

# INDUÇÃO E ANÁLISE BIOQUÍMICA DE CALOS EM SEGMENTOS FOLIARES E NODAIS DE *Coffea canephora* L. cv. APOATÃ

Cíntia Guimarães dos Santos<sup>1</sup>; Renato Paiva<sup>1</sup>; Patrícia Duarte de Oliveira Paiva<sup>2</sup>; Edilson Paiva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Depto. de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA). C. P. 37. CEP: 37.200-000, Lavras-MG. e-mail: santoscg@ufla.br, renpaiva@ufla.br

<sup>2</sup>Depto. de Agricultura, UFLA. e-mail: pdolivei@ufla.br

<sup>3</sup>Embrapa Milho e Sorgo. C. P. 151. CEP: 35701-970, Sete Lagoas-MG. e-mail: edilson@cnpms.embrapa.br

**RESUMO:** A cultura de calos tem mostrado grande potencial para multiplicação em larga escala de genótipos superiores e em curto espaço de tempo. O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma metodologia para induzir a formação de calos em *Coffea canephora* cv. Apoatã através do uso de 2,4-D e AIB, em explantes foliares e nodais, determinar sua curva de crescimento e analisá-los bioquimicamente, mediante determinação dos teores de proteínas totais, açúcares redutores e padrão protéico. Os explantes foram transferidos para meio MS 50 % contendo 3 % de sacarose, 0,7 % de ágar e suplementado com 2,4-D (0; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) e AIB (0; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>), em todas as combinações possíveis. Para determinar a curva de crescimento, calos foram pesados até o 84º dia de cultivo. A quantificação de proteínas totais pelo método do ácido bicinonínico e a de açúcares redutores, foi determinada. As proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida em sistema desnaturante descontínuo. A melhor calogênese foi obtida utilizando-se o 2,4-D em condições isoladas, na concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup>, para ambos os explantes. As curvas de crescimento de calos, obtidos a partir de explantes nodais e foliares, apresentaram cinco fases. Em calos originados desses explantes, o teor máximo de proteína total ocorreu aos 63 dias de cultivo e o de açúcar redutor, no dia da inoculação no meio de cultura. O padrão protéico pode ser utilizado para diferenciar as fases de crescimento de calos.

Palavras-chave: *Coffea canephora*, calogênese, curva de crescimento

## INDUCTION AND BIOCHEMICAL ANALYSIS OF CALLUS FROM LEAF AND NODAL SEGMENTS OF *Coffea canephora* L. cv. APOATÃ

**ABSTRACT:** Callus culture has shown a great potential for large-scale multiplication of superior genotypes in a short period of time. The objective of this work was to establish a methodology for inducing callus formation in leaf and nodal segments of *Coffea canephora* cv. Apoatã through the use of 2,4-D and AIB. The evaluations consisted of the determination of the growth curve of the calli and biochemical analyzes of total protein, reducing sugars and protein pattern. The explants were transferred to 50 % MS medium containing 3 % sucrose, 0.7 % agar supplemented with 2,4-D (0; 0.5; 1.0 mg L<sup>-1</sup>) and IBA (0; 0.5; 1.0 mg L<sup>-1</sup>), in all possible combinations. To determine the growth curve, the calli were weighted up to the 84<sup>th</sup> day of culture. The quantification of total protein was done with the bincinconinic acid method and the reducing sugars were also determined. Total protein content was separated by using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Maximum callus production was obtained using 2,4-D alone at the concentration of 0.5 mg L<sup>-1</sup>, for both explants. The growth curve obtained for leaf and nodal calli presented five phases. In calli originated from both explants the maximum level of total protein was observed at day 63 and the maximum of reducing sugars at the day of inoculation in the culture medium. The protein pattern can be used to distinguish the growth phases of the calli.

Key words: *Coffea canephora*, callus formation, growth curve

### INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma atividade de elevada importância no cenário do agronegócio brasileiro, sendo que a cultivar Apoatã tem atraído a atenção dos produtores devido a sua utilização na indústria de café

solúvel, atividade em expansão no Brasil. Seu surgimento, no Instituto Agronômico de Campinas (IAC), ocorreu após ciclos de seleção em progênies de *Coffea canephora* cv. Robusta, selecionadas para a resistência a nematóides e à ferrugem (Fazuoli, 1986).

