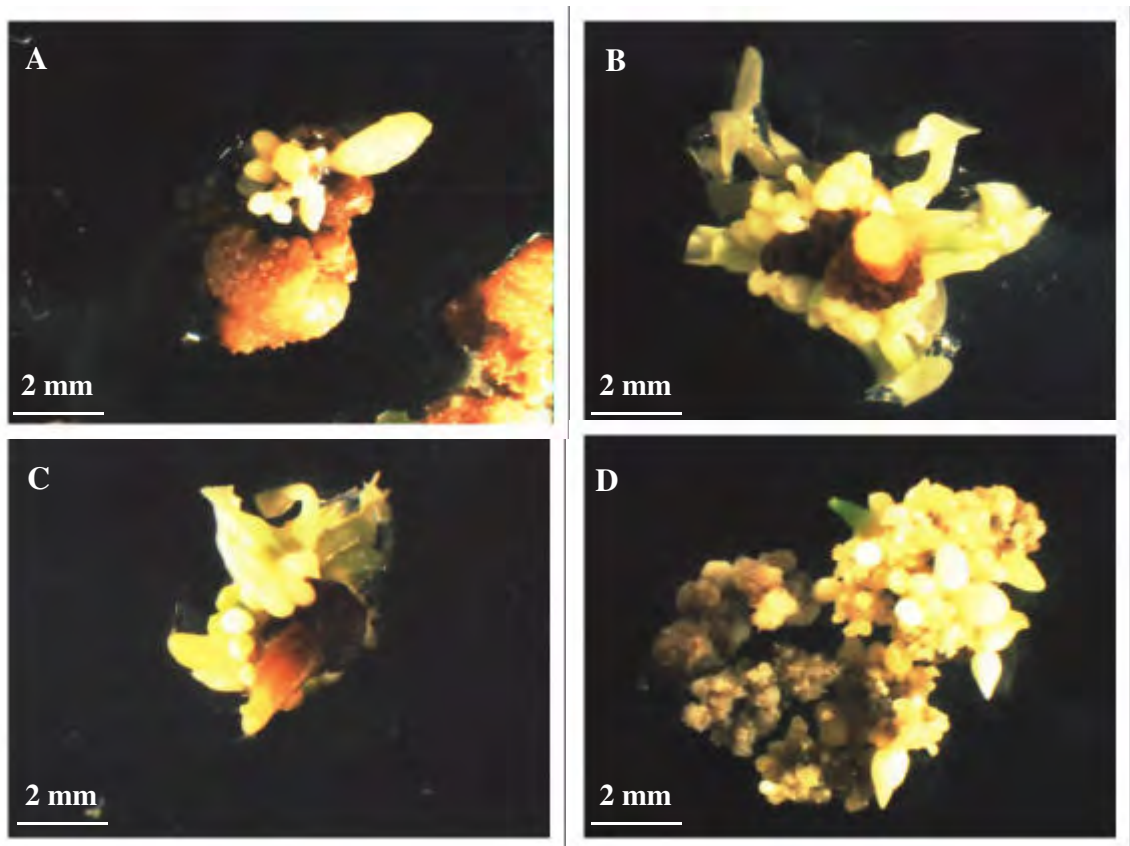


Figura 16 - Calos embriogênicos aos 16 meses da eletro fusão interespecífica entre protoplastos Apoatã, pré-tratados com iodoacetamida 2 mM, e protoplastos Catimor, pré-tratados com rodamina 100  $\mu$ M (A, B e C), e entre protoplastos Apoatã, pré-tratados com rodamina 200  $\mu$ M, e protoplastos DH<sub>3</sub>, pré-tratados com iodoacetamida 1,5 mM (D). Barra: 2 mm.

## 4. CONCLUSÕES

As suspensões celulares Apoatã e DH<sub>3</sub> revelaram, imediatamente após a subcultura, uma fase exponencial de crescimento celular até um ponto de inflexão, a partir do qual as taxas de crescimento reduziram progressivamente para atingir um peso de matéria fresca dos agregados celulares assintótico. Coincidentemente, os menores rendimentos protoplásticos foram observados para tempos pós-subcultura superiores àquele do ponto de inflexão. A pré-plasmólise, a seleção dos agregados celulares de diâmetro inferior a 1 mm e a adição de cisteína 0,83 mM, durante a digestão enzimática, não interferiram no rendimento protoplástico das suspensões celulares Apoatã e DH<sub>3</sub>, ao contrário das concentrações das enzimas pectinases e celulase. De maneira geral, o rendimento protoplástico Apoatã, sempre inferior àquele DH<sub>3</sub>, foi maior quando as duas pectinases, pectoliase e macerozima, estiveram associadas à celulase, as três nas maiores concentrações testadas. Diferentemente, para o diplóide DH<sub>3</sub>, esse sinergismo entre as pectinases foi substituído por um aparente antagonismo. Os 12 meios de cultivo de protoplastos testados, envolvendo seis associações dos reguladores de crescimento auxina e citocinina com dois complexos vitamínicos, de Gamborg e de Morel, não permitiram distinguir os protoplastos parentais Apoatã e DH<sub>3</sub> quanto ao crescimento dos microcalos. Alternativamente, os inibidores metabólicos iodoacetamida e rodamina, nas respectivas concentrações

de 2 e de 0,9 mM, mostraram-se eficazes em inibir a regeneração dos protoplastos parentais em microcalos. Seu aproveitamento permitiu a realização de 23 ensaios de eletro fusão interespecífica, cujos produtos, aparentemente justificados pela complementação metabólica, encontram-se em desenvolvimento com vistas à diferenciação embriogênica e regeneração de plantas. Esta última permitirá análises para verificação do potencial de fusão protoplástica no melhoramento parassexual em *Coffea*.

## 2. RESUMO E CONCLUSÕES

Esta pesquisa foi conduzida com o objetivo de verificar a exequibilidade da fusão protoplástica interespecífica como ferramenta no melhoramento parassexual em *Coffea*. Para tanto, pretendeu-se a introgressão das resistências, aos nematóides *Meloidogyne incognita* e *M. exigua*, do cultivar canéfora Apoatã, nos genótipos arábicas diplóide DH<sub>3</sub> e tetraplóides Catimor e Catuaí Amarelo. Com vistas à obtenção dos protoplastos, foram iniciadas suspensões celulares embriogênicas a partir de calos friáveis embriogênicos induzidos de explantes foliares. Posteriormente foram estudadas, nas suspensões celulares Apoatã e DH<sub>3</sub>, as cinéticas do crescimento e do rendimento protoplástico em função do tempo pós-subcultura, bem como as condições de digestão de seus agregados celulares. Foram realizados, ainda, estudos para a seleção dos heterofusionados.

