

Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

José Amauri Dimárzio
Presidente

Clayton Campanhola
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Dietrich Gerhard Quast
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola
Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca
Herbert Cavalcante de Lima
Mariza Marilena T. Luz Barbosa
Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe -Geral

Maurício Antonio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

DOCUMENTOS 121

Multiplicação clonal de café (*Coffea arábica* L.) via embriogênese somática

**João Batista Teixeira
Cristina Salgado Junqueira
Ana Júlia Prozil da Costa Pereira
Raquel Ivanicska Soriano de Mello
Ana Paula Domingos da Silva
Danielle Alves Mundim**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2004): 150 unidades

M 961 Multiplicação clonal de café (*Coffea arábica* L.) via embriogênese somática / João Batista Teixeira ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

39 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 0102-0110; 121)

1. Café. 2. Clonagem. 3. Embriogênese somática. I. Teixeira, João Batista. II. Série.

633.73 – CDD 21

Autores

João Batista Teixeira
Agr., PhD., Biologia Celular, Embrapa-Recursos
Genéticos e Biotecnologia
E-mail: batista@cenargen.embrapa.br

Cristina Salgado Junqueira
Agr., M.Sci., Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa
E-mail: csjunqueira@hotmail.com

Ana Júlia Prozil da Costa Pereira
Engenharia Biotecnológica, Escola Superior Agrária de Bragança
E-mail: anajuliap81@hotmail.com

Raquel Ivanicska Soriano de Mello
Agronomia, Universidade de Brasília
E-mail: ivanicska@hotmail.com

Ana Paula Domingos da Silva
Agronomia, Universidade de Brasília
E-mail: anads03@hotmail.com

Danielle Alves Mundim
Técnico de Nível Médio
danimundim@pop.com.br

SUMÁRIO

1. Introdução.....	6
2. Revisão de literatura.....	8
3. Revisão da metodologia de embriogênese somática	10
4. Protocolo de Clonagem	12
4.1 Planta matriz.....	12
4.2 Coleta de folhas, desinfestação e inoculação.....	13
4.3 Meio de cultura de indução de calos	14
4.4 Formação de calos primários e calos embriogênicos.....	16
4.5 Multiplicação celular	18
4.6 Diferenciação, maturação e germinação	21
4.7 Crescimento	24
4.8 Aclimação	25
5. Discussão	26
6. Conclusão Final.....	28
7. Agradecimentos.....	29
8. Referência Bibliográfica.....	29

1. Introdução

O café é uma das culturas de maior expressão tanto no mercado interno quando no externo, contribuindo substancialmente para a pauta de exportações brasileiras. Tradicionalmente, o Brasil tem produzido café com qualidade um pouco abaixo de concorrentes como a Colômbia. Entretanto, nos últimos anos, o Brasil mostrou sua capacidade de produção de cafés para bebidas finas como os obtidos principalmente nas regiões montanhosas de Minas e nos Cerrados mineiro e goiano.

A melhora da qualidade do café deveu-se a uma série de procedimentos tanto na condução da cultura quanto no processamento do grão, principalmente durante as fases de colheita, seca e armazenamento. Atualmente, em várias regiões do país, cafés com qualidade igual a dos melhores cafés colombianos vêm sendo produzidos e exportados.

Com a globalização da economia, dois fatores são essenciais para que o Brasil continue competitivo em relação aos concorrentes produtores de café. O primeiro deles refere-se à qualidade da bebida e o segundo, ao custo de produção.

Quanto à primeira condição, a tecnologia disponível associada a condições edafo-climáticas permitem produzir cafés de altíssima qualidade. Entretanto, no que se refere, ao custo de produção, vários fatores devem ser trabalhados no sentido de tornar a cultura menos vulnerável à variação sazonal de preços, o que é típico para esta cultura.

A produtividade do café, como acontece em qualquer outra cultura, reflete a combinação de vários fatores como solo, clima, espaçamento, disponibilidade de água, controle de pragas e doenças, entre outros, o que já vem sendo feito em café, cultura na qual se aplicam os mais modernos insumos agrícolas disponíveis. Entretanto, no que se refere ao material genético, sobretudo, em relação à espécie *Coffea arabica*, o uso de variedades geneticamente estáveis, embora tenha contribuído substancialmente para se atingir um patamar relativamente elevado de produtividade, limita as possibilidades de exploração da variabilidade genética existente, sobretudo no que se refere ao potencial representado pela heterozigose em plantas híbridas.

A exploração da heterozigose, por meio de cruzamentos inter-varietais e inter-específicos, depende da disponibilidade de uma metodologia de multiplicação

vegetativa. Esta metodologia é essencial, tanto para a multiplicação do material genético para os experimentos de avaliação e seleção de clones em condições de campo quanto para plantios comerciais em larga escala das variedades híbridas após o seu lançamento.

Tradicionalmente, o melhoramento do café arábica é conduzido no sentido de lançar variedades geneticamente estáveis. Este procedimento tem dado enormes contribuições à cafeicultura no Brasil, com lançamento nas últimas décadas de algumas dezenas de variedades com as mais distintas características. Entretanto, este processo é extremamente demorado, levando até trinta anos para o lançamento de uma nova variedade.

Os programas de melhoramento têm produzido plantas híbridas F1 e F2 extremamente promissoras do ponto de vista agrônomo, que combinam resistência a doenças e tolerância a pragas, que não têm sido aproveitadas para avaliação no campo porque ainda não se dispunha de um protocolo viável de clonagem.

Com o desenvolvimento, nas últimas décadas, de processos de clonagem via embriogênese somática, é possível se pensar na exploração da heterozigose em café, com o desenvolvimento de variedades híbridas.

2. Revisão de literatura

A domesticação da espécie *Coffea arabica* foi caracterizada por uma redução sucessiva da diversidade genética. Segundo Anthony et al. (2001), o café chegou na América Latina na forma de sementes procedentes de um pequeno número de indivíduos. Esta população foi chamada de "Typica". Uma outra população de sementes foi trazida da ilha de Réunion, também chamada de "Bourbon". Autofecundações sucessivas promoveram a homogeneização das estruturas genéticas destes genótipos (CHARRIER e BERTHAUD, 1985). Mesmo assim, os melhoristas conseguiram obter novas variedades altamente produtivas e com diferentes características agrônomicas desejáveis, embora partindo de uma base genética considerada bastante estreita.

A partir de 1930 o Brasil, por meio do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), deu início ao programa de melhoramento do café, utilizando as populações de plantas

de "Bourbon" (MENDES, 1939). Até a década de 50/60, o melhoramento genético do café visou à substituição de plantações de "Typica" por populações de "Bourbon", altamente produtivas. A descoberta do mutante "Caturra" permitiu o desenvolvimento de novas variedades de porte mais baixo, já que uma das características desfavoráveis dos genótipos Typica e Bourbon era o porte alto.

Segundo Etienne et al. (2002), mais de 80% das variedades de café arábica cultivadas em todo o mundo são derivadas desta tradicional e estreita base genética.

Os programas de melhoramento de café ora em curso tem, entre outros, os seguintes objetivos:

- a. Resistência a doenças e tolerância a pragas (ferrugem, nematóide, bicho mineiro, broca, etc.);
- b. Produtividade;
- c. Qualidade de bebida e porte iguais ao do "Caturra";
- d. Boa adaptabilidade a condições de solo e clima;
- e. Estabilidade na produção ao longo dos anos.

Para obter variedades de café com estas características, são conduzidos cruzamentos intra-específicos e, com menor frequência, interespecíficos. Os cruzamentos intra-específicos são conduzidos utilizando os genótipos Caturra, Typica e Híbrido de Timor, bem como outras variedades como Mundo Novo, Catuaí e demais variedades derivadas dos ancestrais Typica e Caturra.

O Híbrido de Timor, híbrido natural entre *C. arabica* e *C. canephora*, permitiu a transferência de características como resistência a doenças e pragas para as variedades de café derivadas de cruzamentos intra-específicos. Outros híbridos artificiais foram obtidos, primeiramente pelo programa de melhoramento do Instituto Agrônomo de Campinas, o que permitiu explorar com maior profundidade a variabilidade genética dentro da espécie *C. canephora*.

Entretanto, pelo menos dois grandes problemas têm sido enfrentados no melhoramento de café através de cruzamentos entre *C. arabica* e *C. canephora*. Primeiro, é a diferença de ploidia, já que a espécie *C. arabica* é tetraplóide, enquanto

que a espécie *C. canephora* é diplóide. O outro problema diz respeito ao alto teor de cafeína e baixa qualidade de bebida dos frutos da espécie *C. canephora*.

A obtenção de novas variedades depende basicamente da seleção dentro de populações híbridas tendo como base o pedigree. A vantagem deste processo é a relativa facilidade com que são feitas as seleções de características com alta heritabilidade, permitindo o descarte de genótipos indesejáveis. A desvantagem está na rápida perda das características com baixa heritabilidade, devido à redução do nível de heterozigose dos indivíduos selecionados (GALLAIS, 1990).

Portanto, o processo de seleção visando à obtenção de novas variedades geneticamente estáveis corre o risco de obter pequeno ganho genético, uma vez que as variedades geradas podem ser muito parecidas com os parentais.

Por volta de 1980, vários pesquisadores sugeriram a possibilidade de criação de variedades híbridas (CHARRIER, 1978; WALYARO, 1983), visando à exploração da heterozigose. Isto se justifica na medida em que o melhoramento genético do café envolve a seleção inicial de plantas híbridas com alto vigor e produtividade, além de apresentarem resistência a doenças e pragas. Segundo Etienne et al. (2002), híbridos F1 produzem, de 20 a 30% a mais que as melhores linhagens estáveis, além de poder carregar genes complementares para resistência a pragas e doenças. Híbridos F1 obtidos a partir de cruzamentos entre variedades tradicionais, avaliados na América Central tiveram produtividade 30% superior, além de apresentarem resistência à ferrugem e a nematóides (BERTRAND et al., 1997; 1999). Entretanto, a exploração de variedades híbridas pressupõe o domínio de uma metodologia de multiplicação clonal em larga escala, que possa ser viabilizada comercialmente.

