



MAÍSA DE SIQUEIRA PINTO

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA E
CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE *Coffea*
arabica L. cv. CATUAÍ VERMELHO**

LAVRAS – MG

2012

MAÍSA DE SIQUEIRA PINTO

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA E CRIOPRESERVAÇÃO DE
EMBRIÕES DE *Coffea arabica* L. cv. CATUAÍ VERMELHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em
Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em
Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre

Orientador

Renato Paiva PhD

Coorientadores

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva

Dra. Fernanda Carlota Nery

Dra. Raírrys Cravo Herrera

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Pinto, Máisa de Siqueira.

Embriogênese somática direta e criopreservação de embriões de
Coffea arabica L. cv. Catuí Vermelho / Máisa de Siqueira Pinto. –
Lavras : UFLA, 2012.

113 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Renato Paiva.

Bibliografia.

1. Cafeeiro. 2. Micropropagação. 3. Conservação *ex situ*. 4.
Embrião zigótico. 5. Embrião somático. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 583.520433

MAÍSA DE SIQUEIRA PINTO

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA E CRIOPRESERVAÇÃO DE
EMBRIÕES DE *Coffea arabica* L. cv. CATUAÍ VERMELHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em
Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em
Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre

APROVADA em 06 de fevereiro de 2012.

Dr. Marcelo Murad Magalhães EMBRAPA Amazônia Oriental

Dra. Fernanda Carlota Nery UFSJ (Coorientadora)

Renato Paiva PhD

Orientador

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva

Dr. Raírys Cravo Herrera

Coorientadores

LAVRAS – MG

2012

A Deus,

pela presença constante em meu dia a dia e pela luz nos momentos difíceis

DEDICO

Aos meus pais Guilherme e Márcia pelo amor e dedicação em todos os
momentos.

OFEREÇO

A minha família, pelos momentos de alegria tornando mais fácil a realização
deste trabalho.

Ao Fernando pela paciência, presença e carinho em todos os momentos.

Ao meu orientador Renato Paiva pela confiança e oportunidades oferecidas.

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal pela oportunidade concedida e estrutura física oferecida para a realização deste trabalho.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do café (INCT – Café) pelo fomento ao desenvolvimento deste trabalho.

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

Ao Professor Renato Paiva pela orientação, confiança e ensinamentos.

Aos professores do Setor de Fisiologia Vegetal pela formação profissional durante os anos de mestrado.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

À amiga Mariana pela amizade e colaboração no desenvolvimento dos experimentos.

À equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal pela amizade, ajuda, incentivo e companheirismo. Meus agradecimentos sinceros à Tininha, Padô, Luciano, Michele, Nádia, Paulo, Fernanda, Ana Luiza, Rodrigo e Lucas.

Ao amigo Diogo pelos importantes ensinamentos, pela amizade e ajuda durante o desenvolvimento e finalização deste trabalho.

Às amigas Daiane, Milene e Gabriela que mesmo distantes foram importantes para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Márcia e Guilherme, pelo amor, carinho e apoio incondicional.

A minha irmã Patrícia e a todos meus familiares que sempre estiveram presentes.

Ao Fernando pela amizade, carinho e paciência nos dias difíceis.

E a todos os amigos que sempre estiveram ao meu lado e torceram por
minha vitória.

BIOGRAFIA

Maísa de Siqueira Pinto, filha de Guilherme Botelho Pinto e Márcia Regina de Siqueira Pinto, nasceu em 27 de Novembro de 1986, na cidade de Lavras.

Concluiu o ensino médio no Colégio Tiradentes da Polícia Militar – MG em dezembro de 2004, na cidade de Lavras.

Graduou-se Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal de Lavras em Janeiro de 2010. Durante o curso de graduação foi bolsista de Iniciação Científica pelo CNPq, sob orientação do professor Renato Paiva, no período de Agosto de 2007 a Janeiro de 2010, na área de Fisiologia Vegetal desenvolvendo vários trabalhos em propagação *in vitro* de plantas.

Ingressou no mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, em Fevereiro de 2010, concluindo em Fevereiro de 2012.

RESUMO GERAL

A espécie *Coffea arabica* é comumente propagada utilizando sementes ou estacas, entretanto a embriogênese somática apresenta-se como alternativa para sua propagação com alta taxa de multiplicação e maior uniformidade. A embriogênese possibilita ainda a conservação do material genético da espécie utilizando técnicas de criopreservação. Vários explantes podem ser utilizados para formação de criobancos, dentre eles embriões somáticos e zigóticos. Objetivou-se neste trabalho desenvolver um protocolo de embriogênese somática direta a partir de folhas cotiledonares e criopreservar embriões somáticos e zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho IAC 144. Para indução da embriogênese somática foram utilizadas diferentes concentrações de BAP, sendo em seguida cada concentração combinada com a presença ou ausência de ABA durante a fase de maturação. Para germinação avaliou-se a adição de diferentes fontes de carbono ao meio de cultura, sendo os explantes posteriormente enraizados através da utilização de diferentes concentrações de ANA. Durante a aclimatização testou-se a influência de diferentes substratos na sobrevivência das plântulas. O número máximo de embriões somáticos foi obtido utilizando 18,35 mg L⁻¹ de BAP. A utilização de ABA não foi significativa para a maturação dos embriões. Todas as fontes de carbono, exceto sorbitol, promoveram a germinação dos embriões somáticos, obtendo-se uma média geral de 74% de germinação. A utilização de ANA para o enraizamento não foi significativa, obtendo-se uma média geral de 80,57% de enraizamento, entretanto o número máximo de raízes foi obtido utilizando 2,7 mg L⁻¹ de ANA. A aclimatização das plântulas foi bem sucedida independente do substrato utilizado obtendo-se uma média geral de 96% de sobrevivência. Para o experimento de criopreservação de embriões zigóticos foram testados diferentes tempos de desidratação e determinados os teores de umidade em cada um deles. Para avaliação da viabilidade utilizou-se o teste de tetrazólio. Após 120 dias de germinação, as plântulas obtidas foram aclimatizadas. Na medida em que se diminuiu o grau de umidade observou-se o aumento da taxa de sobrevivência, obtendo-se 98% de sobrevivência aos 117 minutos de desidratação. A máxima viabilidade obtida através do teste de tetrazólio foi 60% aos 108 minutos. A aclimatização foi feita com sucesso, sendo obtida a sobrevivência de 100% das plântulas. Apesar da criopreservação de embriões zigóticos ter sido feita com sucesso, não foi possível criopreservar embriões somáticos diretos de cafeeiro, não sendo observada a sobrevivência de nenhum embrião após a desidratação ou desidratação e congelamento.

Palavras-chave: Cafeeiro. Micropropagação. Conservação *ex situ*.

GENERAL ABSTRACT

Coffea arabica is usually propagated by seeds or cuttings, however somatic embryogenesis is an option for its propagation with high multiplication rate and higher uniformity. Somatic embryogenesis also allows the conservation of genetic material through cryopreservation. Various explants can be used to form cryobanks, including somatic and zygotic embryos. The aim of the present study was to develop a protocol for direct somatic embryogenesis using cotyledonary leaves and cryopreserve embryos of *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho IAC 144. During the induction of somatic embryogenesis it was checked the effects of the addition of BAP in the culture medium in different concentrations, each concentration was then combined with the presence or absence of ABA during the maturation phase. Different carbon sources were used to the germination of the embryos, and after germination the embryos were rooted using different concentrations of ANA. The influence of three substrates in the survival rate during acclimatization was checked. It was observed the presence of somatic embryos in all BAP concentrations used, the maximum number of somatic embryos (1,10) was obtained using 18,35 mg L⁻¹ of BAP. No significant difference was observed in the number of mature somatic embryos in the concentration of ABA tested. All carbon sources used, except sorbitol, were efficient to promote germination of somatic embryos, reaching an average germination of 74%. The presence of roots was observed in all ANA concentrations tested. After rooting the seedlings were successfully acclimatized in all substrates checked, reaching a rate of survival of 94%. In the cryopreservation study it was checked different dehydration times in silica gel and the moisture content was set in each one. After 24 hours in liquid nitrogen and one week in MS medium for the germination, the percentage of germinated embryos was determined. The tetrazolium test was used to evaluate the viability of the embryos after freezing. After 120 days in MS medium the seedlings were acclimatized. The embryos that weren't dehydrated didn't survive after freezing, however after the decrease of moisture content the increase in survival rate was observed, the maximum survival rate (98%) was reached after dehydration for 117 minutes. The highest viability (60%), according tetrazolium test, was reached when the embryos were dehydrated for 108 minutes. The acclimatization of seedlings was successfully done, and 100% of survival was observed. Although we have been successful in cryopreserving zygotic embryos, the cryopreservation of somatic embryos wasn't possible, and none of the embryos dehydrated or dehydrated and frozen have been survived.

Keywords: Coffee tree. Micropropagation. *Ex situ* conservation.

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 2

Gráfico 1	Número médio de embriões diretos formados por explante a partir de folhas cotiledonares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho) utilizando diferentes concentrações de BAP.....	53
Gráfico 2	Número médio de embriões diretos formados por explante a partir de folhas cotiledonares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho) utilizando diferentes concentrações de BAP como origem	56
Gráfico 3	Germinação de embriões somáticos diretos de cafeeiro em meio MS com diferentes fontes de carbono (0,09M) aos 60 dias.....	57
Gráfico 4	Comprimento da parte aérea de plântulas obtidas a partir de embriões somáticos diretos de cafeeiro germinados em meio MS com diferentes fontes de carbono (0,09M) aos 60 dias.....	58
Gráfico 5	Número médio de folhas em plântulas obtidas a partir de embriões somáticos diretos de cafeeiro germinados em meio MS com diferentes fontes de carbono (0,09M) aos 60 dias.....	59
Gráfico 6	Presença de raiz em plântulas obtidas a partir de embriões somáticos diretos de cafeeiro germinados em meio MS com diferentes fontes de carbono (0,09M) aos 60 dias.....	60
Gráfico 7	Número de raízes de plântulas obtidas a partir de embriões somáticos diretos de cafeeiro germinados em meio MS com diferentes fontes de carbono (0,09M) aos 60 dias.....	61
Gráfico 8	Comprimento das raízes de plântulas obtidas a partir de embriões somáticos diretos de cafeeiro germinados em meio MS com diferentes fontes de carbono (0,09M) aos 60 dias.....	62

Gráfico 9	Número de raízes de plântulas obtidas a partir de embriões somáticos diretos de cafeeiro enraizados em meio MS em função das diferentes concentrações de ANA após 30 dias de cultivo no meio de enraizamento.....	66
Gráfico 10	Número de raízes de plântulas obtidas a partir de embriões somáticos diretos de cafeeiro enraizados em meio MS em função das diferentes concentrações de ANA após 30 dias de cultivo no meio de enraizamento.....	67
Gráfico 11	Número de folhas de plântulas obtidas a partir de embriões somáticos diretos vindos de folhas cotiledonares de cafeeiro aclimatizadas com diferentes substratos após 35 dias de aclimatização em sala de crescimento.....	69

CAPÍTULO 3

Gráfico 1	Grau de umidade de embriões somáticos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí vermelho após a desidratação em sílica gel por diferentes tempos	88
Gráfico 2	Germinação de embriões zigóticos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho desidratados em sílica gel por diferentes tempos após 7 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS	90
Gráfico 3	Comprimento da parte aérea de plântulas de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho obtidas a partir da germinação de embriões zigóticos desidratados em sílica gel por diferentes tempos após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS	92
Gráfico 4	Comprimento da raiz de plântulas de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho obtidas a partir da germinação de embriões zigóticos desidratados em sílica gel por diferentes tempos após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS	93

Gráfico 5	Porcentagem de germinação, após uma semana de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS, de embriões zigóticos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho desidratados em sílica gel por diferentes tempos e criopreservados em nitrogênio líquido (-196°C) por 24 horas	94
Gráfico 6	Comprimento da parte aérea de plântulas de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho com 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> (meio MS) obtidas a partir da germinação de embriões zigóticos desidratados em sílica gel por diferentes tempos e criopreservados em nitrogênio líquido (-196°C) por 24 horas	96
Gráfico 7	Comprimento da raiz de plântulas de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho com 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> (meio MS) obtidas a partir da germinação de embriões zigóticos desidratados em sílica gel por 0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos e criopreservados em nitrogênio líquido (-196°C) por 24 horas	97
Gráfico 8	Porcentagem de plântulas normais, formadas a partir de embriões zigóticos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho desidratados em sílica gel por 0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos e criopreservados em nitrogênio líquido (-196°C) por 24 horas, após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS	98
Gráfico 9	Viabilidade dos embriões zigóticos avaliados pelo teste de tetrazólio após desidratação por 0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos e criopreservação por 24 horas a -196°C. por 24 horas	100
Gráfico 10	Porcentagem de embriões vigorosos avaliados pelo teste de tetrazólio após desidratação por 0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos e criopreservação por 24 horas a -196°C por 24 horas	101
Gráfico 11	Comprimento médio da raiz de plântulas de cafeeiro cv. Catuaí Vermelho vindas de embriões frescos, desidratados e criopreservados antes e após a aclimatização (35 dias) ...	104

Gráfico 12	Comprimento médio da parte aérea de cafeeiro cv. Catuaí Vermelho vindas de embriões frescos, desidratados e criopreservados antes e após a aclimatização (35 dias)	105
Gráfico 13	Massa fresca de plântulas de cafeeiro cv. Catuaí Vermelho vindas de embriões frescos, desidratados e criopreservados após a aclimatização (35 dias)	106

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Indução de embriões somáticos diretos em folhas cotiledonares de cafeeiro utilizando 15 mg L⁻¹ de BAP (A) e detalhe do embrião somático isolado na fase cotiledonar (B). co – cotilédone, hr – eixo hipocótilo-radícula, ec – embrião somático cotiledonar..... 54
- Figura 2 Plântulas obtidas a partir da germinação de embriões somáticos diretos de cafeeiro em meio MS com diferentes fontes de carbono (0,09M) aos 60 dias. A- Manitol B- Galactose C- Sacarose D- Frutose E- Maltose F- Sorbitol 65
- Figura 3 Plântulas de cafeeiro vindas da germinação de embriões diretos antes (A) e após (B) o enraizamento com ANA 67
- Tabela 1 Fases da embriogênese somática do cafeeiro com os respectivos rendimentos obtidos pela metodologia adaptada nesta pesquisa..... 70

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Plântulas normais provenientes da germinação de embriões zigóticos frescos (A) e desidratados e criopreservados (B). Má formação de parte aérea (C) e raiz (D) de plântulas provenientes da germinação de embriões zigóticos desidratados e criopreservados de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho 99
- Figura 2 Embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho inviável (A), Viável não vigoroso (B) e Viável vigoroso (C) .. 102
- Figura 3 Aspecto das plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho após a aclimatização por 35 dias: A – Plântula proveniente da germinação de embrião zigótico fresco 103
- Tabela 1 Grau de umidade de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho após diferentes tempos de desidratação em sílica gel..... 89

SUMÁRIO

	CAPÍTULO I Introdução geral	17
1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	A espécie <i>Coffea arabica</i> L.	20
2.2	Cultivo <i>in vitro</i>	22
2.2.1	Embriogênese somática	23
2.2.2	Propagação e embriogênese somática em cafeeiro	26
2.3	Conservação do material genético do cafeeiro	27
2.4	Criopreservação	29
2.4.1	Desidratação	31
2.4.2	Descongelamento	32
2.4.3	Recuperação do crescimento	34
2.4.4	Criopreservação do cafeeiro	35
	REFERÊNCIAS	37
	CAPÍTULO II Embriogênese somática direta a partir de folhas cotiledonares	45
1	INTRODUÇÃO	48
2	MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1	Material vegetal	49
2.2	Indução de embriões somáticos diretos	49
2.3	Maturação dos embriões somáticos	50
2.4	Germinação dos embriões somáticos	51
2.5	Enraizamento dos embriões somáticos	51
2.6	Aclimatização das plântulas	52
2.7	Análise estatística	52
3	RESULTADOS	53
3.1	Indução de embriões somáticos	53
3.2	Maturação de embriões somáticos	55
3.3	Germinação de embriões somáticos	57
3.4	Enraizamento de embriões somáticos	65
3.5	Aclimatização de plântulas originadas a partir de embriões somáticos	68
4	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	72
	CAPÍTULO III Criopreservação de embriões somáticos e zigóticos	76
1	INTRODUÇÃO	79
2	MATERIAL E MÉTODOS	81

2.1	Criopreservação de embriões zigóticos	81
2.1.1	Excisão dos embriões zigóticos.....	81
2.1.2	Desidratação dos embriões zigóticos.....	81
2.1.3	Congelamento, descongelamento e reidratação.....	82
2.1.4	Análise da viabilidade.....	83
2.1.5	Aclimatização.....	84
2.2	Criopreservação de embriões somáticos	85
2.2.1	Obtenção dos embriões somáticos.....	85
2.2.2	Desidratação dos embriões somáticos	85
2.2.3	Congelamento, descongelamento e reidratação	86
2.3	Análise estatística.....	87
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
3.1	Criopreservação de embriões zigóticos.....	88
3.1.1	Grau de umidade de embriões zigóticos.....	88
3.1.2	Desidratação de embriões zigóticos.....	90
3.1.3	Congelamento dos embriões zigóticos.....	94
3.1.4	Teste de tetrazólio.....	100
3.1.5	Aclimatização.....	102
3.2	Criopreservação de embriões somáticos	107
3.2.1	Desidratação de embriões somáticos	107
3.2.2	Congelamento de embriões somáticos	107
4	CONCLUSÃO.....	109
	REFERÊNCIAS.....	110

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro foi introduzido no Brasil no século XVIII e desde então é parte importante da economia do país e vem contribuindo para o seu crescimento econômico. O grão é uma das *commodities* de maior valor no mercado mundial, e dentro deste contexto o Brasil é o maior produtor e exportador da bebida no mundo.

Hoje a espécie *Coffea arabica* L. representa mais de 60% da produção total de café no Brasil, e é especialmente apreciada devido à sua qualidade de bebida. A primeira cultivar da espécie introduzida no Brasil foi a chamada Típica ou Arábica e desde então uma série de outras cultivares foram produzidas por meio de hibridações, seleções e mutações.

A cultivar Catuaí Vermelho foi originada através da hibridação entre a cultivar Caturra Amarelo, caracterizada por seu porte baixo, e a cultivar Mundo Novo caracterizada por sua grande produtividade. A hibridação entre as duas cultivares resultou em uma cultivar vigorosa, com menor porte, excelente qualidade de bebida e ampla capacidade de adaptação às diversas regiões.

Pesquisas envolvendo o cafeeiro nas mais diversas áreas são estrategicamente importantes para o país. No caso do cultivo *in vitro* vários estudos já foram desenvolvidos com a espécie, porém devido à grande variedade de cultivares existentes ainda há muito a ser estudado.

Com relação ao cafeeiro outro ponto importante a ser considerado é a conservação do material genético. Normalmente a conservação desta espécie é feita por meio de bancos de germoplasma *in situ*, porém neste tipo de conservação as plantas estão expostas às catástrofes naturais e à ação antrópica, por isso se aconselha que em conjunto seja utilizada a conservação *ex situ*.

Uma forma de conservação *ex situ* que tem sido bastante utilizada é a criopreservação, onde o explante é mantido em nitrogênio líquido (-196°C) teoricamente por tempo indeterminado.

A criopreservação é hoje considerada uma das técnicas mais viáveis para a conservação em longo prazo do material genético de espécies cujas sementes não podem ser armazenadas por muito tempo. Por isso, pesquisas nessa área são crescentes envolvendo os mais diversos explantes.

No caso de sementes de cafeeiro, a conservação em nitrogênio líquido já está bem estabelecida, porém a utilização de embriões zigóticos em substituição às sementes representa economia de espaço e consequentemente de recursos, possibilitando a formação de bancos de germoplasma em instituições menores e com menos recursos.

Objetivou-se neste trabalho desenvolver um protocolo de embriogênese somática direta a partir de folhas cotiledonares e criopreservar embriões somáticos e zigóticos de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho IAC 144).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A espécie *Coffea arabica* L.

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*. Mais de 70 espécies do gênero já foram identificadas, porém destas apenas duas são cultivadas com o propósito comercial, as espécies *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre. As demais espécies do gênero são utilizadas em programas de melhoramento genético devido à presença de características agronômicas importantes como resistência a pragas e doenças (EIRA et al., 2006).

A espécie *Coffea arabica* L. é originária do sudoeste da Etiópia e foi trazida para a América no século 18 contribuindo para o crescimento econômico e cultural dos países onde passou a ser cultivado. Hoje a espécie é cultivada em diversos países, devido principalmente ao interesse em suas características comerciais e também agronômicas (KUMAR; NAIDU; RAVISHANKAR, 2006). Além disso, o café arábica é mais valorizado comercialmente no mercado que o canephora já que seus grãos têm um sabor mais pronunciado e refinado (EL-ABASSY; DONFACK; MATERNY, 2011).

Originalmente os cafezais no Brasil foram formados a partir da cultivar Arábica (*Coffea arabica* L. var. *typica*), primeira a ser introduzida no país. Aos poucos os cafezais foram se diversificando por meio da introdução de novas cultivares. A cultivar Catuaí Vermelho foi originada através da hibridação entre a cultivar Caturra Amarelo, caracterizada por seu porte baixo, e a cultivar Mundo Novo caracterizada por sua grande produtividade. A hibridação entre as duas cultivares resultou em uma cultivar vigorosa, com menor porte, excelente qualidade de bebida e ampla capacidade de adaptação às diversas regiões (MARTINS et al., 1992).