O modo usual para a formação de mudas de

cafeieiro é através de sementes, colhidas de variedades e linhagens selecionadas. Como em *Coffea canephora* a fecundação é predominantemente cruzada, as sementes não reproduzem fielmente as qualidades das plantas matrizes. Deste modo, as plantações apresentam-se desuniformes quando observadas características vegetativas (porte, arquitetura, ângulo dos galhos, formato e tamanho das folhas), de produção (produtividade, tamanho, formato e maturação dos frutos etc.) e de susceptibilidade às doenças (Paulino et al., 1985).

As técnicas de cultura *in vitro* de tecidos vegetais têm sido utilizadas com sucesso na multiplicação de espécies que apresentam dificuldades na propagação sexuada, além de possibilitar a uniformidade genética do material e permitir a obtenção de um grande número de plantas em pouco tempo (Dublin, 1984). A cultura de calos proporciona a propagação em larga escala de diversas espécies vegetais. Os trabalhos pioneiros em cultura de tecidos em cafeeiro foram publicados por Staritsky (1970), que obteve êxito na indução de calos a partir de folhas de várias espécies. Após esse período, muitos trabalhos foram realizados com a adoção de métodos e espécies diversas (Sondahl, 1978; Mezzetti et al., 1991; Landa et al., 2000; Serra et al., 2000). No entanto, as possíveis mudanças no tecido vegetal capazes de induzir a formação de calos ainda estão em fase inicial de exploração (Paiva Neto et al., 1997).

O calo é uma massa compacta de células desorganizadas e parcialmente indiferenciadas que variam quanto ao tipo, ao tamanho, ao conteúdo celular e à espessura da parede (Narayanaswamy, 1977). Os principais fatores que influenciam sua formação são o tipo de explante, a composição do meio nutritivo e as condições físicas de incubação, como luz e temperatura (Pinto e Lameira, 2001).

O índice de divisão celular dos calos pode elucidar as mudanças fisiológicas das células e auxiliar a otimização dos protocolos de regeneração e transformação genética. Segundo Fogliatto et al. (2001), a eficiência da introdução de genes é aumentada durante a fase de divisão celular.

De acordo com Soares (2003), a importância de se estabelecer a curva de crescimento de calos de determinada espécie está na identificação das fases em que ocorrem processos fundamentais ao estudo cinético do seu crescimento. Com isso, pode-se estabelecer o momento exato da repicagem para um novo meio.

As etapas que compõem o crescimento do calo são: 1) fase lag: caracterizada pelo número estacionário de células, início da imobilização de metabólitos, sem qualquer divisão celular, síntese de proteínas e síntese de metabólitos específicos; 2) fase exponencial: a divisão celular é máxima, o número de células aumenta, formando agregados compostos por mais de dez células; 3) fase linear: ocorre a redução na

taxa de divisão celular; 4) fase de desaceleração progressiva: a divisão celular diminui e ocorre a expansão da célula e 5) fase estacionária: não ocorre divisão celular, não há síntese de biomassa ou aumento do número de células. As determinações quantitativas e qualitativas de macro e micromoléculas que constituem os tecidos vegetais podem auxiliar nos processos de estabelecimento *in vitro* e conseqüentemente, propiciarem a otimização das condições de cultivo de espécies com dificuldade de propagação natural, bem como permitirem a determinação da melhor fase de crescimento ou desenvolvimento celular, que propicie uma maior produção de compostos celulares específicos (Serra, 2000).

A aplicação da eletroforese na diferenciação de proteínas em tecidos vegetais tem sido ampliada para estudos de fisiologia e genética de plantas, por ser uma técnica relativamente simples, rápida e de alto valor informativo (Alfenas et al., 1981).

O presente trabalho teve por objetivo induzir calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. 'Apoatã', determinar sua curva de crescimento e analisar bioquimicamente, mediante teores de proteínas totais, açúcares redutores e padrão protéico, as diferentes fases de desenvolvimento do calo, visando facilitar seu estabelecimento *in vitro* e posterior desenvolvimento em embriões ou formação de órgãos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Efeito do AIB e do 2,4-D na calogênese

Os explantes, constituídos por segmentos foliares e nodais, de aproximadamente 0,25 cm<sup>2</sup>, foram retirados de plântulas originadas da germinação *in vitro* de embriões zigóticos e inoculados em meio de cultura MS 50 % (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 3 % de sacarose, 0,7 % de ágar e com diferentes concentrações de 2,4-D (0; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) e AIB (0; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) em todas as combinações possíveis. O pH foi ajustado para 5,6, após a autoclavagem à 121 °C por 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos no escuro, em sala de crescimento, à 25±1 °C por um período de 45 dias, quando foi avaliada a área dos explantes coberta com calos. Foram atribuídas notas de 0, 1, 2, 3 e 4 para os explantes que apresentavam, respectivamente 0, 25, 50, 75 e 100 % da área coberta com calos. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo cada repetição composta por três tubos. Para a análise estatística foi utilizado contraste de médias.