3. Revisão da metodologia de embriogênese somática

Os primeiros trabalhos de micropropagação de café via embriogênese somática foram publicados por Staritsky (1970) para *Coffea canephora* e por Herman e Haas (1975) para *Coffea arabica*. Posteriormente, Söndahl e Sharp (1977) ampliaram o trabalho de Herman e Haas (1975) e apresentaram em definitivo os fundamentos

básicos para a multiplicação clonal de plantas de *Coffea arabica* via embriogênese somática.

Embriões somáticos de café podem ser produzidos via direta ou indireta. No primeiro caso, os embriões são produzidos diretamente do tecido foliar em cultivo *in vitro*, enquanto que no segundo, inicialmente observa-se uma proliferação de calos, nos quais ocorre a formação de um segundo tipo de calos de características embriogênicas. Este tipo de calos pode ser subcultivado por um período de tempo relativamente longo, durante o qual pode ser transferido para meios apropriados à formação de grande número de embriões somáticos (SONDAHL e SHARP,1977; SONDAHL et al., 1979; BOXTEL e BERTHOULY, 1996).

Os calos embriogênicos podem ser cultivados em meio líquido em frascos de Erlenmeyer (BOXTEL e BERTHOULY, 1996), em biorreatores de imersão contínua (NORIEGA e SONDAHL; 1993) e biorreatores de imersão temporária (TEISSON et al., 1995).

Os biorreatores permitem o cultivo tanto de gemas nodais como calos embriogênicos de café, o que constitui um dos meios mais promissores no sentido de aumentar a eficiência do processo, uma vez que, em meio líquido tanto a gema nodal quanto os calos embriogênicos podem ser cultivados em condições ótimas desde que alguns parâmetros sejam ajustados, como tipo de explante, meio de cultivo, sobretudo quanto à qualidade e quantidade de reguladores de crescimento, ciclos de imersão/emersão, temperatura e luminosidade. Esta alternativa de cultivo permite uma melhor uniformidade dos embriões produzidos, uma vez que é possível induzir a sincronização do processo embriogênico (NORIEGA e SONDAHL, 1993). Da mesma forma, a diferenciação do embrião pode ser conduzida de forma mais adequada, além de oferecer a oportunidade de encapsulamento do embrião diferenciado em larga escala. Estas vantagens comparativas irão contribuir para uma substancial redução de custo da muda final de café.

O protocolo descrito por Boxtel e Berthouly (1996) foi inicialmente avaliado no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Posteriormente, uma série de adaptações foram conduzidas nesta metodologia, visando a melhorar a eficiência do processo. A seguir, será descrito o procedimento básico, que vem sendo utilizado rotineiramente na Embrapa Recursos Genéticos e

Biotecnologia, para produção de mudas de café de vários genótipos. No Apêndice, é apresentado um resumo do protocolo, com os detalhes de cada passo do processo.

4. Protocolo de Clonagem

4.1. Planta matriz

As plantas matrizes utilizadas foram originadas da germinação de sementes das seguintes variedades, provenientes do programa de melhoramento da Epamig: Catuaí Vermelho, Rubi, Acaiá Cerrado, Mundo Novo e Icatu Amarelo. As sementes, gentilmente fornecidas pelo Dr. Antônio Alves Pereira, foram germinadas em leito de areia e, no estádio de orelha de onça, transplantadas para vasos de 100 litros. Quando as plantas apresentavam aproximadamente 1,0 m de altura (Fig. 1A), foram coletadas folhas para os experimentos.

No caso de uso de plantas selecionadas no campo, as matrizes devem ser multiplicadas via enraizamento de estacas, de tal forma a constituir um estoque mínimo de indivíduos que possam ser disponibilizados para os trabalhos de clonagem via embriogênese somática. Para enraizamento, as estacas devem ser retiradas de brotos ortotrópicos e levadas para casa de vegetação com umidade relativa entre 80 e 90% nas primeiras semanas, podendo baixar nas semanas seguintes para 70 a 80%. As estacas com um par de folhas devem ser plantadas em leito de areia, não havendo necessidade de tratamento com substância estimuladora do enraizamento, embora esta prática possa favorecer a sua pega.

As mudas bem enraizadas são transferidas para vasos de volume mínimo de dez litros, preenchido com uma mistura de solo, areia e esterco curtido na proporção de 2:1:1 e mantidos em casa de vegetação. O solo deve receber adubação NPK e calcário em quantidades adequadas ao bom desenvolvimento das plantas, as quais devem ser mantidas num ambiente de sombreamento de 40% a 50% da luz solar direta e irrigação adequada, duas a três vezes por semana, sempre feita na base da planta, tendo-se o cuidado de não molhar as folhas. O molhamento das folhas estimula o crescimento de fungos e bactérias superficiais, o que redundará em maior dificuldade de desinfestação.

4.2. Coleta de folhas, desinfestação e inoculação

Folhas bem desenvolvidas (Fig. 1B), correspondentes àquelas do terceiro par foram coletadas sempre no início da manhã e conduzidas para o laboratório, onde permaneceram sobre a bancada por, pelo menos, 30 minutos para fechamento completo dos estômatos.

Após este período, as folhas foram conduzidas para capela de fluxo laminar e submetidas à desinfestação superficial, que consistiu de tratamento com álcool comum a 70%, por 2 a 3 minutos. Após este tratamento, as folhas foram cortadas em metades quando muito grandes e tratadas com hipoclorito de sódio a 2,4% por 10 minutos, seguido de 3 lavagens em água destilada estéril. Após a drenagem, as folhas permaneceram em copo de Becker coberto com uma placa de Petri estéril até o momento do uso.

Após a desinfestação, as folhas foram transferidas para placa de Petri contendo papel filtro estéril, onde foram cortadas com bisturi com lâmina número 10, em segmentos de 0,5 a 0,7 cm e inoculadas em placa de Petri contendo meio de cultura gelificado, sempre com a parte adaxial em contato com o meio (Fig. 1C). As placas foram mantidas no escuro em caixas de papelão fechadas ou em câmara de crescimento tipo B.O.D., sob temperatura de 24 a 27 ° C.

4.3. Meio de cultura de indução de calos.

O meio de cultura utilizado para indução de calo primário foi o C, descrito por Boxtel e Bertouly (1996) (Tabela 1), tendo a concentração de 2,4-D aumentada de 2,3 para 20 μ M, durante o primeiro mês de cultivo, o qual passou a ser chamado de meio primário- PM (Tabela 2). Ao final deste período, os explantes foram transferidos para o mesmo meio C, mas com a concentração de 2,4-D reduzida pela metade, i.é, 10 μ M, denominado meio secundário-SM (Tabela 2). Os explantes foram mantidos neste meio por um período adicional de três a cinco meses sem repicagem para meio fresco.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura utilizados para embriogênese somática de café de acordo com Boxtel & Berthouly (1996), em mg/L e μM (reguladores de crescimento).

Componente	Meio C	Meio E	Meio CP	Meio R	Meio EG	Meio DEV
Macronutrientes	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2	MS
Micronutrientes	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2	MS
FeSO ₄ .7H ₂ O	13,9	13,9	13,9	13,9	13,9	27,8
Na ₂ EDTA	18,65	18,65	18,65	18,65	18,65	37,3
Tiamina	10	20	5	10	8	1
Piridoxina	1	-	0,5	1	3,2	1
Ácido Nicotínico	1	-	0,5	1	-	1
Pantotenato de Cálcio	-	-	-	-	-	1
Biotina	-	-	-	-	-	0,01
Glicina	1	20	-	2	-	-
L-cisteína	-	40	10	-	-	-
Mio-inositol	100	200	50	200	100	100
Sulfato de adenina	-	60	-	40	-	-
Caseína hidrolisada	100	200	100	400	-	-
Extrato de malte	400	800	200	400	-	-
2,4-D (μM)	2,26	4,52	4,52-9,04	-	-	-
IBA (μM)	4,92	-	-	-	-	-
IAA (μM)	-	-	-	-	2,57	-
2-iP (μM)	9,84	-	-	-	-	-
Kinetina (μM)	-	-	4,65	-	-	-
BAP (μM)	-	17,77	-	4,44--17,77	1,11	1,33
Sacarose	30.000	30.000	15.000	40.000	20.000	30.000
Phytigel	2.000	2.000	-	-	2.500	2.500
pH	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6

Tabela 2. Composição dos meios de cultura utilizados para produção de mudas de café via embriogênese somática, em mg/L e μM (reguladores de crescimento).

Componentes	Meio Primário - PM	Meio Secundário - SM	Meio de Multiplicação - MM	Meio de Regeneração RM	Meio de Maturação e Germinação MGM	Meio de Crescimento - PRM
Macro-nutrientes	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2	DKW/5 ⁽¹⁾
Micro-nutrientes	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2	DKW/5
FeSO ₄ .7H ₂ O	13,9	13,9	13,9	13,9	13,9	6,95 (MS/4)
Na ₂ EDTA	18,65	18,65	18,65	18,65	18,65	9,33 (MS/4)
Tiamina	10	10	10	10	10	10
Piridoxina	1	1	1	1	1	1
Ácido Nicotínico	1	1	1	1	1	1
Glicina	1	1	1	1	1	1
L-cisteína	-	-	10	-	-	-
Mio-inositol	100	100	100	100	100	100
Caseína hidrolisada	100	100	100	100	-	-
Extrato de malte	400	400	200	400	-	-
Ácido Cítrico	-	-	250	-	-	-
2,4-D (μM)	20,0	10,0	5,0	-	-	-
IBA (μM)	4,92	4,92	4,92	-	-	-
IAA (μM)	-	-	-	-	2,57	-
2-iP (μM)	9,84	9,84	9,84	-	-	-
BAP (μM)	-	-	-	8,88	1,11	1,33
ANA (μM)	-	-	-	1,34	-	-
Sacarose	20.000	20.000	20.000	30.000	20.000	5.000
Glucose	-	-	-	-	-	10.000
Phytigel	2.400	2.400	-	-	-	-
pH	5,7-5,8	5,7-5,8	5,7-5,8	5,7-5,8	5,7-5,7	5,7-5,8

⁽¹⁾ Driver & Kuniyuki (1984)

4.4. Formação de calos primários e calos embriogênicos

Ao final do primeiro mês de cultivo, observou-se intensa proliferação celular nos bordos dos explantes. Segundo Quiroz-Figueroa et al. (2002), esta proliferação ocorre nas células do câmbio vascular, o que leva à formação do calo primário (Fig. 1D).

