

CARACTERÍSTICAS HISTO-ANATÔMICAS DOS CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS IMATUROS DE *Coffea arabica* L. CV. RUBI

Guilherme Araújo Lacerda¹; Brenda de Oliveira e Silva²; Antonio Chalfun Junior³; Luciano Vilela Paiva³

¹Professor do Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros - MG, guilhermebiologia@hotmail.com

²Bióloga, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, brendinha13@hotmail.com

³Professor do Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, chalfunjunior@ufla.br

⁴Professor do Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, luciano@ufla.br

RESUMO: Com o objetivo de estudar o processo de calogênese utilizando-se embriões zigóticos imaturos de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Rubi como fonte alternativa de explantes, foi realizado o presente trabalho. Foram coletados frutos de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Rubi em estágio verde-cana e mantidos em sacos de papel, por 24 horas, sob refrigeração (4°C). Os frutos foram desinfestados com hipoclorito de sódio comercial 70% (v/v) durante 30 minutos, em câmara de fluxo laminar e lavados 3 vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida, os embriões foram isolados utilizando-se placas de Petri esterilizadas contendo papel filtro e água destilada e autoclavada. Para induzir a calogênese, foi realizada uma incisão no hipocótilo do embrião zigótico imaturo no momento de sua excisão do fruto. Calos provindos de plantas de cafeeiro com um ano de estabelecimento foram observados quanto aos seus aspectos histo-anatômicos. Foram feitos cortes transversais corados com safrablau (safranina e azul de astra) e observados e fotografados em microscópio fotônico. Foi observado, ao MEV, que as células acumulam grande quantidade de amiloplastídeos, sugerindo que os grãos de amido podem ser utilizados como marcadores iniciais do potencial embriogênico. A microscopia fotônica revelou que os calos provindos de embriões zigóticos apresentam-se como uma fonte de explante responsiva à embriogênese, mostrando indícios de formação de embriões somáticos.

PALAVRAS-CHAVE: calogênese, embriogênese, explante e potencial embriogênico.

HISTO-ANATOMICAL CHARACTERISTICS OF THE CALLUSES FROM *Coffea arabica* L. CV. RUBI

ABSTRACT: With the objective of studying the callogenesis process being used zygotic embryos immature of coffee plant *C. arabica* L. cv. Rubi as alternative source of explants was accomplished the present work. Coffee plant fruits were collected *C. arabica* L. cv. Rubi in stage verde-cana and maintained in paper bags by 24 hours under cooling (4 °C). The fruits were disinfected with commercial hypochlorite of sodium 70% (v/v) for 30 minutes, in flow camera to laminate and washed 3 times in distilled water and autoclavada. Soon afterwards the embryos were isolated using plates of sterilized Petri containing paper filter and distilled water and autoclavada. To induce the calogênese an incision it was accomplished in the hypocotyls of the immature zygotic embryo in the moment of his excised of the fruit. Calluses of the coffee plant plants with 1 year old of establishment were observed. They were made red-faced traverse cuts with safrablau (safranina and astra blue) and observed and photographed in optical microscope. It was observed SEM that the cells accumulate great amount of grains of starch, suggesting that the grains of starch can be used as initial markers of the embryogenic potential. The optical microscopy revealed that the calluses of the zygotic embryos come as a source of responsive explante to the embryogenesis, showing indications of formation of somatic embryos.

KEYWORDS: callogenesis, embryogenesis, explante, embryogenic potential.

INTRODUÇÃO

A embriogênese somática torna-se uma estratégia viável para o estudo do desenvolvimento fisiológico do embrião e da produção de sementes sintéticas em larga escala. Esta técnica é uma das melhores opções para a propagação massal de plantas elite (Gupta et al., 1993), proporcionando alta taxa de multiplicação, escalonamento da produção, manutenção de embriões em meios de cultura, plantio direto da muda sem necessidade de enxertia, além de possibilitar a transferência de genes, tanto pela fusão de protoplastos como pela transformação genética (Barros, 1999). Segundo Ammirato (1983), na embriogênese somática, uma única célula ou um grupo de células somáticas são precursoras de embriões somáticos, sendo esse processo similar ao da embriogênese zigótica. Os embriões somáticos in vitro podem ser formados a partir de dois padrões básicos de embriogênese, direto ou indireto. Embora o sucesso da embriogênese somática em plantas lenhosas seja muito baixo, foi possível estabelecer protocolos de indução de embriogênese somática para várias espécies florestais, incluindo vários membros da família Lauraceae, como para *Laurus nobilis* (Canhoto et al., 1999), *Persea americana* Mill. (Witjaksono et al., 1999) e *Ocotea catharinensis* (Viana & Mantell,