### Curva de crescimento de calos

Para a obtenção da curva de crescimento de calos, segmentos foliares e nodais foram inoculados

em meio MS 50 % suplementado com 3 % de sacarose e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, com pH ajustado para 5,6. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, na ausência de luz, sob temperatura controlada de 25 ± 1°C. As avaliações do desenvolvimento dos calos foram feitas a partir do dia da inoculação (tempo 0) até o 84º dia de cultivo, com intervalos de coleta de sete dias. Em cada coleta, os calos foram cuidadosamente limpos com papel absorvente e pesados em balança de precisão.

O percentual de crescimento dos calos foi determinado, segundo Lameira (1997), através da equação:

$$\% \text{ crescimento} = \frac{P_f - P_i}{P_f} \times 100$$

onde:  $P_i$  = peso inicial e  $P_f$  = peso final de calos

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, cada uma composta por cinco tubos.

### Análise bioquímica

Nas análises bioquímicas, foram utilizados intervalos de 21 dias para as coletas de calos (300 mg), durante um período de 84 dias de inoculação. Os calos foram imersos em nitrogênio líquido e armazenados em freezer à temperatura de -80 °C, para, posteriormente, procederem-se às análises bioquímicas.

O extrato enzimático bruto foi obtido utilizando-se 300 mg de calos, que foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido, adicionando-se 300 mL de tampão de extração (12,5 mM Borato pH 10; 1 % SDS; 5 % -mercaptoetanol; 1 % PVPP; 1 Mm PMSF; 2 mM DTT). As amostras foram centrifugadas a 16.000 g por 20 minutos, sob refrigeração (4° C). O sobrenadante foi armazenado à 4° C.

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo Método do Ácido Bicinconínico (Smith et al., 1985). Para determinar a concentração de proteína total, 2 L do extrato protéico foram diluídos 500 vezes. Foram adicionados 2 mL do reagente de determinação de proteína (solução de ácido bicinconínico acrescido de sulfato de cobre 1:50 v/v). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 562 nm, sendo os valores expressos em g proteína g<sup>-1</sup> de embrião, utilizando-se o BSA (soroalbuminabovina) para a determinação da curva padrão.

A determinação do teor de açúcares redutores foi realizada pela metodologia descrita por Miller (1959), utilizando-se ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Alíquotas de 500 L do sobrenadante foram adicionadas em 1000 L de água destilada e 1000 L do reagente DNS. Esta mistura foi homogeneizada em agitador e colocada em água fervente (100°C), por cinco minutos, sendo, posteriormente, resfriada à temperatura ambiente. Após o resfriamento, foram realizadas as leituras, em

espectrofotômetro a 540 nm, sendo a quantificação baseada em curva padrão para glicose.

Os géis de poliacrilamida foram preparados em sistema desnaturante descontínuo (Laemmli, 1970). A separação eletroforética foi realizada em cuba vertical Biorad, em tampão de corrida (TRIS 0,5 M; pH 8,8; glicina 1,92 M; pH 8,3 e SDS 0,1 %), com voltagem de 100 volts. Foram aplicados 30 L de amostra por canaleta de gel para proteína total, num equivalente a 300 mg dos calos macerados. Nesses géis foram utilizados marcadores de elevada massa molecular, com faixas de 29 a 205 kD.

Os géis foram corados com Coomasse Brilliant Blue (Coomassie Brilliant Blue R-250, 0,15 % p/v, etanol 50 %, ácido acético 10 %) durante 12 horas, sob leve agitação e descorados em solução contendo etanol 5 % e ácido acético 10 %, para visualização das bandas. Após a descoloração, as proteínas foram visualizadas com o auxílio de um transluminador.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Efeito do AIB e do 2,4-D na calogênese

Não foi observada calogênese em explantes foliares e nodais inoculados na ausência de reguladores de crescimentos.