Ao final de, aproximadamente, cem dias de cultivo, é possível observar sob microscópio estereoscópico a formação dos primeiros pontos amarelados sobre os calos primários, correspondente ao início de formação dos setores embriogênicos. Após quatro meses de cultivo, já é possível observar a olho nu o crescimento dos setores embriogênicos, os quais apresenta textura granular, coloração amarela intensa e medem de 1 a 3 mm de comprimento (Fig. 1E).

Um ou mais setores embriogênicos podem se formar sobre um mesmo explante. Até aproximadamente seis meses de cultivo, os setores embriogênicos continuam a crescer podendo atingir de 8 a 10 mm de comprimento. Após este período, observa-se uma paralização do crescimento e mudança da coloração de amarelo intenso para amarelo acinzentado, o que sugere um envelhecimento dos calos possivelmente devido a mudanças na qualidade e quantidade dos componentes do meio de cultura e/ou acúmulo de substâncias inibidores do crescimento produzidas pelo explante original.

A taxa de formação de calos primários em diferentes genótipos foi próxima de 100%. Entretanto, a taxa de formação de setores embriogênicos variou substancialmente dependendo da variedade utilizada. Como pode ser observado pela Figura 1F, Mundo Novo foi a variedade que respondeu com a menor percentagem de formação de setores embriogênicos, próximo de 8%, enquanto que, para Catuaí Vermelho, a percentagem foi de 100%, o que significa que todos os explantes apresentavam pelo menos um setor embriogênico. Icatu Amarelo, Acaiá Cerrado e Rubi apresentaram valores intermediários.

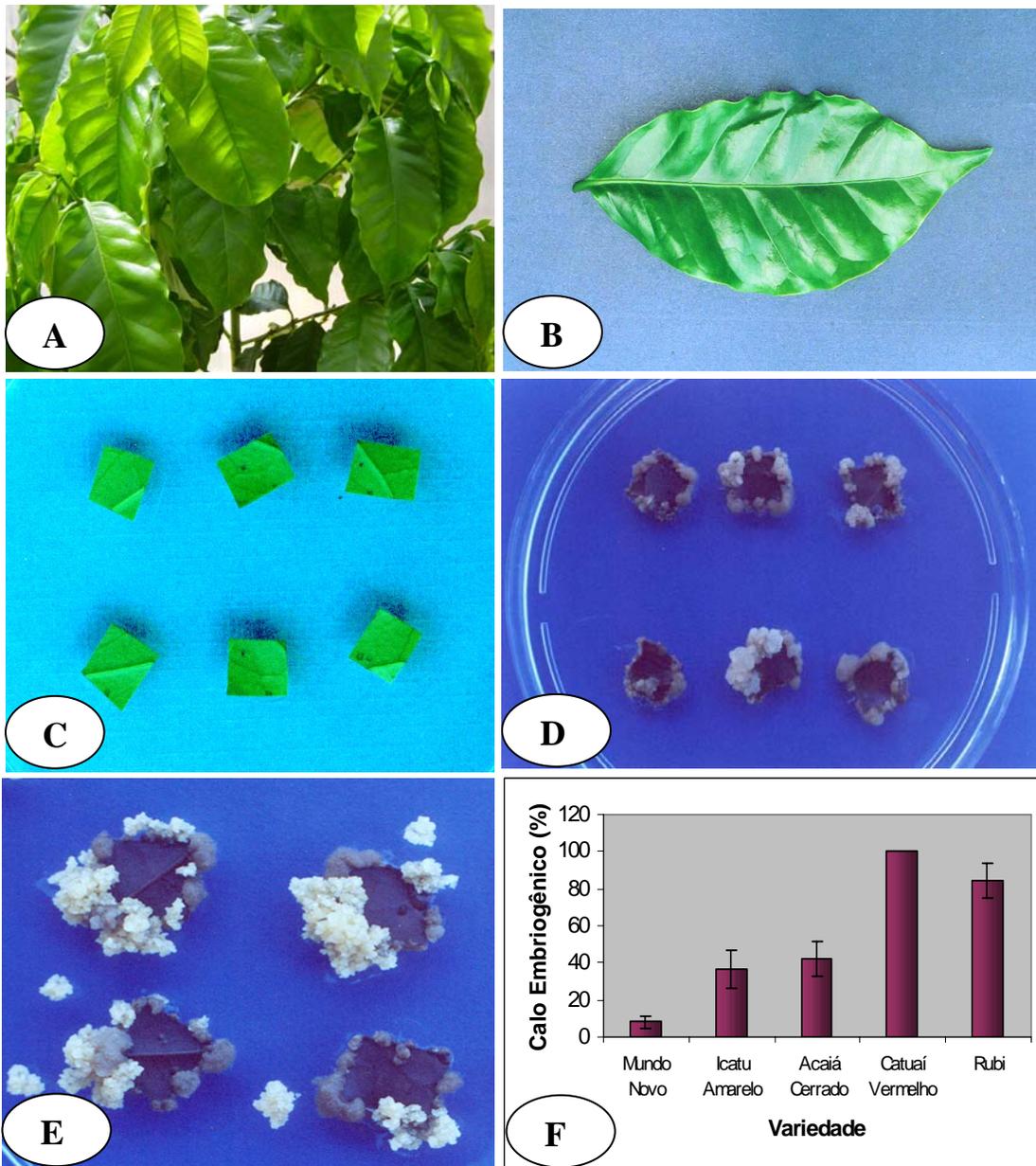


Figura 1. Formação de calos primários, calos embriogênicos e avaliação da resposta embriogênica em diferentes genótipos. A. Planta matriz com 1,0 m de altura; B. Folha correspondente ao terceiro par de folhas a contar do ápice do ramo plageotrópico; C. Segmentos de folha de 0,5 a 0,7 cm utilizado como explante inicial; D. Calos primários desenvolvendo nos bordos dos segmentos de folhas; E. Setores embriogênicos em desenvolvimento sobre os calos primários; F. Resposta embriogênica de diferentes genótipos. A barra vertical representa o intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

4.5. Multiplicação celular

Após quatro a seis meses do início do cultivo dos segmentos de folhas, os setores embriogênicos foram isolados e subcultivados em meio líquido para fins de multiplicação. O cultivo foi conduzido em frascos de Erlenmeyer de 125 ml mantidos em agitadores orbitais a 90-100 rpm (Fig. 2A) ou em frascos de 2000 ml, boca estreita, mantidos em roladores de frascos (Fig. 2B), sob rotação de 1,5 rpm.

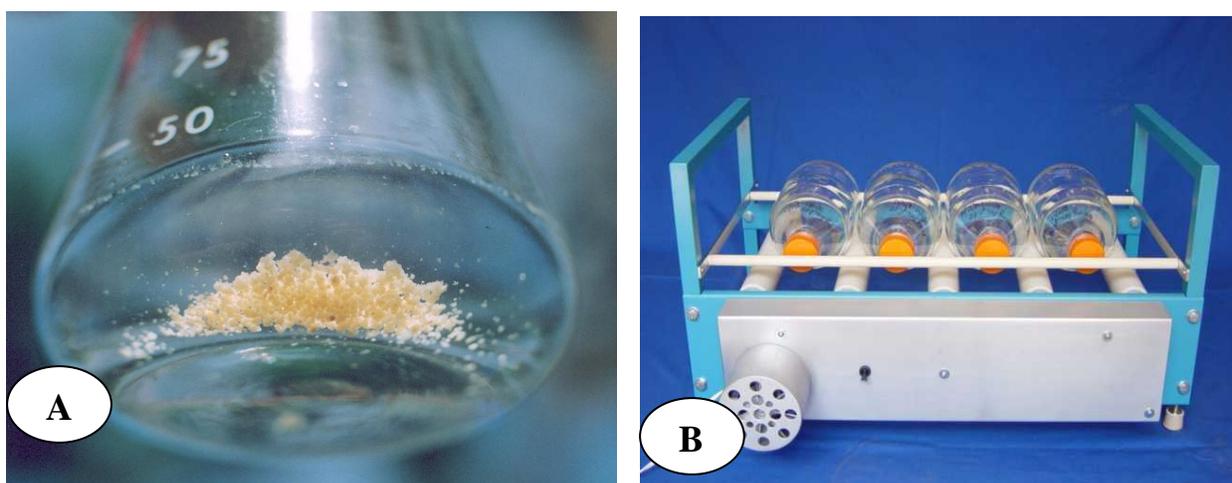


Figura 2. Multiplicação de células embriogênicas em meio líquido. A. Cultivo em frasco de Erlenmeyer de 125 ml, em agitador orbital, a 90-100 rpm; B. Cultivo em frascos de 2000 ml, em rolador de frasco a 1,5 rpm.

A multiplicação foi conduzida no meio MM (Tabela 2), constituído do meio CP (Tabela 1) com as seguintes modificações: vitaminas do meio C (Tabela 1), 3% de sacarose, 250 mg/L de ácido cítrico, 5,0 μM de 2,4-D, 4,9 μM de AIB e 9,8 μM de 2-iP. O meio de cultura era renovado a cada duas semanas de cultivo.