De maneira geral, explantes de todos os genótipos estudados reagiram favoravelmente à formação de tecido embriogênico friável. Contudo, apenas os genótipos arábicas DH<sub>3</sub> e Catuaí Vermelho requereram, no meio de indução, a ação combinada da auxina 2,4-D e da citocinina KIN para a sua obtenção. Os demais genótipos reagiram mais favoravelmente quando o regulador de crescimento foi apenas a citocinina BAP. O surgimento de calos embriogênicos e embriogênicos friáveis foi antecipado, em cerca de dois meses, quando os explantes foliares de Apoatã, DH<sub>3</sub> e Catimor foram removidos de partes aéreas

micropropagadas relativamente às plantas mantidas em casa de vegetação. Diferentemente, o agente gelificante Gelrite<sup>TM</sup>, em comparação ao ágar, aumentou a frequência de ambos os calos embriogênico e embriogênico friável em explantes foliares de partes aéreas micropropagadas de Apoatã. As maiores frequências de explantes com calos friáveis verificadas para os genótipos canéfora Apoatã e arábicas DH<sub>3</sub>, Catimor, Catuaí Amarelo e Catuaí Vermelho foram respectivamente 80 (M3/B4), 60 (A2/M3), 40 (M3/B4), 40 (A4/M3) e 20% (A2/B4/B5). A diferenciação embriogênica dos agregados celulares, em cultura líquida, rendeu cerca de 241.000, 72.870 e 121.760 embriões por grama de peso da matéria fresca de agregados celulares Apoatã, Catimor e DH<sub>3</sub>, respectivamente.

Ambos os genótipos Apoatã e DH<sub>3</sub> revelaram, imediatamente após a subcultura, uma fase exponencial de crescimento celular até um ponto de inflexão, a partir do qual as taxas de crescimento reduziram progressivamente para atingir um peso de matéria fresca dos agregados celulares assintótico. Coincidentemente, os menores rendimentos protoplásticos foram observados para tempos pós-subcultura superiores àquele do ponto de inflexão. Embora a pré-plasmólise e a não-utilização dos agregados celulares de diâmetro superior a 1 mm, bem como a adição de cisteína 0,83 mM durante a digestão enzimática, não interferissem no rendimento protoplástico das suspensões celulares Apoatã e DH<sub>3</sub>, as concentrações das enzimas pectinases e celulase o influenciou. De maneira geral, o rendimento protoplástico Apoatã, sempre inferior àquele DH<sub>3</sub>, foi maior quando as duas pectinases, pectoliase e macerozima, estiveram associadas à celulase, as três nas maiores concentrações testadas. Diferentemente, para o diplóide DH<sub>3</sub>, esse sinergismo entre as pectinases foi substituído por um aparente antagonismo. Tendo como objetivo uma possível seleção de heterofusionados com o meio de cultivo dos protoplastos, os 12 meios testados, envolvendo seis associações dos reguladores de crescimento auxina e citocinina com dois complexos vitamínicos, de Gamborg e de Morel, não permitiram distinguir os protoplastos parentais Apoatã e DH<sub>3</sub> quanto ao crescimento dos microcalos. Alternativamente, os inibidores metabólicos iodoacetamida e

rodamina, nas respectivas concentrações de 2 e de 0,9 mM, mostraram-se eficazes em inibir a regeneração dos protoplastos parentais em microcalos. Seu aproveitamento permitiu a realização de 23 ensaios de eletrofusão interespecífica, cujos produtos, aparentemente justificados pela complementação metabólica, encontram-se em desenvolvimento com vistas à diferenciação embriogênica e à regeneração de plantas. Esta última permitirá análises para verificação do potencial da fusão protoplástica no melhoramento parassexual em *Coffea*.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA, R., DE PENA, M. Plant regeneration from protoplasts of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. cv.Caturra. **Plant Cell Rep.**, v.10, p.345-348, 1991.
- ALDER, H.L., ROESSLER, E.B. Times series. In: ALDER, H.L., ROESSLER, E.B. (Eds.) **Introduction to probability and statistics**, 3ed. San Francisco: W.H. Freeman, 1964. p.209-231.
- ALEMANNI, L., BERTHOULY, M., MICHAUX-FERRIERE, N. Histology of somatic embryogenesis from tissues cocoa. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.46, p.187-194, 1996.
- ANZUETO, F., ESKES, A.B., SARAH, J.L., DECAZY, B. Résistance de quelques descendances de *Coffea arabica* et *C. canephora* vis-à-vis de deux populations de *Meloidogyne* spp., originaires du Guatemala et du Brésil. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15, 1993, Montpellier. **Annales...** Paris: ASIC, 1993. p.338-349.
- APONTE ACUÑA, M.E. Somatic embryogenesis induced by culture on single media in coffee plants from crosses of *Coffea arabica* by Timor Hibrid. In: COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15, 1993. Montpellier. **Annales ...** Paris: ASIC, 1993. p.82-88.
- AUSTIN, S., BAER, M., EHLENFELDT, M., KAZMIERCZAK, P.J., HELGESON, J.P. Intraspecific fusion in *Solanum tuberosum*. **Theor. Appl. Genet.**, v.71, p.172-175, 1986.

- AUSTIN, S., POHLMAN, J.D., BROWN, C.R., MOJTAHEDI, H., SANTO, G.S., DOUCHES, D.S., HELGESON, J.P. Interspecific somatic hybridization between *Solanum tuberosum* L. and *S. bulbocastanum* Dun. as a means of transferring nematode resistance. **Amer. Potato J.**, v.70, p.485-495, 1993.
- AVIV, D., ARZEE-GONEN, P., BLEICHMAN, S., GALUN, E. Novel alloplasmic *Nicotiana* plants by "donor-recipient" protoplast fusion: cybrids having *N. tabacum* or *N. sylvestris* nuclear genomes and either or both plastomes and chondriomes from alien species. **Mol. Gen. Genet.**, v.196, p.244-253, 1984.
- AVIV, D., CHEN, R., GALUN, E. Does pretreatment by rhodamine 6-G affect the mitochondrial composition of fusion-derived *Nicotiana* cybrids? **Plant Cell Rep.**, v.3, p.227-230, 1986.
- BABIYCHUK, E., KUSKNIR, S., GLEBA, Y.Y. Spontaneous extensive chromosome elimination in somatic hybrids between somatically congruent species *Nicotiana tabacum* L. and *Atropa belladonna* L. **Theor. Appl. Genet.**, v.84, p.87-91, 1992.
- BALLVORA, A., HESSELBACH, J., NIEWÖHNER, J., LEISTER, D., SALAMINI, F., GEBHARDT, C. Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene Gro1. **Mol. Gen. Genet.**, v.249, p.82-90, 1995.
- BATES, G.W. Electrical fusion for optimal formation of protoplast heterokaryons in *Nicotiana*. **Planta**, v.165, p.217-224, 1985.
- BELARMINO, M.M., ABE, T., SASAHARA, T. Asymmetric protoplast fusion between sweet potato and its relatives, and plant regeneration. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.46, p.195-202, 1996.
- BERTHAUD, J. L'incopatibilité chez *Coffea canephora*: méthode de test et déterminisme génétique. **Café Cacao Thé**, v.24, n.4, p.267-274, 1980.
- BERTHAUD, J., CHARRIER, A. Genetic resources of *Coffea*. In: CLARK, R. J., MACRAE, R. (Eds.). **Coffee**. London: Elsevier Applied Science, 1985. v.4, p.1-42.
- BERTHOUD, F., MATHIEU, C., VEDEL, F. Chloroplast and mitochondrial DNA variation as indicator of phylogenetic relationships in the genus *Coffea* L. **Theor. Appl. Genet.**, v.65, p.77-84, 1983.
- BERTHOULY, M., MICHAUX-FERRIERE, N. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.44, p.169-176, 1996.