Comparando-se o efeito dos reguladores de crescimento adicionados isoladamente no meio de cultura, observou-se que o 2,4-D apresentou aumento da produção de calos no explante foliar e nodal, de 81% e 46 %, respectivamente, em relação ao AIB (Tabela 1). O efeito positivo do 2,4-D na produção de calos de várias espécies em explantes foliares também foi relatado por Pasqual et al. (1998). Sondahl (1978), estudando os efeitos das auxinas na proliferação de calos de explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Bourbon observou que o 2,4-D foi a auxina mais efetiva na promoção da proliferação celular. Em relação às concentrações de 2,4-D utilizadas (0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>), a indução de calos apresentou um acréscimo de 25 %, no explante foliar, quando foi utilizada a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> em comparação com a de 1,0 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 2). Utilizando-se o explante nodal, não foi observada diferença significativa entre as concentrações utilizadas. Comparando as diferentes concentrações de AIB, no explante nodal houve acréscimo de 28 % utilizando 1,0 mg L<sup>-1</sup> e no explante foliar não foi observada diferença significativa.

Utilizando AIB, independente de sua concentração, com 2,4-D na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup>, observou-se aumento de 19 % na produção de calos em explante foliar de 'Apoatã' (Tabela 2). Para os demais tratamentos não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 1 - Contraste de médias para percentagem da cobertura de calos em explantes foliares e nodais de *Coffea canephora* 'Apoatã' (EF: explante foliar e EN: explante nodal).

Contraste	EF	EN
2,4-D X AIB	-81,25 *	-45,87 *
0,5 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D X 1,0 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D	-25,00 *	-3,12 ns
0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB X 1,0 mg L <sup>-1</sup> de AIB	0,00 ns	28,12 *

\* significativo ao nível de 1 % de probabilidade pelo teste de média de contraste. ns: não significativo.

Tabela 2 - Contraste de médias para percentagem da cobertura de calos em explantes foliares e nodais de *Coffea canephora* 'Apoatã' utilizando o efeito combinado de 2,4-D e AIB (EF: explante foliar e EN: explante nodal).

Contraste	EF	EN
0,5 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D + (0,5 e 1 mg L <sup>-1</sup> ) AIB X 1,0 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D + (0,5 e 1,0 mg L <sup>-1</sup> ) AIB	18,75 *	0,00 ns
0,5 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg L <sup>-1</sup> AIB X 0,5 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L <sup>-1</sup> AIB	3,12 ns	3,12 ns
1,0 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg L <sup>-1</sup> AIB X 1,0 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D + 1,0 mg L <sup>-1</sup> AIB	-3,12 ns	9,37 ns

\* significativo ao nível de 1 % de probabilidade pelo teste de média de contraste. ns: não significativo.

### Curva de crescimento de calos

Os padrões de crescimento dos calos formados a partir de segmentos foliares e nodais do cultivar Apoatã estão apresentados na Figura 1. Observou-se um crescimento sigmoidal com cinco fases de crescimento em ambos os explantes utilizados. Santos et al. (2003), estudando a curva de crescimento de calos durante 84 dias de cultivo em explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Rubi, observaram a presença de três fases de crescimento (lag, exponencial e linear), não detectando a presença das fases de desaceleração e estacionária.

A fase lag, na qual células do explante preparam-se para divisão celular, acumulando biomassa, ocorreu até o 28º dia de inoculação (equivalente a 39 % de crescimento) no segmento foliar e até o 49º dia (equivalente a 67 % de crescimento) no segmento nodal. Landa (2000) verificou que para calos obtidos a partir de segmentos foliares de pequiheiro, a fase lag ocorre até o 7º dia após à inoculação. Mezzetti et al. (1991), avaliando o crescimento de calos obtidos a partir de segmentos foliares de *Actinidia deliciosa*, observaram um acúmulo de matéria fresca e seca até o 30º dia após a inoculação. Segundo Scragg e Allan (1993), a fase lag pode ser considerada como produtora de energia.

A fase de crescimento exponencial, considerada por Scragg e Allan (1993) como fase biossintética, período em que ocorre máxima divisão celular, ocorreu entre o 28º e o 63º dia após a inoculação dos explantes foliares e entre o 49º e o 63º dia, dos explantes nodais. O maior percentual de crescimento foi observado nessa fase, sendo de 92% para os calos obtidos a partir de segmentos foliares e de 79% para os segmentos nodais. Em segmentos foliares de pequiheiro essa fase foi observada entre o 7º e o 35º dia após a inoculação

(Landa, 2000).