A espécie *Coffea arabica* L. é tetraploide possuindo 44 cromossomos. Sua multiplicação natural é feita por autopolinização, com uma taxa de fecundação cruzada de apenas 10%. Em cada ovário são desenvolvidas uma ou duas sementes, as sementes são constituídas por um endosperma verdadeiro dentro do qual se insere o embrião com dois pequenos cotilédones e eixo hipocotiledonar. As sementes são envolvidas por uma película prateada e protegidas pelo endocarpo do fruto, chamado de pergaminho. O início da germinação das sementes leva em média de 30 a 60 dias (CARVALHO et al., 1991).

Com relação ao caráter econômico, o café está entre as commodities de maior valor no mercado, sendo a espécie *Coffea arabica* L. responsável por 66% do volume de negócios no mercado externo (LABOUISSSE et al., 2008), além disso, é uma das bebidas mais apreciadas no mundo (DULLOO et al., 2009).

O Brasil é hoje o maior exportador mundial de café seguido por Vietnã, Indonésia e Colômbia. Até setembro de 2011, as exportações já haviam atingido 24,32 milhões de sacas representando um aumento de 3,49% das exportações feitas até setembro de 2010 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011).

A previsão atual para a produção nacional de café beneficiado em 2012 indica entre 48,97 e 52,27 milhões de sacas de 60 quilos, representando um crescimento entre 12,6% e 20,2% quando comparada com a produção obtida na temporada anterior (43,48 milhões de sacas). Se este resultado for confirmado esta será a maior safra já produzida no país. Dentre os estados brasileiros, Minas Gerais é o maior produtor com safra estimada de 26 milhões de sacas beneficiadas na safra 2012 (CONAB, 2012).

2.2 Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* pode ser definido como o cultivo de células, tecidos e órgãos isolados da planta mãe e em um meio artificial. Além de ser utilizado em diversas áreas de pesquisas, possui também uma série de aplicações práticas, entre elas a propagação assexuada em larga escala, ou micropropagação. A micropropagação permite a propagação de plantas idênticas à planta mãe da qual originaram e em larga escala formando, portanto clones. Utilizando esta técnica as plântulas podem ser obtidas de três formas: cultura de gemas ou meristemas, organogênese e embriogênese somática (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; PINHAL et al., 2011).

A micropropagação envolve uma série de etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até a fase de aclimatização. O sucesso final da micropropagação depende da capacidade das plântulas sobreviverem após a transferência do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* em larga escala, com baixo custo e sem grandes perdas. Quando cultivadas *in vitro* as plantas crescem em um microambiente adaptado para gerar o mínimo estresse possível e condições ótimas para a multiplicação das plantas, com baixa luminosidade, condições assépticas e açúcar e nutrientes que permitem seu crescimento heterotrófico. Quando transferidas para o ambiente *ex vitro* a planta tem que se adaptar ao modo autotrófico e às condições de umidade do ambiente (HAZARIKA, 2006).

Para que a planta supere essas mudanças de ambiente de forma menos traumática são utilizadas técnicas de aclimatização. Para muitas espécies essa é a etapa mais crítica, e a escolha do substrato adequado pode reduzir a mortalidade durante a aclimatização (MOREIRA et al., 2006).

2.2.1 Embriogênese somática

A embriogênese somática pode ser definida como o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estágios embriogênicos originando uma nova planta sem que ocorra a fusão de gametas (PINHAL et al., 2011). A competência embriogênica desenvolvida nas células somáticas é adquirida através de estímulos físicos e/ou químicos que dão início à transição das células de somáticas para embriogênicas (GAJ et al., 2005).

A embriogênese somática possui várias aplicações práticas, como utilização como modelo em estudos de desenvolvimento embriológico, formação de bancos de germoplasma através da criopreservação, e propagação clonal em larga escala, além de ser utilizada para transformação genética (VON ARNOLD et al., 2002).

Dois tipos de embriogênese somática podem ocorrer, a embriogênese somática direta e a embriogênese somática indireta. O termo embriogênese somática direta é aplicado a explantes que passam por uma mínima proliferação antes da formação dos embriões, já a embriogênese indireta acontece quando antes da formação do embrião ocorre uma proliferação extensiva do explante formando uma massa celular não diferenciada, chamada de calo (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; SHARP et al., 1980).

Em geral a produção de embriões somáticos passando pela fase de calos pode levar a ocorrência de variações somaclonais, porém quando os embriões são obtidos de forma direta este tipo de variação pode ser evitada (GHANTI et al., 2010).

A escolha do explante inicial para o processo de embriogênese somática é de fundamental importância. Em algumas espécies apenas tecidos com características embrionárias são capazes de originar embriões somáticos, isto acontece principalmente com espécies monocotilédones. Outras espécies,

entretanto, são capazes de expressar potencial embriogênico independente do explante utilizado, como é o caso de espécies de cenoura, alfafa, tabaco entre outras (BAJAJ, 1995). Para que a embriogênese somática ocorra o explante além de apresentar capacidade embriogênica precisa que suas células possuam a capacidade de receber sinais endógenos e exógenos que serão responsáveis pelo início da embriogênese somática culminando na formação do embrião somático maduro (DAM; PAUL; BANDYOPADHYAY, 2010).

Fatores endógenos como o nível de auxina e citocinina são fatores importantes na regulação da embriogênese somática. A auxina é o principal fitormônio envolvido na embriogênese somática, sendo que sua redução pode levar à inibição da capacidade embriogênica do explante (PARK et al., 2011).

Também podem ser utilizados reguladores de crescimento em meio de cultura para indução da embriogênese somática, em geral os mais utilizados são auxinas, citocininas, ácido abscísico (ABA) e etileno (LU; VAHALA; PAPPINEN, 2011).

Na maior parte das vezes, a embriogênese somática é induzida na presença apenas de uma auxina ou pela sua combinação com uma citocinina, porém em alguns casos a utilização de apenas uma citocinina é efetiva tanto para indução, quanto para a maturação dos embriões somáticos (PAUL et al., 2011).

Etileno e ABA estão relacionados às fases mais tardias de desenvolvimento do embrião e à maturação. Genes expressos em abundância nos estádios mais tardios da embriogênese somática são em geral ativados pelo ABA (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

Outras características do meio de cultura como composição mineral, tipo e concentração de carboidrato e aminoácidos também podem influenciar a resposta à embriogênese somática (CEASAR; IGNACIMUTHU, 2010). As fontes de nitrogênio presentes no meio de cultura geralmente são suficientes para disponibilizar o nitrogênio necessário à indução da embriogênese, porém a

adição de aminoácidos ao meio pode promover a embriogênese e, em alguns casos, a formação do embrião pode não ocorrer sem a presença da fonte de aminoácido, demonstrando a necessidade de NH_4^+ além daquele já disponibilizado pelos sais do meio (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). Alguns aminoácidos como prolina, por exemplo, têm comprovadamente influência positiva na embriogênese somática (GERDAKANEH et al., 2011).

A posterior conversão dos embriões somáticos em plântulas é uma fase crucial para o sucesso dos protocolos de embriogênese à qual deve ser dada especial atenção. Dentre os fatores que podem determinar a capacidade dos embriões de se converterem em plântulas estão a síntese e o acúmulo de substâncias de reserva (WALKER; PARROTT, 2001).

A fonte de carbono presente no meio de cultura em muitos trabalhos foi citada como fator determinante para a taxa de conversão de embriões somáticos em plântulas. Dentre as fontes de carbono mais comumente utilizadas estão os monossacarídeos frutose, glicose e galactose, os dissacarídeos sacarose e maltose e os açúcares de alcoóis manitol e sorbitol (BLANC et al., 1999; CEASAR; IGNACIMUTHU, 2010; WALKER; PARROTT, 2001; YANG et al., 2004).

Esses açúcares além de serem fontes de carbono também são responsáveis pela regulação de várias etapas do metabolismo vegetal incluindo assimilação, particionamento e transporte de nutrientes, aspectos do crescimento e desenvolvimento, respostas ao estresse entre outros. Os mecanismos pelos quais esses açúcares funcionam como sinalizadores no metabolismo ainda são pouco conhecidos, entretanto sabe-se que as hexoses e sacarose funcionam como moléculas sinalizadoras no metabolismo vegetal (YANG et al., 2004).

2.2.2 Propagação e embriogênese somática em cafeeiro

A propagação convencional de cafeeiro é feita com o uso de sementes ou estacas. A propagação por sementes está associada à variação genética descontrolada e a baixas taxas de multiplicação. Já a utilização de estacas possibilita a obtenção de maior uniformidade entre as plantas, porém a taxa de multiplicação é relativamente baixa, uma vez que só podem ser utilizadas estacas provenientes de ramos ortotrópicos (KUMAR; NAIDU; RAVISHANKAR, 2006).

A multiplicação por meio de técnicas de cultura de tecidos é uma alternativa viável aos tradicionais métodos de propagação do cafeeiro, uma vez que permite a produção de plântulas relativamente uniformes em pouco tempo e em larga escala. Além disso, o desenvolvimento de métodos para a regeneração e propagação *in vitro* do cafeeiro, incluindo a embriogênese somática, permitem sua manipulação a nível celular e molecular adequando a espécie para a utilização em programas de melhoramento pela transformação genética (KUMAR; NAIDU; RAVISHANKAR, 2006).

A embriogênese somática em cafeeiro foi descrita pela primeira vez na espécie *Coffea canephora* por Staritsky (1970) e na espécie *Coffea arabica* L. por Söndahl e Sharp (1977), e desde então tem sido estudada por diversos pesquisadores (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002).

Vários protocolos já foram desenvolvidos para a espécie arábica, desde protocolos com apenas uma etapa antes da obtenção dos embriões até protocolos mais complexos envolvendo etapas sequenciais e diferentes meios de cultura (SANTANA-BUZZY et al., 2007).

Com relação à embriogênese somática direta, várias cultivares de cafeeiro já tiveram protocolos estabelecidos como Catuaí Amarelo

(CALHEIROS; VIEIRA; FUENTES, 1994), Acaiá Cerrado (PEREIRA et al., 2007) e Rubi (REZENDE et al., 2008).

2.3 Conservação do material genético do cafeeiro

O centro de diversidade genética do cafeeiro está localizado na Etiópia, porém esse banco genético natural está suscetível a uma série de fatores que têm causado a erosão genética da espécie na região (LABOUISSSE et al., 2008). Vários pesquisadores visitam a Etiópia com o intuito de coletar sementes de cafeeiro e estudar a variabilidade disponível no seu centro de origem (ANTHONY et al., 2001). No entanto, devido à erosão genética os recursos genéticos do cafeeiro que formam a base genética do melhoramento para produtividade e qualidade estão rapidamente se tornando menos diversos (DULLOO et al., 2009). Diante disso, destaca-se a importância da criação de bancos de germoplasma que possam armazenar os recursos genéticos da espécie em longo prazo disponibilizando-os para pesquisas futuras.

Essencialmente existem duas estratégias básicas de conservação: conservação *in situ* e *ex situ*. Segundo o artigo 2 da Convenção em Diversidade Biológica (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME - UNEP, 1992) a conservação *in situ* que é definida como:

A conservação dos ecossistemas e habitats naturais e a manutenção e recuperação de populações viáveis das espécies em seu meio natural e, no caso de espécies domesticadas ou cultivadas, nos ambientes onde tenham desenvolvido suas propriedades distintivas.

A conservação *in situ* é uma alternativa para conservação das espécies que permite a continuidade dos processos dinâmicos evolutivos, especialmente a produção de novas resistências a pragas e doenças. Porém as desvantagens da utilização deste tipo de conservação são principalmente devido ao difícil acesso

aos materiais e, além disso, a vulnerabilidade a catástrofes naturais e interferências antrópicas e bióticas (DULLOO et al., 1998).

Por outro lado a conservação *ex situ* é descrita da seguinte forma: “A conservação de componentes da diversidade biológica fora dos seus habitats naturais” (UNEP, 1992). Na conservação *ex situ* o acesso aos materiais é facilitado seja para caracterização, avaliação ou utilizações posteriores, além disso uma vez conservado o material necessita de uma mínima manutenção (DULLOO et al., 1998).

A conservação *ex situ* funciona como um *back-up* para alguns segmentos da diversidade que de outra maneira poderiam ser perdidos na natureza ou nos ecossistemas dominados pelo homem (LI; PRITCHARD, 2009).

É nos chamados bancos de sementes que normalmente acontece a conservação *ex situ*, entretanto esse tipo de conservação só é viável para espécies cujas sementes sejam tolerantes a dessecação e possam ser armazenadas a baixas temperaturas e umidade, as chamadas sementes ortodoxas. Para o gênero *Coffea* a implantação de bancos de sementes é difícil de ser conseguida uma vez que suas sementes apesar de tolerarem níveis significativos de desidratação são sensíveis ao frio sendo então classificadas como sementes intermediárias (ABDELNOUR-ESQUIVEL; VILLALOBOS; ENGELMANN, 1992; DUSSERT et al., 1997). Dentro do gênero são encontrados diferentes graus de tolerância à dessecação sendo a espécie *C. liberica* a menos tolerante e a *C. racemosa* a mais tolerante (BERJAK; PAMMENTER, 2008).

Considerando a dificuldade de conservação de algumas espécies pelos métodos convencionais torna-se necessário o investimento em esforços para que sejam desenvolvidas novas técnicas de conservação (DULLOO et al., 2009).

O rápido avanço na área da biotecnologia viabilizou uma série de novas alternativas de conservação *ex situ*. Alguns exemplos da utilização de técnicas biotecnológicas na conservação de germoplasma são as conservações de

plântulas *in vitro* pelas técnicas de cultura de tecidos, a criopreservação dos mais diversos tipos de materiais vegetais em nitrogênio líquido, o armazenamento de grãos de pólen e os bancos de DNA (DULLOO et al., 1998).

Para a espécie *Coffea arabica* L. a utilização de técnicas de crescimento lento *in vitro* e criopreservação têm sido utilizadas como alternativa para conservação em longo prazo (SANTANA-BUZZY et al., 2007). Foi demonstrado que alguns grupos genéticos da espécie adaptam-se bem às condições *in vitro* podendo ser conservados por até três anos, porém outros não podem ser mantidos *in vitro* sendo rapidamente perdidos. Dessa forma, a criopreservação, na qual os tecidos são conservados a uma temperatura muito baixa (-196°C) em nitrogênio líquido interrompendo suas atividades mitóticas e metabólicas, é a opção mais promissora para conservação em longo prazo do material genético do cafeeiro (DULLOO et al., 2009).

2.4 Criopreservação

A criopreservação pode ser definida como o armazenamento do material vegetal em temperaturas ultrabaixas, e é uma das técnicas atualmente disponíveis considerada segura e economicamente viável para a conservação em longo prazo de uma série de espécies que apresentam dificuldades de armazenamento pelos métodos mais tradicionais. Em temperaturas ultrabaixas (-196°C) a divisão celular e os processos metabólicos são interrompidos permitindo que o material seja armazenado em teoria por um período ilimitado sem qualquer alteração ou modificação do explante. Outras vantagens da técnica são a necessidade de pouco espaço para o armazenamento de grande quantidade de material, a ausência de possíveis contaminantes e a necessidade de pouca manutenção (ENGELMANN, 2004).

Para a criopreservação vários tipos de explantes já foram utilizados com sucesso como embriões zigóticos (ISHIKAWA et al., 1997; STEINMACHER et

al., 2007; WEN; WANG, 2010), embriões somáticos (FERNANDES et al., 2008; MYCOCK; WESLEY-SMITH; BERJAK, 1995; POPOVA; KIM; PAEK, 2010), ápices caulinares (SARKAR; NAIK, 1998; UCHENDU et al., 2010; VOLK; WALTERS, 2006), meristemas (PANIS et al., 2002) e suspensões celulares (ISHIKAWA et al., 2006; MENGES; MURRAY, 2004).

O estado da água e o equilíbrio osmótico relacionado com os movimentos da água dentro e fora das células são parâmetros de grande importância para a criopreservação, a desidratação dos explantes desempenha papel central na prevenção de lesões que podem ocorrer durante o congelamento e conseqüentemente na viabilidade pós-descongelamento (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008).

Durante o congelamento o grande desafio é prevenir os danos às células causados pela cristalização da água em seu interior. Estes danos acontecem principalmente devido à característica de expansão da água quando congelada e a conformação dos seus cristais de gelo durante o congelamento. Alguns líquidos são capazes de evitar a cristalização quando resfriados a uma temperatura muito abaixo do seu ponto de fusão. O líquido super-resfriado mantém as características de um líquido até que a chamada temperatura de vitrificação seja atingida. Abaixo desta temperatura as moléculas de água permanecem desordenadas como no estado líquido, entretanto suas propriedades físicas se assemelham às de um sólido rígido. O “sólido-líquido” formado é chamado de vidro e o processo de formação é chamado de vitrificação. Esse processo é importante para criobiologia uma vez que a água líquida no seu estado natural encontra-se desordenada no interior dos seres vivos, e a manutenção dessa desordem natural é vantajosa devido ao fato de perturbar minimamente o sistema que está sendo preservado (WOWK, 2010).

A possibilidade de o estado vítreo ser atingido é maior se o líquido for viscoso e o resfriamento ocorrer rapidamente. Por isso é importante que o

material vegetal passe por uma desidratação prévia antes do congelamento, aumentando a viscosidade dos solutos internos e permitindo que o estado vítreo seja atingido. Um bom nível de sobrevivência geralmente é obtido quando as amostras são congeladas a um grau de umidade de 10% a 20% (ENGELMANN, 2004; WOWK, 2010).

Várias técnicas de criopreservação já foram estabelecidas, sendo que nessas técnicas o congelamento pode acontecer rapidamente ou lentamente (ENGELMANN, 2004). No congelamento rápido, a desidratação do explante ocorre antes da sua exposição ao nitrogênio líquido por meio da utilização das técnicas de vitrificação, essa desidratação normalmente acontece mediante a exposição da amostra a um meio com alta concentração de soluções crioprotetoras ou a métodos físicos de desidratação. Assim a maior parte da água intracelular é retirada antes do congelamento da amostra. Após a desidratação é feito o congelamento rápido do material pela imersão em nitrogênio líquido induzindo a vitrificação dos solutos internos (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008).

2.4.1 Desidratação

Como já foi mencionado, a criopreservação só é bem sucedida quando o congelamento dos solutos internos não causa danos às células. A única forma de evitar esses danos às células é através da vitrificação. A vitrificação é um processo físico de transição no qual uma solução aquosa passa do estado líquido para um estado vítreo ou amorfo (não-cristalino) (ENGELMANN, 2004).

Para que a célula atinja o estado vítreo são necessárias duas condições: rápidas taxas de congelamento (6°C por segundo) e uma solução celular concentrada. Na prática, o congelamento rápido acontece ao mergulhar o explante em um criotubo no nitrogênio líquido. Já a concentração da solução

celular pode acontecer de várias maneiras, secagem ao ar, desidratação induzida pelo congelamento e aplicação de crioprotetores penetrantes e não penetrantes (PANIS; LAMBARDI, 2006).

Um dos procedimentos baseados na vitrificação utilizados na criopreservação é a desidratação dos explantes utilizando métodos físicos. Para muitas espécies esse é o método ideal para promover a desidratação dos explantes antes do congelamento, em especial para espécies recalcitrantes. A desidratação dos explantes utilizando câmara de fluxo laminar é a mais comum, porém a desidratação é mais uniforme e eficiente quando se utiliza um sistema fechado contendo sílica gel (SISUNANDAR et al., 2010).

A grande vantagem desse método é que o material pode ser diretamente preservado em nitrogênio líquido após a desidratação, sem a utilização de crioprotetores que possam ser tóxicos às células (ENGELMANN, 2004; GONZALEZ-ARNAO; ENGELMANN, 2006). Esse método é amplamente utilizado para criopreservação de sementes ortodoxas, embriões zigóticos e pólen. Secagens super-rápidas demonstraram ser benéficas para criopreservação de embriões zigóticos de algumas espécies de plantas que possuem sementes recalcitrantes (PANIS; LAMBARDI, 2006).

Plântulas originadas a partir da germinação de embriões zigóticos desidratados e criopreservados de espécies ortodoxas em geral apresentam morfologia similar àquelas utilizadas como controle. Já para espécies recalcitrantes a desidratação e/ou criopreservação tem causado anormalidades na morfologia e diminuição do crescimento (SERSHEN; PAMMENTER; BERJAK, 2011).

2.4.2 Descongelamento

Após a criopreservação das amostras o descongelamento deve ser feito

de maneira eficiente para garantia da sobrevivência dos explantes. Métodos ineficientes de descongelamento são frequentemente causa de danos às células e aos tecidos após a criopreservação e motivo de insucesso da mesma. O efeito dos protocolos de descongelamento na sobrevivência das células é fortemente dependente do tipo de explante e do método de congelamento (KARLSSON, 2001).

Supõe-se que as injúrias causadas durante o descongelamento resultem do processo de devitrificação do conteúdo citosólico levando à formação e ao crescimento de cristais de gelo letais no interior das células (KARLSSON, 2001). Assim o descongelamento deve ser feito de maneira criteriosa evitando-se ao máximo a formação de cristais de gelo que possam ser letais para a célula.