- BERTRAND, B., ANZUETO, F., PENA, M.X., ANTHONY, F., ESKES, A.B. Genetic improvement of *Coffea* for resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Central America. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 16, 1995. Kyoto. **Annales...** Paris: ASIC, 1995. p.630-636.
- 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.
- BOAVENTURA, V.M.S., CRUZ, N.B. Análise citológica em espécies de *Coffea* L. poliploidizadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 14, 1987. Campinas. **Resumos...** Rio de Janeiro: GOTEC/DIPRO/IBC, 1987. p.102-103.
- BOQUET, D., WILIAMS, C., BIRCHFIELD, W. Inheritance of resistance to the wartlike race of root-knot nematode in soybeans. **Crop Science**, v.16, p.783-785, 1976.
- BÖTTCHER, U., AVIV, D., GALUN, E. Complementation between protoplasts treated with either of two metabolic inhibitors results in somatic-hybrid plants. **Plant Sci.**, v.63, p.67-77, 1989.
- BROMOVA, M., KNOPF, U.C. High frequency recovery of intergeneric fusion products of tobacco (*Nicotiana tabacum*) and potato (*Solanum tuberosum*) by electromechanical selection. **Plant Sci.**, v.74, p.127-133, 1991.
- CAI, D., KLEINE, M., KIFLE, S., HARLOFF, H-J., SANDAL, N.N., MARCKER, K.A., KLEIN-LANKHORST, R.M., SALENTIYN, E.M.J., LANGE, W., STIEKEMA, W.J., WYSS, U., GRUNDLER, F.M.W., JUNG, C. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. **Science**, v.275, p.832-834, 1997.
- CAMPOS, V.P. Situação atual do ataque de nematóides do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30, 1997. Poços de Caldas. **Resumos...** Brasília: **Fitopatol. Bras.**, 1997. v.22, p.230 (Suplemento).
- CAMPOS, V.P., LIMA, R.D. Nematóides parasitas do cafeeiro. In: RENA, A. B., MALAVOLTA, E., ROCHA, M., YAMADA, T. (Eds). **Cultura do cafeeiro – fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, SP: Associação Brasileira Pesq. Potassa Fosfato, 1986. p.379-389.
- CAMPOS, V.P., LIMA, R.D., ALMEIDA, V.F. Nematóides parasitas do cafeeiro. **Inf. Agropec.**, v.11, n.126, p.50-58, 1985.

- CARNEIRO FILHO, F., LIMA, F.B., MOURA, A.L., ISHIZAKA, A.M. Competição de progênies, linhagens e híbridos de café resistentes e ou tolerantes ao nematóide *Meloidogyne incognita* em solos arenosos e argilosos na região norte do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15, 1989. Maringá. **Resumos...** Rio de Janeiro: GOTEC/DIPRO/IBC, 1989. p.153-155.
- CARNEIRO, R.G. Fitonematóides na cafeicultura paranaense: situação atual. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 17, 1993. Jaboticabal, SP. **Resumos...** Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1993. p.42-44.
- CHAND, P.K., OCHATT, S. J., RECH, E. L., POWER, J. B., DAVEY, M. R. Electroporation stimulates plant regeneration from protoplasts of the woody medicinal species *Solanum dulcamara* L. **J. Exp.Bot.**, v.39, n.206, p.1267-1274, 1988.
- CONAGIN, C.H.T.M., MENDES, A.J.T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea* – autoincompatibilidade em *Coffea canephora*. **Bragantia**, Campinas, v.20, n.34, p.787-804, 1961.
- CORRIVEAU, J.L., COLEMAN, A.W. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. **Amer. J. Bot.**, v.75, p.1443-1458, 1988.
- CROCOMO, O.J., CARVALHO, F.J.P.C., SHARP, W.R., BANDEL, G., CARVALHO, P.C.T. Hormonal control of cellular phenotype and induction of globular embryos in tissue cultures of *Coffea arabica* cv. Catuaí. **Energ. Nucl. Agric.**, v.1, n.1, p.41-47, 1979.
- DE PENA, M. Somatic embryo induction and plant regeneration from *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. In: SIMPÓSIO SOBRE FERRUGENS DO CAFEEIRO, 1983. Oeiras-Portugal. **Anais...** Oeiras: CIFC, 1983. p.493-512.
- DUBLIN, P. Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. **Café Cacao Thé**, v.25, n.4, p.237-242, 1981.
- DUBLIN, P. Induction de bourgeons néoformés et embryogenèse somatique. Deux voies de multiplication végétative *in vitro* des caféiers cultivés. **Café Cacao Thé**, v.24, n.2, p.121-130, 1980.
- DUBLIN, P. Techniques de reproduction végétative *in vitro* et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. **Café Cacao Thé**, v.28, n.4, p.231-244, 1984.

- ETIENNE, H., BERGER, A., CARRON, M.P. Water status of callus from *Hevea brasiliensis* during induction of somatic embryogenesis. **Physiol. Plant.**, v.82, p.213-218, 1991.
- FAHLESON, J., LANGERCRANTZ, V., MOURAS, A., GLIMELIUS, K. Characterization of somatic hybrids between *Brassica napus* and *Eruca sativa* using species-specific repetitive sequences and ag genomic in situ hybridization. **Plant Sci.**, v.123, p.133-142, 1997.
- FAHLESON, J., RAHLÉN, L., GLIMELIUS, K. Analysis of plants regenerated from protoplast fusions between *Brassica napus* and *Eruca sativa*. **Theor. Appl. Genet.**, v.76, p.507-512, 1988.
- FASSULIOTIS, G. Genetic basis of plant resistance to nematodes. In: VEECH, J.A., DICKSON, D.W. (Eds.), **Vistas on nematology: a commemoration of the twenty-fifth anniversary of nematologists**. Wattsville: Maryland. Society of Nematologists, 1987. p.364-371.
- FAZUOLI, L.C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A. B., MALAVOLTA, E., ROCHA, M., YAMADA, T. (Eds.). **Cultura do cafeeiro – fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, SP: Associação Brasileira Pesq. Potassa Fosfato, 1986. p.87-113.
- FAZUOLI, L.C., CARVALHO, A., COSTA, W.M. Melhoramento do café Icatu em Campinas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 14, 1987. Campinas. **Resumos...** Rio de Janeiro: GOTEK/DIPRO/IBC, 1987. p.91.
- FAZUOLI, L.C., COSTA, W.M., BORTOLETTO, N. Resistência das progênies de café LC 1669-31 aos nematóides *Meloidogyne exigua* e *M. incognita*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 10, 1983. Poços de Caldas, **Anais...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1983a. p.81-83.
- FAZUOLI, L.C., COSTA, W.M., FERNANDES, J.J.R. Variabilidade na resistência de linhagens de *Coffea canephora* em relação a uma população do nematóide *Meloidogyne incognita* em condições de viveiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 10, 1983. Poços de Caldas, **Anais...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1983b. p.115-116.
- FAZUOLI, L.C., COSTA, W.M., FERNANDES, J.J.R., GONÇALVES, N. Identificação de tolerância em cafeeiros ao nematóide *Meloidogyne incognita* raça 2. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 6, 1982. Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: UFA, 1982. p.20.