1999). Pescador et al. (2000) reportam que a possibilidade de manipular sistemas in vitro para a clonagem de genótipos vegetais superiores depende de vários fatores, como parâmetros morfológicos, genéticos, bioquímicos, citológicos e o conhecimento da fisiologia do desenvolvimento celular, que é de fundamental importância para se obter respostas morfogenéticas nos sistemas de cultura in vitro. Embora não se conheça, ainda, de forma satisfatória, por que certos eventos regenerativos, in vitro, são mais facilmente induzidos em alguns tecidos do que em outros, admite-se que as diferentes expressões morfogenéticas reflitam na natureza e no grau de diferenciação destes tecidos. Assim, alguns autores tentam relacionar as características ultra-estruturais ao potencial embriogênico (Radojevic et al., 1975). No entanto, a caracterização citológica de calos durante o desenvolvimento não tem sido realizada com frequência na cultura de tecidos. O estudo das alterações ultra-estruturais durante a organogênese in vitro para caracterizar as células meristemóides e a formação dos brotos é escasso (Pihakashi-Maunsbach et al., 1993; Arai et al., 1997). Dessa forma, a falta de conhecimento dos fatores que regulam a embriogênese somática e a assíncronia no desenvolvimento de embriões somáticos são os principais responsáveis por sua reduzida aplicação comercial (Pihakashi-Maunsbach, 1993). Uma das estratégias que podem aumentar a eficiência do processo embriogênico seria uma análise ultra-estrutural ainda no estágio de calo. Com o objetivo de estudar o processo de calogênese utilizando-se embriões zigóticos imaturos de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Rubi como fonte alternativa de explantes, foi realizado o presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em associação com o Laboratório Central de Biologia Molecular, o Laboratório de Anatomia Vegetal e o Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais. Foram coletados frutos de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Rubi em estágio verde-cana e mantidos em sacos de papel, por 24 horas, sob refrigeração (4°C). Os frutos foram desinfestados com hipoclorito de sódio comercial 70% (v/v) durante 30 minutos, em câmara de fluxo laminar e lavados 3 vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida, os embriões foram isolados utilizando-se placas de Petri esterilizadas contendo papel filtro e água destilada e autoclavada. Para induzir a calogênese, foi realizada uma incisão no hipocótilo do embrião zigótico imaturo, no momento de sua retirada do fruto. Os embriões zigóticos imaturos foram utilizados como fonte de explante para calogênese, sendo, posteriormente, inoculados em 20 mL de meio em frascos do tipo baby food. Foi utilizado meio para cultivo de embriões zigóticos de cafeeiro *C. arabica* L. cv. Rubi, descrito como o melhor tratamento para desenvolvimento das partes aéreas, por Santos (2001), constituído pelo MS sais e vitaminas (Murashige & Skoog, 1962) e suplementado com BAP (12 mg L⁻¹), ágar (8 g L⁻¹) e sacarose (30 g L⁻¹). O pH dos meios, autoclavados a 121 °C por 20 minutos, foram ajustados em 5,8. Depois de inoculados, os embriões foram mantidos em sala de crescimento a 27±2°C e intensidade luminosa de 80 µmol.s⁻¹.m⁻², sob fotoperíodo de 16 horas, durante todo o experimento. Calos provindos de plantas de cafeeiro com um ano de estabelecimento em meio de cultura foram fixados em Karnovsky (1965) modificado [glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%)] em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,0, por 24 horas, em temperatura ambiente. Posteriormente, os calos foram colocados em glicerol 30% por 30 minutos e cortados em nitrogênio líquido com bisturi. Os fragmentos foram lavados três vezes (10 minutos) em tampão cacodilato 0,05 M e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% por 1-2 horas. Em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%) por 10 minutos e em 100% por 2 vezes de 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico por meio de CO₂ líquido para completar a secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio stubs, com fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Diversas imagens para cada amostra foram geradas e registradas digitalmente, a aumentos variáveis, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de 9 mm. Foram feitos cortes transversais nos calos, que foram corados com safrablau (safranina e azul de astra) (Bukatsh, 1972) e observado e fotografados em microscópio fotônico. Para a captura das imagens foi utilizado o microscópio Leica DM LS® com câmera Nikon® acoplada, no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ocorrência do calo em decorrência do BAP pode ser visualizada nas plantas que sofreram uma incisão na região do hipocótilo, o que, provavelmente devido ao estresse, provocou uma resposta calogênica do tecido (Figura 1).