Durante o descongelamento os cristais letais de gelo podem ser formados de duas maneiras. No primeiro caso, pode ocorrer o congelamento da água liberada pela devitrificação. Com o aumento da temperatura, a água que não foi congelada durante a redução da temperatura, mas sofreu vitrificação começa a ser liberada na forma líquida podendo sofrer o congelamento antes que a temperatura ambiente seja atingida. No segundo caso, com o aumento da temperatura pequenos cristais de gelo que foram formados durante o congelamento têm a oportunidade de crescer formando cristais de gelo maiores que podem causar o rompimento e morte das células (SANTOS, 2000).

Têm sido observados melhores resultados com a utilização de protocolos de descongelamento rápido através da imersão em água ou meio de cultura líquido (35°C-40°C) (KARLSSON, 2001). Durante este tipo de descongelamento não há tempo hábil para a formação dos cristais letais de gelo (ENGELMANN, 1997).

A reidratação do explante após o descongelamento é uma etapa da criopreservação à qual nem sempre é dada a devida atenção. Durante a reidratação podem ocorrer danos às membranas capazes de causar a morte dos

explantes ou impedir a formação de plântulas normais. Isso acontece porque durante o processo de vitrificação ocorre o enrijecimento da membrana plasmática, e após o descongelamento muitas vezes a membrana encontra-se desorganizada em razão do estresse causado durante o congelamento. Devido a esses fatores, quando a água penetra novamente na célula durante a reidratação rapidamente e com muita pressão podem ocorrer danos à membrana plasmática das células levando-a à morte. A utilização de soluções osmorreguladoras após o descongelamento pode prevenir tais danos. Normalmente são utilizadas durante a reidratação soluções decrescentes de açúcares que permitem que a água retorne lentamente ao interior das células e só então após a reidratação os explantes são inoculados no meio de crescimento (DUSSERT et al., 2003).

2.4.3 Recuperação do crescimento

O processo de regeneração ideal é aquele que propicia a recuperação da maior quantidade de células vivas e que culmina na formação de uma nova plântula (SANTOS, 2000).

Para o monitoramento e escolha dos protocolos mais eficientes de criopreservação é importante ter disponíveis testes eficientes de viabilidade que possam de maneira rápida e exata determinar a eficiência da criopreservação e a probabilidade de regeneração dos explantes criopreservados. Os testes de viabilidade são definidos como testes que avaliam o estresse causado ao tecido vegetal pela criopreservação e expressa a probabilidade de sobrevivência e recuperação. Como normalmente os explantes utilizados na criopreservação são pequenos é difícil determinar precisamente sua viabilidade, entretanto algumas técnicas permitem analisar o estresse e danos causados às células de um lote de explantes criopreservados. Quanto menor o estresse causado às células pela criopreservação, maior é a probabilidade de sobrevivência e recuperação do explante (VERLEYSEN et al., 2004).

Os testes de Tetrazólio e de diacetato de fluoresceína são métodos de avaliação por coloração que têm sido utilizados para avaliar a viabilidade de sementes, tecidos e células congeladas. Entretanto deve-se ter cautela na utilização desses métodos uma vez que podem fornecer informações incorretas sobre a viabilidade, pois as células podem apresentar coloração positiva imediatamente após o descongelamento, mas eventualmente morrerem durante o cultivo (SANTOS, 2000).

2.4.4 Criopreservação do cafeeiro

Devido a pouca longevidade das sementes de cafeeiro durante o armazenamento e às dificuldades enfrentadas na conservação em campos de germoplasma e no cultivo *in vitro*, observou-se a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas para a conservação do germoplasma da espécie. Pesquisas para o desenvolvimento de técnicas de criopreservação do cafeeiro têm sido feitas com sementes, embriões zigóticos, ápices e embriões somáticos. Porém apenas os estudos desenvolvidos até o momento para criopreservação de sementes foram suficientes para permitir seu uso rotineiro em bancos de germoplasma de cafeeiro (ETIENNE et al., 2002).

A criopreservação de embriões de cafeeiro é uma forma viável de conservação do germoplasma da espécie. Embriões zigóticos de *C. arabica* L. cv. Caturra excisados de frutos imaturos foram eficientemente criopreservados após a desidratação em câmara de fluxo por 30 minutos, obtendo-se uma taxa de sobrevivência de 83% a 95% (ABDELNOUR-ESQUIVEL; VILLALOBOS; ENGELMANN, 1992). Para as demais cultivares, entretanto ainda não foram desenvolvidos protocolos que possibilitem o armazenamento de embriões zigóticos em nitrogênio líquido em longo prazo.

Embriões somáticos de cafeeiro da espécie *Coffea canephora* também já foram eficientemente criopreservados por Abdelnour et al. (1993), Hatanaka et al. (1994) e Tessereau et al. (1994). Porém apenas Mycock; Wesley-Smith; Berjak (1995) conseguiram resultados positivos para a criopreservação de embriões somáticos da espécie *Coffea arabica* L., obtendo 70% de sobrevivência após o congelamento rápido de embriões na fase cordiforme ou torpedo, entretanto os autores não especificam a cultivar utilizada no trabalho.

Um estudo comparativo entre a maior coleção de germoplasma em campo de cafeeiro do mundo e a criocoleção de cafeeiro do Centro Agronômico Tropical de Pesquisa e Ensino Superior (CATIE) na Costa Rica demonstrou que a criopreservação custa menos que a conservação em campo. Além disso, o estudo analisou as vantagens da criopreservação em relação às coleções de campo e observou que para aquelas espécies que possuem dificuldades de conservação em bancos de semente, como o cafeeiro, e só podem ser conservadas a partir de plantas inteiras a criopreservação é a melhor escolha para sua conservação em longo prazo (DULLOO et al., 2009).

REFERÊNCIAS

ABDELNOUR, A. et al. Zygotic and somatic embryo cryopreservation in coffee (*Coffea arabica*, *C. canephora* and Arabusta). In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15., 1993, Paris.

Quinzième colloque scientifique international sur le café. Montpellier: Asic, 1993. p. 751 - 753.

ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; VILLALOBOS, V.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 13, n. 5, p. 297-302, 1992.

ANTHONY, F. et al. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 118, n. 1, p. 53-65, 2001.

BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry**: somatic embryogenesis and synthetic seed I. 30th ed. Dordrecht: Springer, 1995. 472 p.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. **Annals Of Botany**, London, v. 101, n. 2, p. 213-228, 2008.

BLANC, G. et al. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 59, n. 2, p. 103-112, Dec. 1999.

CALHEIROS, M. B. P.; VIEIRA, L. G. E.; FUENTES, S. R. L. Effects of exogenous polyamines on direct embryogenesis in coffee. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, n. 2, p. 109-114, 1994.

CARVALHO, A. et al. Aspectos genéticos do cafeeiro. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 1, p. 135-183, 1991.

CEASAR, S. A.; IGNACIMUTHU, S. Effects of cytokinins, carbohydrates and amino acids on induction and maturation of somatic embryos in kodo millet (*Paspalum scorbiculatum* Linn.). **Plant Cell, Tissue And Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, n. 2, p. 153-162, Mar. 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: café safra 2011: terceira estimativa**. Brasília, 2011. 22 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: café safra 2012: primeira estimativa**. Brasília, 2012. 28 p.

DAM, A.; PAUL, S.; BANDYOPADHYAY, T. K. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Limonium sinensis* (Girard) Kuntze. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 126, n. 2, p. 253-260, set. 2010.

DULLOO, M. E. et al. Complementary conservation strategies for the genus *Coffea*: A case study of Mascarene *Coffea* species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 45, n. 6, p. 565-579, Oct. 1998.

DULLOO, M. E. et al. Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. **Crop Science**, Madison, v. 49, p. 2123-2138, Nov./Dec. 2009.

DUSSERT, S. et al. Basis of coffee seed sensitivity to liquid nitrogen exposure: oxidative stress or imbibitional damage? **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 119, n. 4, p. 534-543, Mar. 2003.

DUSSERT, S. et al. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature. **Cryoletters**, Cambridge, v. 18, n. 1, p. 269-276, 1997.

EIRA, M. T. S. et al. Coffee seed physiology. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Minireview, v. 18, n. 1, p. 149-163, 2006.

EL-ABASSY, R. M.; DONFACK, P.; MATERNY, A. Discrimination between Arabica and Robusta green coffee using visible micro Raman spectroscopy and chemometric analysis. **Food Chemistry**, London, v. 126, p.1443-1448, 2011.

ENGELMANN, F. In vitro conservation methods. In: CALLOW, J. A.; FORD-LLOYD, B. V.; NEWBURY, H. J. **Biotechnology and plant genetic resources**. Rome: Cab International, 1997. p. 119-161.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sept./Oct. 2004.

ETIENNE, H. et al. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 38, n. 2, p. 129-138, Mar./Abr. 2002.

FERNANDES, P. et al. Cryopreservation of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability. **Tree Physiology**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 1841-1850, Aug. 2008.

GAJ, M. D. et al. Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. **Planta**, Berlin, v. 222, n. 6, p. 977-988, Dec. 2005.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3th. ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1.

GERDAKANEH, M. et al. Effects of different amino acids on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). **Acta Physiologiae Plantarum**, Dordrecht, v. 33, n. 5, p.1847-1852, Feb. 2011.

GHANTI, S. K. et al. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature explants of chickpea. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 1, p.121-125, Jan. 2010.

GONZALEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 27, n. 3, p. 155-168, Maio/June 2006.

GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 1-13, 2008.

HATANAKA, T. et al. Direct regrowth of encapsulated somatic embryos of coffee (*Coffea canephora*) after cooling in liquid-nitrogen. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 15, n. 1, p.47-52, Jan./Fev. 1994.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 105-120, Jan. 2006.

ISHIKAWA, K. et al. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 11, p. 754-757, Feb. 1997.

ISHIKAWA, M. et al. Effect of growth phase on survival of Bromegrass suspension cells following cryopreservation and abiotic stresses. **Annals of Botany**, London, v. 97, n. 3, p. 453-459, Mar. 2006.

KARLSSON, J. O. A theoretical model of intracellular devitrification. **Cryobiology**, San Diego, v. 42, n. 3, p. 154-169, Apr. 2001.

KUMAR, V.; NAIDU, M. M.; RAVISHANKAR, G. A. Developments in coffee biotechnology: *In vitro* plant propagation and crop improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 87, p. 49-65, Oct. 2006.

LABOUISSSE, J. et al. Current status of coffee (*Coffea arabica* L.) genetic resources in Ethiopia: Implications for conservation. **Genetic resources and crop evolution**: review article. Dordrecht, v. 55, p. 1079-1093, July 2008.

LI, D.; PRITCHARD, H. W. The science and economics of *ex situ* plant conservation. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 14, n. 11, p. 614-621, Oct. 2009.

LU, J.; VAHALA, J.; PAPPINEN, A. Involvement of ethylene in somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 107, n. 5, p. 25-33, Apr. 2011.

MARTINS, A. L. M. et al. Avaliação de progênies dos cafés Catuaí Amarelo e Catuaí Vermelho na região de Pindorama (SP). **Bragantia**, Campinas, v. 51, n. 1, p. 31-38, 1992.

MENGES, M.; MURRAY, J. A. H. Cryopreservation of transformed and wild-type *Arabidopsis* and tobacco cell suspension cultures. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 635-644, Feb. 2004.

MOREIRA, M. A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 875-879, Sept./Oct. 2006.

MYCOCK, D. J.; WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P. Cryopreservation of somatic embryos of four species with and without cryoprotectant pre-treatment. **Annals of Botany**, London, v. 75, n. 4, p.331-336, Apr. 1995.

PANIS, B. et al. Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 23, n. 6, p. 375-384, Nov./Dec. 2002.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: RUANE, J.; SONNINO, A. **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**. Rome: Food And Agriculture Organization Of The United Nations, 2006. cap. 6, p. 61-78.

PARK, S. Y. et al. Genotypic variation and aging effects on the embryogenic capability of *Kalopanax septemlobus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 105, n. 2, p. 265-270, Jan. 2011.

PAUL, S. et al. An efficient regeneration system via direct and indirect somatic embryogenesis for the medicinal tree *Murraya koenigii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 105, n. 2, p. 271-283, Jan. 2011.

PEREIRA, A. R. et al. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaia cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 332-336, Mar./Apr. 2007.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, June 2011.

POPOVA, E.; KIM, H. H.; PAEK, K. Y. Cryopreservation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) somatic embryos using sucrose preculture and air desiccation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 124, n. 4, p. 522-528, May 2010.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R. et al. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, n. 12, p. 1141-1149, May 2002.

REZENDE, J. C. et al. Development of *Coffea arabica* L. seedlings obtained from direct somatic embryogenesis. **Coffee Science**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 30-37, Jan./June 2008.

SANTANA-BUZZY, N. et al. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Columbia, v. 43, n. 6, p. 507-520, Aug. 2007.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 70-84, 2000. Número especial.

SERSHEN, P. B.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Effects of partial dehydration of recalcitrant *Haemanthus montanus* zygotic embryos on vigour of recovered seedlings. **Journal of Botany**, South Africa, v. 77 p. 193-202. Jan. 2011.

SHARP, W. R. et al. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Reviews**, New York, v. 2, n. 1, p. 268-310, Apr. 1980.

SISUNANDAR, S. et al. Dehydration improves cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cryobiology**, San Diego, v. 61, p. 289-296. Oct. 2010.

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

STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v. 19, n. 4, p. 509-514, 1970.

STEINMACHER, D. A. et al. Cryopreservation of peach palm zygotic embryos. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 28, n. 1, p. 13-22, Jan./Feb. 2007.

TESSEREAU, H. et al. Cryopreservation of somatic embryos: A tool for germplasm storage and commercial delivery of selected plants. **Annals Of Botany**, London, v. 74, n. 5, p.547-555, Maio 1994.

UCHENDU, E. E. et al. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, n. 1, p. 25-35, Jan. 2010.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **Convention on Biological Diversity**. Nairobi, 1992. 52 p.

VERLEYSSEN, H. et al. Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, n. 1, p.11-21, Apr. 2004.

VON ARNOLD, S. et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, n. 3, p. 233-249, June 2002.

WALKER, D. R.; PARROTT, W. A. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 64, n. 1, p. 55-62, Jan. 2001.

WEN, B.; WANG, R. Pretreatment incubation for culture and cryopreservation of Sabal embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, n. 2, p. 237-243, Aug. 2010.

WOWK, B. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**, San Diego, v. 60, n. 1, p. 11-22, Feb. 2010.

YANG, Z. et al. Sucrose regulates elongation of carrot somatic embryo radicles as a signal molecule. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, n. 3, p. 441-459, Mar. 2004.

CAPÍTULO II

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA A PARTIR DE FOLHAS COTILEDONARES

RESUMO

O cafeeiro, espécie de destacada importância econômica para o país, é em geral propagado por meio de sementes. Esse tipo de propagação é responsável pela geração de grande variabilidade genética e a causa de menor uniformidade no campo após o plantio. A propagação por meio de técnicas de cultura de tecidos é uma alternativa para manutenção da uniformidade das mudas e aumento da taxa de multiplicação. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a embriogênese somática direta a partir de folhas cotiledonares de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho IAC 144, e o posterior desenvolvimento dos embriões desde a germinação até a fase de aclimatização. Para indução da embriogênese somática foram utilizadas diferentes concentrações de BAP, sendo em seguida cada concentração combinada com a presença ou ausência de ABA durante a fase de maturação. Para germinação avaliou-se a adição de diferentes fontes de carbono ao meio de cultura, sendo os explantes posteriormente enraizados através da utilização de diferentes concentrações de ANA. Durante a aclimatização testou-se a influência de diferentes substratos na sobrevivência das plântulas. Em todas as concentrações de BAP testadas foi observado o desenvolvimento de embriões somáticos, sendo o número máximo de embriões (1,10) obtido utilizando $18,35 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. A utilização de ABA não foi significativa para a maturação dos embriões, porém a retirada do regulador de crescimento BAP do meio de cultura promoveu aumento no número de embriões, sendo o número máximo de embriões (8,39) obtido utilizando $23,52 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP na origem. Todas as fontes de carbono, exceto sorbitol, promoveram a germinação dos embriões somáticos, obtendo-se uma média geral de 74% de germinação. A utilização de ANA para o enraizamento não foi significativa, obtendo-se uma média geral de 80,57% de enraizamento, entretanto o número máximo de raízes foi obtido utilizando $2,7 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA. A aclimatização das plântulas foi bem sucedida independente do substrato utilizado obtendo-se uma média geral de 96% de sobrevivência.

Palavras-chave: Benzilaminopurina. Folha cotiledonar. Embrião somático.

ABSTRACT

The *Coffea arabica* L., specie which has a great economic importance for the country, is propagated mainly by seed. However this kind of propagation increases the genetic variability between the seedlings decreasing the uniformity in the field. The propagation using tissue culture techniques is an alternative to maintain the uniformity and increase the multiplication rate of the seedlings. Somatic embryogenesis is one of the tissue culture techniques that allow obtaining clones from explants coming of the mother plant. The aim of the present study was to develop a protocol for direct somatic embryogenesis using cotyledonary leaves of *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho IAC 144. During the induction of somatic embryogenesis it was checked the effects of the addition of BAP in the culture medium in different concentrations, each concentration was them combined with the presence or absence of ABA during the maturation phase. Different carbon sources were used to the germination of the embryos, and after germination the embryos were rooted using different concentrations of ANA. The influence of three substrates in the survival rate during acclimatization was checked. It was observed the presence of somatic embryos in all BAP concentrations used, the maximum number of somatic embryos (1,10) was obtained using 18,35 mg L⁻¹ of BAP. No significant difference was observed in the number of mature somatic embryos in the concentration of ABA tested, however the absence of BAP during maturation increased the number of embryos per explant. The maximum number of somatic embryos after maturation phase (8,39) was obtained using 23,52 mg L⁻¹ of BAP in the induction medium. All carbon sources used, except sorbitol, were efficient to promote germination of somatic embryos, reaching an average germination of 74%. The presence of roots was observed in all ANA concentrations tested, but the maximum number of roots was reached using 2,7 mg L⁻¹ of ANA. After rooting the seedlings was successfully acclimatized in all substrates checked, reaching a rate of survival of 94%.

Keywords: 6-Benzylaminopurine. Cotyledonary leave. Somatic embryo.

1 INTRODUÇÃO

A propagação do cafeeiro é geralmente feita de duas formas, por meio de sementes ou de estacas. No caso das sementes, a variabilidade genética entre as plântulas formadas é grande, prejudicando desta forma a uniformidade no campo. Por isso tem-se optado pela propagação por meio de estacas.

Um dos problemas da propagação do cafeeiro utilizando estacas é a baixa taxa de multiplicação, uma vez que as estacas devem ser retiradas apenas de ramos ortotrópicos. Uma forma de manter a uniformidade aumentando a taxa de multiplicação é utilizar técnicas de cultura de tecidos para a propagação do cafeeiro.

Dentre as técnicas utilizadas para este fim está a embriogênese somática com a qual é possível produzir clones em larga escala de forma direta ou indireta a partir de explantes retirados da planta mãe. Uma das vantagens da embriogênese direta é que como não há a formação de calos a possibilidade de haver variação somaclonal nos embriões formados é mais baixa. Entretanto esse tipo de embriogênese é menos frequente que a embriogênese somática indireta e a taxa de formação de embriões por explante é normalmente menor.

No caso do cafeeiro, uma série de protocolos de embriogênese somática, tanto direta quanto indireta já foram desenvolvidos. Porém, devido ao grande número de cultivares existentes e a possibilidade de desenvolver protocolos mais rápidos e eficientes, pesquisas na área ainda são válidas.

Neste trabalho, foi desenvolvido um protocolo para a obtenção de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho) utilizando a técnica de embriogênese somática direta, a partir de folhas cotiledonares de plântulas germinadas *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As plântulas de cafeeiro utilizadas foram obtidas por meio da germinação de sementes de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho adquiridas no Setor de Sementes do Departamento de Agricultura da UFLA.

Após a retirada do pergaminho, as sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar utilizando-se álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 minutos, em seguida foi feita a tripla lavagem das sementes em água destilada e autoclavada, seguindo o protocolo desenvolvido por Andrade et al. (2001). Para a germinação utilizou-se o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar e o pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C por 20 minutos.

Após 60 dias de cultivo em sala de crescimento, sob irradiância de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, as plântulas obtidas foram utilizadas para a obtenção dos embriões somáticos.

2.2 Indução de embriões somáticos diretos

Para a obtenção dos embriões somáticos foram utilizadas folhas cotiledonares de plântulas germinadas *in vitro* com aproximadamente 60 dias. Após a excisão da planta mãe, as folhas foram divididas em fragmentos de 1 cm², sendo que em cada fragmento foram feitos pequenos cortes para aumentar o contato da folha com o regulador de crescimento. Em seguida, os fragmentos da folha foram inoculados no meio de indução com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

Utilizou-se meio MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar e acrescido de diferentes concentrações de BAP (6-benzilamino purina): 0, 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹ e 33 mg L⁻¹ de cisteína (AYUB; GEBIELUCA, 2003). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C por 20 minutos. Após 90 dias de cultivo na ausência de luz, foram avaliados a formação de embriões somáticos e o número de embriões por explante.

Foram utilizadas 20 repetições por tratamento, sendo os tratamentos compostos pelas diferentes concentrações de BAP e as repetições por um tubo de ensaio contendo um explante.