- FAZUOLI, L.C., COSTA, W.M., GONÇALVES, N., LIMA, M.M.A., FERNANDES, J.J.R.,. Café Icatu como fonte de resistência e/ou tolerância ao nematóide *Meloidogyne incognita*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 11, 1984. Londrina. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1984. p.247-248.
- FREARSON, E. M., POWER, J. B., COCKING, E. C. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. **Dev. Biol.**, v.33, n.1, p.130-137, 1973.
- FUENTES, S.I., SUAREZ, R., VILLEGAS, T., CASTRO-ACERO, L., HERNANDEZ, G. Embryogenic response of mexican alfafa (*Medicago sativa*) varieties. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.34, p.299-302, 1993.
- FUJIMURA, T., KOMAMINE, A. The serial observation of embryogenesis in a carrot cell suspension culture. **New Phytol.**, v.86, p.213-218, 1980.
- GAIKWAD, K., KIRTI, P.B., SHARMA, A., PRAKASH, S., CHOPRA, V.L. Cytogenetical and molecular investigations on somatic hybrids of *Sinapsis alba* and *Brassica juncea* and their backcross progeny. **Plant Breeding**, v.115, p.480-483, 1996.
- GALBRAITH, D. W., MAUCH, T. J. Identification of fusion of plant protoplasts II: conditions for the reproducible fluorescence labelling of protoplasts derived from mesophyll tissue. **Z. Pflanzenphysiol.**, v.98, p.129-140, 1980.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp.Cell Res.**, v.50, p.151-158, 1968.
- GANAL, M.W., SIMON, R., BROMMONSCHENKEL, S., ARNDT, M., PHILLIPS, M.S., TANKSLEY, S.D., KUMAR, A. Genetic mapping of a wide spectrum nematode resistance gene (hero) against *Globodera rostochiensis* in tomato. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.8, n.6, p.886-891, 1995.
- GARCIA, E. , MENENDEZ, A. Embryogénesis somática a partir de explantes foliares del cafeto Catimor. **Café Cacao Thé**, v.31, n.1, p.15-22, 1987.
- GAVISH, H., VARDI, A., FLUHR, R. Extracellular proteins and early embryo development in *Citrus* nucellar cell cultures. **Physiol. Plant.**, v.82, p.606-616, 1991.
- GLEBA, Y.Y., SYTNIK, K.M. Protoplast fusion and parasexual hybridization of higher plants. In: SHOEMAN, R. (Ed.). **Protoplast fusion – genetic engineering in higher plants**. New York: Springer-Verlag, 1984a. p.36-62.

- GLEBA, Y.Y., SYTNIK, K.M. Techniques of parasexual hybridization. In: SHOEMAN, R. (Ed.). **Protoplast fusion – genetic engineering in higher plants**. New York: Springer-Verlag, 1984b. p.5-35.
- GLEDDIE, S., KELLER, W.A., SETTERFIELD, G. Production and characterization of somatic hybrids between *Solanum melongena* L. and *S. sisymbriifolium* Lam. **Theor. Appl. Genet.**, v.71, p.613-621, 1986.
- GLIMELIUS, K., FAHLESON, J., LANDGREN, M., SJÖDIN, C., SUNDBERG, E. Gene transfer via somatic hybridization in plants. **Trends Biotech.**, v.9, p.24-30, 1991.
- GOMES, P.L., PLAISTED, R.L., BRODIE, B.B. Inheritance of the resistance to *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria* in potatoes. **Am. Potato J.**, v.60, p.339-351, 1983.
- GONÇALVES, W., FAZUOLI, L.C., LIMA, M.M.A., COSTA, W.M., FERNANDES, J.A.R. Seleção de cafeeiros visando a resistência à raça 3 de *Meloidogyne incognita*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 14, 1987. Campinas. **Resumos...** Rio de Janeiro: GOTEK/DIPRO/IBC, 1987. p.89-90.
- GONÇALVES, W., LIMA, M.M.A., FAZUOLI, L.C. Resistência do cafeeiro a nematóides: III. Avaliação da resistência de espécies de *Coffea* e de híbridos interespecíficos a *Meloidogyne incognita* raça 3. **Nematol. Bras.**, v.12, p.47-54, 1988.
- GONÇALVES, W., MARTINS, A.L.M. Fitonematóides da cafeicultura paulista: situação atual. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 17, 1993. Jaboticabal., SP. **Resumos...** Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1993. p.51-58.
- GRÈZES, J., THOMAS, D., THOMASSET, B. Factors influencing protoplast isolation from *Coffea arabica* cells. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.36, p.91-97, 1994.
- GRÈZES, J., THOMASSET, B., THOMAS, D. *Coffea arabica* protoplast culture: transformation assays. In: **Colloque Scientifique International sur le Café**, 15, 1993. Montpellier. **Annales...** Paris: ASIC, 1993. p.745-747.
- GROSSER, J.W., GMITTER, F.G., LOUZADA, E.S., CHANDLER, J.L. Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless Citrus development. **HortScience**, v.27, n.10, p.1125-1127, 1992.

- GROSSER, J.W., GMITTER, F.G., CHANDLER, J.L. Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv.Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv.Flying Dragon. **Plant Cell Rep.**, v.7, p.5-8, 1988a.
- GROSSER, J.W., GMITTER, F.G., CHANDLER, J.L. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus sinensis* and *Severina distiche*. **Theor. Appl. Genet.**, v.75, p.397-401, 1988b.
- GUPTA, P.P., GUPTA, M., SCIEDER, O. Correction of nitrate reductase defect in auxotrophic plant cells through protoplast mediated intergeneric genes transfer. **Mol. Gen. Genet.**, v.188, p.378-383, 1982.
- HAHN-HÄGERDAL, B., HOSONO, K., ZACHRISSON, A., BORNMAN, C.H. Polyethylene glycol and electric field treatment of plant protoplast: characterization of some membrane properties. **Physiol. Plant.**, v.67, p.359-364, 1986.
- HANDLEY, L.W., NICKLES, R.L., CAMERON, M.W., MOORE, P.P., SINK, K.C. Somatic hybrid plants between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum lycopersicoides*. **Theor. Appl. Genet.**, v.71, p.691-697, 1986.
- HATANAKA, T., ARAKAWA, D., YASUDA, T., UCHIDA, N., YAMAGUCHI, T. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. **Plant Cell Rep.**, v.10, p.179-182, 1991.
- HATANAKA, T., AZUMA, T., UCHIDA, N., YASUDA, T. Effect of plant hormones on somatic embryogenesis of *Coffea canephora*. In: COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 16, 1995. Kyoto. **Annales...** Paris: ASIC, 1995. p.790-797.
- HELGESON, J.P., HUNT, G.J., HABERLACH, G., AUSTIN, S. Somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum*: expression of a late blight resistance gene and potato leaf roll resistance. **Plant Cell Rep.**, v.3, p.212-214, 1986.
- HUANG, L., CHIU, D., MURASHIGE, T., Van GUNDY, R., MAHDI, El F.M., NAGAI, K, PLIEGO-ALFARRO, F. Rejuvenation of trees and other perennials for restoration of plant regeneration competence. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH, 1990. p.251-264.
- ICHI, T., KODA, T., ASAI, I., HATANAKA, A., SEKIYA, J. Effects of gelling agents on *in vitro* culture of plant tissues. **Agric. Biol. Chem.**, v.50, n.9, p.2397-2399, 1986.