Figura 1. A) Plântula obtida a partir de um embrião zigótico imaturo de *Coffea arabica* L. cv. Rubi, mostrando o calo formado na região da incisão. B) Estereomicrografia para o detalhe do calo, permitindo a visualização de seu aspecto e coloração clara. Barra = 1 mm.

De forma geral, a maioria dos calos apresentava-se com o mesmo aspecto da Figura 1B, porém, com diferenças na coloração de marrom-claro (Figura 1B), marrom-escuro, verde e alguns avermelhados. Foi observado, ao MEV, que as células acumulam grande quantidade de grãos de amido e material protéico amorfo (Figura 2).

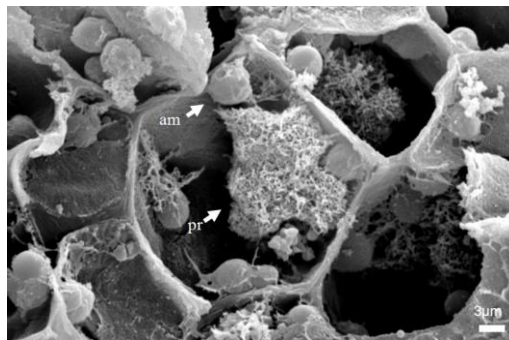


Figura 2. Eletromicrografia de varredura mostrando o tecido adjacente ao calo de *Coffea arabica* L. cv. Rubi. Amiloplastídeo (am); proteína like (pr).

A afinidade da técnica de microscopia eletrônica de varredura por proteínas pôde ser constatada com a utilização de glicerol. Moore et al. (2005), trabalhando com biofilmes de queratina, concluíram que, à medida que aumentava a concentração de glicerol, observava-se maior homogeneidade dos biofilmes protéicos. Santos (2001) observou que os teores de proteínas totais (método do ácido bicinonínico) de calos de explantes foliares mantiveram-se constantes e em baixas concentrações durante o período de crescimento, para a cultivar Rubi. Durante a cultura de embriões somáticos, as células acumulam grande quantidade de grãos de amido, sugerindo que os grãos de amido podem ser utilizados como marcadores iniciais do potencial embriogênico (Radojevic, 1979; Ho & Vasil, 1983; Godbole et al., 2004; Appezzato-da-Glória e Machado, 2004). Em detalhe, na Figura 3, observa-se onde fica a delimitação do tecido adjacente que originou o calo, mostrando a ligação morfoanatômica entre a presença de grãos de amido (internos as células do caule) e as células isodiamétricas do calo.

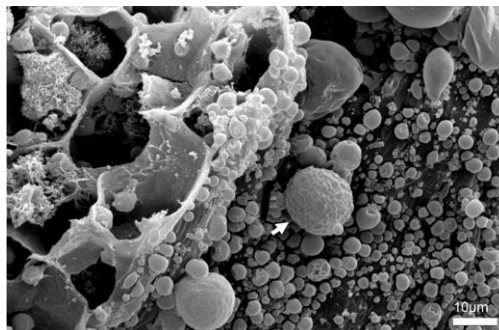


Figura 3. Eletromicrografia de varredura, mostrando o tecido adjacente ao calo de *Coffea arabica* L. cv. Rubi. Observou-se, no interior das células, o material protéico amorfo e os amiloplastídeos, e a delimitação entre o tecido adjacente da plântula e as células isodiamétricas do calo. A seta indica o pró-embrião em estágio globular inicial.

As células embriogênicas, de maneira geral, apresentam características comuns ao comportamento de células embriogênicas ativas, incluindo rápida divisão mitótica, pequeno tamanho, citoplasma denso, núcleo grande com nucléolo proeminente, vacúolo pequeno e abundância de grãos de amido. Essas características sugerem intensa síntese

de RNA e ampla atividade metabólica. De acordo com Quiroz-Figueroa et al. (2002), o desenvolvimento de um embrião se inicia com pequenas células isodiamétricas, com citoplasma denso, que é sucedido de uma série de divisões celulares sucessivas, idêntica à observada durante a embriogênese zigótica (Moens, 1965).

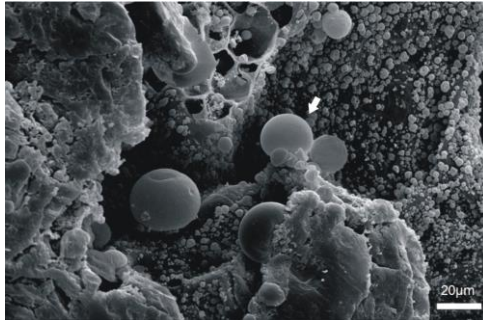


Figura 4. Eletromicrografia de varredura mostrando as células isodiamétricas em diversos tamanhos (estádios) do calo de *Coffea arabica* L. cv. Rubi. A seta indica o pró-embrião em estágio globular inicial.