A quantidade inicial das células inoculadas foi de 1, 4, 8 e 12 g/L de meio, o que é referido como a densidade inicial de cultivo. Os períodos de cultivo avaliados foram 28, 56 e 86 dias. O peso da matéria fresca ao final dos diferentes períodos de cultivo variou de acordo com a densidade inicial de células, atingindo o valor máximo de 2387 mg para uma inoculação inicial de 160 mg em 20 ml de meio, referente à densidade de

8 g/L (Fig. 3A), correspondendo a quase 15 vezes a massa inicial de células, ao final de 86 dias de cultivo.

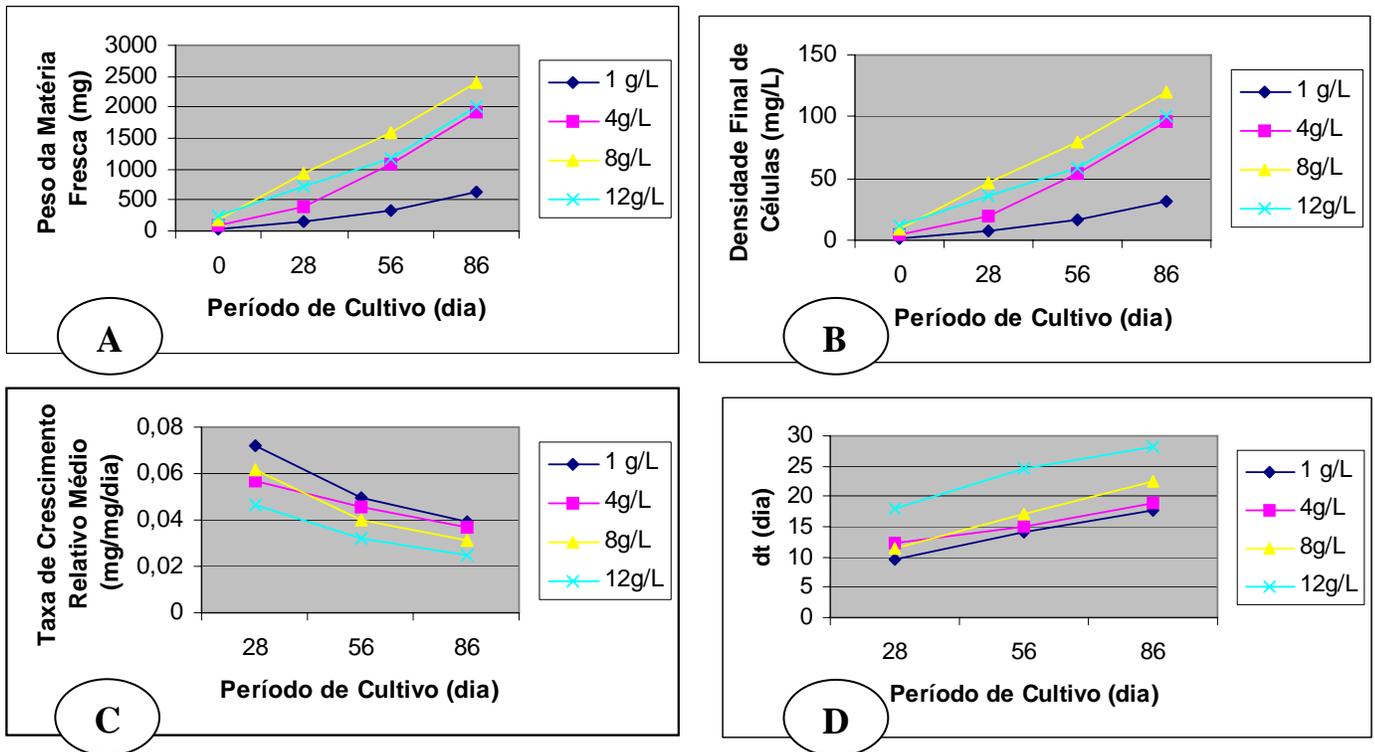


Figura 3. Avaliação do crescimento de células embriogênicas cultivadas em frascos de Erlenmeyer de 125 ml, em agitador orbital a 90-100 rpm, em função do período de cultivo e diferentes densidades de células.. A. Aumento da matéria fresca; B. Aumento da densidade de células; C. Taxa de crescimento relativo; D. Tempo para dobramento do peso (dt).

Verificou-se aumento da densidade de células próximo a cinco vezes após 28 dias, dez vezes após 56 dias e quinze vezes após 86 dias de cultivo, para a densidade inicial de 8 g/L (Fig. 3B). Assim, após 86 dias, a densidade chegou a 119 g/L. Densidade inicial mais elevada resultou em menor acúmulo de matéria fresca no mesmo período e, conseqüentemente, uma menor densidade final, como pode ser observado para a densidade de 12g/L, com uma densidade final de 100,7. Desta forma, a densidade de células deve ser reajustada ao final de cada mês de cultivo para valores próximos de 8 g/L. Segundo Boxtel e Berthouly (1996), a densidade de 10 g/L foi a que propiciou as maiores taxas de crescimento.

A avaliação do crescimento foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{TCM (Taxa de crescimento médio)} = (\ln \text{PF final} - \ln \text{PF inicial})/t,$$

onde **PF final** é o peso da matéria fresca final, **PF inicial**, o peso da matéria fresca inicial e **t** o período de cultivo em dias.

O período de tempo para dobramento do peso foi calculado pela seguinte fórmula:

$$dt = 0,693/\text{TCM},$$

onde **dt** é o tempo em dias para dobramento do peso das células em cultivo e **TCM**, a taxa de crescimento médio.

Densidades menores resultavam numa maior taxa de crescimento principalmente ao final de 28 dias de cultivo, com taxa de 0,072 mg/mg/dia para a densidade inicial de 1 g/L e 0,047 mg/mg/dia para a densidade de 12 g/L (Fig. 3C), com correspondente **dt** variando de 9,6 a 17,7 ao final do mesmo período (Fig. 3D).

Observou-se igualmente uma redução na taxa de crescimento ao final de 56 e 86 dias (Fig. 3C), com conseqüente aumento de **dt** (Fig. 3D). Para manter a taxa de crescimento em valores elevados é necessário reajustar a densidade de células ao final de cada mês de cultivo ou mesmo a intervalos menores, três ou duas semanas.

4.6 Diferenciação, maturação e germinação de embriões

A diferenciação de embriões foi inicialmente conduzida em meio gelificado a fim de avaliar a capacidade embriogênica das linhagens selecionadas (Fig. 4A). Para isso, os setores embriogênicos de cada explante foram isolados constituindo uma linhagem embriogênica, a qual foi inoculada em meio de diferenciação, constituído pelo meio

básico R, vitaminas do C (Tabela 1), 8,9 μM de BAP, 1,3 μM de ANA, 3% de sacarose e 0,24% de fitagel, que foi denominado de meio de regeneração - RM (Tabela 2). Após dois meses de cultivo, foi feita a avaliação e verificou-se que 71,3% das linhagens apresentavam algum grau de regeneração enquanto que 28,5% não apresentavam formação de embrião (Tabela 3).

Tabela 3. Regeneração de embriões em meio gelificado, a partir de calos embriogênicos friáveis obtidos em três diferentes experimentos.

	Total de linhagens	Nota de regeneração							
		zero	%	um	%	dois	%	três	%
Experimento 1	61	17	27,4	13	21,3	13	21,3	18	30
Experimento 2	30	6	19,7	12	40	7	23,3	5	17
Experimento 3	56	21	37,5	26	46,4	6	10,7	3	5,4
Média	49	14,7	28,2	17	35,9	8,7	18,4	8,7	17,5

Nota um: poucos embriões; dois: quantidade mediana; três: regeneração considerada máxima

A diferenciação em meio líquido foi levada a cabo tanto em frasco de Erlenmeyer de 125 ou 250 ml, mantidos em agitadores orbitais a 90-100 rpm quanto em frascos de boca estreita de 2000 ml mantidos em roladores de frascos, sob 1,5 rpm. A densidade de células inoculadas em meio líquido foi de 1g/L. Densidades menores podem levar à germinação precoce dos embriões formados, enquanto que densidades maiores impedem o bom desenvolvimento dos mesmos.

A diferenciação demorou cerca de dois meses, com troca do meio aos trinta dias. Ao final do processo, os embriões apresentavam comprimento aproximado de 2 a 3 mm de comprimento e aspecto semelhante aos da Figura 4B.

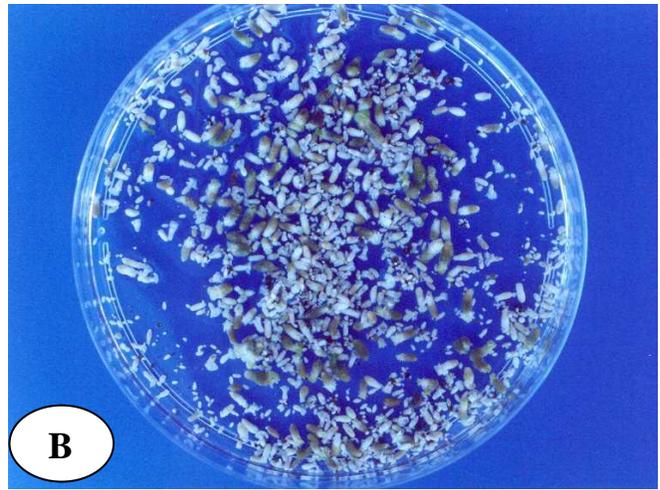
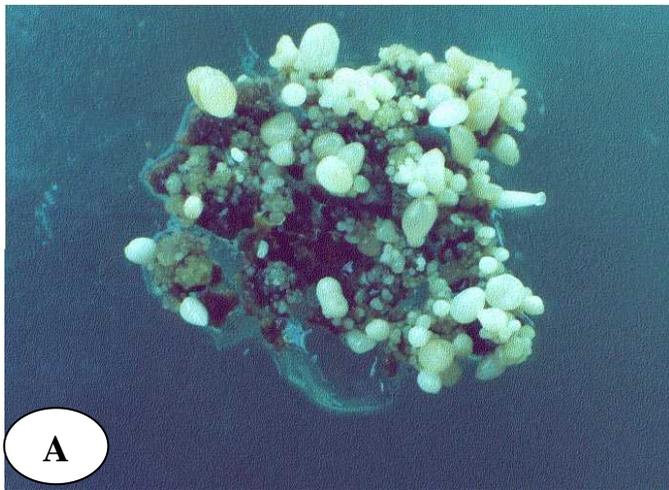


Figura 4. Diferenciação e germinação de embriões somáticos de café, variedade Catuaí Vermelho. A. Diferenciação em meio gelificado; B. Embriões diferenciados em meio líquido; C. Embriões ao final da fase de maturação, presença de cotilédones bem formados; D. Embriões germinados em meio líquido em frasco de Erlenmeyer de 250 ml; E. Embriões germinados em biorreator de imersão temporária, modelo com sub-iluminação; F. Plântulas enraizadas, obtidas em biorreator de imersão temporária, modelo com sub-iluminação.