- ISHII, S. Factors influencing protoplast viability of suspension-cultured rice cells during isolation process. **Plant Physiol.**, v.88, p.26-29, 1988.
- JONES, M. Fusing plant protoplasts. **Trends Biotech.**, v.6, p.153-158, 1988.
- KAMEYA, T., KANZAKI, H., TOKI, S., ABE, T. Transfer of radish (*Raphanus sativus* L.) chloroplasts into cabbage (*Brassica oleracea* L.) by protoplast fusion. **Jpn. J. Genet.**, v.64, p.27-34, 1989.
- KAO, K.N., MICHAYLUK, M.R. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. **Planta**, v.115, p.355-367, 1974.
- KAO, K.N., MICHAYLUK, M.R. Nutritional requirement for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts set a very low population density in liquid media. **Planta**, v.126, p.105-110, 1975.
- KAO, K.N. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean-*Nicotiana glauca*. **Mol. Gen. Genet.**, v.150, p.225-230, 1977.
- KARLSSON, S.B., VASIL, I.K. Morphology and ultrastructure of embryogenic cell suspension cultures of *Panicum maximum* (Guinea grass) and *Pennisetum purpureum* (Napier grass). **Amer. J. Bot.**, v.73, n.6, p.894-901, 1986.
- KISAHA, H., KAMEYA, T. Production of somatic hybrids between *Daucus carota* L. and *Nicotiana tabacum*. **Theor. Appl. Genet.**, v.88, p.75-80, 1994.
- KLEIN-LANKHORST, R.M., SALENTIJN, E.M.J., DIRKSE, W.G., ARENS-DE-REUVER, M., STIEKEMA, W.J. Construction of a YAC library from a *Beta vulgaris* fragment addition and isolation of a major satellite DNA cluster linked to the beet cyst nematode resistance locus Hs1<sup>pat-1</sup>. **Theor. Appl. Genet.**, v.89, p.426-434, 1994.
- KOCHBA, J., BEM-HAYYIM, G., SPIEGEL-ROY, P., SAAD, S., NEUMANN, H. Selection of stable salt-tolerant callus cell lines and embryos in *Citrus sinensis* and *C. aurantium*. **Z. Pflanzenphysiol.**, v.106, p.111-118, 1982.
- KUMAR, A., COCKING, E.C. Protoplast fusion: a novel approach to organelle genetics in higher plants. **Amer. J. Bot.**, v.74, n.8, p.1289-1303, 1987.
- LASHERMES, P., CROS, J., COMBES, M.C., TROUSLOT, P., ANTHONY, F., HAMON, S., CHARRIER, A. Inheritance and restriction fragment length polymorphism of chloroplast DNA in the genus *Coffea* L. **Theor. Appl. Genet.**, v.93, p.626-632, 1996b.

- LASHERMES, R., COUTURON, E., MOREAU, N., PAILLARD, M., LOUARN, J. Inheritance and genetic mapping of self-incompatibility in *Coffea canephora* Pierre. **Theor. Appl. Genet.**, v.93, p.458-462, 1996a.
- LÁZÁR, G.B., DUDITS, D., SUNG, Z.R. Expression of cycloheximide resistance in carrot somatic hybrids and their segregants. **Genetics**, v.98, p.347-356, 1981
- LÁZÁR, G.B., FANKHAUSER, H., POTRYKUS, I. Complementation analysis of a nitrate reductase deficient *Hyoscyamus muticus* cell line by somatic hybridization. **Mol. Gen. Genet.**, v.189, p.359-364, 1983.
- LIMA, M.M.A., GONÇALVES, W., FAZUOLI, L.C., OLIVEIRA, R.P. Avaliação da resistência de seleções de *Coffea canephora* e *C. congensis* à raça 3 de *Meloidogyne incognita*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 14, 1987. Campinas. **Resumos...** Rio de Janeiro: GOTEC/DIPRO/IBC, 1987. p.87-88.
- LIMA, M.M.A., GONÇALVES, W., FAZUOLI, L.C., TRISTÃO, R.O. Estudo comparativo do ciclo de *Meloidogyne incognita*, raça 3, em Mundo Novo e Apoatã. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15, 1989. Maringá. **Resumos...** Rio de Janeiro: GOTEC/DIPRO/IBC, 1989. p.128-129.
- LIMA, R.D. Fitonematóides na cafeicultura mineira: situação atual. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 17, 1993. Jaboticabal, SP. **Resumos...** Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1993. p.45-50.
- LOOMIS, W.D., BATTAILE, J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. **Phytochemistry**, v.5, n.3, p.423-428, 1966.
- LOUZADA, E.S., GROSSER, J.W., GMITTER, F.G., NIELSEN, B., CHANDLER, J.L. Eight new somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved disease resistance. **HortScience**, v.27, n.9, p.1033-1036, 1992.
- MATIBIRI, E.A., MANTELL, S.H. Cybridization in *Nicotiana tabacum* L. using double inactivation of parental protoplast and post-fusion selection based on nuclear encoded and chloroplast-encoded marker genes. **Theor. Appl. Genet.**, v.88, p.1017-1022, 1994.
- MAZZAFERA, P., GONÇALVES, W., FERNANDES, J.A.R. Fenóis, peroxidase e polifenoloxidase na resistência do cafeeiro à *Meloidogyne incognita*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15, 1989. Maringá. **Resumos...** Rio de Janeiro: GOTEC/DIPRO/IBC, 1989. p.4-6.