O período de crescimento linear, em que os calos diminuem a divisão celular e aumentam a área celular, foi observado entre o 63º e o 70º dia de inoculação em ambos explantes, com 9 e 5 % de crescimento para segmento foliar e nodal, respectivamente. Segundo Smith (1992), o crescimento e desenvolvimento celular nesta fase são mais evidentes. Santos et al. (1997), estudando a curva de crescimento de japecanga (*Smilax japecanga*), indicaram que a fase linear dessa espécie ocorreu entre o 18º e 26º dia após a inoculação.

O intervalo de desaceleração do crescimento ocorreu entre 70º e o 77º dia de inoculação em ambos os explantes, com 7 e 4 % de crescimento dos calos provenientes de segmento foliar e nodal, respectivamente. Segundo Smith (1992), as culturas, nesse período, devem ser transferidas para um novo meio de cultura, devido à redução de nutrientes, secagem do ágar e acúmulo de substâncias tóxicas. Dessa forma, a repicagem de calos para um novo meio de cultura deve ser feita no início da fase de desaceleração, ou seja, aos 70 dias de cultivo. Landa (2000) verificou a ocorrência dessa fase, entre o 46º e o 49º dia de cultivo, em calos obtidos de segmentos foliares de pequiheiro.

O crescimento dos calos chegou à fase estacionária entre 77º e o 84º dia de inoculação de ambos os tipos de explantes, sendo observado nesse período apenas 2% de crescimento. Landa (2000) verificou a ocorrência dessa fase, entre o 46º e o 49º dia, em calos obtidos de segmentos foliares de pequiheiro. Segundo Mesquita (2003), o período de desaceleração ocorreu entre o 63º e o 77º dia após a inoculação, para calos formados a partir de segmentos foliares de lechieira.

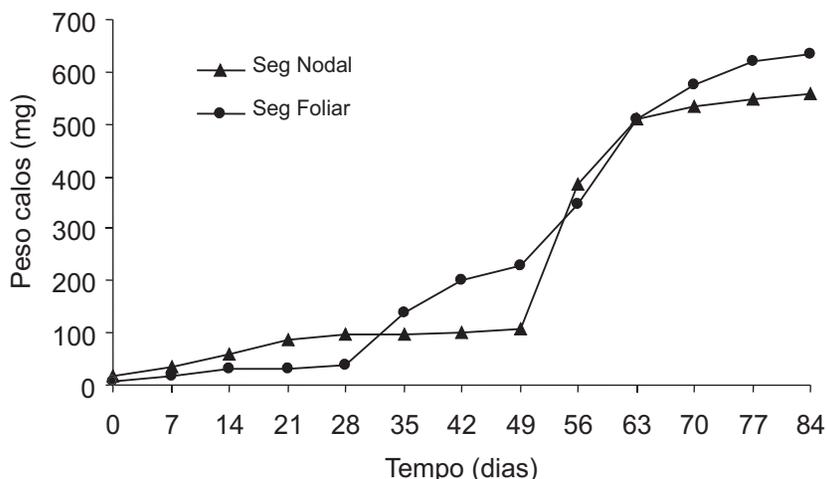


Figura 1 - Curva de crescimento de calos formados a partir de segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* 'Apoatã' inoculados em meio MS suplementado com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D, durante 84 dias de cultivo.

O padrão de crescimento foi semelhante para os explantes utilizados, variando apenas na fase lag, onde os calos provenientes de segmentos nodais apresentaram um crescimento mais lento em relação aos provenientes de segmentos foliares. A repicagem dos calos para um novo meio de cultivo deve ser feita após 70 dias.

Os teores de proteínas totais dos calos originados de explantes foliares e nodais apresentaram um acúmulo até o 63º dia de cultivo (Figura 2), sendo que os maiores teores de proteínas totais foram observados em calos originados de segmentos foliares. Esse período coincide com o término da fase exponencial e o início da linear, e o aumento no teor de proteína pode ser devido a uma absorção do íon amônio e de glicina presente no meio de cultura.