Nesta fase, o meio de diferenciação foi substituído pelo meio de maturação, constituído pelo meio EG (Tabela 1), modificado pela substituição das vitaminas do meio EG pelas do meio C (Tabela 1), passando a se chamar meio de maturação/germinação - MGM (Tabela 2). Para promover uma boa maturação, a densidade dos embriões foi ajustada para 10 g/L de acordo com recomendação de Boxtel e Berthouly (1996). Ao final de um a dois meses de cultivo, com renovação do meio aos trinta dias, os embriões apresentavam uma completa formação de cotilédones.

Com a formação dos cotilédones, os embriões atingiram o estágio final da diferenciação e estavam prontos para serem germinados (Fig. 4C), o que foi conduzido no mesmo meio MGM, com reajuste da densidade para 10 g/L e exposição das culturas à luz.

A germinação foi a primeira fase do processo conduzida na presença de luz. As fases iniciais de formação de calo primário e setores embriogênicos foram conduzidas em escuro completo. A fase de multiplicação das linhagens embriogênicas, diferenciação e maturação dos embriões foi conduzida no escuro ou em luz difusa, até $7,5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Entretanto, a germinação foi conduzida em intensidade de luz mais alta, em torno de $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fornecida por quatro lâmpadas fluorescentes de 40 W a uma distância de 35 cm. A germinação completou-se com o desenvolvimento dos cotilédones e início do desenvolvimento da radícula como mostram as Figuras 4D, E e F.

4.7 Crescimento

Após a germinação, as plântulas foram transferidas para meio de cultura gelificado para crescimento e enraizamento tanto em tubos de ensaio (Fig. 5A) quanto em frascos Magenta[®] (Fig. 5B), utilizando meio de cultura PRM (Tabela 2). Foram avaliados vários meios de cultura, mas o que apresentou melhores resultados foi o PRM, derivado do meio DKW (DRIVER e KUNIYUKI, 1984). Ao final do experimento, as plântulas foram levadas para casa de vegetação para aclimação.

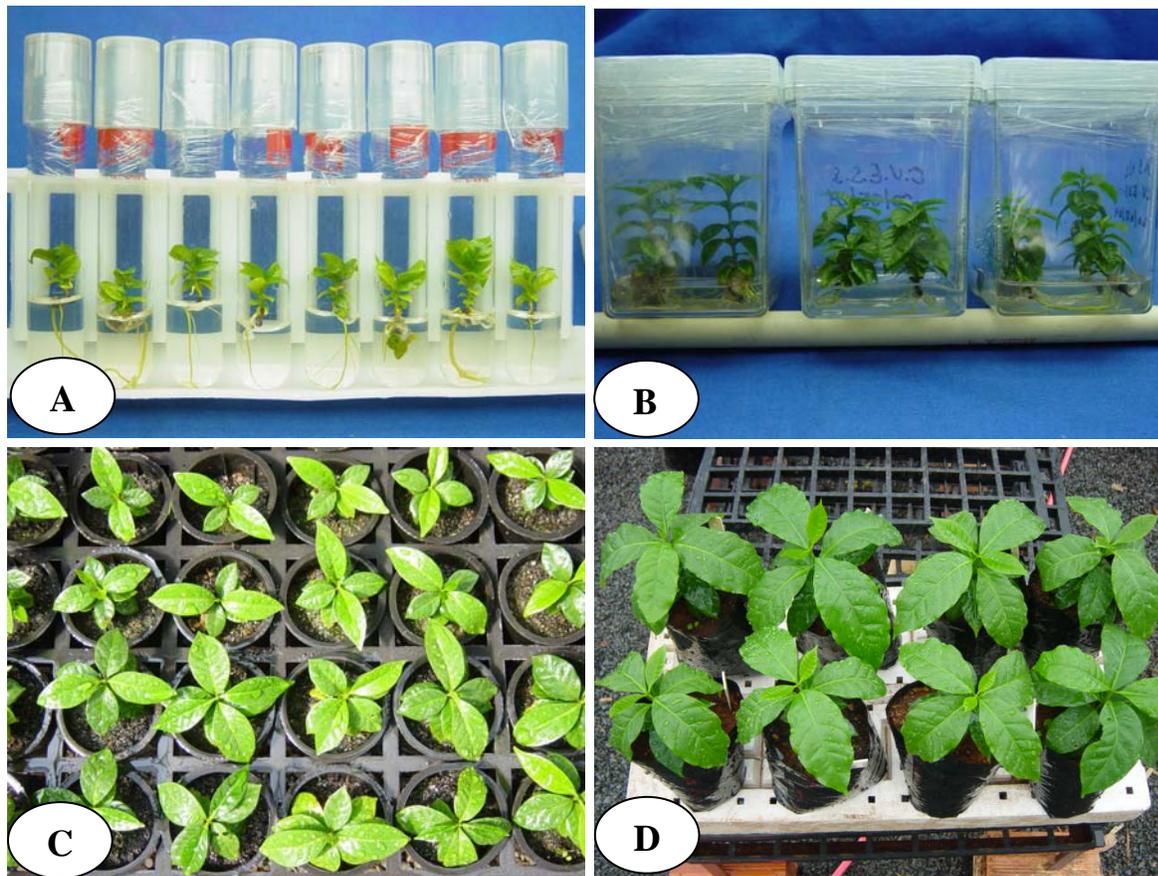


Figura 5. Crescimento das plântulas *in vitro* em sala de cultura (A, B) e aclimação em tubetes em casa-de-vegetação (C,D). A. Plântulas em tubos, após dois meses de cultivo; B. Plântulas em frascos do tipo Magenta, após três meses de cultivo; C. Mudas em tubetes após dois meses e meio de cultivo; D. Muda pronta para ser levada ao campo, após cinco meses de cultivo.

4.8 Aclimação

A aclimação foi conduzida em tubetes contendo substrato tipo PlantMax[®] peneirado. Após o plantio, as mudas eram irrigadas diariamente e, uma vez por semana, recebiam uma solução de macro e micronutrientes. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação com sombreamento equivalente a 40 a 50% da luz solar direta, umidade relativa de 70 a 90% e temperatura variando entre 20 e 30 °C.

Após dois meses e meio em casa de vegetação, as mudas apresentavam-se com três ou mais pares de folhas (Fig. 5C) e, ao final de cinco meses, já estavam no ponto de serem levadas para o plantio em condições de campo (Fig. 5D).

5. Discussão

No protocolo publicado por Boxtel e Berthouly (1996), os segmentos de folha foram cultivados inicialmente no meio C e, após um mês, transferidos para o meio E. O meio C contém 2,3 μM de 2,4-D enquanto que o meio E contém 4,5 μM de 2,4-D e 17,8 μM de BAP. Este protocolo foi avaliado para 3000 segmentos de folhas de 'Catuaí Vermelho' em diferentes experimentos, ao longo de dez meses durante o ano de 2000. Ao final dos experimentos, chegou-se a uma média de formação de calos embriogênicos de 4,3%, o que representa 129 calos em 3000 explantes. Essa taxa de obtenção de calos embriogênicos foi próxima do relatado por Boxtel e Berthouly (1996), que foi de 5,7% para a mesma variedade.

Com o objetivo de aumentar a taxa de formação de calos embriogênicos, foi conduzido um experimento onde foram avaliadas diferentes concentrações de 2,4-D (Tabela 4). Os segmentos de folha foram inoculados em placas de Petri, contendo o meio C (Tabela 1) e concentrações de 5,0; 10,0; 15,0 e 20 μM 2,4-D. Ao final de 30 dias, os explantes foram subcultivados para os mesmos meios, sendo mantidos em placas de Petri sem renovação do meio por um período adicional de três meses, quando foi feita a avaliação final.

Como pode ser observado pela Tabela 4, a percentagem de formação de setores embriogênicos variou de 35,7 a 90,2, valores bem superiores ao valor de 5,7% descrito por Boxtel e Berthouly (1996) para a mesma variedade. Desta forma, um aumento na concentração de 2,4-D de 2,3 para 20 μM foi essencial para se obter um aumento substancial da frequência de formação de setores embriogênicos. Posteriormente, verificou-se que transferência aos 30 dias para meio com concentração de 10 μM de 2,4-D não resultava em redução da taxa de formação de setores embriogênicos. Assim, no novo protocolo, houve um aumento da concentração de 2,4-D de 8,7 vezes no primeiro meio e 2,2 vezes aos 30 dias de cultivo, além da adição de AIB e 2-iP no segundo meio (Tabela 2), em vez da adição de BAP como relatado por Boxtel e Berthouly (1996) (Tabela 1).