- MEADOWS, M.G., POTRYKUS, I. Hoechst 33258 as a vital stain for plant cell protoplast. **Plant Cell Rep.**, v.1, p.77-79, 1981.
- 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, n.4, p.207-217, 1989.
- MICHAUX-FERRIERE, N., DUBLIN, P., SCHWENDIMAN, J. Etude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explantas foliaires de *Coffea arabica* L. **Café Cacao Thé**, v.31, n.2, p.103-111, 1987.
- MIKI, B.L.A., IYER, V.N. Fundamentals of gene transfer in plants. In: DENNIS, D.T., TURPIN, D.H. (Eds.). **Plant physiology, biochemistry and molecular biology**. London: Longman Scientific Technical, 1990. p.473-489.
- MONACO, L.C., SÖNDAHL, M.R., CARVALHO, A., CROCOMO, O.J., SHARP, W.R. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J., BAJAJ, Y. P.S. (Eds.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.109-129.
- MOREL, G., WETMORE, R.H. Fern callus tissue culture. **Am. J. Bot.**, v.38, p.141-143, 1951.
- MORIKAWA, H., KUMASHIRO, T., KUSAKARI, K., IIDA, A., HIRAI, A., YAMADA, Y. Interspecific hybrid plant formation by electrofusion in *Nicotiana*. **Theor. Appl. Genet.**, v.75, p.1-4, 1987.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v.15, p.473-479, 1962.
- NAGATA, T. Cell biological aspects of gene delivery into plant protoplasts by electroporation. **Int. Rev. Cytol.**, v.116, p.229-255, 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.
- NEHLS, R. The use of metabolic inhibitors for the selection of fusion products of higher plant protoplasts. **Mol. Gen. Genet.**, v.166, p.117-118, 1978.
- NEUENSCHWANDER, B., BAUMANN, T.W. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Plant Cell Rep.**, v.10, p.608-612, 1992.

- NISHIBATA, T., AZUMA, T., UCHIDA, N., YASUDA, T., YAMAGUCHI, T., Amino acids on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 16, 1995. Kyoto. **Annales...** Paris: ASIC, 1995. p.839-844.
- NORIEGA, C., SÖNDAHL, M.R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15, 1993. Montpellier. **Annales...** Paris: ASIC, 1993. p.73-81.
- NOZERAN, R. Polymorphisme des individus issues de la multiplication végétative des végétaux supérieurs avec conservation du potentiel génétique. **Physiol. Veg.**, v.16, n.2, p.177-194, 1978.
- O'CONNELL, M.A., HANSON, M.R. Regeneration of somatic hybrid plants formed between *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. **Theor. Appl. Genet.**, v.75, p.83-89, 1987.
- OCHATT, S.J., PATAT-OCHATT, E.M., POWER, J.B. Protoplasts. In: HAMMERSCHLAG, F.A., LITZ, R.E. (Eds.) **Biotechnology of perennial fruits crops**. Cambridge: University Press, 1992. p.77-103.
- OCHATT, S.J., POWER, J.B. Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. In: FOWLER, M.W., WARREN, G.S., MOO-YOUNG, M. (Eds.). **Comprehensive biotechnology**. New York: Pergamon, 1992. p.99-127 (Supplement, 2).
- OHGAWARA, J., KOBAYASHI, S., OHGAWARA, E., UCHIMIYA, H., ISHII, S. Somatic hybrid plant obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. **Theor. Appl. Genet.**, v.71, p.1-4, 1985.
- OKADA, K., TAKEBE, I., NAGATA, T. Expression and integration of genes introduced into highly synchronized plant protoplasts. **Mol. Gen. Genet.**, v.205, p.398-403, 1986.
- ORDAS, R.J., TAVAZZA, R., ANCORA, G. Callus formation from isolated globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) suspension protoplasts. **Plant Sci.**, v.77, p.253-259, 1991.
- OROZCO, F.J., SCHIEDER, O. Isolation of mesophyll protoplasts of the genus *Coffea*. **Turrialba**, v.34, n.4, p.534-536, 1984.
- OTONI, W.C. **Hibridação e embriogênese somáticas e transformação genética em espécies de *Passiflora***. Viçosa: UFV, 1994. 198p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1994.

- OTONI, W.C., BLACKHALL, N.W., UTRA VAZ, F.B., CASALI, V.W., POWER, J.B., DAVEY, M.R. Somatic hybridization of the *Passiflora* species, *P.edulis* f. *flavicarpa* Degener. and *P.incarnata* L. **J. Exp. Bot.**, v.46, n.288, p.777-785, 1995.
- PATNAIK, G., COCKING, E.C., HAMILL, J., PENTAL, D. A simple procedure for the manual isolation and identification of plant heterokaryons. **Plant Sci. Lett.**, v.24, p.105-110, 1982.
- PELLETIER, G. Chloroplast and mitochondrial genomes: manipulation through somatic hybridization. In: MURRAY, D.R. (Ed.). **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Melksham: Redwood, 1991. p.201-221.
- PEREIRA, A.A., LIMA, D.G., CHAVES, G.M., FERRAZ, S. Seleção de cafeeiros de Catimor, Sarchimor e Híbrido de Timor com resistência à *Meloidogyne exigua*. In: EPAMIG (Ed.). **Projeto café: resumos de trabalhos realizados pelo Sistema Estadual de Pesquisa Agropecuária**. Belo Horizonte. 1980. p.175-178.
- PIERSON, E.S., VAN LAMMEREN, A.A.M., SCHEL, J.H.N., STARITSKY, G. *In vitro* development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora*. **Protoplasma**, v.115, p.208-216, 1983.
- PIJNACKER, L.P., FERWERDA, M.A., PUIITE, K.J., ROEST, S. Elimination of *Solanum phureja* nucleolar chromosomes in *S. tuberosum* + *S. phureja* somatic hybrids. **Theor. Appl. Genet.**, v.73, p.878-882, 1987.
- POTRYKUS, K., SHILLITO, R.D. Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration. **Meth. Enzymol.**, v.118, p.549-578, 1986.
- POWER, J.B., BERRY, S.F., FREASON, E.M., COCKING, E.C. Selection procedures for the production of interspecies somatic hybrids of *Petunia hybrida* and *Petunia parodii*. I. Nutrient media and drug sensitivity complementation selection. **Plant Sci. Lett.**, v.10, p.1-6, 1977.
- RAJYALAKSHMI, K., GROVER, A., MAHESHAWAKI, N., TYAGI, A.K., MAHESHWARI, S.C. High frequency regeneration of plantlets from the leaf-bases via somatic embryogenesis and comparison of polypeptide profiles from morphogenic and non-morphogenic calli in wheat (*Triticum aestivum*). **Physiol. Plant.**, v.82, p.617-623, 1991.
- RAMOS, L.C.S., YOKDO, E.Y., GONÇALVES, W. Direct somatic embryogenesis is genotype specific in *Coffee*. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15, 1993. Montpellier. **Annales...** Paris: ASIC, 1993. p.763-766.