2.3 Maturação dos embriões somáticos

Após os 90 dias no meio de indução, os explantes com os embriões foram transferidos para o meio de maturação com ABA (ácido abscísico) para uniformizar o desenvolvimento dos embriões. Para isso, os explantes foram transferidos para meio MS na ausência e presença de 10 mg L⁻¹ do regulador de crescimento ABA. Após 15 dias de cultivo na ausência de luz avaliou-se o número total de embriões por explante e o número de embriões maduros (fase cotiledonar).

Para cada tratamento foram utilizadas 10 repetições, sendo cada tratamento composto pela interação do tratamento de origem (indução de embriões somáticos) e ABA, cada repetição foi composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

2.4 Germinação dos embriões somáticos

Para a germinação, embriões maduros foram separados do explante com a utilização de pinça e em seguida inoculados em meio de cultura MS solidificado com 7 g L^{-1} de ágar e acrescido de $0,09 \text{ M}$ de diferentes fontes de carbono (sacarose, frutose, galactose, maltose, manitol ou sorbitol). Após 60 dias de cultivo em sala de crescimento avaliou-se a porcentagem de germinação, o comprimento da parte aérea, o comprimento da raiz, o número de folhas e o número de raízes por embrião.

Foram utilizadas três repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri contendo 5 embriões.

2.5 Enraizamento dos embriões somáticos

Após 120 dias de cultivo em meio de germinação, os embriões somáticos foram transferidos para o meio de enraizamento. Utilizou-se meio MS suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, solidificado com 7 g L^{-1} de ágar e acrescido de diferentes concentrações de ANA (ácido naftalenoacético): 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3 mg L^{-1} .

Após 30 dias de cultivo em sala de crescimento, avaliou-se a formação de raiz, o tamanho, o número e o diâmetro das raízes. Foram utilizadas 12 repetições por tratamento, sendo os tratamentos constituídos pelas diferentes concentrações de ANA e cada repetição por um tubo de ensaio contendo um embrião germinado.

2.6 Aclimatização das plântulas

As plântulas provenientes da germinação dos embriões somáticos após 60 dias no meio de enraizamento e com aproximadamente 2 cm de parte aérea e 2,5 cm de sistema radicular foram transferidos para a fase de aclimatização.

As plântulas foram retiradas do meio de cultura, suas raízes foram lavadas em água destilada para retirada do excesso do meio de cultura e avaliou-se a altura das plântulas e o número de folhas.

Para aclimatização utilizou-se diferentes substratos: 100% de areia, 100% de substrato comercial, 100% de vermiculita, 50% de substrato comercial + 50% de vermiculita, 50% de substrato comercial + 50% de areia e 50% de areia + 50% de vermiculita. Para o controle da umidade as plântulas foram cobertas com sacos plásticos comuns, sendo retirados gradativamente ao longo das semanas até sua retirada total aos 35 dias.

Os tratamentos foram compostos pelos diferentes substratos e as repetições por um tubete contendo uma plântula. Aos 35 dias de cultivo avaliou-se o número de folhas e a altura das plântulas.

2.7 Análise estatística

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado e os dados analisados através do pacote estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011) utilizando teste de média (Scott Knott) para as variáveis qualitativas e análise de regressão para as variáveis quantitativas. Após a análise de regressão determinou-se o ponto máximo das curvas.

3 RESULTADOS

3.1 Indução de embriões somáticos

Em todas as concentrações de BAP utilizadas observou-se a formação de embriões somáticos diretos. Foi observado um aumento no número de embriões por explante na medida em que se aumentou a concentração do regulador de crescimento até 18,35 mg L⁻¹. Na ausência do regulador de crescimento, não houve a formação de embriões somáticos (Gráfico 1).

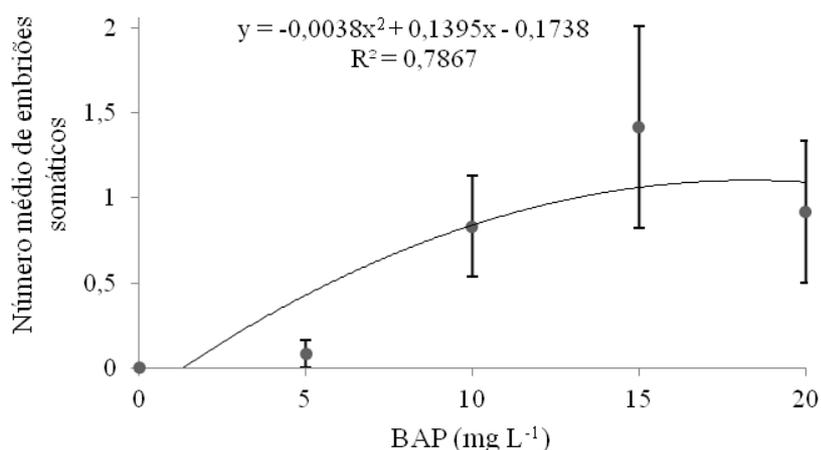


Gráfico 1 Número médio de embriões somáticos diretos formados por explante a partir de folhas cotiledonares de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho) utilizando diferentes concentrações de BAP

Em geral, a embriogênese somática é induzida em meios de cultura suplementados apenas com auxina ou com sua interação com uma citocinina. A utilização apenas de citocinina é menos frequente, entretanto já foram relatados casos em que citocininas isoladas, principalmente BAP, foram capazes de

promover a indução de embriões somáticos em *Limonium sinensis* (DAM; PAUL; BANDYOPADHYAY, 2010), *Beta vulgaris* L. (ZHANG et al., 2008), *Arachis* sp. (PACHECO et al., 2007) e *Coffea arabica* L. (CID; CRUZ; CASTRO, 2004).

O início do aparecimento dos embriões somáticos aconteceu após 2 meses de cultivo no meio de indução. Nesse período, as partes excisadas da folha começaram a escurecer e delas surgiram os embriões diretos, que em sua maioria apresentavam morfologia normal com estrutura bipolar e muito semelhante a embriões zigóticos de cafeeiro (Figura 1).

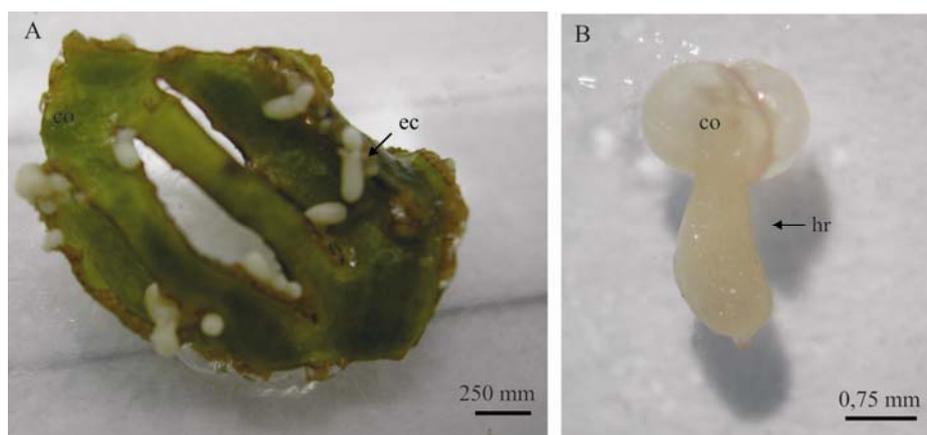


Figura 1 Indução de embriões somáticos diretos em folhas cotiledonares de cafeeiro utilizando 15 mg L^{-1} de BAP (A) e detalhe do embrião somático isolado na fase cotiledonar (B). co – cotilédone, hr – eixo hipocótilo-radícula, ec – embrião somático cotiledonar

O escurecimento da folha na parte onde foram feitos os cortes está ligado à presença de compostos fenólicos que parecem ser necessários ao processo de embriogênese somática em *Coffea*. A presença desses compostos também foi observada em calos embriogênicos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra, sendo que não foi observado o escurecimento em calos classificados como não embriogênicos (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002).

O início da embriogênese somática não foi sincronizado e embriões em diferentes fases de desenvolvimento foram observados em todos os explantes. A embriogênese somática de acordo com o número de embriões formados pode ser classificada como de baixa frequência (1 a 10 embriões por explante) ou de alta frequência (10 a 100 embriões por explante). Neste caso, devido ao número de embriões obtidos por explantes pode-se classificar como embriogênese somática de baixa frequência. Molina et al. (2002) demonstraram que a baixa frequência embriogênica em cafeeiro está associada à genealogia das progênies e pode variar até mesmo dentro de uma mesma cultivar. Normalmente a frequência de embriões somáticos originados de forma direta é baixa.

Entretanto o tempo de resposta à embriogênese foi de aproximadamente 60 a 90 dias sendo considerada rápida, o que demonstra ser este um dos pontos positivos deste protocolo tendo em vista que para embriogênese somática direta em cafeeiro pode-se levar até 6 meses para que seja observada resposta (MOLINA et al., 2002).

Baixa frequência embriogênica também foi encontrada em embriogênese direta de segmentos foliares de *Coffea arabica* L. cv. Caturra cultivados em meio contendo BAP com número médio de 5 embriões por explante (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002).

3.2 Maturação de embriões somáticos

A utilização de ABA para a maturação dos embriões não foi significativa para o número total de embriões. Da mesma maneira a interação entre ABA e BAP na sua origem (indução de embriões somáticos) não foi significativa.

Assim como ocorreu na indução de embriões, na medida em que se aumentou a concentração de BAP nos tratamentos de origem houve aumento no

número de embriões independente da utilização de ABA obtendo-se o ponto máximo de 8,39 embriões utilizando 23,52 mg L⁻¹ de BAP na origem (Gráfico 2).

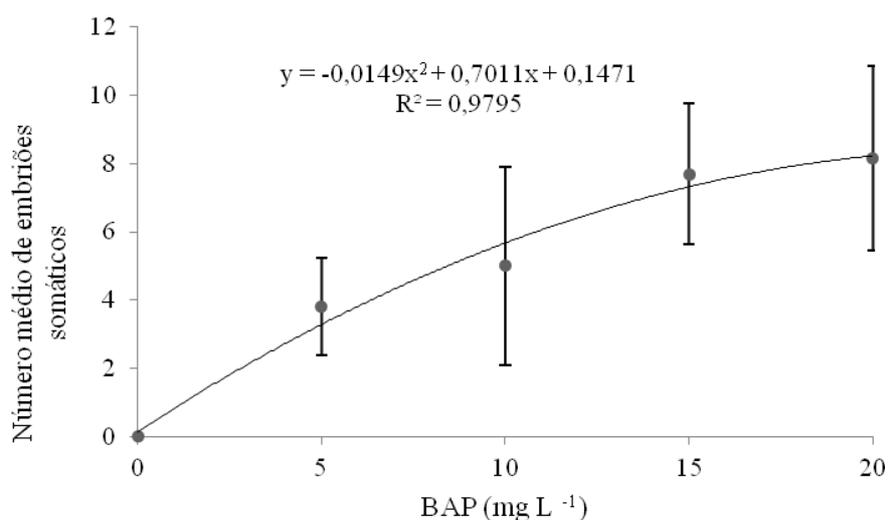


Gráfico 2 Número médio de embriões somáticos diretos formados por explante a partir de folhas cotiledonares de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho) utilizando diferentes concentrações de BAP como origem

O número médio de embriões somáticos maduros não foi significativamente diferente entre os tratamentos com relação à utilização de ABA, bem como com relação à sua interação com o regulador BAP (origem), obtendo uma média de 2 embriões maduros por explante.

Provavelmente a concentração de ABA utilizada não foi eficiente para a promoção da maturação dos embriões somáticos. Prakash e Gurumurthi (2010) observaram que baixas concentrações de ABA (0-1 mg L⁻¹) promoveram aumento no número de embriões maduros de *Eucalyptus camaldulensis* por explante, porém quando utilizaram concentrações mais altas deste regulador de

crescimento ($2-5 \text{ mg L}^{-1}$) não foi observado aumento no número de embriões maduros.

3.3 Germinação de embriões somáticos

No caso dos embriões somáticos diretos de cafeeiro 80% dos embriões germinaram utilizando a fonte de carbono convencional, sacarose. Além da sacarose, a utilização das fontes de carbono manitol, maltose, frutose e galactose também promoveram a germinação dos embriões somáticos, obtendo-se uma média geral de 74% de germinação, não sendo observadas diferenças significativas entre elas. Já a utilização de sorbitol foi prejudicial para a germinação dos embriões, não sendo observada a germinação de nenhum embrião no tratamento utilizando essa fonte de carbono (Gráfico 3).

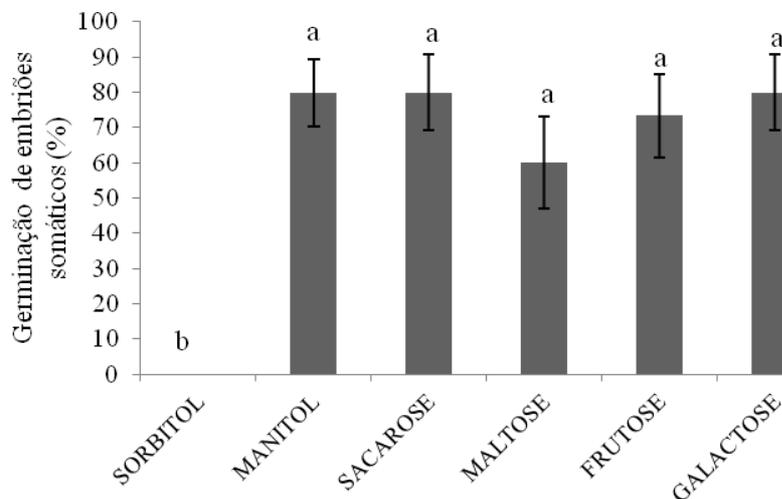


Gráfico 3 Germinação de embriões somáticos diretos de cafeeiro em meio MS com diferentes fontes de carbono (0,09 M) aos 60 dias

Com relação ao comprimento da parte aérea, foi observada diferença significativa apenas entre o sorbitol e as demais fontes de carbono (manitol, galactose, sacarose, frutose e maltose). No tratamento em que se utilizou sorbitol não foi observado o desenvolvimento de parte aérea, já com relação às demais fontes de carbono, obteve-se uma média geral de 0,8 cm de comprimento da parte aérea, não sendo observadas diferenças estatísticas entre si (Gráfico 4).

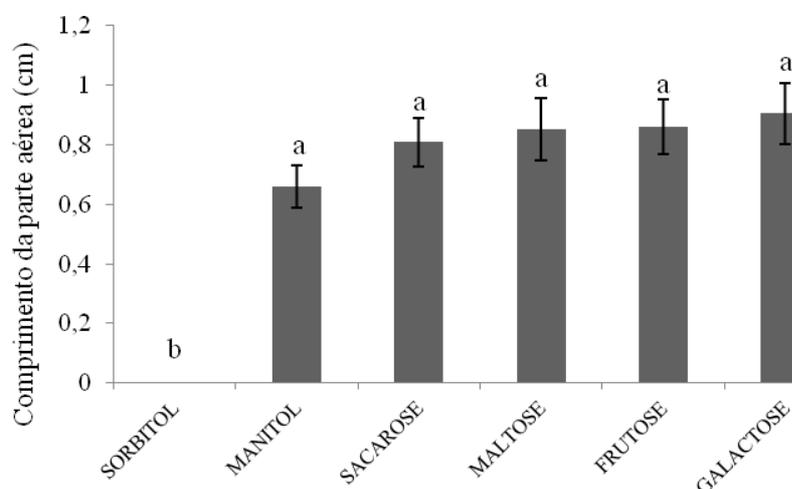


Gráfico 4 Comprimento da parte aérea de plântulas obtidas a partir de embriões somáticos diretos de cafeeiro germinados em meio MS com diferentes fontes de carbono (0,09 M) aos 60 dias

Para o número médio de folhas por explante também observou-se diferença estatística apenas entre o sorbitol e as demais fontes de carbono (manitol, galactose, sacarose, frutose e maltose). A utilização de sorbitol não foi eficiente para a formação de novas folhas, observando-se apenas um pequeno aumento nos cotilédones dos embriões sem, no entanto haver posterior desenvolvimento da parte aérea. Já para as demais fontes de carbono, observou-

se uma média geral de 1,5 folhas por explante, não havendo diferença estatística entre elas (Gráfico 5).

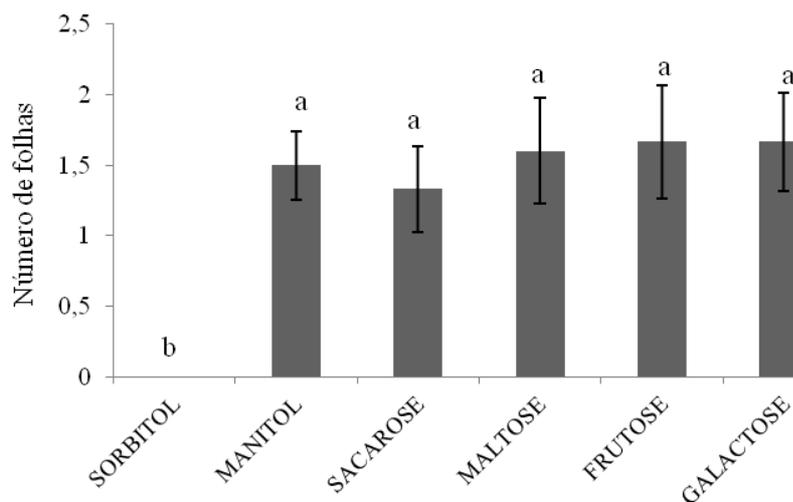


Gráfico 5 Número médio de folhas em plântulas obtidas a partir de embriões somáticos diretos de cafeeiro germinados em meio MS com diferentes fontes de carbono (0,09 M) aos 60 dias

O desenvolvimento das raízes foi significativamente afetado pela fonte de carbono utilizada. Dentre os carboidratos utilizados o manitol foi aquele que apresentou maior taxa de enraizamento, 87%, diferenciando-se estatisticamente das demais fontes de carbono. O sorbitol, como já foi relatado, não foi capaz de promover a germinação dos embriões somáticos, não sendo observada, portanto a formação de raízes em nenhum dos explantes (Gráfico 6).

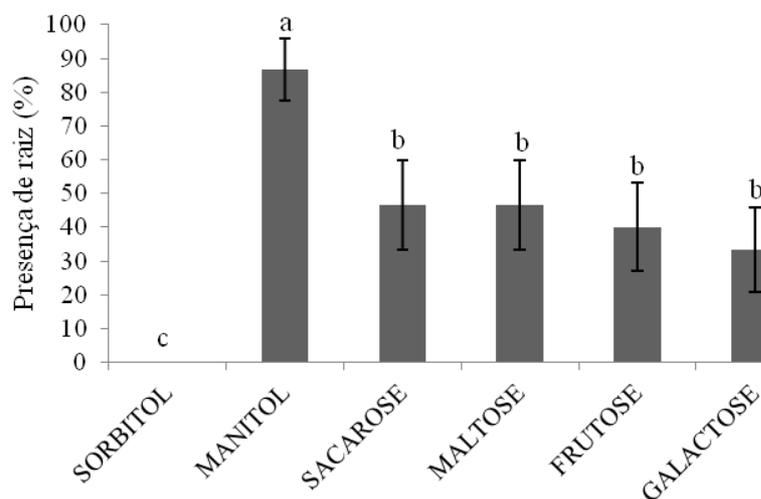


Gráfico 6 Presença de raiz em plântulas obtidas a partir de embriões somáticos diretos de cafeeiro germinados em meio MS com diferentes fontes de carbono (0,09 M) aos 60 dias

Apesar de alguns embriões terem sido capazes de formar raízes, estas eram pequenas e finas.

Com relação ao número de raízes observou-se diferença estatística apenas entre o sorbitol e as demais fontes de carbono (manitol, galactose, sacarose, frutose e maltose) que apresentaram em média 0,5 raízes por explante. Como já foi relatado no tratamento utilizando sorbitol não se observou a formação de raízes (Gráfico 7).

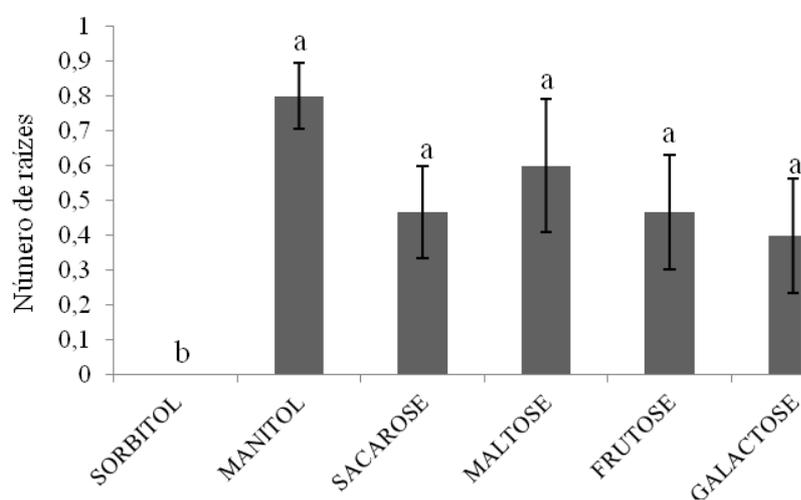


Gráfico 7 Número de raízes de plântulas obtidas a partir de embriões somáticos diretos de cafeeiro germinados em meio MS com diferentes fontes de carbono (0,09 M) aos 60 dias

A sacarose é a fonte de carbono comumente utilizada em meios de cultura e apesar de não ter sido observada diferença significativa com relação à germinação, ao desenvolvimento da parte aérea e à formação e número de raízes, entre ela e as demais fontes de carbono, com exceção do sorbitol, sua utilização foi prejudicial para o desenvolvimento das raízes, apresentando menor comprimento de raízes que as demais fontes de carbono, com exceção do sorbitol (Gráfico 8).