Aumento na concentração de 2,4-D acarretou uma redução na taxa de formação de embriões do tipo LFSE (Low Frequency Somatic Embryo induction) (SÖNDAHL e SHARP, 1977), de 46,4 para 0,0%, o que pode ser devido à alteração na relação 2,4-D/2-iP (auxina/citocinina) no meio de cultura.

A embriogênese somática, embora apresente um potencial muito grande de poder ser utilizada para produção de mudas em larga escala, apresenta a possibilidade de introduzir variações genéticas e epigenéticas nas mudas obtidas, principalmente no presente protocolo, onde houve um aumento substancial da concentração de 2,4-D.

Entretanto, os primeiros trabalhos com variação somaclonal em café parece mostrar que esta espécie apresenta uma estabilidade genética muito elevada *in vitro*. Ducos et al. (2000) relataram que não foi encontrada variação somaclonal em 8000 plantas derivadas de nove clones de *C. canephora*. Da mesma forma, Etienne et al. (2002) encontraram a mesma estabilidade genética em 18.000 plantas de *C. canephora* avaliadas no campo. De acordo com Etienne e Bertrand (2001), a produtividade, a fertilidade e características bioquímicas, minerais e organolépticas do grão, de híbridos F1 derivadas de células em suspensão com cinco meses de idade e plantas obtidas por estaquia foram idênticas. Nesse estudo, a frequência de plantas fora do padrão ("offtype") ficou em torno de 2,1%. Posteriormente, 30.000 plantas derivadas de clones de 20 híbridos F1 foram avaliadas no campo. A estimativa de risco de variação somaclonal ficou entre 3 e 10%, dependendo do genótipo. A frequência de indivíduos "offtype" aumentou com o uso de células em suspensão com idade superior a seis meses. Entretanto, com exceção das plantas anãs, todas as plantas "offtype" puderam ser eliminadas ainda na fase de viveiro, apenas tomando como base os aspectos fenotípicos (ETIENNE et al., 2002). Portanto, há elementos suficientes para afirmar que a multiplicação clonal via embriogênese somática não acarreta variações genética ou epigenéticas que comprometam a qualidade da muda produzida. Além do mais, a muda produzida via embriogênese somática apresenta características similares do ponto de vista morfológico ao embrião zigótico, apresentando um sistema radicular pivotante bem desenvolvido, o que deverá permitir um enraizamento normal e um bom desenvolvimento da planta no campo.

6. Conclusões

- A taxa de formação de calos primários, próxima de 100%, foi observada após três a quatro semanas para todos os genótipos avaliados;
- A quantidade de calos primários variou de explante para explante;
- Setores embriogênicos ocorreram sempre sobre os calos primários e só foram observados após três meses e meio a quatro meses do início do cultivo;
- Ao contrário do esperado, quanto mais vigoroso o calo primário menor era a frequência de formação de setores embriogênicos. Parece haver uma competição entre o crescimento de calos primários e a indução de formação de setores embriogênicos;
- Em experimentos com várias folhas, observou-se a formação de setores embriogênicos em algumas folhas, não em todas. Possivelmente, há um efeito do estado fisiológico da folha sobre a capacidade de formação de setores embriogênicos;
- Os setores embriogênicos foram facilmente isolados e multiplicados tanto em meio gelificado quanto em meio líquido;
- Os setores embriogênicos novos apresentavam coloração amarela intensa, textura granular e friável;
- A taxa de crescimento dos setores embriogênicos diminuía com a idade, o que coincidia com a mudança de coloração de amarelo intenso para amarelo acinzentado;
- Os calos embriogênicos foram cultivados em meio líquido por até três meses sem maiores problemas;
- A capacidade regenerativa do calo embriogênico não reduziu com a idade. Em alguns experimentos, observou-se uma certa correlação positiva entre o envelhecimento dos calos embriogênicos e sua capacidade de regeneração;
- Algumas linhagens consideradas embriogênicas, tomando como base o seu aspecto visual, não regeneraram embriões quando transferidas para meio de regeneração;
- Para vários experimentos conduzidos, a taxa de regeneração foi próxima de 20.000 embriões por grama de células inoculadas (dados não apresentados);

- Visualmente, não foi detectada nenhuma variação que sugerisse a presença de mudas fora do padrão fenotípico de cada variedade. Entretanto, ensaios serão conduzidos em condições de campo para avaliar o comportamento fenotípico das mudas obtidas por embriogênese somática;
- A metodologia como se encontra atualmente já pode ser utilizada para multiplicação em escala piloto de alguns clones promissores, para avaliação do seu comportamento no campo.

7. Agradecimentos

Agradecemos ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café pelo financeiro parcial do presente trabalho.

8. Referência Bibliográfica

ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; QUIROS, O.; LASHERMES, P.; BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic diversity of wild coffee (*C. arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 118, p. 53-65, 2001.

BERTRAND, B.; AGUILAR, G.; SANTACREO, R.; ANTHONY, F.; ETIENNE, H. Comportement d'hybrides F1 de *Coffea arabica* pour la production et la fertilité en Amérique Centrale. In: COLLOQUIUM OF INTERNATIONAL COFFEE SCIENCE ASSOCIATION, 17., 1975, Nairobi, Kenya. **Proceedings...** Vevey, Switzerland: ASIC, 1997. p. 415-423.

BERTRAND, B.; AGUILAR, G.; SANTACREO, R.; ANZUETO, F. El mejoramiento genético en America Central. In: BERTRAND, B.; RAPIDEL, B. (Ed). **Desafios de la caficultura centroamericana**. San José, Costa Rica: IICA, 1999. p. 407-456.

BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 44, p. 7-17, 1996.

CHARRIER, A. Etude de la structure et de la variabilité génétique des caféiers. **Bulletin IFCC**, v. 14, p. 100, 1978.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M. N.; WILSON, K. C. (Ed.). *Coffee, botany, biochemistry and production of beans and beverage*. London: Croom Helm, 1985. p. 13-47.

DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 19, p. 507-509, 1984.

DUCOS, J. P.; GIANFORCANO, M.; FLORIN, B.; PÉTIARD, V.; DESHAYES, A. A technically and economically attractive way to propagate elite *Coffea canephora* (Robusta) clones: *in vitro* somatic embryogenesis. In: COLLOQUIUM OF INTERNATIONAL COFFEE SCIENCE ASSOCIATION, 18., Helsinki, Finland. **Proceedings...** Vevey, Switzerland: ASIC, 2000. p. 295-301.

ETIENNE, H.; ANTHONY, F.; DUSSERT, S.; FERNANDEZ, D.; LASHERMES, P.; BERTRAND, B. Biotechnological application for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). **In Vitro Cellular And Development Biology . Plant**, Columbia, v. 38, p. 129-138, 2002.

ETIENNE, H.; BERTRAND, B. Trueness-to-type and agronomic characteristics of *Coffea arabica* Trees micropropagated by the embryogenic cell suspension technique. **Tree Physiology**, Victoria, Canada, v. 21, p. 1031-1038, 2001.

GALLAIS, A. **Théorie de la sélection en amélioration des plantes**. Paris: Masson, 1990. 588 p.

HERMAN, E. B.; HAAS, G. J. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. (1975) from callus culture. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 10, n. 6, p. 588-589.

MENDES, J. E. T. Ensaio de variedades de cafeeiros. **Boletim Tecnico / Instituto Agronomico De Campinas**, Campinas, SP, v. 65, 35 p., 1939.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, DK, v. 15, p. 473-497, 1962.

NORIEGA, C.; SÖNDAHL, M. R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. BIOTECHNOLOGIE ASIC COLLOQUE, 15., 1993, Montpellier. **[Anais...]**. [S.l: s.n.], [1993]. p. 73-80.

QUIROZ-FIGUEROA, E. R.; FUENTES-CERDAS, C. F. J.; ROJAS-HERRERA, R.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Histological studies on the development stages and differentiation of two different somatic embryogenesis system of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, p. 1114-1149, 2002.

SONDAHL, M. R.; SHARP, W. R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 81, p. 395-408, 1977.

SONDAHL, M. R.; SALISBURY, J. L.; SHARP, W. R. SEM characterisation of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic

embryogenesis in coffee callus cells. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 94, p. 185-188, 1979.

STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v. 18, p. 509-514, 1970.

TEISSON, C.; ALVARD, D.; BERTHOULY, M.; COTE, F.; ESCALANTE, J. V.; ETIENNE, H. Culture *in vitro* par immersion temporaire: un nouveau récipient. **Plantations, Recherche, Développement**, Paris, v. 2, n.5, p. 29-31, 1995;

WALYARO, D. J. **Consideration in breeding for improved yield and quality in arabica coffee (*Coffea arabica* L.)**. 1983. 119 p. Tese (Doutorado) - Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

Apêndice

Resumo do Protocolo

1. Planta Matriz

A planta deve ser cultivada em vaso com, no mínimo, 10 litros de solo, mantida em casa de vegetação, sob sombreamento de 40-50%, temperatura mínima em torno de 20 e máxima em torno de 30 °C, umidade relativa entre 50 e 80%. Irrigação, pela base da planta 3 a 4 vezes por semana, de acordo com a necessidade, tomando o cuidado de não molhar as folhas. Proceder ao controle adequado de pragas e doenças e uma vez ao mês, as mudas devem receber adubação de acordo com as exigências da cultura.

OBS: Folhas de plantas matrizes do campo são altamente infestadas por fungos e bactérias e são de difícil desinfestação. Desta forma, estacas de brotos ortotrópicos devem ser coletadas e enraizadas em leito de areia, em ambiente de alta umidade, em telado ou casa de vegetação. Após o enraizamento as mudas devem ser transferidas para vasos de, pelo menos, 10 litros de solo e mantida em casa de vegetação ou telado com cobertura plástica, para uso posterior.

OBS: Em caso de uso de folhas de plantas do campo, os segmentos (6 por placa) devem ser inoculados de forma espalhada na placa de modo a evitar a contaminação cruzada durante o período inicial de cultivo, também chamado de período de incubação. Neste período, que dura de alguns dias até uma semana, os segmentos não contaminados com fungos são transferidos para nova placa. A contaminação nesta fase é basicamente de fungos.