- RAMULU, K.S., DIJKHVIS, P., RUTGERS, E., BLAAS, J., BERBEEK, W.H. J., VERHOEVEN, H.A., COLIJN-HOOYMANS, C.M. Microprotoplast fusion technique: a new tool for gene transfer between sexually-incongruent plant species. **Euphytica**, v.85, p.255-268, 1995.
- REBOIS, R.V., EPPS, J.M., HARTWIG, E.E. Correlation of resistance in soybeans to *Heterodera glycines* and *Rotylenchulus reniformis*. **Phytopathology**, v.60, p.695-700, 1970.
- REGAZZI, A.J. Teste para verificar a identidade de modelos de regressão e a igualdade de alguns parâmetros num modelo polinomial ortogonal. **Rev. Ceres**, v.40, n.228, p.176-195, 1993.
- REICH, T., IYER, V.N., HAFFNER, M., HOLBROOK, L.A., MIKI, B.L. The use of fluorescent dyes in the microinjection of alfalfa protoplasts. **Can. J. Bot.**, v.64, p.1259-1267, 1986.
- ROEST, S., GILISSEN, L.J.W. Regeneration from protoplasts – a supplementary literature review. **Acta Bot. Neerl.**, v.42, n.1, p.1-23, 1993.
- SATO, H., YAMADA, K., MII, M., HOSOMI, K., OKUYAMA, S., UZAWA, M., ISHIKAWA, H., ITO, Y. Production of an interspecific somatic hybrid between peppermint and gingermint. **Plant Sci.**, v.115, p.101-107, 1996.
- SCHOPKE, C., MULLER, L.E., KOHLENBACH, H.W. Coffee protoplasts: isolation, culture and plantlet regeneration. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 12, 1987. Montreux. **Annales...** Paris: ASIC, 1987. p.426-432.
- SCHOPKE, C., MULLER, L.E., KOHLENBACH, H.W. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in protoplasts cultures from somatic embryos of Coffee (*Coffea canephora* P.ex Fr.). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.8, p.243-248, 1987.
- SIDOROV, V.A., MENCZEL, L., NAGY, F., MALIGA, P. Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts. **Planta**, v.152, p.341-345, 1981.
- SIHACHAKR, D., HAICOUR, R., SERRAF, I., BARRIENTOS, E., HERBRETEAU, C., DUCREUX, G., ROSSIGNOL, L., SOUVANNAVONG, V. Electrofusion for the production of somatic hybrid plant of *Solanum melongena* L. and *Solanum khassianum* C.B. Clark. **Plant Sci.**, v.57, p.215-223, 1988.

- SÖNDAHL, M.R., CHAPMAN, M.S., SHARP, W.R. Protoplast liberation, cell wall reconstitution, and callus proliferation in *Coffea arabica* L. callus tissues. **Turrialba**, v.30, n.2, p.161-165, 1980.
- SÖNDAHL, M.R., MARTINS, I.S. Isolamento e cultura de protoplastos de folhas de *Coffea arabica* e *Nicotiana tabacum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 8, 1980. Campos de Jordão. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1980. p.220.
- SÖNDAHL, M.R., NAKAMURA, T., SHARP, W.R. Propagation of coffee. In: HENKE, R.R., HUGHES, K.W., CONSTANTIN, M.P., HOLLAENDER, A. (Eds.), **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum, 1985. p.215-232.
- 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, 1979.
- SÖNDAHL, M.R., SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Z. Pflanzenphysiol**, v.81, p.395-408, 1977 (Supplement).
- SÖNDAHL, M.R., SHARP, W.R. Research in *Coffea* spp and applications of tissue culture methods. In: SHARP, W. R., LARSEN, P.D., PADDOCK, E. F., RAGHAVAN, V.(Eds.). **Plant cell and tissue culture – principles and applications**. Columbus: Ohio State Univ.Press,.1979. p.527-584.
- 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. Bd**, v.94, p.101-108, 1979 (Supplement).
- SPIRAL, J., PETIARD, V. Protoplast culture and regeneration in *Coffea* species. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 14, 1991. San Francisco. **Annales...** Paris: ASIC, 1991. p.383-390.
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Bot. Neerl.**, v.19, p.509-514, 1970.
- SUNDBERG, E., GLIMELIUS, K. Effects of parental ploidy level and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within *Brassicaceae*. **Theor. Appl. Genet.**, v.83, p.81-88, 1991.

- TAHARA, M., YASUDA, T., UCHIDA, N., YAMAGUCHI, T. Formation of somatic embryos from protoplasts of *Coffea arabica* L. **Hortscience**, v.29, n.3, p.172-174, 1994.
- TAYLOR, A.L., SASSER, J.N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species)**, **International Meloidogyne Project**. Raleigh: North Carolina St. Univ., 1978. 111p.
- TEMPELAAR, M.J., JONES, M.G.K. Fusion characteristics of plant protoplasts in electric fields. **Planta**, v.165, p.205-216, 1985.
- THOMPSON, W., COLLIN, H.A., ISAAC, S.L., HARDWICK, K. Isolation of protoplasts from cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves. **Café Cacao Thé**, v.31, n.2, p.115-120, 1987.
- TRUDGILL, D.L. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.29, p.167-192, 1991.
- TSUKAHARA, M., KOMAMINE, A. Separation and analysis of cell types involved in early stages of carrot somatic embryogenesis. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.47, p.145-151, 1997.
- TUSA, N., GROSSER, J.W., GMITTER, F.G. Plant regeneration of “Valencia” sweet orange, “Femminello” lemon, and interspecific somatic hybrid following protoplast fusion. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v.115, n.6, p.1043-1046, 1990.
- TUSA, N., GROSSER, J. W., GMITTER, F. G., LOUZADA, E. S. Production of tetraploid somatic hybrid breeding parents for use in lemon cultivar improvement. **HortScience**, v.27, n.5, p.445-447, 1992.
- 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.4-17, 1996.
- 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.4-17, 1996.
- VARDI, A., BREIMAN, A., GALUN, E. Citrus cybrids: production by donor-recipient protoplast-fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles. **Theor. Appl. Genet.**, v.75, p.51-58, 1987.



- VARDI, A., FRYDMAN-SHANI, A., GALUN, W., GONEN, P., BLIECHMAN, S. Citrus cybrids: transfer of microcitrus organelles into citrus cultivars. **Acta Hort.**, v.280, p.239-245, 1990.
- VARDI, A., SPIECHEL-ROY, P., GALUN, E. Citrus cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. **Plant Sci. Lett.**, v.4, p.231-236, 1975.
- VASIL, V., VASIL, I.K. Isolation and culture of cereal protoplasts. Part 2: embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. **Theor. Appl. Genet.**, v.56, p.97-99, 1980.
- VASIL, V., VASIL, I.K. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (Pearl millet, *Graminae*). **Amer. J. Bot.**, v.69, n.9, p.1441-1449, 1982.
- VASIL, V., VASIL, I.K. Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays* L. **J. Plant Physiol.**, v.124, p.399-408, 1986.
- VASIL, V., VASIL, I.K., LU, C-Y. Somatic embryogenesis in long-term callus cultures of *Zea mays* L. (*Gramineae*). **Amer. J. Bot.**, v.71, n.1, p.158-161, 1984.
- VERHOEVEN, A.A., RAMULU, K.S., GILISSEN, L.J.W., FAMELAER, I., DIJKHUIS, P., BLAAS, J. Partial genome transfer through micronuclei in plants. **Acta Bot. Neerl.**, v.40, n.2, p.97-113, 1991.
- WAARA, S., GLIMELIUS, K. The potential of somatic hybridization in crop breeding. **Euphytica**, v.85, p.217-233, 1995.
- WAARA, S., WALLIN, A., ERIKSSON, T. Production and analysis of intraspecific somatic hybrids of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Sci.**, v.75, p.107-115, 1991.
- WALLIN, A., GLIMELIUS, K., ERIKSSON, T. The induction of aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by polyethylene glycol. **Z. Pflanzenphysiol.**, v.74, p.64-80, 1974.
- WILLIAMS, E.G., MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Ann.Bot.**, v.57, p.443-462, 1986.
- WILLIAMSON, V.M., HUSSEY, R.S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **Plant Cell**, v.8, p.1735-1745, 1996.