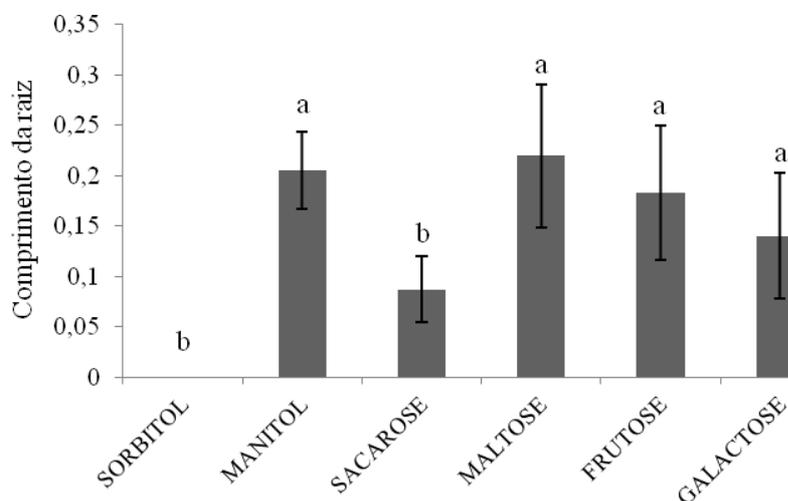


Gráfico 8 Comprimento das raízes de plântulas obtidas a partir de embriões somáticos diretos de cafeeiro germinados em meio MS com diferentes fontes de carbono (0,09 M) aos 60 dias

Apesar de sua forma de ação ainda não estar bem clara, acredita-se que a maltose possa causar um estresse nutricional causado pela menor absorção de nutrientes e, conseqüentemente, favorecer o desenvolvimento dos embriões somáticos (BLANC et al., 1999). Em alguns casos, a utilização de maltose em substituição à sacarose demonstrou ser superior não só durante a germinação de embriões somáticos, mas também ainda na fase de indução da embriogênese (ZHANG et al., 2008). Acredita-se que os melhores resultados obtidos com a utilização de maltose em substituição à sacarose possa ser explicado pelo fato de o metabolismo da sacarose gerar produtos potencialmente tóxicos (SCOTT; LYNE, 1994) ou à maltose ser degradada mais lentamente que a sacarose (NAVARRO-ALVAREZ et al., 1994).

Assim como a maltose, a utilização de frutose tem apresentado resultados positivos para a germinação de embriões somáticos. Junaid et al. (2006) obtiveram melhores resultados na germinação de embriões somáticos de

Catharanthus roseus utilizando 6% de maltose ou 3% de frutose. Ao contrário do observado neste trabalho, em castanheira a utilização de frutose favoreceu a formação de parte aérea em detrimento de raízes, sendo que a utilização de sacarose foi mais eficiente na formação tanto de raiz quanto de parte aérea (TROCH et al., 2009).

Existem alguns relatos na literatura da utilização de galactose para a regeneração de embriões, como é o caso do trabalho desenvolvido por Ling e Iwamasa (1997) para a regeneração de embriões somáticos de espécies relacionadas ao gênero *Citrus* onde foram utilizados 5% de galactose no meio de regeneração dos embriões. Entretanto, trabalhando com variedades de laranja doce Castro et al. (2010), observaram que a utilização de galactose no meio de cultura não foi eficiente para indução de embriões somáticos, porém sua eficácia na regeneração dos mesmos não foi avaliada.

Manitol e sorbitol são açúcares de alcoóis diferindo-se apenas na orientação do grupo hidroxila no segundo átomo de carbono, entretanto os resultados obtidos para a germinação dos embriões somáticos utilizando meio de cultura suplementado com essas duas fontes de carbono foram contrários. Enquanto a utilização de manitol promoveu a germinação de 80% dos embriões, nenhum embrião foi capaz de se desenvolver no meio de cultura suplementado com sorbitol.

Resultados antagônicos também já foram encontrados em outros trabalhos. Enquanto a adição de 3% de sorbitol no meio de cultura dobrou a taxa de conversão dos embriões comparados com o controle a utilização de manitol não foi eficiente em promover aumento da germinação dos embriões. O papel desses dois açúcares de alcoóis na germinação de embriões somáticos ainda não está claro, entretanto acredita-se que a pressão osmótica causada pela sua adição ao meio possa favorecer o desenvolvimento dos embriões somáticos (WALKER; PARROTT, 2001).

O sorbitol, da mesma forma que observado neste trabalho, foi prejudicial para a conversão de embriões somáticos de castanheira em plântulas. Os autores sugerem que a concentração utilizada pode não ter sido adequada ou o composto pode apresentar toxidez à espécie (CORREDOIRA; BALLESTER; VIEITEZ, 2003). Plantas de fumo transgênicas com superexpressão da enzima sorbitol-6-fosfato desidrogenase e que acumulavam uma quantidade excepcional de sorbitol apresentaram sintomas de toxidez (SHEVELEVA et al., 1998). Este resultado também está de acordo com o resultado encontrado em trabalhos com laranja doce em que o uso de sorbitol não foi eficiente para a formação de embriões somáticos (CASTRO et al., 2010).

Na Figura 2, pode ser observado o aspecto dos embriões germinados utilizando as diferentes fontes de carbono após os 60 dias de germinação.

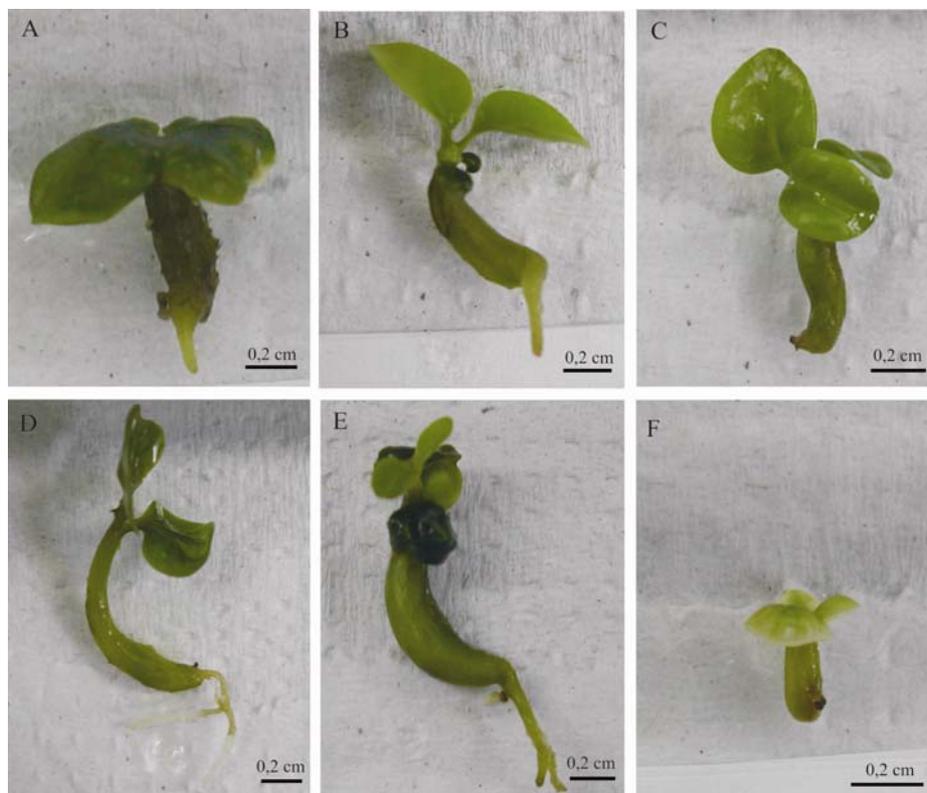


Figura 2 Plântulas obtidas a partir da germinação de embriões somáticos diretos (A-E) e embrião somático não germinado (F) de cafeeiro em meio MS com diferentes fontes de carbono (0,09 M) aos 60 dias. A- Manitol B- Galactose C- Sacarose D- Frutose E- Maltose F- Sorbitol

3.4 Enraizamento de embriões somáticos

Com relação à formação de raízes não houve diferença significativa entre as concentrações de ANA testadas, sendo que em todas as concentrações foi observada a formação de raízes. A porcentagem média de embriões enraizados foi de 80,57%.

O número de raízes, entretanto, variou significativamente em função da concentração de ANA, sendo que, na medida em que se aumentou a

concentração do regulador foi observado aumento no número de raízes, atingindo o máximo (5 raízes) com 2,7 mg L⁻¹ de ANA (Gráfico 9).

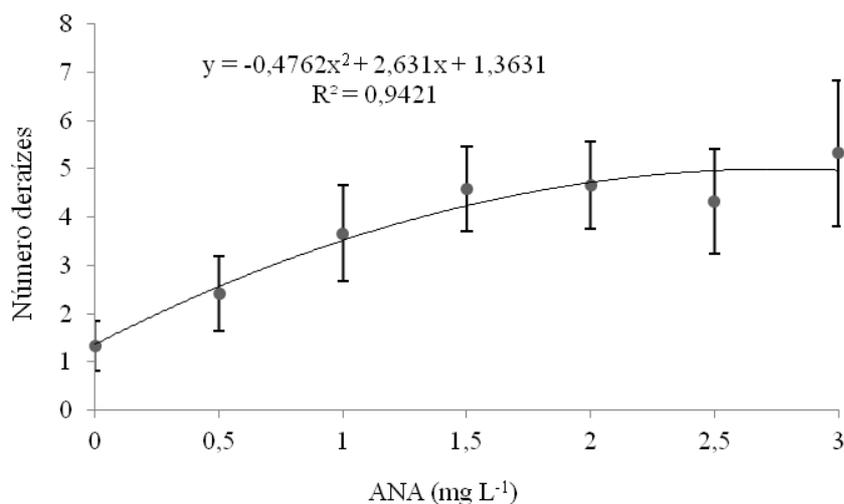


Gráfico 9 Número de raízes de plântulas obtidas a partir de embriões somáticos diretos de cafeeiro enraizados em meio MS em função das diferentes concentrações de ANA após 30 dias de cultivo no meio de enraizamento

Com relação ao comprimento das raízes, não foi observada diferenças estatística entre as concentrações de ANA utilizadas obtendo-se uma média geral de 1,5 cm.

Já para o diâmetro das raízes houve diferença estatística entre as concentrações de ANA utilizadas, observando-se um aumento no diâmetro médio das raízes na medida em que se aumentou a concentração do regulador de crescimento. O maior diâmetro (0,14 cm) foi encontrado na concentração de 2 mg L⁻¹ de ANA, e a partir de então, observou-se uma diminuição no diâmetro, devido a um possível efeito tóxico causado pela alta concentração do regulador de crescimento (Gráfico 10).

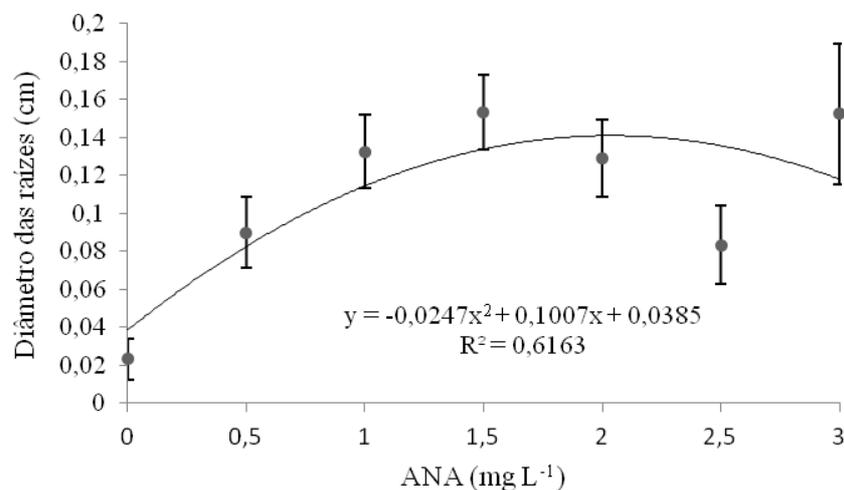


Gráfico 10 Número de raízes de plântulas obtidas a partir de embriões somáticos diretos de cafeeiro enraizados em meio MS em função das diferentes concentrações de ANA após 30 dias de cultivo no meio de enraizamento

No geral a utilização do regulador de crescimento ANA foi eficiente para o enraizamento dos embriões somáticos (Figura 3).

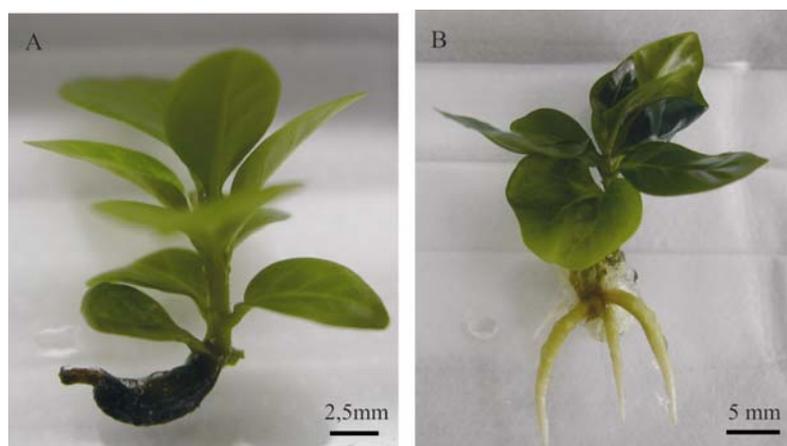


Figura 3 Plântulas de cafeeiro vindas da germinação de embriões diretos antes (A) e após (B) o enraizamento com 1,5 mg L⁻¹ de ANA

Pacheco et al. (2007) obtiveram resultados semelhantes com embriões de *Arachis* utilizando BAP para indução dos embriões, observando a ausência de raízes na maioria dos embriões germinados. A dificuldade na formação de raízes é comum em embriões somáticos formados em meio suplementado apenas com citocininas (KAPARAKIS; ALDERSON, 2002).

Em geral a utilização de ANA é eficiente para o enraizamento de espécies do gênero *Coffea*. Durante o enraizamento de estacas de cafeeiro Ono, Rodrigues e Pinho (1992) observaram que a utilização de ANA foi mais eficaz para o desenvolvimento das raízes do que o AIB (ácido indol butírico).

3.5 Aclimatização de plântulas originadas a partir de embriões somáticos

A aclimatização foi bem sucedida em todos os substratos testados não sendo observada diferença significativa entre eles, obtendo-se-se uma média geral de sobrevivência de 96%.

A altura e o número de folhas antes da aclimatização foram avaliados e não foram observadas diferenças significativas entre eles, demonstrando que as plântulas apresentavam uniformidade antes da aclimatização. Para a altura antes da aclimatização observou-se uma média de 1,96 cm e para o número de folhas, 9,6 folhas por explante. Após o período de aclimatização novamente avaliou-se o número de folhas e altura das plântulas.

Para a variável altura não houve diferença significativa após a aclimatização, observando-se uma média geral de altura de 3,35 cm. Entretanto o número de folhas foi afetado pelo substrato utilizado, sendo que a média do número de folhas nas plântulas aclimatizadas utilizando apenas areia como substrato foi menor (2,4) que nas plântulas aclimatizadas com os demais substratos, que apresentaram uma média geral de 5,16 folhas por explante (Gráfico 11).

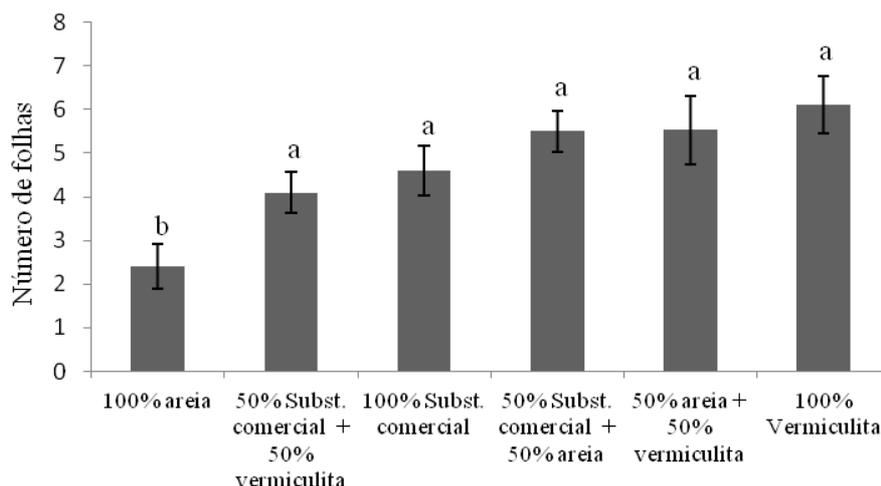


Gráfico 11 Número de folhas de plântulas obtidas a partir de embriões somáticos diretos vindos de folhas cotiledonares de cafeeiro aclimatizadas com diferentes substratos após 35 dias de aclimatização em sala de crescimento

Plântulas vindas de embriões somáticos diretos de cafeeiro da cultivar Rubi foram eficientemente aclimatizados utilizando como substrato Plantmax[®] e casca de arroz carbonizada. Segundo os autores, o número de folhas por explante é uma das variáveis mais importantes a ser considerada durante a aclimatização, uma vez que fornece uma área foliar satisfatória para a fotossíntese do sistema (REZENDE et al., 2008).

Carvalho et al. (2011) observaram que plântulas de cafeeiro cv. Catuaí Vermelho provenientes de embriogênese somática indireta apresentaram desenvolvimento mais rápido que plantas obtidas por meio da germinação de sementes, apresentando diâmetro de copa superior após 30 meses de plantio no campo, demonstrando que o desempenho agrônômico das plantas obtidas através da embriogênese somática direta é semelhante ao daquelas obtidas pela germinação de sementes.

Os rendimentos médios obtidos através da metodologia desenvolvida neste trabalho são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Fases da embriogênese somática do cafeeiro com os respectivos rendimentos obtidos pela metodologia adaptada nesta pesquisa

Etapa	Rendimento
Número de explante (1 cm ²) por folha cotiledonar	4
Quantidade de embriões somáticos por 10 folhas cotiledonares	336
Número de embriões somáticos germinados por 10 folhas cotiledonares	252
Número de embriões somáticos com enraizamento por 10 folhas cotiledonares	203
Número de plântulas aclimatizadas por 10 folhas cotiledonares	195

Segundo a tabela para cada 10 folhas cotiledonares 195 plântulas são obtidas ao final do processo, obtendo um rendimento de 58%.

4 CONCLUSÃO

A utilização de $18,35 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP promove o desenvolvimento de embriões somáticos de cafeeiro a partir de folhas cotiledonares provenientes de plântulas cultivadas *in vitro*.

A utilização de ABA na concentração utilizada (10 mg L^{-1}) não é eficiente para a maturação de embriões somáticos diretos de cafeeiro.

A adição dos açúcares sacarose, frutose, maltose e galactose, e do álcool de açúcar manitol ao meio de cultura na concentração de $0,09 \text{ M}$ promove a germinação de embriões somáticos de cafeeiro. Sendo os melhores resultados para enraizamento encontrados com o álcool de açúcar manitol.

O enraizamento de embriões somáticos é possível através da adição de $2,7 \text{ mg L}^{-1}$ do regulador de crescimento ANA ao manejo de cultura.

A sobrevivência de plântulas de cafeeiro obtidas a partir da germinação de embriões somáticos durante a aclimatização é alta (96%) independente do substrato utilizado.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. M. C. O. et al. Cultura *in vitro* de embriões de *Coffea arabica*: influência de NAA e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p.1063-1070, set./out. 2001.
- AYUB, R. A.; GEBIELUCA, A. N. Embriogênese somática em genótipos de café (*Coffea arabica*) é citocinina dependente. **Publicatio UEPG**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, p. 25-30, ago. 2003.
- BLANC, G. et al. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 59, n. 2, p. 103-112, Dec. 1999.
- CARVALHO, C. H. S. de et al. Características agronômicas e morfológicas de cafeeiro 'Catuai Vermelho' propagado por embriogênese somática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 4, p. 378-383, abr. 2011.
- CASTRO, L. M. et al. Embriogênese somática a partir de calos de cultivares de laranja doce. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 8, p. 1831-1834, ago. 2010.
- CID, L. P. B.; CRUZ, A. R. R.; CASTRO, L. H. R. Somatic embryogenesis from three coffee cultivars: 'Rubi', 'Catuai Vermelho 81', and 'IAPAR 599'. **Hortscience**, Alexandria, v. 39, n. 1, p. 130-131, Feb. 2004.
- CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. **Annals of Botany**, London, v. 92, n. 1, p. 129-136, May 2003.
- DAM, A.; PAUL, S.; BANDYOPADHYAY, T. K. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Limonium sinensis* (Girard) Kuntze. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 126, n. 2, p. 253-260, Sept. 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./Dec. 2011.