2. Folha

Devem ser utilizadas folhas correspondentes ao terceiro par (da ponta do ramo lateral ou plagiotrópico para a base), bem desenvolvidas, sem sinal de deficiência mineral e livres de doenças e pragas.

3. Coleta da folha e pré tratamento

As folhas devem ser coletadas no início da manhã, colocadas em bandeja de plástico, alumínio ou saco plástico de PVC e levadas para o laboratório, onde permanecerão exposta ao ar por 30 minutos, com a face abaxial voltada para cima. Este pré tratamento tem como objetivo induzir o fechamento estomático.

4. Pré limpeza

As folhas não devem passar por nenhum tratamento de pré limpeza tais como lavagem com água de torneira, limpeza com algodão molhado em detergente, água ou qualquer outra substância. Caso haja deposição de muita poeira ou qualquer outro tipo de sujeira na superfície adaxial, pode-se fazer uma escovação suave, a seco, da superfície com um pincel de pelos finos.

OBS-1: A lavagem da folha com água de torneira pode aumentar a taxa de contaminação, principalmente com bactérias.

5. Desinfestação em capela de fluxo laminar de ar estéril

As folhas são imersas em álcool a 70% (vol/vol) por um período de 2 a 3 minutos. Em seguida, o álcool é substituído por uma solução de hipoclorito de sódio a 2,4% de cloro ativo (vol/vol) por um período de 10 minutos. Ao final deste período, a solução de hipoclorito é descartada e substituída por água destilada estéril. São conduzidas 3 lavagens com água destilada estéril, por um período mínimo de 5 minutos por lavagem. Em seguida, a água é drenada e o frasco de Becker tampado com uma placa de Petri estéril até o momento do uso.

OBS-1.: Usa-se copo de Becker de 1000 mL autoclavado, com, no máximo, 900 mL da solução de desinfestação. Se o tamanho das folhas for menor, pode-se usar copos de 400 mL.

OBS-2: Folhas muito grandes podem ser cortadas transversalmente antes da desinfestação, de modo a ter duas porções: uma basal e outra apical.

OBS-3: Durante o procedimento, a solução deve ser agitada freqüentemente com pinça de ponta grossa e cabo longo ou bastão de vidro estéril.

OBS-4: Utilizar hipoclorito de sódio comercial que é comercializado em galões na concentração de 12%. Não utilizar água sanitária, pois este produto contém alta concentração de hidróxido de sódio, o qual é danoso ao tecido da folha.

6. Corte da folha e inoculação

Para a segmentação da folha, cada metade é colocada em placas de Petri, contendo papel filtro estéril. O corte é feito com bisturi número 10 (lâmina de corte curva) na face abaxial da folha (corte mais fácil e nervuras salientes). Pela face abaxial, os setores afetados pela solução de desinfestação podem ser identificados mais facilmente e devem ser eliminados. Os segmentos de 0,8 a 1,0 cm de lado são inoculados com a face adaxial em contato com o meio de cultura. Com a pinça, faz-se uma leve pressão do explante de modo a permitir uma boa aderência do mesmo ao meio de cultura.

OBS-1: Devem ser utilizadas três pinças e três bisturis, os quais serão usados alternadamente de modo a evitar o uso de ferramenta com temperatura acima de 40 ° C.

OBS-2: O corte deve ser feito riscando a folha e não comprimindo a folha com a lâmina do bisturi. Isto permite um corte com menos dano às células dos bordos dos explantes, onde irão se formar os calos primários.

OBS-3: A face abaxial apresenta uma coloração verde mais escura do que a adaxial.

7. Fase de inoculação dos segmentos de folha

Os explantes são inicialmente inoculados no meio primário (PM) como descrito nas Tabela 2 e 5. Os explantes são mantidos neste meio por 30 dias.

Tabela 5. Meio de cultura primário para inoculação dos segmentos de folha

Meio de cultura primário - PM			
Solução Estoque	Estoque	Concentração	Volume por 1000 mL de meio
Macro - MS ^(*)	Frasco 1	50x	10 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O - MS	Frasco 2	50x	10 mL
Ferro-EDTA - MS	Frasco 3	100x	5 mL
Micro - MS	Frasco 4	100x	5 mL
Vitaminas	Frasco 5	100x	10 mL
Caseína	-	-	100 mg
Extrato de Malte	-	-	400 mg
2,4-D	2,21 mg/mL	-	2 mL
2-iP	1 mg/mL	-	2 mL
IBA	1 mg/mL	-	1 mL
Sacarose	-	-	20 g
Fitigel	-	-	2,4 g
pH	-	-	5,7-5,8

^(*) MS: Meio básico de Murashige & Skoog(1962)

OBS-1: O meio é autoclavado por 20 minutos e transferido para placas de Petri plásticas ou de vidro logo em seguida. Agitar bem o meio de cultura antes de transferir para as placas.

OBS-2: Vide preparo das soluções estoques na Tabela 11.

OBS-3: O 2,4-D e o IBA é dissolvido com KOH ou NaOH a 1M, enquanto que 2-iP é dissolvido com HCl 1M.

OBS-4: O 2-iP é esterilizado por filtração em filtros tipo Millipore, tamanho do poro de 0,22 micra de diâmetro e adicionado ao meio após a autoclavagem. Os outros reguladores de crescimento são autoclavados juntos com o meio de cultura.

8. Fase de repicagem dos segmentos de folha

Após 30 dias de cultivo no meio primário (PM), os explantes são repicados para o meio secundário (SM) (Tabela 2 e 6), permanecendo aí por até 3, 4 ou, no máximo, 5 meses. Neste período, não há renovação do meio.

Tabela 6. Meios de cultura secundário para repicagem dos segmentos de folha, aos 30 dias de cultivo

Meio de cultura secundário - SM			
Solução Estoque	Estoque	Concentração	Volume por 1000 mL de meio
Macro - MS	Frasco 1	50x	10 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O - MS	Frasco 2	50x	10 mL
Ferro-EDTA - MS	Frasco 3	100x	5 mL
Micro - MS	Frasco 4	100x	5 mL
Vitaminas	Frasco 5	100x	10 mL
Caseína	-	-	100 mg
Extrato de Malte	-	-	400 mg
2,4-D	2,21 mg/mL	-	1 mL
2-iP	1 mg/mL	-	2 mL
IBA	1 mg/mL	-	1 mL
Sacarose	-	-	20 g
Fitigel	-	-	2,4 g
Ph	-	-	5,7-5,8

Após 90 dias de cultivo, sendo um mês no meio primário (PM) e dois meses no meio secundário (SM), é feita a avaliação da formação de calos primários, por notas de 0 a 4, sendo 0 (ausência), 1 (pouca formação de calos), 2 (boa formação de calos), 3 (ótima formação de calos) e 4 (excessiva formação de calos). Após a repicagem aos 30 dias, ocorre oxidação lenta do explante original, bem como dos calos primários, com paralisação do seu crescimento. Alguns explantes, entretanto, apresentam calos primários crescendo vigorosamente, dando origem aos calos tipo 4, os quais são

indesejáveis, já que se observou uma correlação inversa entre o crescimento excessivo desse tipo de calos e formação de setores embriogênicos.

OBS:-1: A formação de calo primário pode ser avaliada com 60 ou mesmo com 30 dias de cultivo.

9. Fase de multiplicação dos setores embriogênicos

Os setores embriogênicos são subcultivados em meio de cultura para multiplicação (MM)(Tabela 2 e 7), gelificado ou líquido, por um período máximo de seis meses, sendo mais recomendado o cultivo por três meses, para evitar o envelhecimento excessivo das linhagens embriogênicas e também o aparecimento de variantes somaclonais.

Tabela 7. Meio de cultura para multiplicação dos setores embriogênicos

Meio de multiplicação - MM			
Solução Estoque	Estoque	Concentração	Volume por 1000 mL de meio
Macro - MS	Frasco 1	50x	10 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O - MS	Frasco 2	50x	10 mL
Ferro-EDTA - MS	Frasco 3	100x	5 mL
Micro - MS	Frasco 4	100x	5 mL
Vitaminas	Frasco 5	100x	10 mL
Cisteína	-	-	10 mg
Caseína	-	-	100 mg
Extrato de Malte	-	-	200 mg
Ácido Cítrico	-	-	250 mg
2,4-D	2,21 mg/mL	-	0,5 mL
2-iP	1 mg/mL	-	2 mL
IBA	1 mg/mL	-	1 mL
Sacarose	-	-	20 g
Fitigel	-	-	2,4 g ou 0,0
pH	-	-	5,7-5,8

Após 3 meses e meio a contar do início do cultivo, os primeiros sinais de formação de setores embriogênicos já podem ser visualizados com a ajuda de microscópio estereoscópico. Estes setores se formam em um ou mais pontos dos calos primários. Inicialmente, medem menos que 1 mm de diâmetro e distinguem-se dos calos primários por apresentar uma coloração amarela intensa e textura friável. Os setores apresentam uma alta taxa de crescimento e aos 120-130 dias podem ser vistos a olho nu e medem de 2 a 4 mm de diâmetro. Nesta fase, podem ser isolados e

transferidos para meio líquido para fins de multiplicação. Os setores embriogênicos continuam crescendo por até 180 a 200 dias, sem haver a necessidade de renovação do meio de cultura. À medida que vão envelhecendo há mudança de coloração de amarelo claro para amarelo acinzentado, resultado de acúmulo de substâncias polifenólicas oxidadas.