Segundo George (1996), a presença de amônio no meio de cultura resulta no aumento da síntese de aminoácidos e proteínas, os quais são produzidos utilizando-se energia liberada no catabolismo dos carboidratos. A partir do 63º dias de cultivo, iniciou-se uma redução no teor de proteínas totais. Esse aumento inicial e posterior redução no teor de proteína total também foram detectados por Sachi et al. (1995) em calos de *Actinidia deliciosa*. Serra (2000) observou um acúmulo nos teores de proteínas e aminoácidos até o 30º dia de inoculação.

O teor máximo de açúcares redutores ocorreu no dia da inoculação dos explantes, a partir do qual sofreu redução, atingindo um teor mínimo no 84º dia de cultivo (Figura 3).

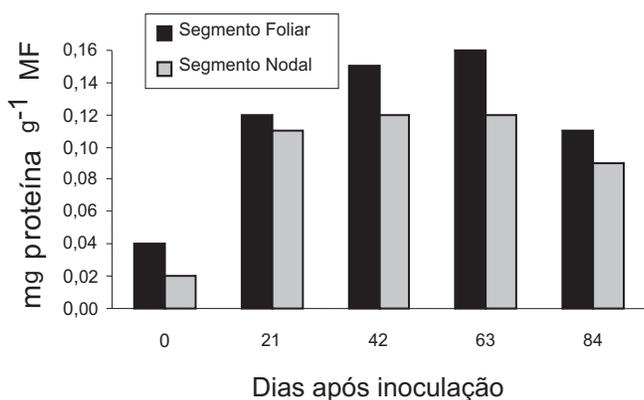


Figura 2 - Teores de proteínas totais de calos formados a partir de segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* 'Apoatã' inoculados em meio MS, suplementado com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D, durante 84 dias de cultivo.

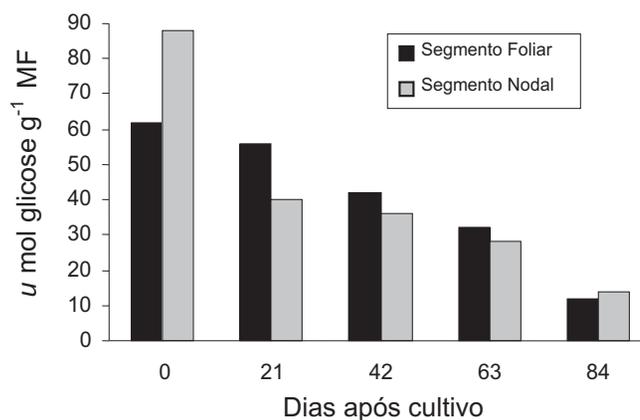


Figura 3 - Teores de açúcares redutores de calos formados a partir de segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* 'Apoatã' inoculados em meio MS, suplementado com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D durante 84 dias de cultivo.

Esses resultados coincidem com os resultados obtidos por Serra (2000), o qual demonstrou que o teor máximo de açúcares redutores de calos de castanha-do-brasil, formados a partir de segmentos foliares, foi observado no dia da inoculação dos explantes e o teor mínimo, no último dia da avaliação (84º dia). A redução dos açúcares redutores, no período compreendido entre 0 e 21 dias após a inoculação, coincide com a fase lag (até o 28º dia para calos provenientes de segmento foliar e 49º dia para segmento nodal) de crescimento dos calos, o que, possivelmente, ocorreu para produzir energia a ser utilizada na fase exponencial. Os resultados indicam uma preparação para o início da fase de crescimento exponencial, em que ocorre um aumento na divisão celular, resultando no maior percentual de crescimento. No período entre 42º e 84º dia de inoculação, os teores de açúcares redutores continuaram apresentando redução, porém, de uma forma menos acentuada, possivelmente devido ao esgotamento natural desses nos tecidos.

Na Figura 4 são apresentados os padrões protéicos da curva de crescimento de calos da cultivar Apoatã. Foi observada a presença de polipeptídeos de tamanho entre 29 a 66 kD nos explantes foliares e

nodais em todo período de crescimento dos calos.

Polipeptídeos de massa molecular de 42 kD foram observados em todas as fases de crescimento dos calos originados de explantes foliares e nodais, no entanto, aos 84 dias de cultivo, verificou-se maior intensidade dessa banda.

Aos 84 dias de cultivo de calos originados de segmentos foliares e nodais, observou-se a presença de polipeptídeos com tamanho de 36 kD. Esse período corresponde à fase estacionária na curva de crescimento de calos.