JUNAID, A. et al. Somatic embryo proliferation, maturation and germination in *Catharanthus roseus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 84, n. 3, p.325-332, Mar. 2006.

KAPARAKIS, G.; ALDERSON, P. G. Influence of high concentrations of cytokinins on the production of somatic embryos by germinating seeds of tomato, aubergine and pepper. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 77, n. 2, p. 186-190, Mar. 2002.

LING, J. T.; IWAMASA, M. Plant regeneration from embryogenic calli of six *Citrus* related genera. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 49, n. 2, p.145-148, June 1997.

MOLINA, D. M. et al. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, n. 2, p.117-123, mar. 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p.473-497, Apr. 1962.

NAVARRO-ALVAREZ, W. et al. Effect of sugars in wheat anther culture media. **Plant Breeding**, Berlin, v. 112, n. 1, p. 53-62, Jan. 1994.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; PINHO, S. Z. Interações entre auxinas e ácido bórico, no enraizamento de estacas caulinares de *Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 49, n. 1, p. 23-27, 1992.

PACHECO, G. et al. The role of BAP in somatic embryogenesis induction from seed explants of *Arachis* species from Sections *Erectoides* and *Procumbentes*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 88, n. 2, p. 121-126, Jan. 2007.

PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 100, n. 1, p. 13-20, Jan. 2010.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R. et al. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, n. 12, p. 1141-1149, May 2002.

REZENDE, J. C. et al. Development of *Coffea arabica* L. seedlings obtained from direct somatic embryogenesis. **Coffee Science**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 30-37, Jan./June 2008.

SCOTT, P.; LYNE, R. L. Initiation of embryogenesis from cultured barley microspores: a further investigation into the toxic effects of sucrose and glucose. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 37, n. 1, p. 61-65, 1994.

SHEVELEVA, E. V. et al. Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco: High amounts of sorbitol lead to necrotic lesions. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 117, n. 3, p. 831-839, July 1998.

TROCH, V. et al. Optimization of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryo conversion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, n. 1, p. 115-123, May 2009.

WALKER, D. R.; PARROTT, W. A. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 64, n. 1, p. 55-62, Jan. 2001.

ZHANG, C. L. et al. Efficient somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 93, n. 2, p. 209-221, Mar. 2008.

CAPÍTULO III

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS E ZIGÓTICOS

RESUMO

A conservação dos recursos genéticos vegetais é uma medida importante para a prevenção do processo de erosão genética das espécies, principalmente para aquelas importantes para o país do ponto de vista econômico ou ecológico. Uma das formas mais comuns de conservação *ex situ* é a formação de bancos de sementes, porém para espécies cujas sementes não toleram a conservação em longo prazo, como é o caso do cafeeiro, deve-se buscar outras alternativas para sua conservação. A criopreservação é hoje a alternativa mais viável para a conservação em longo prazo dessas espécies. Neste trabalho, objetivou-se criopreservar embriões zigóticos e somáticos de *Coffea arabica* L. cv Catuaí Vermelho utilizando a técnica de desidratação. Foram testados diferentes tempos de desidratação e determinados os teores de umidade em cada um deles. Para avaliação da viabilidade utilizou-se o teste de tetrazólio. Após 120 dias de germinação, as plântulas obtidas foram aclimatizadas. Embriões não desidratados não foram capazes de sobreviver ao congelamento, porém na medida em que se diminuiu o grau de umidade observou-se o aumento da taxa de sobrevivência, obtendo-se 98% de sobrevivência aos 117 minutos de desidratação. A máxima viabilidade obtida através do teste de tetrazólio foi 60% aos 108 minutos. A aclimatização foi feita com sucesso, sendo obtida a sobrevivência de 100% das plântulas provenientes de embriões frescos, desidratados em sílica gel, ou desidratados e criopreservados. Apesar da criopreservação de embriões zigóticos ter sido feita com sucesso, não foi possível criopreservar embriões somáticos diretos de cafeeiro, não sendo observada a sobrevivência de nenhum embrião após a desidratação ou desidratação e congelamento.

Palavras-chave: Cafeeiro. Conservação *ex situ*. Desidratação.

ABSTRACT

The conservation of vegetal genetic resource is important to prevent the process of genetic erosion of economic and ecological important species. The most ordinary form of genetic conservation is the seed banks, however the seeds of some species, like *Coffea arabica* L., don't tolerate conservation for a long period. For that species another kind of *ex situ* conservation must be used. Cryopreservation is an alternative form to conserve for a long period the genetic resources of that species. The aim of the present study was to cryopreserve somatic and zygotic embryos of *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho IAC 144. Different dehydration times in silica gel were checked and the moisture content was set in each one. After 24 hours in liquid nitrogen and one week in MS medium for the germination, the percentage of germinated embryos was determined. The tetrazolium test was used to evaluate the viability of the embryos after freezing. After 120 days in MS medium the seedlings were acclimatized. The embryos that weren't dehydrated didn't survive after freezing, however after the decrease of moisture content the increase in survival rate was observed, the maximum survival rate (98%) was reached after dehydration for 117 minutes. The highest viability (60%), according tetrazolium test, was reached when the embryos were dehydrated for 108 minutes. The acclimatization of seedlings was successfully done, and 100% of survival was observed in seedlings coming of fresh embryos, dehydrated embryos or dehydrated and cryopreserved embryos. Although we have been successful in cryopreserving zygotic embryos, the cryopreservation of somatic embryos wasn't possible, and none of the embryos dehydrated or dehydrated and frozen have been survived.

Keywords: Coffee tree. *Ex situ* conservation. Dehydration.

1 INTRODUÇÃO

Sementes da espécie *Coffea arabica* L. apesar de serem tolerantes à desidratação parcial não podem ser armazenadas em bancos de germoplasma tradicionais à baixa temperatura e umidade, isso se deve ao fato de suas sementes serem sensíveis à baixa temperatura e não apresentarem aumento em sua longevidade após desidratação. Assim, as sementes de cafeeiro são classificadas como sementes intermediárias, e para essa classe de sementes a criopreservação é hoje considerada a técnica mais segura para a conservação de germoplasma em longo prazo.

A criopreservação de sementes já é hoje uma realidade, sendo que já existem alguns criobancos de sementes de cafeeiro no mundo. Porém criopreservar apenas o embrião é uma forma de diminuir significativamente o espaço necessário para a manutenção de um banco de germoplasma. Esta otimização do espaço nos criobancos permite sua ampliação podendo assim abranger um maior número de cultivares e/ou espécies e ainda permite a instalação de pequenos bancos de germoplasmas em instituições menores e com menos recursos.

A formação de bancos de germoplasma de cafeeiro no Brasil é estrategicamente importante uma vez que a cultura é hoje uma das commodities de maior valor no mercado sendo o Brasil o maior exportador mundial. Desta forma, estudar os efeitos da criopreservação em diferentes cultivares contribui para a formação de futuros bancos de germoplasma de embriões zigóticos da espécie.

Durante as etapas da criopreservação algumas são ditas críticas e devem ser criteriosamente estudadas para que o sucesso na regeneração dos explantes seja alcançado. Uma etapa importante para a criopreservação é a desidratação do material. A formação de gelo no interior das células dos explantes é o principal

causador da morte das células uma vez que pode causar o rompimento da parede celular. Por isso antes do congelamento do material todo excesso de água passível de formar cristais de gelo deve ser retirada do interior das células mantendo apenas um mínimo necessário para a manutenção dos processos metabólicos.

A técnica de desidratação utilizada e a desidratação crítica tolerada pelas células devem ser otimizadas para que estas não percam a viabilidade antes mesmo de serem expostas ao nitrogênio líquido.

Neste trabalho, procurou-se observar os efeitos da desidratação parcial e da criopreservação na germinação de embriões zigóticos e somáticos, e na posterior formação, desenvolvimento e aclimatização de plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho IAC 144 originadas a partir desses embriões.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Criopreservação de embriões zigóticos

2.1.1 Excisão dos embriões zigóticos

As sementes de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho foram obtidas no Setor de Sementes do Departamento de Agricultura da UFLA.

Antes da excisão dos embriões zigóticos as sementes tiveram o pergaminho retirado e passaram por uma pré-desinfestação utilizando álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 minutos. Em seguida as sementes passaram por uma tripla lavagem seguida por embebição em água destilada e autoclavada por 24 horas, para facilitar a retirada dos embriões. Após as 24 horas de embebição, as sementes foram levadas para a câmara de fluxo laminar onde passaram por uma desinfestação em álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 minutos, seguida de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada (ANDRADE et al., 2001).

A excisão dos embriões foi feita com a utilização de pinças e bisturi, e após a excisão os embriões foram mantidos em solução de polivinilpirrolidona (PVP) (200 mg L⁻¹) para prevenir a oxidação.

2.1.2 Desidratação dos embriões zigóticos

Após a excisão dos embriões, foi realizada a desidratação pelo método físico com a utilização de sílica-gel. Em cada tratamento foram utilizados 12 embriões desidratados em 68 g de sílica gel acondicionada em caixas tipo Gerbox[®]. Os tempos de desidratação utilizados foram 0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos.

O grau de umidade dos embriões foi determinado em todos os tempos de desidratação (0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos). Após a desidratação em sílica gel os embriões foram pesados e levados para secagem em estufa 70°C por 3 dias. Após a secagem os embriões foram pesados novamente e foi determinada a porcentagem de umidade.

Após a desidratação, os embriões foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar, o pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C por 20 minutos. Os embriões foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, irradiância de fótons de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 \pm 2°C. Após 7 dias de cultivo, foi avaliada a germinação dos embriões e aos 30 dias de cultivo o comprimento da raiz e parte aérea.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), foram utilizadas 12 repetições por tratamento, sendo cada tratamento representado pelos tempos de desidratação (0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos) e cada repetição por um embrião em um tubo de ensaio.

2.1.3 Congelamento, descongelamento e reidratação

Para o congelamento, os embriões desidratados foram transferidos para criotubos com capacidade de 2,0 mL, em cada criotubo foram acondicionados 12 embriões. Os criotubos foram então mergulhados em nitrogênio líquido (-196°C) onde permaneceram por 24 horas.

Após este período, os embriões foram descongelados em banho-maria em agitação a 40 \pm 2°C por 3 minutos, e em seguida procedeu-se sua reidratação. Para a reidratação utilizou-se o próprio criotubo onde foram adicionados 2,0 mL de meio MS líquido suplementado com 1 M de sacarose. Após 30 minutos, 0,5 mL do meio de cultura foram substituídos por 0,5 mL de

meio MS líquido suplementado com 0,1 M de sacarose permanecendo por 10 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes como descrito por Steinmacher et al. (2007).

Os embriões foram então retirados dos criotubos e inoculados em meio de cultura MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar, o pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C por 20 minutos. Em seguida foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, irradiância de fótons de 36 μmol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 25 ± 2°C. Após 7 dias de cultivo foi avaliada a germinação dos embriões e aos 30 dias de cultivo o comprimento da raiz e parte aérea e o número de plântulas normais. Foram considerados germinados os embriões em que observou-se o desenvolvimento da radícula

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 12 repetições, sendo cada tratamento representado pelos tempos de desidratação antes da criopreservação (0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos) e cada repetição por um tubo de ensaio contendo um embrião zigótico.

2.1.4 Análise da viabilidade

Para avaliação da viabilidade, após o congelamento e reidratação, os embriões foram submersos em solução 0,1% de 2,3,5 Trifenil Cloreto de Tetrazólio, em ausência de luz em incubadora BOD a 35°C, por um período de 16 horas. Em seguida foram lavados em água corrente e mantidos em água destilada até o momento da avaliação (ZONTA et al., 2009).

Os embriões foram avaliados individualmente utilizando-se lupa e foi observada a intensidade de coloração dos embriões. De acordo com a coloração apresentada os embriões foram classificados em três classes: viáveis vigorosos, viáveis não-vigorosos e inviáveis. Foram considerados viáveis vigorosos os

embriões que se apresentavam íntegros e completamente coloridos de róseo brilhante a vermelho carmim, viáveis não vigorosos aqueles que apresentavam extremidade da radícula e/ou dos cotilédones não coloridos ou inteiramente coloridos de vermelho carmim mais forte, e inviáveis aqueles completamente coloridos de carmim mais forte ou com coloração amarelada e branco leitosa.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento, sendo os tratamentos constituídos pelos tempos de desidratação e as repetições por 10 embriões zigóticos.

2.1.5 Aclimatização

Plântulas oriundas da germinação de embriões desidratados (30 minutos) e criopreservados, apenas desidratados (60 minutos) e o controle (sem desidratação) foram aclimatizados após 120 dias de cultivo. Para aclimatização utilizou-se como substrato uma mistura com 50% de substrato comercial e 50% de vermiculita. Os substratos foram adicionados a sacos plásticos próprios para a produção de mudas e para o controle da umidade as plântulas foram cobertas com sacos plásticos transparentes, sendo retirados gradativamente ao longo das semanas até sua retirada total aos 35 dias.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, sendo que para cada tratamento foram utilizadas 10 repetições, cada repetição foi representada por um saco plástico contendo uma plântula. Foram feitas avaliações do comprimento da parte aérea e número de folhas antes e depois da aclimatização (aos 35 dias de cultivo) quando foi também avaliada a sobrevivência das plântulas e massa fresca.

2.2 Criopreservação de embriões somáticos

2.2.1 Obtenção dos embriões somáticos

Foram utilizados como explante, embriões somáticos obtidos a partir de folhas cotiledonares de cafeeiro utilizando $18,35 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP de acordo com o protocolo descrito no capítulo II.

Após atingirem a fase cotiledonar, os embriões foram excisados utilizando pinça e bisturi em câmara de fluxo, inoculados em meio MS suplementado com 100 mg L^{-1} de sacarose, para aumentar a tolerância dos embriões à desidratação, e mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 3 dias.

2.2.2 Desidratação dos embriões somáticos

Após os três dias em meio MS suplementado com sacarose, foi realizada a desidratação pelo método físico com a utilização de sílica-gel. Em cada tratamento foram utilizados 12 embriões desidratados em 68 g de sílica gel acondicionada em caixas tipo Gerbox[®]. Os tempos de desidratação utilizados foram 0, 60 e 120 minutos.

Após a desidratação, os embriões foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 0,09 M de manitol, seguindo protocolo descrito no capítulo II, solidificado com 7 g L^{-1} de ágar e pH do meio ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C por 20 minutos. Os embriões foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após 60 dias

de cultivo, foi avaliada a germinação dos embriões somáticos sendo considerado como germinado, aqueles que apresentaram crescimento da radícula.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 12 repetições por tratamento, sendo cada tratamento representado pelos tempos de desidratação (0, 60 e 120) e cada repetição por um embrião em um tubo de ensaio.

2.2.3 Congelamento, descongelamento e reidratação

Para o congelamento, os embriões desidratados por 0, 30 ou 60 minutos foram transferidos para criotubos com capacidade de 2,0 mL, e em cada criotubo foram acondicionados 12 embriões. Os criotubos foram então imersos em nitrogênio líquido (-196°C) onde permaneceram por 24 horas.

Após este período, os embriões foram descongelados em banho-maria em agitação a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ por 3 minutos, e em seguida procedeu-se sua reidratação. Para a reidratação, utilizou-se o próprio criotubo onde foram adicionados 2,0 mL de meio MS líquido suplementado com 1 M de sacarose. Após 30 minutos, 0,5 mL do meio de cultura foram substituídos por 0,5 mL de meio MS líquido suplementado com 0,1 M de sacarose permanecendo por 10 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes como descrito por Steinmacher et al. (2007).

Os embriões foram então retirados dos criotubos e inoculados em meio de cultura MS suplementado com 0,09 M de manitol, segundo protocolo desenvolvido no capítulo II, solidificado com 7 g L^{-1} de ágar e pH do meio ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C por 20 minutos. Em seguida foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após 60 dias de cultivo

foi avaliada a germinação dos embriões. Foram considerados germinados os embriões em que se observou o desenvolvimento da radícula.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 12 repetições, sendo cada tratamento representado pelos tempos de desidratação antes da criopreservação (0, 30 e 60 minutos) e cada repetição por um tubo de ensaio contendo um embrião zigótico.

2.3 Análise estatística

Os dados foram analisados através do pacote estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011) utilizando teste de média (Tukey) para as variáveis qualitativas e análise de regressão para as variáveis quantitativas. Após a análise de regressão, determinou-se o ponto máximo das curvas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Criopreservação de embriões zigóticos

3.1.1 Grau de umidade de embriões zigóticos

O grau de umidade dos embriões zigóticos que não passaram pela desidratação em sílica manteve-se em 61,30% (Gráfico 1). O alto grau de umidade nos embriões antes da desidratação se deve à necessidade de embeber as sementes em água para facilitar a excisão dos mesmos.

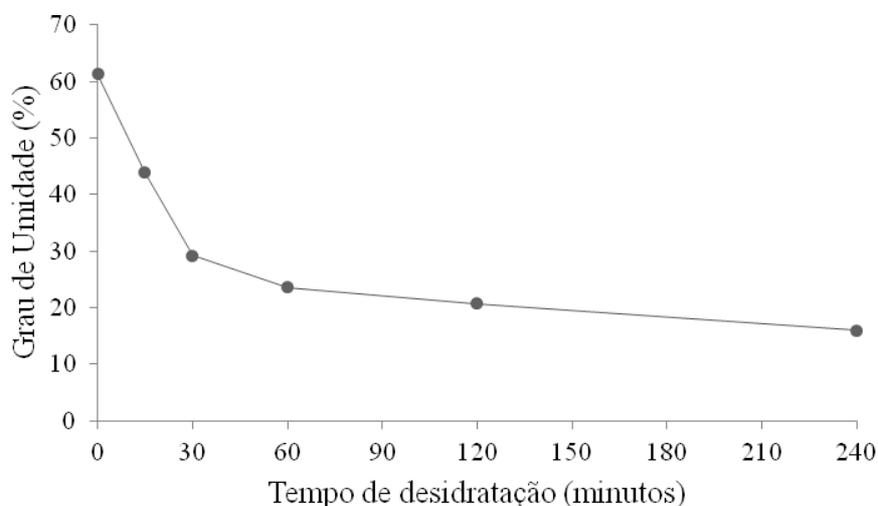


Gráfico 1 Grau de umidade de embriões somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho após a desidratação em sílica gel por diferentes tempos

Após a exposição à sílica gel, houve um rápido decréscimo no grau de umidade dos embriões nos primeiros 60 minutos, caindo de 60% para 23%. A

partir de então, o grau de umidade continuou a diminuir lentamente durante o tempo restante de desidratação atingindo o mínimo de 16% de umidade ao final dos 240 minutos (Tabela 1).

Tabela 1 Grau de umidade de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho após diferentes tempos de desidratação em sílica gel

Tempo de desidratação (min)	Grau de umidade (%)
0	61
15	44
30	29
60	24
120	21
240	16

Durante a desidratação dos embriões zigóticos observou-se a formação de uma curva com duas fases, uma de rápida desidratação e outra de desidratação mais lenta após atingir 24% de umidade, esse padrão já foi observado durante a desidratação de embriões zigóticos de outras espécies como *Haemanthus montanus* (SERSHEN; PAMMENTER; BERJAK, 2011), *Cocos nucifera* L. (SISUNANDAR et al., 2010), *Sabal* sp. (WEN; WANG, 2010) e *Bactris gasipaes* (STEINMACHER et al., 2007).

A desidratação de embriões zigóticos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) possui uma curva de desidratação semelhante à obtida para o cafeeiro. Durante as primeiras 6 horas de desidratação ocorre uma rápida diminuição do grau de umidade de 80% para 25%, e nas últimas 6 horas de desidratação o grau de umidade diminui mais lentamente até 10% de umidade (SISUNANDER et al., 2010). Em geral a sobrevivência pós desidratação dos tecidos é favorecida pela rápida perda de água intracelular, uma vez que quanto mais demorada a

desidratação do explante mais severos são os danos causados ao metabolismo das células (WALTERS; PAMMENTER; BERJAK, 2001).

Diferenças no tempo de desidratação entre espécies e até mesmo cultivares se devem principalmente a diferenças na constituição e morfologia dos embriões, já que o tempo necessário para que cada espécie atinja o grau de umidade adequado para criopreservação depende das características físicas e químicas inerentes a cada espécie (SERSHEN; PAMMENTER; BERJAK, 2011).

3.1.2 Desidratação de embriões zigóticos

A germinação dos embriões zigóticos foi significativamente afetada pela desidratação como demonstrado no Gráfico 2, diminuindo na medida em que houve diminuição no grau de umidade.