A embriogênese somática direta ocorre a partir do explante, que possui células programadas para a diferenciação e a formação de embriões somáticos. Para a embriogênese somática indireta, a dediferenciação dos explantes resulta na formação de calos, com células ou grupo de células competentes, ou seja, com capacidade de responder aos efeitos estimulantes do meio de cultura. As estruturas globulares (Figura 4) notadas no centro indicam a ocorrência de pró-embriões somáticos em estágio inicial. Quiroz-Figueroa et al. (2002) definem estas estruturas como sendo uma célula embriogênica com o diâmetro entre 15 e 20 µm, demonstrando sinais de polarização (Figura 5).

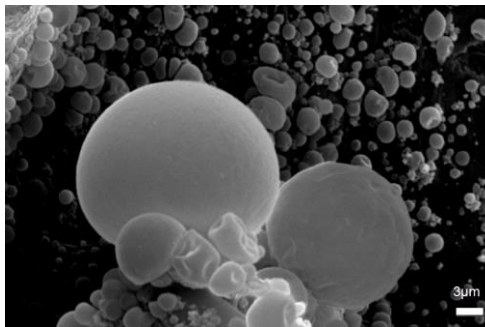


Figura 5. Eletromicrografia de varredura, mostrando, em detalhes, as células isodiamétricas em diversos tamanhos (estádios) do calo de *Coffea arabica* L. cv. Rubi.

A microscopia fotônica revelou que os calos provindos de embriões zigóticos apresentam-se como uma fonte de explante responsiva à embriogênese, mostrando indícios de formação de embriões somáticos (Figura 5). De acordo com Quiroz-Figueroa et al. (2002), trata-se de um embrião globular e estágio avançado de cafeeiros em embriogênese somática indireta.

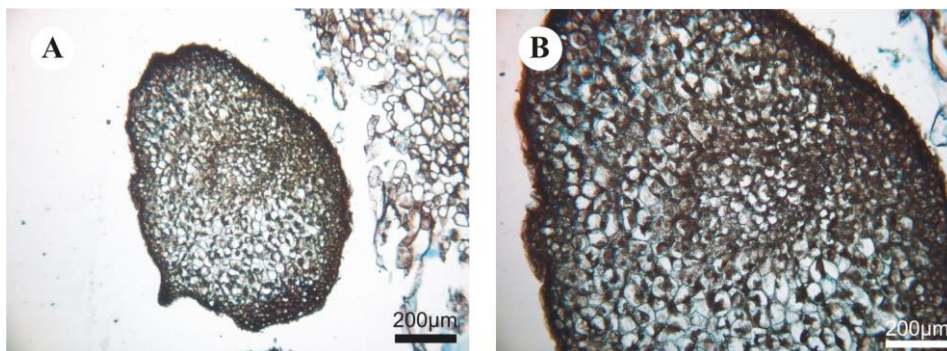


Figura 6. Micrografia fotônica, mostrando o embrião globular identificado no calo de *Coffea arabica* L. cv. Rubi. A) Aspecto geral do embrião globular; B) linha circular de células (procâmbio) em evidência ao centro.

A secção de embriões somáticos em estágio globular (Figura 5) demonstra um procâmbio bem definido (linha circular de células ao centro das estruturas). O mesmo procâmbio é facilmente visualizado em outros estádios da embriogênese somática, demonstrando o desenvolvimento dos embriões de *C. arabica* L. cv. Caturra Rojo (Quiroz-Figueroa et al, 2002). Segundo Vikrant & Rashid (2001), a embriogênese somática direta ocorre mais frequentemente em explantes de micrósporos, óvulos e embriões imaturos. Em contraste, embriogênese somática indireta ocorre nas células indeterminadas e não diferenciadas, formadas, primeiramente, nos calos. Portanto, a compreensão da organogênese de plantas nos estádios iniciais de desenvolvimento das células meristemáticas requer a observação das mudanças subcelulares e as suas correlações com as alterações bioquímicas (Pihakashi-Maunsbach et al., 1993). A grande aplicação desta metodologia é fornecer informações associadas aos parâmetros morfológicos e bioquímicos das células competentes (Santiago, 2003).