No dia da inoculação dos explantes foliares e nodais no meio de cultura e aos 42 dias, observou-se a presença de polipeptídeos de peso molecular de 31 kD com alta intensidade de banda, a partir da qual, a intensidade da banda diminuiu gradativamente.

O cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ), sob condições alcalinas, forma um complexo com ligações peptídicas, sendo reduzido a  $\text{Cu}^+$ . Esse  $\text{Cu}^+$ , bem como os resíduos de tirosina, triptofano e cisteína, reagem com o ácido bicinconínico, formando um complexo de coloração púrpura. A concentração de proteína é diretamente proporcional à leitura da absorbância em 562 nm.

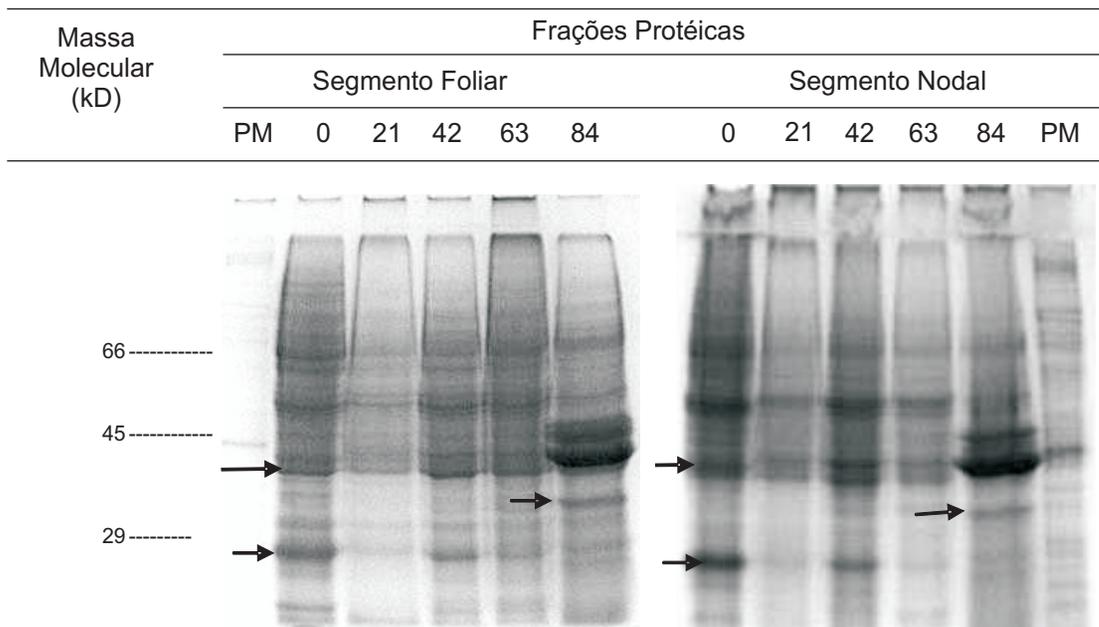


Figura 4 - Padrão protéico de calos formados a partir de segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* 'Apoatã' inoculados em meio MS, suplementado com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D durante 84 dias de cultivo.

## CONCLUSÕES

1. A presença de reguladores de crescimento no meio de cultura é essencial para a indução de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* 'Apoatã'.

2. O 2,4-D apresenta-se mais eficiente que o AIB na formação de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* 'Apoatã'.

3. A concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D é mais eficiente para a calogênese de segmentos foliares dessa cultivar.

4. A interação de 2,4-D com AIB não se apresenta significativa, exceto quando o 2,4-D encontra-se na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup>.

5. A curva de crescimento de calos originados de explantes foliares, apresenta crescimento tipo sigmóide, com cinco fases: lag (de 0 a 28 dias de inoculação), exponencial (28 a 63 dias), linear (63 a 70 dias), desaceleração (70 a 77 dias) e estacionária (77 a 84 dias).

6. Os calos, independente do tipo de explante utilizado, devem ser transferidos para um novo meio de cultura após 70 dias de cultivo para que a indução de embriogênese ou organogênese possa ser realizada.

7. O teor máximo de proteína total, em calos originados a partir de explantes foliares e nodais, pode ser obtido ao 63º dia de cultivo, coincidindo com o final do crescimento exponencial e início do crescimento linear.