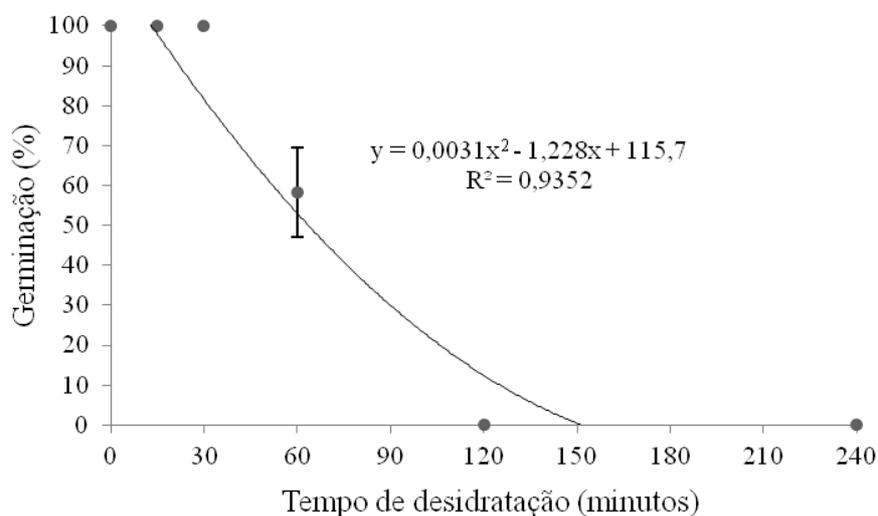


Gráfico 2 Germinação de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho desidratados em sílica gel por diferentes tempos após 7 dias de cultivo *in vitro* em meio MS

Considerando alta uma taxa de germinação de até 80%, pode-se dizer que a desidratação por até 30 minutos (29% de umidade) não prejudicou a germinação dos embriões, já que a porcentagem de germinação após 30 minutos de desidratação foi de 81%. Porém em teores de umidade abaixo de 29% observou-se queda significativa na porcentagem de germinação dos embriões chegando a 53% aos 60 minutos de desidratação (24% de umidade). A partir dos 150 minutos de desidratação o baixo grau de umidade afetou severamente a sobrevivência causando a morte de 100% dos embriões.

Embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra apresentaram 25% de sobrevivência quando desidratados até 10% de umidade em câmara de fluxo laminar (ABDELNOUR-ESQUIVEL; VILLALOBOS; ENGELMANN, 1992). A diferença na tolerância à dessecação dos embriões pode ter ocorrido devido a diferenças inerentes às cultivares e ao estado da semente no momento de excisão dos embriões. Em *Citrus* também já foram observadas grandes variações na tolerância à dessecação entre espécies (HOR et al., 2005).

O desenvolvimento das plântulas após a germinação também foi afetado pela desidratação dos embriões. O comprimento da parte aérea diminuiu na medida em que se aumentou o tempo de desidratação dos embriões (Gráfico 3).

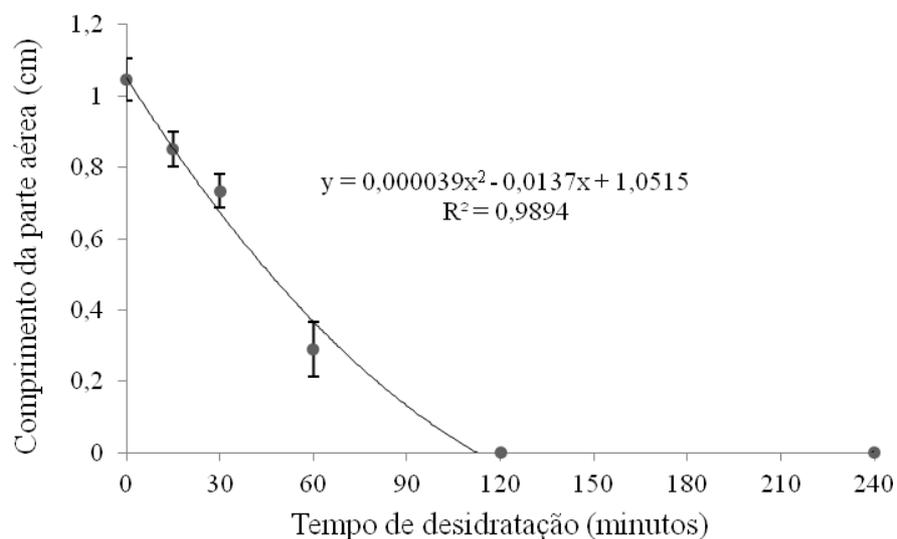


Gráfico 3 Comprimento da parte aérea de plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho obtidas a partir da germinação de embriões zigóticos desidratados em sílica gel por diferentes tempos após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS

O mesmo padrão foi observado no comprimento da raiz, que diminuiu na medida em que se aumentou o tempo de desidratação (Gráfico 4)

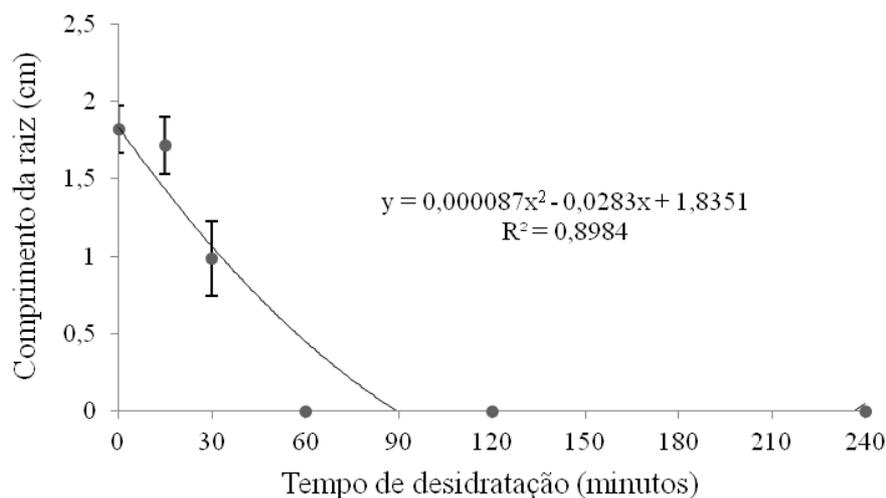


Gráfico 4 Comprimento da raiz de plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho obtidas a partir da germinação de embriões zigóticos desidratados em sílica gel por diferentes tempos após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS

Esses resultados demonstram que a desidratação dos embriões afeta o desenvolvimento das plântulas após a germinação. Com 23% de umidade (60 minutos) além da taxa de germinação ter diminuído a formação das plântulas foi significativamente afetada, não apresentando formação de raízes e parte aérea normais.

O mesmo foi observado por Sershen, Pammenter e Berjak (2011) na desidratação de embriões zigóticos de *Haemanthus montanus*. Plântulas que se desenvolveram a partir de embriões zigóticos desidratados até um grau de umidade de 22% apresentaram uma redução de 48% na biomassa total após 60 dias de cultivo quando comparadas com plântulas vindas de embriões não desidratados. Com a diminuição do grau de umidade para 10% a redução da biomassa total aumentou para 63%.

3.1.3 Congelamento dos embriões zigóticos

Embriões viáveis após a criopreservação foram obtidos quando estes foram previamente desidratados antes do congelamento. Com o início da desidratação dos embriões pôde ser observado o aumento da taxa de germinação atingindo o ponto máximo, 98% de germinação dos embriões, aos 117 minutos com o grau de umidade por volta de 20%. A partir deste ponto a germinação começou a diminuir chegando a zerar a taxa de germinação aos 240 minutos (Gráfico 5).

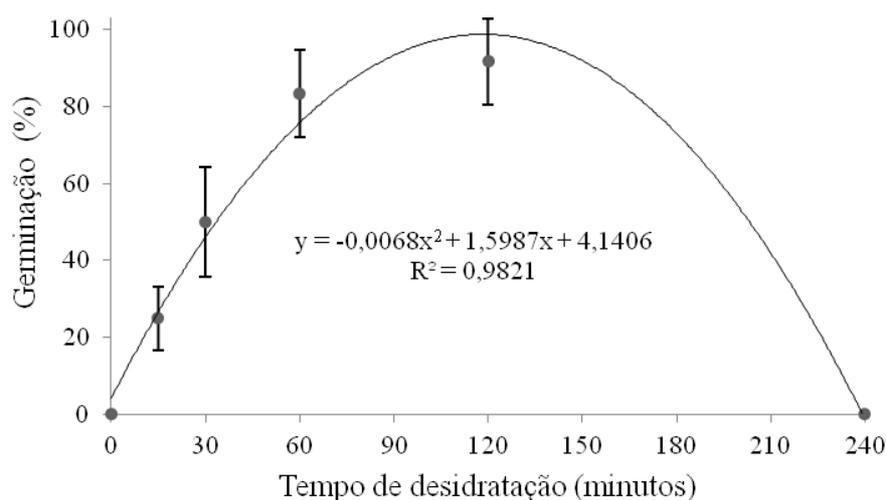


Gráfico 5 Porcentagem de germinação, após 7 dias de cultivo *in vitro* em meio MS, de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho desidratados em sílica gel por diferentes tempos e criopreservados em nitrogênio líquido (-196°C) por 24 horas

Quando os embriões zigóticos foram criopreservados sem a desidratação prévia em sílica gel houve morte de 100% dos embriões, isto demonstra que devido à presença de grandes quantidades de água no interior da célula

possivelmente ocorreu a formação de grandes cristais de gelo que causaram danos à membrana plasmática e a conseqüente morte das células.

A diminuição da quantidade de água no interior da célula proporcionada pela desidratação dos embriões causou um aumento na concentração dos solutos no interior das células permitindo que houvesse a formação do estado vítreo ao invés da cristalização dos solutos internos durante o congelamento.

No estado vítreo forma-se um sistema amorfo que, apesar de não possuir uma estrutura organizada possui propriedades mecânicas e físicas de um sólido sem, no entanto ser capaz de danificar as membranas celulares permitindo assim a sobrevivência dos embriões (WOWK, 2010).

A queda na taxa de germinação a partir dos 117 minutos de desidratação provavelmente ocorreu devido à diminuição da água intercelular em níveis danosos à célula, evidenciando a necessidade de se equilibrar a taxa de desidratação das células até uma quantidade mínima de água que permita a formação do estado vítreo, mas que não prejudique os processos metabólicos celulares.

Quando a germinação dos embriões zigóticos apenas desidratados é comparada com a germinação dos embriões criopreservados observa-se uma diferença na germinação com umidade próxima a 20%. No caso dos embriões apenas desidratados não houve germinação de nenhum embrião, porém quando os embriões foram desidratados a esse grau de umidade e então criopreservados a sobrevivência dos embriões após o descongelamento e reidratação osmocondicionada chegou a mais de 90%. Essa diferença marcante na germinação pode ter acontecido devido à ausência da etapa de reidratação nos embriões apenas desidratados. Como o grau de umidade era muito baixo e não houve a reidratação lenta dos embriões a entrada brusca de água nas células pode ter causado danos à membrana celular levando à morte as células. Já após a

criopreservação e reidratação osmocondicionada esse dano não deve ter ocorrido.

Dussert et al. (2000) destacam o benefício do osmocondicionamento após o descongelamento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.), a taxa de germinação das sementes que passaram pela reidratação osmocondicionada antes da germinação foi de 64-74%, enquanto aquelas que não passaram pelo osmocondicionamento foram de apenas 13-16%.

O comprimento da parte aérea também foi afetado pelo tempo de desidratação dos embriões antes da criopreservação (Gráfico 6) seguindo a mesma tendência apresentada pela curva de germinação dos embriões.

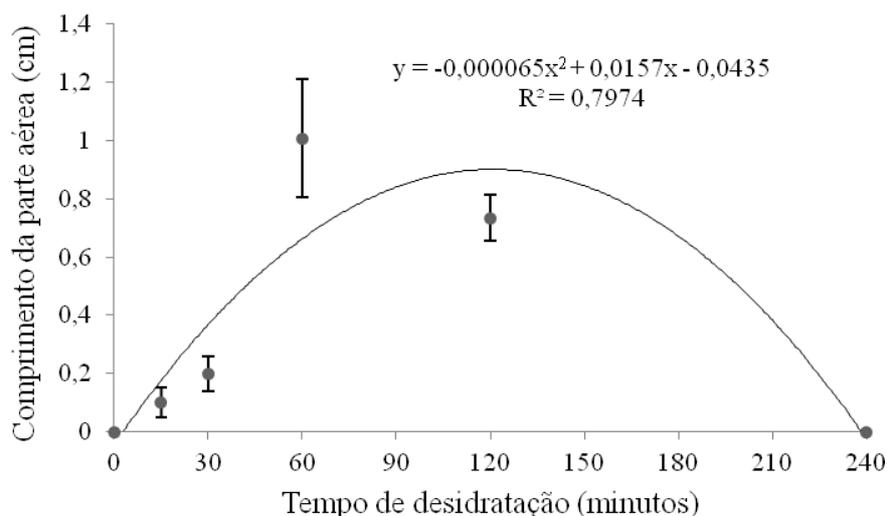


Gráfico 6 Comprimento da parte aérea de plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho com 30 dias de cultivo *in vitro* (meio MS) obtidas a partir da germinação de embriões zigóticos desidratados em sílica gel por diferentes tempos e criopreservados em nitrogênio líquido (-196°C) por 24 horas

O máximo comprimento da parte aérea (0,9 cm) foi obtido com 120 minutos de desidratação próximo ao tempo de desidratação em que foi obtida maior taxa de germinação (117 min.)

Quanto ao comprimento das raízes o valor máximo obtido foi de 1,93 cm quando os embriões foram desidratados por 60 minutos (Gráfico 7).

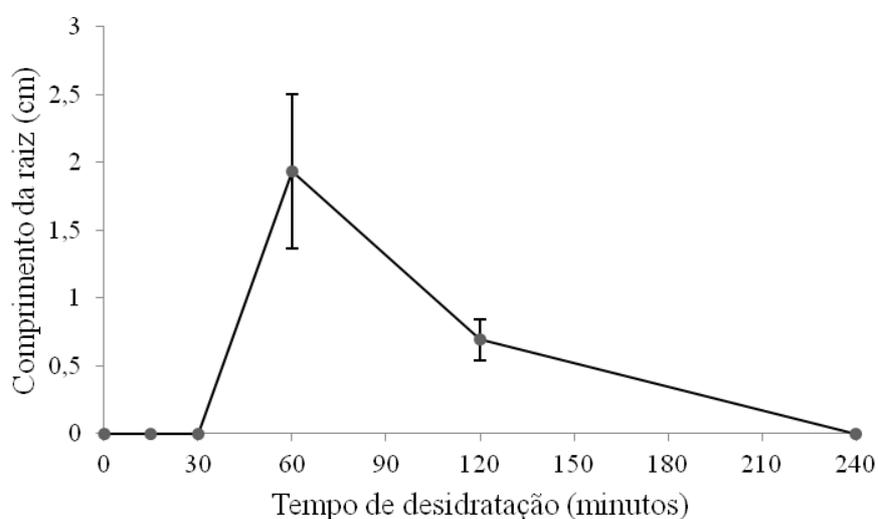


Gráfico 7 Comprimento da raiz de plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho com 30 dias de cultivo *in vitro* (meio MS) obtidas a partir da germinação de embriões zigóticos desidratados em sílica gel por 0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos e criopreservados em nitrogênio líquido (-196°C) por 24 horas

Após 120 minutos de desidratação o comprimento médio das raízes foi menor 0,69 cm. Já nos demais tempos de desidratação não foi observado desenvolvimento de raízes.

Uma vez que foram consideradas plântulas normais aquelas em que se observou o desenvolvimento de parte aérea e raízes, os resultados observados seguiram a mesma tendência observada para formação de raízes. A máxima porcentagem de plântulas normais foi de 75% no tratamento em que os embriões

foram desidratados por 60 minutos, já aos 120 minutos de desidratação essa porcentagem caiu para 41% (Gráfico 8).

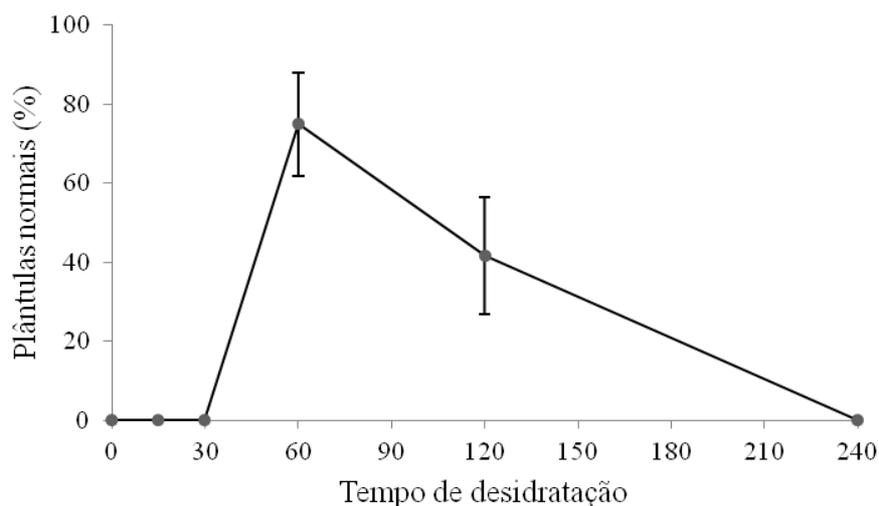


Gráfico 8 Porcentagem de plântulas normais, formadas a partir de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho desidratados em sílica gel por 0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos e criopreservados em nitrogênio líquido (-196°C) por 24 horas, após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio MS

Apesar da taxa de germinação aos 120 minutos de desidratação ter sido próxima a 90% observa-se que a alta desidratação dos embriões (20% de umidade) afetou a formação de plântulas normais, principalmente devido à má formação das raízes e parte aérea (Figura 1).

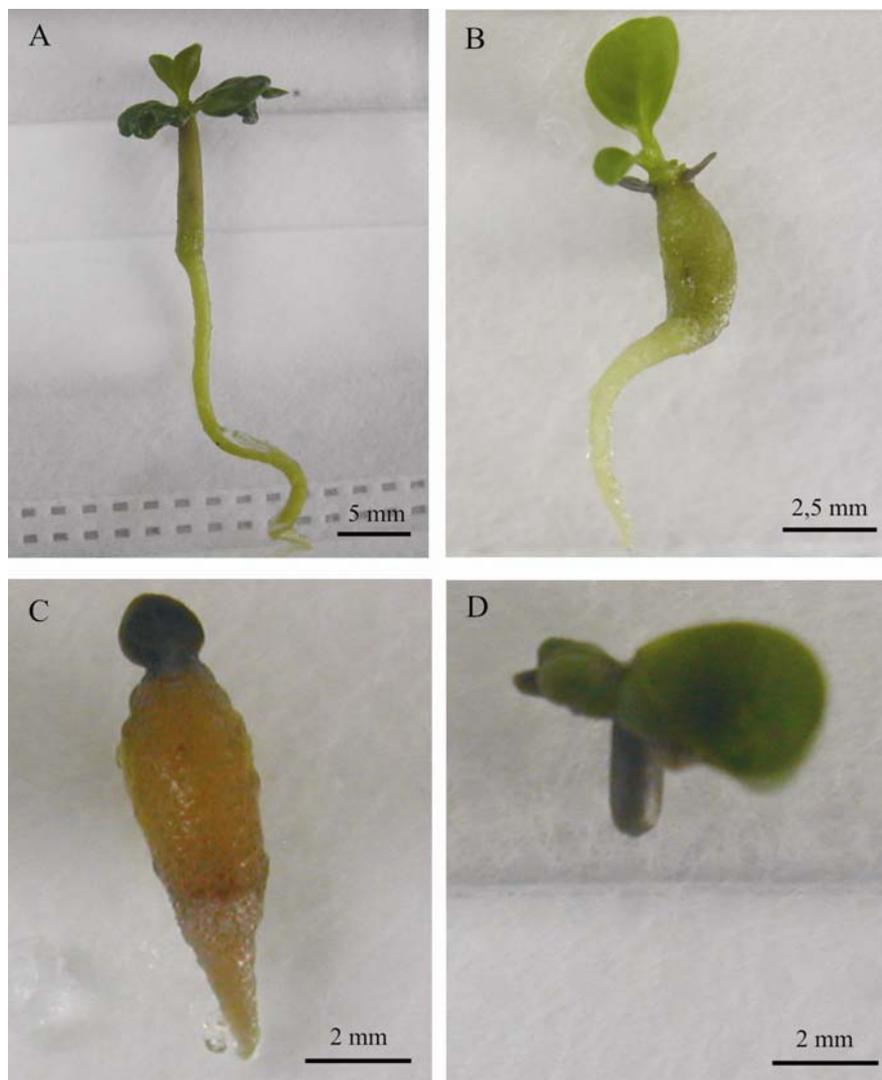


Figura 1 Plântulas normais provenientes da germinação de embriões zigóticos fresco (A) e desidratados e criopreservados (B). Má formação de parte aérea (C) e raiz (D) de plântulas provenientes da germinação de embriões zigóticos desidratados e criopreservados de *Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho

3.1.4 Teste de tetrazólio

Em geral, testes de coloração de tecidos como o teste de tetrazólio tendem a subestimar a viabilidade de sementes e embriões. Neste caso, a curva formada pela análise da viabilidade pelo teste de tetrazólio seguiu a mesma tendência da curva de germinação, entretanto o ponto máximo de viabilidade acontece aos 108 minutos com viabilidade de 60% (Gráfico 9), bem mais baixa que a encontrada por meio do teste de germinação no mesmo tempo de desidratação (97%) (Gráfico 5).