Os setores embriogênicos podem ser mantidos em meio líquido para fins de multiplicação por até seis meses. Nos primeiros meses, a massa celular dobra de peso a cada 8 a 12 dias. Com o envelhecimento da cultura, o período de dobramento vai aumentando podendo ultrapassar 30 dias. No início, as células apresentam coloração amarela clara e, após alguns meses de cultivo, há mudança da coloração para amarelo acinzentado ou mesmo castanho, denotando acúmulo progressivo de substâncias fenólicas oxidadas, as quais permanecem ligadas às células, já que não se observa escurecimento substancial do meio de cultura. Um dos fatores mais importantes para manutenção do crescimento é a densidade de células, que deve ser de 8 a 12 g/L. Assim, com o crescimento, há um aumento substancial da densidade de células, a qual deve ser reajustada após cada mês de cultivo.

OBS-1: A troca do meio de cultura na fase de multiplicação em meio líquido é feita a cada 15 dias e o reajuste da densidade a cada 30 dias.

10. Fase de regeneração de embriões

A regeneração é conduzida no meio RM (Tabela 2 e 8), gelificado ou líquido, por um período máximo de dois meses, com renovação do meio ao final do primeiro mês de cultivo.

Tabela 8. Meio de cultura de regeneração

Meio de regeneração - RM			
Solução Estoque	Estoque	Concentração	Volume por 1000 mL de meio
Macro - MS	Frasco 1	50x	10 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O - MS	Frasco 2	50x	10 mL
Ferro-EDTA - MS	Frasco 3	100x	5 mL
Micro - MS	Frasco 4	100x	5 mL
Vitaminas	Frasco 5	100x	10 mL
Caseína	-	-	100 mg
Extrato de Malte	-	-	400 mg
BAP	1 mg/mL	-	2 mL
ANA	0,5 mg/mL	-	0,5 mL
Sacarose	-	-	30 g
Fitagel	-	-	2,4 g ou 0,0
pH	-	-	5,7-5,8

A regeneração de embriões pode ser conduzida tanto em meio gelificado quanto em meio líquido. A regeneração em meio líquido é mais eficiente e resulta em embriões mais uniformes. Entretanto, a regeneração em meio gelificado deve ser utilizada para avaliar a capacidade regenerativa de diferentes linhagens celulares, uma vez que é mais fácil de ser conduzida, tem menos problemas de contaminação e pode ser levada a cabo em grande número por vez.

A regeneração em meio líquido é influenciada pela densidade de células, que deve estar em torno de 1 g/L. Concentrações maiores inibem a formação dos embriões e favorecem a multiplicação celular. Após 40 a 60 dias, pode ser feita a avaliação da regeneração. Normalmente, é retirada uma amostra, a qual é pesada e os embriões presentes contados. Em geral, os embriões apresentam tamanhos aproximados. Caso isto não ocorra, faz-se a separação da amostra em dois ou três tamanhos de embriões: globular, coração e torpedo. Os embriões não apresentam cotilédones desenvolvidos nesta fase.

11. Fase de maturação e germinação dos embriões

A maturação e germinação dos embriões é conduzida num mesmo meio (MGM)(Tabela 2 e 9), havendo necessidade apenas de ajustar a quantidade de embriões por volume de meio ao final de cada fase, i.é., a densidade de embriões.

Tabela 9. Meio de cultura para maturação e germinação

Meio de maturação e germinação - MGM			
Solução Estoque	Estoque	Concentração	Volume por 1000 mL de meio
Macro - MS	Frasco 1	50x	10 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O - MS	Frasco 2	50x	10 mL
Ferro-EDTA - MS	Frasco 3	100x	5 mL
Micro - MS	Frasco 4	100x	5 mL
Vitaminas	Frasco 5	100x	10 mL
BAB	1 mg/mL	-	0,25 mL
AIA	1 mg/mL	-	0,45 mL
Sacarose	-	-	20 g
Fitagel	-	-	2,4 g ou 0,0
pH	-	-	5,7-5,8

Durante a fase de maturação, há crescimento do embrião e formação dos cotilédones, os quais são brancos aclorofilados e medem de 1 a 3 mm de comprimento. Para a maturação, a quantidade de embriões inoculada é extremamente importante e deve ser da ordem de 10 g/L. Para maturação, utiliza-se o mesmo meio de germinação. Com o desenvolvimento, há aumento de 10 ou mais vezes na massa dos embriões.

Este aumento da quantidade de matéria fresca parece ser o fator fundamental para inibir a germinação dos embriões, o que não deve ocorrer nesta fase.

Para proceder à germinação, os embriões são cultivados no mesmo meio de maturação só que com a densidade de embriões maduros reduzida para 10 g/L. Após 30 a 45 dias, as plântulas já podem ser transferidas para meio gelificado em magenta para crescimento.

OBS-1: Não é necessário fazer o reajuste da densidade de embriões nesta fase.

12. Fase de crescimento e enraizamento das plântulas

Após completar a fase de germinação, as plântulas são transferidas para meio de crescimento (PRM)(Tabela 2 e 10).

Tabela 10. Meio de cultura para crescimento e enraizamento das plântulas

Meio de crescimento - PRM			
Solução Estoque	Estoque	Concentração	Volume por 1000 mL de meio
Macro DKW/5	Frasco 1-A	50x	20 mL
Cálcio	Frasco 2-A	50x	20 mL
Ferro-EDTA - MS	Frasco 3	100x	2,5 mL
Micro - DKW/5	Frasco 4-A	100x	10 mL
Vitaminas ⁽¹⁾	Frasco 5	100x	10 mL
BAP	-	1 mg/mL	0,3 mL
Sacarose	-	-	5 g
Glucose	-	-	10 g
Fitagel	-	-	2,4 g
pH	-	-	5,7-5,8

OBS-1: Vitaminas do meio C (BOXTEL e BERTHOULY, 1996), frasco 5 (Tabela 11)

As plântulas são cultivadas em meio gelificado para crescimento e enraizamento. Dos meios testados, o que apresentou melhor resultado foi o DKW reduzido a 1/5 da concentração original.

Após aproximadamente dois meses de cultivo *in vitro*, as plântulas estão prontas para transferência para casa de vegetação ou telado para fins de aclimação. Vários substratos podem ser utilizados nesta fase. PlantMax® foi utilizado com excelentes resultados, em termos de pega e crescimento das mudas. A avaliação das plantas aclimatadas é conduzida tomando como base a percentagem de pega, número de folhas e altura das plantas após um, dois, três e quatro meses de cultivo.

Tabela 11. Soluções estoques do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), vitaminas do meio C (BOXTEL e BERTHOULY, 1996) e DKW/5 (DRIVER e KUNIYUKI, 1984).

Componentes	Meio de MS (mg)	Concentração do estoque	Preparo de 1000 mL	Número do Estoque	Meio DKW/5(mg)	Preparo de 1000 mL	Número do Estoque
KNO ₃	1900,0	50 x	95,0 g	Frasco 1	200,0	10,0 g	Frasco 1-A
NH ₄ NO ₃	1650,0	50 x	82,5 g	Frasco 1	283,2	14,16 g	Frasco 1-A
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,0	50 x	22,0 g	Frasco 2	22,5	1,125 g	Frasco 2-A
Ca(NO ₃) ₂	-	-	-	-	273,4	13,67 g	Frasco 2-A
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0	50 x	18,5 g	Frasco 1	72,3	3,615 g	Frasco 1-A
KH ₂ PO ₄	170,0	50 x	8,5 g	Frasco 1	53,0	2,65 g	Frasco 1-A
K ₂ SO ₄	-	-	-	-	311,8	15,59 g	Frasco 1-A
Na ₂ EDTA ⁽¹⁾	37,3	100 x	3,73 g	Frasco 3	9,33	MS/4	Frasco 3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	100 x	2,78 g	Frasco 3	6,95	MS/4	Frasco 3
MnSO ₄ .H ₂ O	22,4	100 x	2,24 g	Frasco 4	6,7	670,0 mg	Frasco 4-A
ZnSO ₄ .6H ₂ O	8,6	100 x	860 mg	Frasco 4	3,4	340,0 mg	Frasco 4-A
H ₃ BO ₃	6,2	100 x	620 mg	Frasco 4	0,96	96 mg	Frasco 4-A
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	100 x	25 mg	Frasco 4	0,078	7,8 mg	Frasco 4-A
CuSO ₄ .5H ₂ O ⁽²⁾	0,025	100 x	2,5 mg	Frasco 4	0,05	5 mg	Frasco 4-A
CoCl ₂ .6H ₂ O ⁽³⁾	0,025	100 x	2,5 mg	Frasco 4	-	-	-
KI	0,83	100 x	83 mg	Frasco 4	-	-	-
NiSO ₄ .5H ₂ O ⁽⁴⁾	-	-	-	-	0,001	0,1 mg	Frasco 4-A
Tiamina	10	100 x	1000 mg	Frasco 5	-	-	-
Piridoxina	1	100 x	100 mg	Frasco 5	-	-	-
Ácido Nicotínico	1	100 x	100 mg	Frasco 5	-	-	-
Glicina	1	100 x	100 mg	Frasco 5	-	-	-
Mio-inositol	100	100 x	10,0 g	Frasco 5	-	-	-

- (1) O preparo do FeEDTA é feita dissolvendo 2,78 g de FeSO₄.7H₂O em 100 mL de água deionizada, a qual é vertida sobre uma solução de 3,73 g de Na₂EDTA, também em 100 mL de água deionizada. Após a mistura, o volume é completado para 1000 mL.
- (2) O preparo do CuSO₄.5H₂O do meio MS é feita a partir da adição de 1 mL de um sub-estoque, no qual foram dissolvidas 125 mg de CuSO₄.5H₂O para um volume final de 50 mL de água deionizada;
- (3) O preparo do CoCl₂.6H₂O do meio MS é feita a partir da adição de 1 mL de um sub-estoque, no qual foram dissolvidas 125 mg de CoCl₂.6H₂O para um volume final de 50 mL de água deionizada;
- (4) O preparo do NiSO₄.5H₂O do meio DKW/5 é feita a partir da adição de 1 mL de um sub-estoque, no qual foram dissolvidas 5 mg de NiSO₄.5H₂O para um volume final de 50 mL de água deionizada;