8. Os teores de açúcares redutores dos calos originados de explantes foliares e nodais decrescem com o tempo de cultivo.

9. Diferenças quantitativas (intensidade das bandas) e qualitativas (presença ou ausência de bandas) no padrão protéico são observadas durante o período de desenvolvimento de calos originados de explantes foliares e nodais.

## REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1981. 242p.

DUBLIN, P. Tequiques de reproduction végétative *in vitro* et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v. 28, n.4, p. 281-290, oct./dec. 1984.

FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A.B., MALAVOLTA, E. ROCHA, M.; YAMADA, T. (Ed.) **Cultura do cafeeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1986. p. 87-106.

FOGLIATTO L. F.; DROSTE, A.; ZANETTINI, M. H. B. **Freqüência de divisões celulares em tecido embriogênico de Soja x eficiência de transformação via biolística**. Disponível em: [http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/posters/02/02pdf/02-004.PDF](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/02/02pdf/02-004.PDF). Acesso em: 05 maio 2006.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part. 2. The technology 2.ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361p.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-684, Aug. 1970.

LAMEIRA, O. A. **Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.)**. 1997. 88p (Tese – Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal da Lavras, Lavras.

LANDA, F. S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. BUENO FILHO, J. S. S. Indução *in vitro* de calos explantes foliares de pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 56-63, 2000. Edição Especial.

MESQUITA, A. C.; PAIVA, R.; SANTIAGO, E. J. A.; PAIVA, P. D. O.; GOMES, G. A. C.; SANTOS, C. G. (2003) Efeito de 2,4-D e ANA na formação de calos em explantes foliares de lechiera (*Litchi chinensis* Sonn.). **Revista Ceres**, v. 50, n.29, p. 593-601. Viçosa, MG.

MEZZETTI, B.; CONTE, L. S.; ROSATI, P. **Actinidia deliciosa in vitro**: II. Growth and exogenous carbohydrates utilization by explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 26, p. 153-160, 1991.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, p. 426-428, 1959.

- MURASHIGE, T. SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabaco tissue cultures. **Physiology Plantarum**. Copenhagen, v. 15, p. 473-479, 1962.
- NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. Cap. 10. p. 179-206
- PAIVA NETO, V.B.; PAIVA, R.; GOMES, G. A. C.; PÓVOA, J. S. R. Comportamento *in vitro* de segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**. Curitiba, v. 40, n.1, p. 135-141, mar. 1997.
- PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMANN, A.; CARVALHO, G. R. Meios de Cultura. In: **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**, Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 127p. (Especialização) Curso de Pós-Graduação "Latu Sensu" a distância.
- PAULINO, A. J.; MATIELLO, J. B.; PAULINI, A. E. **Produção de mudas de café 'Conilon' por estacas**: instruções técnicas sobre a cultura de café no Brasil. Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1985. 12 p.
- PINTO, J. E. B. P.; Lameira, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 80p.
- SACCHI, G. A.; MORGUTTI, S.; ABRUZZESE, A. Changes in some physiological and biochemical parameters during two subcultures in kiwi (*Actinidia deliciosa*) callus. **Plant Science**, Berkeley, v. 106, n. 1, p. 107-113. Mar. 1995.
- SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. (2003) Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar Rubi. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 3, p. 571-577.
- SANTOS, M. R. A.; PAIVA, R.; BENDADIS, A. K. Cultura de tecidos de *Smilax japecanga* Grisebach: indução e crescimento de calos. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 28, p. 37-43, 1997.
- SCRAGG, A. H.; ALLAN, E. J. *Picrasma quassioides* Bennet (Japanese quassia tree): *in vitro* culture and production of quassin. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants IV**. Berlin: Springer-Verlag, , 1993. v. 21, p. 249-268
- SERRA, A. G. P.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 40, p. 833-840, 2000.
- SMITH, R.M. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic Press, 1992. 171p.
- SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C.; Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85. 1985.
- SOARES, G. de A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [Inga Vera Willd. subsp. *affinis* (DC) T. D. Penn]**. 2003. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SONDAHL, M. R. Interações de citoquininas e auxinas no crescimento e embriogênese de explantes foliares de *Coffea* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, **Resumos...**, Ribeirão Preto, 1978. p. 67
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus culture tissue of *Coffea*. **Acta Botanica Neerlandica**, Netherlands, v. 19, n. 4, p. 509-514, 1970.

Recebido: 20/11/2006

Aceito:14/06/2007