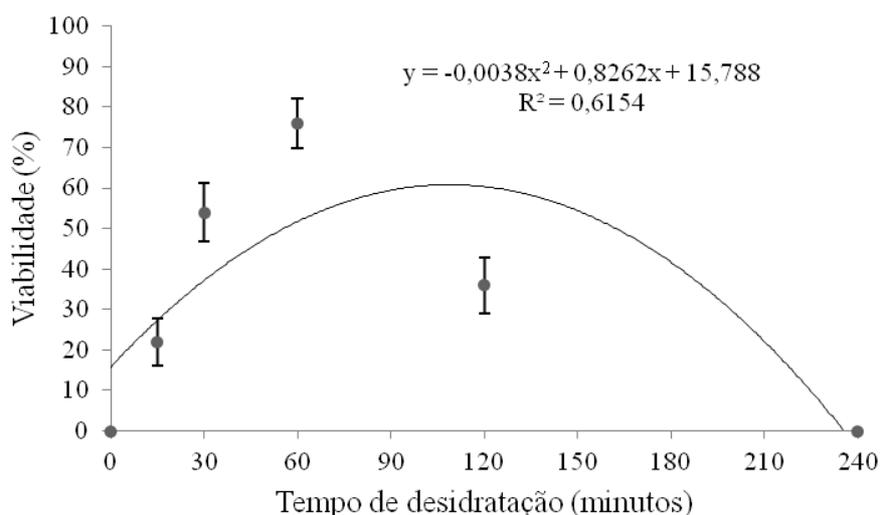


Gráfico 9 Viabilidade dos embriões zigóticos avaliados pelo teste de tetrazólio após desidratação por 0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos e criopreservação por 24 horas a -196°C por 24 horas

Apesar de a viabilidade ter sido mais baixa no teste de tetrazólio que no teste de germinação ela está mais próxima à taxa de formação de plântulas normais.

No caso da criopreservação, a recuperação dos tecidos após o congelamento envolve complexos eventos, como a morte de células em algumas partes mais danificadas do tecido e recuperação de tecidos menos danificados levando a recuperação aparentemente normal do metabolismo e formação da plântula (SERSHEN; PAMMENTER; WESLEY-SMITH, 2011). Essa capacidade de tecidos danificados recuperarem-se ou não após o descongelamento pode explicar a diferença na viabilidade dos embriões avaliados por meio da germinação *in vitro* e pelo teste de tetrazólio em teores de umidade mais baixos.

O vigor dos embriões avaliados por esse teste também foi extremamente baixo 26% aos 60 minutos, não condizendo com a germinação e formação de plântulas normais no mesmo tempo de desidratação (Gráfico 10).

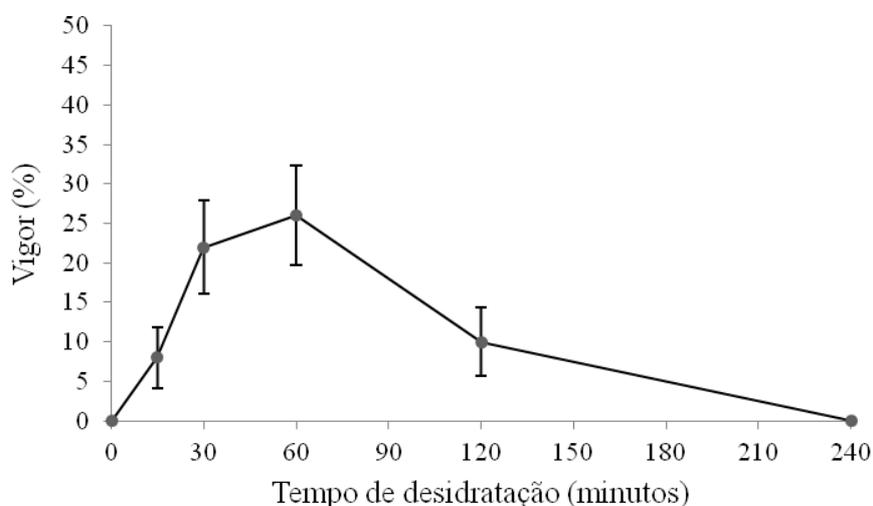


Gráfico 10 Porcentagem de embriões vigorosos avaliados pelo teste de tetrazólio após desidratação por 0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos e criopreservação por 24 horas a -196°C por 24 horas

Apesar do teste de tetrazólio subestimar a viabilidade dos embriões após a criopreservação ele nos dá uma resposta rápida sobre a sobrevivência do explante e uma ideia sobre os tempos de desidratação eficientes para a criopreservação. Porém, não é aconselhável sua utilização para uma resposta definitiva sobre a viabilidade pós-criopreservação, uma vez que a avaliação definitiva da viabilidade só é possível pela análise da germinação dos embriões e formação de plântulas normais (NORMAH; MAKEEN, 2007).

Na figura abaixo pode ser observada a coloração dos embriões zigóticos após o teste de tetrazólio (Figura 2).

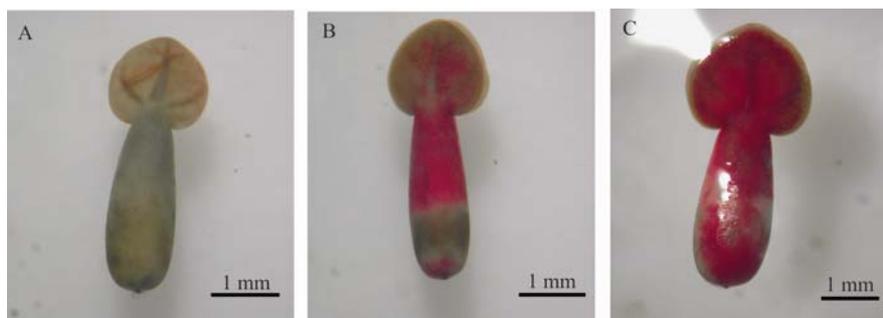


Figura 2 Embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho inviável (A), Viável não vigoroso (B) e Viável vigoroso (C)

3.1.5 Aclimatização

Durante os 35 dias de aclimatização não foi observada a morte de plântulas em nenhum dos tratamentos, demonstrando que a desidratação e criopreservação dos embriões zigóticos não afeta a taxa de sobrevivência durante a aclimatização das plântulas (Figura 3).

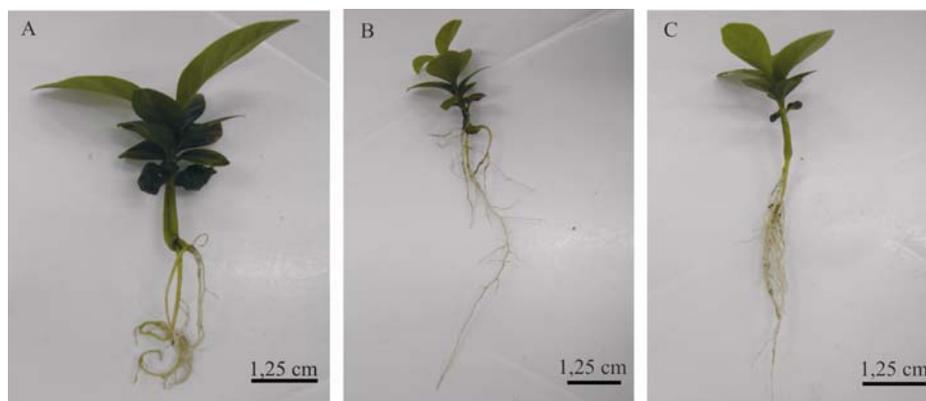


Figura 3 Aspecto das plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho após a aclimatização por 35 dias: A – Plântula proveniente da germinação de embrião zigótico fresco (controle), B – Plântula proveniente da germinação de embrião zigótico desidratado (30 minutos) C – Plântula proveniente da germinação de embrião zigótico desidratado (60 minutos) e criopreservado

Em plântulas de mamoeiro provenientes de gemas apicais criopreservadas também não foram observadas diferenças significativas na sobrevivência durante a aclimatização de plântulas vindas de embriões criopreservados e aquelas provenientes do controle (KAITY; ASHMORE; DREW, 2009).

Não foram observadas diferenças fenotípicas (forma da folha, coloração das plântulas, má formação de órgãos) aparentes entre as plantas desidratadas e criopreservadas e o controle. O desenvolvimento normal de plântulas de coqueiro provenientes de embriões desidratados e criopreservados foi descrito por Sisunander et al. (2010), não sendo observadas diferenças fenotípicas após 16 semanas de aclimatização. Entretanto o desenvolvimento das plântulas tanto em casa de vegetação quanto em campo deverá ser posteriormente acompanhado uma vez que já foram observadas diferenças fenotípicas em órgãos reprodutivos após a criopreservação (FUKAI; GOI; TANAKA, 1994).

Com relação ao desenvolvimento do sistema radicular antes da aclimatização não foi observada diferença significativa para o comprimento da

raiz entre os tratamentos, entretanto após 35 de aclimatização essa diferença pôde ser observada. Após os 35 dias de aclimatização, o comprimento da raiz de plântulas vindas de embriões criopreservados (5,64 cm) foi estatisticamente maior que de plântulas vindas de embriões frescos (4,52 cm) ou apenas desidratados (4,6 cm) (Gráfico 11).

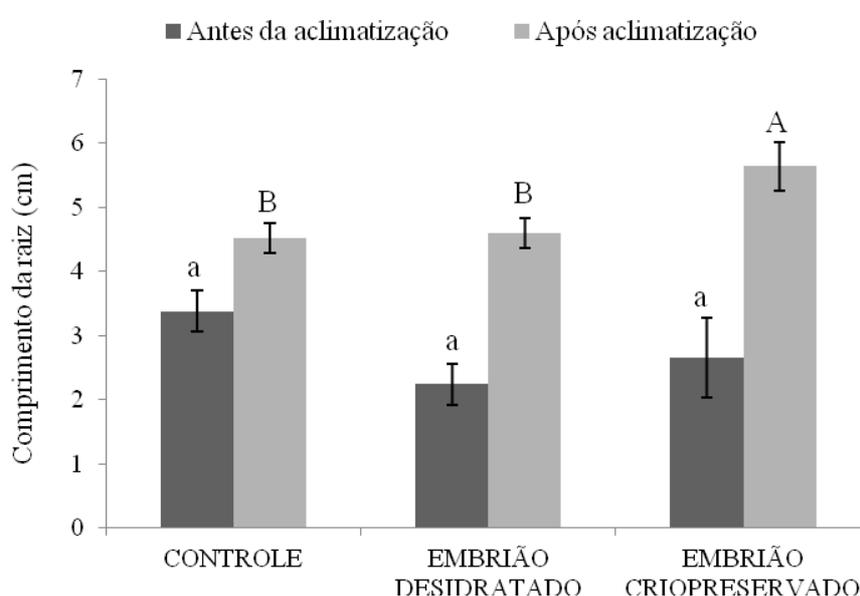


Gráfico 11 Comprimento médio da raiz de plântulas de cafeeiro cv. Catuaí Vermelho provenientes de embriões frescos, desidratados e criopreservados antes e após a aclimatização (35 dias)

Com relação ao número de raízes não foi observada diferença significativa entre os tratamentos nem antes nem depois da aclimatização.

O comprimento da parte aérea antes da aclimatização apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que plântulas oriundas de embriões desidratados apresentaram menor comprimento da parte aérea (1,42 cm) que as plântulas do controle (1,75 cm), ambos não diferindo estatisticamente das plântulas oriundas de embriões criopreservados (1,6 cm).

Após 35 dias de aclimatização o comprimento da parte aérea de embriões criopreservados foi estatisticamente superior (2,39 cm) que de embriões apenas desidratados (1,96 cm), ambos não diferindo do controle (2,16 cm) (Gráfico 12).

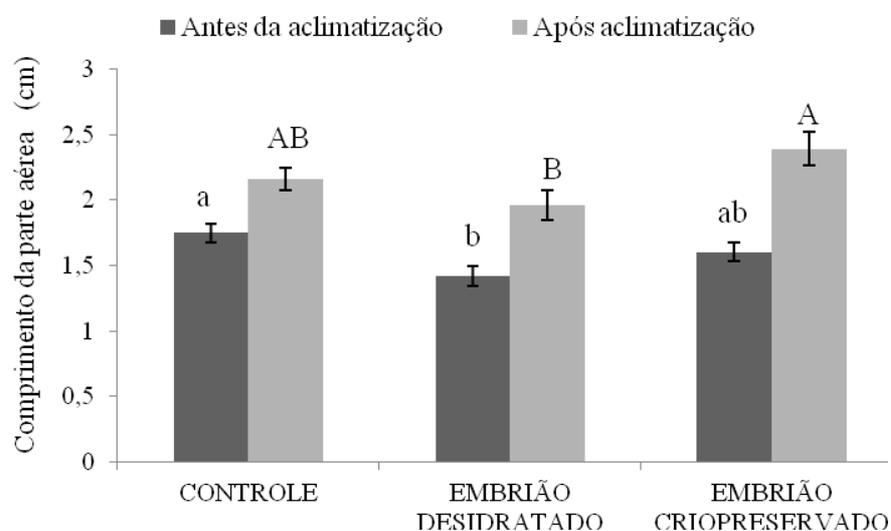


Gráfico 12 Comprimento médio da parte aérea de cafeeiro cv. Catuaí Vermelho provenientes de embriões frescos, desidratados e criopreservados antes e após a aclimatização (35 dias)

Para o número de folhas, tanto antes quanto após a aclimatização, não foram observadas diferenças estatísticas. Obtendo-se uma média geral de 9,3 folhas por explante.

Com relação à massa fresca das plântulas após a aclimatização, foram observadas diferenças estatísticas. Da mesma forma que observada para o comprimento das raízes a massa fresca das plântulas oriundas de embriões criopreservados (0,254 g) foi superior à massa fresca de plântulas oriundas de

embriões apenas desidratados (0,136 g), ambos não diferindo do controle (0,195 g) (Gráfico 13).

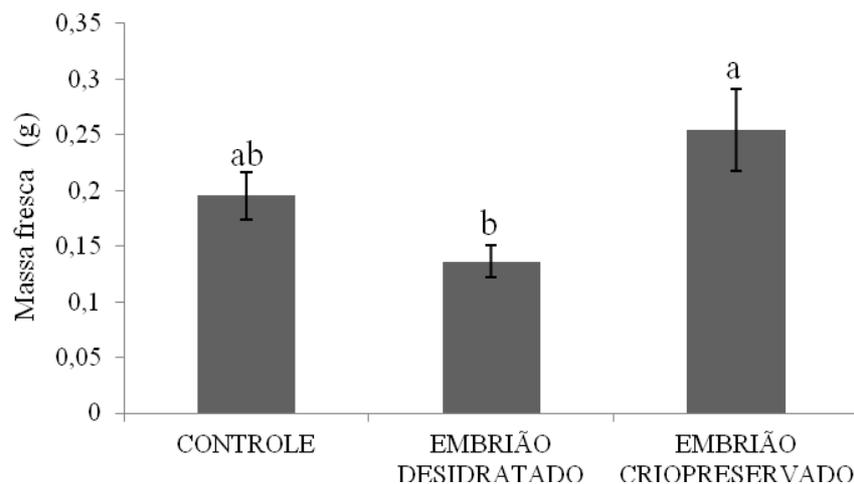


Gráfico 13 Massa fresca de plântulas de cafeeiro cv. Catuai Vermelho provenientes de embriões frescos, desidratados e criopreservados após a aclimatização (35 dias)

Em plantas de *Solanum tuberosum* regeneradas a partir de gemas apicais criopreservadas foi observado aumento do peso comparado com as plantas controles (HARDING; BENSON, 1994). Já plântulas de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) provenientes de embriões desidratados e criopreservados apesar de apresentarem desenvolvimento normal durante a aclimatização, seu crescimento foi mais lento que o de plântulas provenientes de embriões frescos. Entretanto não se observou diferença no comprimento da parte aérea, no número de folhas nem de raízes primárias.

3.2 Criopreservação de embriões somáticos

3.2.1 Desidratação de embriões somáticos

Embriões somáticos não desidratados apresentaram uma taxa de germinação de 66%, porém após a desidratação por 60 ou 120 minutos não foi observada a germinação de nenhum embrião somático demonstrando que embriões somáticos são mais sensíveis à desidratação que embriões zigóticos.

3.2.2 Congelamento de embriões somáticos

A criopreservação de embriões somáticos de *Coffea arabica* da cv. Catuaí Vermelho não foi possível através das técnicas utilizadas. Devido à grande sensibilidade dos embriões à desidratação, àqueles que foram previamente desidratados antes da criopreservação não foram capazes de sobreviver após o congelamento.

Embriões criopreservados sem prévia desidratação também não sobreviveram ao congelamento, possivelmente devido ao alto teor de umidade de suas células que possibilitaram a formação de cristais de gelo letais.

Abdelnour et al. (1993) também não obtiveram sucesso na criopreservação de embriões somáticos de *Coffea arabica* L. var. Catimor utilizando desidratação em câmara de fluxo laminar antes da criopreservação através do congelamento rápido.

A criopreservação de embriões somáticos de *Coffea arabica* L. foi possível através da desidratação dos embriões em câmara de fluxo laminar por uma hora seguida de congelamento rápido em nitrogênio líquido. Neste trabalho, entretanto, a temperatura do nitrogênio líquido foi reduzida de -196°C para -210°C por meio de vácuo, possibilitando a sobrevivência de 70% dos embriões

após a desidratação em meio de cultura líquido a 37°C por 2 a 3 minutos (MYCOCK; WESLEY-SMITH; BERJAK, 1995).

4 CONCLUSÃO

Embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho são capazes de germinar após desidratação a um grau de umidade de até 23%.

A desidratação de embriões zigóticos em sílica gel favorece a sobrevivência dos embriões zigóticos após a criopreservação, atingindo o máximo de germinação de 98% com grau de umidade de aproximadamente 20% aos 117 minutos de desidratação.

A máxima viabilidade alcançada através do teste de tetrazólio após a criopreservação foi de 60% aos 108 minutos e o máximo vigor de 26% aos 60 minutos.

A aclimatização das plântulas provenientes de embriões zigóticos criopreservados pode ser feita com sucesso obtendo 100% de sobrevivência. Nesta fase não foram observadas alterações em plântulas provenientes de embriões frescos, desidratados ou desidratados e criopreservados.

Não é possível a criopreservação de embriões somáticos diretos de cafeeiro obtidos a partir de folhas cotiledonares através das técnicas utilizadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS

ABDELNOUR, A. et al. Zygotic and somatic embryo cryopreservation in coffee (*Coffea arabica*, *C. canephora* and Arabusta). In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15., 1993, Paris.

Quinzième colloque scientifique international sur le café. Montpellier: Asic, 1993. p. 751 - 753.

ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; VILLALOBOS, V.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 13, n. 5, p. 297-302, 1992.

ANDRADE, L. M. C. O. et al. Cultura *in vitro* de embriões de *Coffea arabica*: influência de NAA e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1063-1070, set./out. 2001.

DUSSERT, S. et al. Beneficial effect of post-thawing osmoconditioning on the recovery of cryopreserved coffee (*Coffea arabica* L.) seeds. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 21, n. 1, p. 47-52, Jan./Feb. 2000.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./Dec. 2011.

FUKAI, S.; GOI, M.; TANAKA, M. The chimeric structure of the apical dome of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat) Kitam) is affected by cryopreservation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 57, p. 347-351, 1994.

HARDING, K.; BENSON, E. E. A study of growth, flowering and tuberisation in plants derived from cryopreserved potato shoot tips: implications for in vitro germplasm collections. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 15, n. 1, p. 59-66, Jan./Feb. 1994.

HOR, Y. L. et al. Optimal hydration status for cryopreservation of intermediate oily seeds: citrus as a case study. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, p. 1153-1161, Mar. 2005.

KAITY, A.; ASHMORE, S. E.; DREW, R. A. Field performance evaluation and genetic integrity assessment of cryopreserved papaya clones. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, n. 9, p. 1421-1430, Sept. 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Apr. 1962.

MYCOCK, D. J.; WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P. Cryopreservation of somatic embryos of four species with and without cryoprotectant pre-treatment. **Annals of Botany**, London, v. 75, n. 4, p.331-336, Apr. 1995.

NORMAH, M. N.; MAKEEN, A. M. Cryopreservation of excised embryos and embryonic axes. In: REED, B. M. **Plant Cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2007. p. 211-220.

SERSHEN, P. B.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Effects of partial dehydration of recalcitrant *Haemanthus montanus* zygotic embryos on vigour of recovered seedlings. **South Africa Journal of Botany**, South Africa, v. 77, p. 193-202, Jan. 2011.

SERSHEN, P. B.; PAMMENTER, N. W.; WESLEY-SMITH, J. The effects of various parameters during processing for cryopreservation on the ultrastructure and viability of recalcitrant zygotic embryos of *Amaryllis belladonna*. **Protoplasma**, New York, v. 249, n. 1, p. 155-169, Dec. 2011. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/nk0348155x10rn47/>>. Acesso em: 22 dez. 2011.

SISUNANDAR et al. Dehydration improves cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cryobiology**, San Diego, v. 61, p. 289-296, Oct. 2010.

STEINMACHER, D. A. et al. Cryopreservation of peach palm zygotic embryos. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 28, n. 1, p. 13-22, Jan./Feb. 2007.

WALTERS, C.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Desiccation damage, accelerated aging and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 11, p. 135-148, 2001.

WEN, B.; WANG, R. Pretreatment incubation for culture and cryopreservation of Sabal embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, n. 2, p. 237-243, Aug. 2010.

WOWK, B. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**, San Diego, v. 60, n. 1, p. 11-22, Feb. 2010.

ZONTA, J. B. et al. Comparação de metodologias do teste de tetrazólio para sementes de cafeeiro. **Idesia**, Arica, v. 27, n. 2, p. 17-23, maio/ago. 2009.