- WRIGHT, W.E. The isolation of heterokaryons and hybrids by a selective system using irreversible biochemical inhibitors. **Exp.Cell Res.**, v.112, p.395-407, 1978.
- YASUDA, T., FUJII, Y., YAMAGUCHI, T. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. **Plant Cell Physiol.**, v.26, n.3, p.595-597, 1985.
- ZACHRISSON, A., BORNMAN, C.H. Electromanipulation of plant protoplasts. **Physiol. Plant.**, v.67, p.507-516, 1986.
- ZAMARRIPA, A. **Etude et développement de l'embryogenèse somatique en milieu liquide du caféier (*Coffea canephora* P., *Coffea arabica* L. et l'hibryde Arabusta)**. Rennes, France: Ecole Nationale Supérieure Agronomique, 1993. 191p.Thèse (Doctorat) - Ecole Nationale Supérieure Agronomique, 1993.
- 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, n.4, p.233-244, 1991.
- ZHAO, J., CHANG, S.T. Interspecific hybridization between *Volvariella volvacea* and *V.bombycina* by PEG-induced protoplast fusion. **World J. Microbiol. Biotech.**, v.13, p.145-151, 1997.
- ZIMMERMANN, U., SCHEURICH, P. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. **Planta**, v.151, p.26-32, 1981.

## **APÊNDICE**

Quadro 1A - Análise de variância relativa ao teste de hipótese  $H_0: \beta_{DH3} = \beta_{Apoatã\ IV-D}$  (as equações MF  $f(t)$  são iguais)

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F
Parâmetros ( $\beta$ )	(6)	(96.987.606)		
Parâmetros ( $\theta$ )	3	93.976.868		
Redução ( $H_0$ )	3	3.010.738	1.003.579,3	105*
Resíduo	12	114.516	9.543	
Total	18	97.102.122		

\* Significativo a 0,005 de probabilidade.

Quadro 2A - Análise de variância relativa ao teste de hipótese  $H_0: \beta_{Apoatã\ IV-C} = \beta_{Apoatã\ IV-D}$  (as equações MF  $f(t)$  são iguais)

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F
Parâmetros ( $\beta$ )	(6)	(36.798.314)		
Parâmetros ( $\theta$ )	3	30.707.583		
Redução ( $H_0$ )	3	6.090.731	2.030.243,7	676*
Resíduo	12	35.999,7	2.999,975	
Total	18	36.834.314		

\* Significativo a 0,005 de probabilidade.

Quadro 3A - Análise de variância relativa ao teste de hipótese  $H_0: \beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = \beta_4 = \beta_5$  (as equações  $R_p f(t_d)$  para o canéfora Apoatã são iguais)

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F
Parâmetros ( $\beta$ )	(10)	(1.523,848)		
Parâmetros ( $\theta$ )	2	1.061,656		
Redução ( $H_0$ )	8	462,192	57,77395	23,88*
Resíduo	10	21,192	2,41920	
Total	20	1.548,04		

\* Significativo a 0,005 de probabilidade.

Quadro 4A - Análise de variância relativa ao teste de hipótese  $H_0: \beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = \beta_4 = \beta_5$  (as equações  $R_p f(t_d)$  para o arábica DH<sub>3</sub> são iguais)

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F
Parâmetros ( $\beta$ )	(10)	(99.590,289)		
Parâmetros ( $\theta$ )	2	96.073,842		
Redução ( $H_0$ )	8	3.516,447	439,5559	26,50*
Resíduo	10	165,823	16,5823	
Total	20	99.756,112		

\* Significativo a 0,005 de probabilidade.

Quadro 5A - Análise de variância relativa ao teste de hipótese  $H_0: \beta_{DH3} = \beta_{Apoatã}$  (as equações  $N_c f(Rho)$  aos 21 dias de cultivo são iguais)

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F
Parâmetros ( $\beta$ )	(4)	(301,5459)		
Parâmetros ( $\theta$ )	2	254,5500		
Redução ( $H_0$ )	2	46,9959	23,4979	46*
Resíduo	6	3,0111	0,5019	
Total	10	304,557		

\* Significativo a 0,005 de probabilidade.

Quadro 6A - Análise de variância relativa ao teste de hipótese  $H_0: \beta_{DH3} = \beta_{Apoatã}$  (as equações  $N_c f(Rho)$  ao 60 dias de cultivo são iguais)

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F
Parâmetros ( $\beta$ )	(4)	(424,0604)		
Parâmetros ( $\theta$ )	2	394,4927		
Redução ( $H_0$ )	2	29,5677	14,7839	15,44*
Resíduo	6	5,7435	0,9572	
Total	10	429,8039		

\* Significativo a 0,005 de probabilidade.

Quadro 7A - Análise de variância relativa ao teste de hipótese  $H_0: \beta_{DH3} = \beta_{Apoatã}$   
(as equações  $\mu C f(Rho)$  aos 75 dias de cultivo são iguais)

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F
Parâmetros ( $\beta$ )	(4)	(402,3968)		
Parâmetros ( $\theta$ )	2	399,3350		
Redução ( $H_0$ )	2	3,0618	1,5309	3,37 <sup>ns</sup>
Resíduo	6	2,7181	0,4530	
Total	10	405,1149		

<sup>ns</sup> não-significativo.

Quadro 8A - Análise de variância relativa ao teste hipótese  $H_0: \beta_{DH3} = \beta_{Apoatã}$   
(as equações  $\mu C f(Rho)$  aos 100 dias de cultivo são iguais)

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F
Parâmetros ( $\beta$ )	(4)	(551,3551)		
Parâmetros ( $\theta$ )	2	542,1424		
Redução ( $H_0$ )	2	9,2127	4,6063	7,92*
Resíduo	6	3,4876	0,5813	
Total	10	554,8427		

\* significativo a 0,025 de probabilidade.

Quadro 9A - Análise de variância relativa ao teste de hipótese  $H_0: \beta_{DH3} = \beta_{Apoatã}$   
(as equações  $\mu C f(Rho)$  aos 140 dias de cultivo são iguais)

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F
Parâmetros ( $\beta$ )	(4)	(8.158.224,9)		
Parâmetros ( $\theta$ )	2	7.167.665,1		
Redução ( $H_0$ )	2	990.559,8	495.279,9	87*
Resíduo	6	33.836,8	5.639,5	
Total	10	8.192.061,7		

\* significativo a 0,005 de probabilidade.