CONCLUSÃO

O calo provindo de embriões zigóticos imaturos apresenta-se como uma fonte de explante responsiva à embriogênese, mostrando indícios de formação de embriões somáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; MACHADO, S. R. Ultrastructural analysis of in vitro direct and indirect organogenesis. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v.27, n.3, p.429-437, jul./set. 2004.
- AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. U.; YAMADA, Y. (Ed.). *Handbook of plant cell culture*. New York: Macmillan, 1983. p.82-123.
- ARAI, M.; SAITO, T.; KANEKO, Y.; MATSUSHIMA, H. Cellular origin and ultrastructural changes of regenerating shoots from tobacco (*Nicotiana tabacum*) internodes cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.99, n.4, p.523-528, Apr. 1997.
- BARROS, L. de M. Embriogênese somática. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Uberlândia, v.2, n.7, p.36-43, jan./fev. 1999.
- BUKATSH, F. Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina. *Microkosmos*, Stuttgart, v.61, p.255, Nov. 1972.
- CANHOTO, J. M.; LOPES, M. L.; CRUZ, G. S. Somatic embryogenesis in Bay Laurel (*Laurus nobilis*). In: JANI, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Ed.). *Somatic embryogenesis in woody plants*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1999. v.4, p.41-367.
- GODBOLE, S.; SOOD, A.; SHARMA, M.; NAGAR, P.K.; AHUJA, P.S. Starch deposition and amylase accumulation during somatic embryogenesis in bamboo (*Dendrocalamus hamiltonii*). *Journal of Plant Physiology*, v.161, p.245-248, 2004.
- GUPTA, P.K.; PULLMAN, G.; TIMMIS, R.; KREITINGER, M.; CARLSON, W.C.; GROB, J.; WELTY, E. *Forestry in the 21st Century*. Bio/Technology, New York, v.11, n.4, p.454-459, Apr. 1993.
- HO, W.; VASIL, I.K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma*, New York, v.118, p.169-180, 1983.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, New York, v.27, p.137A-138A, 1965.
- MOENS, P. Développement de l'ovule et embryogenèse chez *Coffea canephora* Pierre. *La Cellule*, Paris, v.65, p.129-147, 1965.
- MOORE, G.R.P.; MARTELLI, S.M.; ANDREO, P.D.; GANDOLFO, C.A.; MACHADO, R.F.A.; BOLZAN, A.; LAURINDO, J.B. Obtenção de biofilmes a partir de queratina de penas de frango. *Revista Matéria*, Rio de Janeiro, v.10, n.1, p.8-13, mar. 2005.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-92, 1962.
- PESCADOR, R.; ARAÚJO, P. S.; MAAS, C. H.; REBELO, R. A.; GIOTO, C. R.; WENDHAUSEN Jr., R.; LARGURA, G. TAVARES, L. B. B. *Biotecnologia de Piper hispidinervium-pimenta longa*. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, Brasília, v.3, n.15, p.19-23, jul./ago. 2000.
- PIHAKASHI-MAUNSBACH, K.; NYGAARD, K.B.; JENSEN, K.H.; RASMUSSEN, O. Cellular changes in early development of regenerating thin cell layer-explants of rapeseed analysed by light and electron microscopy. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.87, n.2, p.167-176, Feb. 1993.
- QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; FUENTES-CERDA, C.F.J.; ROJAS-HERRERA, R.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.20, p.1141-1149, 2002.
- RADOJEVIC, L. Somatic embryos and plantlets from callus cultures of *Paulownia tomentosa* teud. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, Jena, v.91, n.1, p.57-62, 1979.
- RADOJEVIC, L.; VUJICIC, R.; NESKOVIC, M. Embryogenesis in tissue culture of *Coryllus avellana* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, Jena, v.77, p.33-41, 1975.

SANTIAGO, E.J.A. de. Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, DeCandolle). 2003. 184p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, C.G. dos. Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. 2001. 110p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

VIANA, A.M.; MANTELL, S.H. Somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*: an endangered tree of the mata atlântica (South Brazil). In: JAIN, S. M.; GUPTA P. K.; NEWTON, R. J. Somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Kluwer Academic, 1999. v.5, p.3-30.

VIKRANT; RASHID, A. Comparative study of somatic embryogenesis from immature and mature embryos and organogenesis from leaf-base of Triticale. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, v.64, n.1, p.33-38, 2001.

WITJAKSONO, R.E.; LITZ, R.E.; PLIEGO-ALFARO, F. Somatic embryogenesis of avocado (*Persea americana* Mill.). In: JAIN, S.M.; GUPTA P.K.; NEWTON, R.J. Somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Kluwer Academic, 1999. v.5, p.197-214.