

## **BAP e 2,4-D na diferenciação de calos em anteras de *Coffea arabica*.**

Luz, José Magno Queiroz<sup>1</sup>; Silva, Adelaide Siqueira<sup>1</sup>; Bittar, Cecília Alves<sup>1</sup>; Lino, Leandro de Oliveira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia (ICIAG-UFU), Campus Umuarama, Caixa Postal 593, CEP 38400-902Uberlândia, Minas Gerais, fone (34) 3218-2225, email: [jmagno@umuarama.ufu.br](mailto:jmagno@umuarama.ufu.br).

### **INTRODUÇÃO**

O Brasil é o maior exportador mundial de café com aproximadamente dez milhões de pessoas envolvidas direta ou indiretamente com este agronegócio (USDA/FNP, 2005). O melhoramento genético do cafeeiro por meio de métodos convencionais, é um processo demorado, podendo levar mais de 30 anos para se obter uma nova cultivar, e pelo fato do cafeeiro ser uma espécie perene, de ciclo longo e porte arbustivo, as dificuldades práticas do melhoramento genético referem-se, principalmente, ao tempo e à extensão da área experimental necessários para o desenvolvimento de variedades (Almeida et al., 2000). Além de ser um processo demorado e trabalhoso, a eficiência da seleção nas primeiras gerações de autofecundação é muito baixa devido, principalmente, à ocorrência de alelos dominantes em heterozigose.

A redução deste tempo é possível por meio da produção de linhagens homozigóticas oriundas de dihaplóides (Araújo, 2004). Existem alguns métodos para a obtenção de dihaplóides, cuja eficiência é variável de acordo com a espécie. Uma das técnicas é a cultura de anteras, a qual tem se mostrado eficiente para diversas espécies, sendo uma alternativa para acelerar os programas de melhoramento genético na cultura do cafeeiro. Ela é considerada uma ferramenta importante, uma vez que pode auxiliar no melhoramento da cultura, permitindo a obtenção de haplóides em gerações segregantes, o que leva a rápida produção de plantas homozigóticas através da duplicação do número de cromossomos numa única etapa, substituindo as gerações de autofecundação.

Diante do exposto, por meio da cultura de anteras, o objetivo deste trabalho foi regenerar calos em anteras de *Coffea arabica* L. com o uso dos reguladores de crescimento BAP e 2,4-D.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado no laboratório de Biotecnologia/Cultura de Tecidos do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG) da Universidade Federal de Uberlândia. Foi utilizado o genótipo de cafeeiro de *Coffea arabica* Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44 plantado na área experimental da Universidade Federal de Uberlândia.

Os botões florais foram coletados por volta de 8:00 horas quando estavam com tamanho de 4,5 a 6,0mm correspondendo à anteras contendo micrósporos uninucleados, segundo Silva et al. (2004), depois foram mantidos em placas de Petri com papel de filtro umedecido para evitar a desidratação dos mesmos. Já no laboratório, os botões foram medidos e selecionados com o auxílio de um paquímetro e enrolados em uma gase para posterior desinfestação que foi feita em álcool 70% por 20 segundos e hipoclorito de sódio (2%) por 10 minutos sob agitação.

Em câmara de fluxo laminar foram lavados três vezes em água destilada e autoclavada. As anteras foram retiradas dos botões florais através de uma incisão em um dos seus lados com o auxílio de estereomicroscópio, pinça e bisturi; sendo os últimos flambados a cada novo botão. Posteriormente as anteras eram imersas por 1 segundo, antes de serem inoculadas, em uma solução de ácido ascórbico na concentração de 600 mgL<sup>-1</sup>, em hipoclorito de sódio à 0,2% e por fim em água destilada e autoclavada, respectivamente.

Para a obtenção dos calos, as anteras foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo 20 ml do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com pH ajustado para 5,9,

adicionado de 7 g/L de ágar e previamente autoclavado, suplementado com o regulador de crescimento 2,4-D na concentração de 2 mgL<sup>-1</sup>. As inoculações das anteras ocorreram a partir das 1<sup>as</sup> semanas com florada. O material foi mantido em sala de crescimento com 25 ± 2°C na ausência de luz.

Após 90 dias da inoculação, os calos obtidos foram sub-cultivados para o meio de cultura sólido MS, acrescido de diferentes concentrações de BAP (0,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mgL<sup>-1</sup>) e 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mgL<sup>-1</sup>) e foram transferidos para sala de crescimento sob condições de obscuridade, com temperatura de 26°C. As avaliações foram realizadas aos 90 dias após a instalação do experimento, analisando as seguintes características: número de calos embriogênicos (CE), número de calos friáveis (CF), e diâmetro de calos (cm).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial de 4x4, com 6 repetições, sendo cada tubo de ensaio contendo um calo, considerado uma parcela. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização dos programas PROPHET, onde os resíduos não apresentaram distribuição normal e as variâncias não foram homogêneas, e transformados em  $\sqrt{x + 1/2}$ ; aplicação do teste Qui-Quadrado, a 5% de probabilidade e SISVAR para o teste de Tukey na comparação das médias com relação aos tratamentos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teste de significância estatística do quiquadrado realizado para calos friáveis da cv. Catuaí Vermelho 44 mostrou que de maneira geral aos 90 dias de cultivo o 2,4-D sozinho ou combinado com concentrações iguais ou próximas de BAP, foram os que apresentaram um número maior de calos friáveis, com exceção dos tratamentos com alta concentração de BAP (8 mgL<sup>-1</sup>) (Tabela 1). No entanto, estes últimos tratamentos não induziram a formação de pró-embrióides nos calos (Tabela 1). Calos friáveis e formação de pró-embrióides também foram encontrados por Figueira et al. (2005) em anteras de café em meio MS com 2 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D, obtendo 19,8% de pró-embrióides, sendo 21,5% pertencentes ao cv. Mundo Novo e 17,6% ao Catuaí Vermelho 44, tendo estas estruturas maiores índices quando estavam na ausência de AgNO<sub>3</sub>.

Com relação ao diâmetro dos calos não foi detectada diferença significativa entre os tratamentos. Silva & Ferreira (2006) obtiveram resultados semelhantes ao deste trabalho com a utilização de BAP na indução à embriogênese somática em calos oriundos de anteras de café; os autores também não verificaram diferença significativa entre seus tratamentos quanto à variável diâmetro; mas ao contrário deste trabalho, eles tiveram embriões somáticos que posteriormente foram regenerados.

Tabela 1. Valores de qui-quadrado para os calos friáveis e calos com pró-embriões em anteras da cultivar Catuaí Vermelho 44 aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamentos (BAP + 2,4-D/mgL <sup>-1</sup> )	Número de calos friáveis	fo-fe/fé*	Número de calos com pró- embriões	fo-fe/fe**
T1 (0 + 0)	1	0,796053	1	0,017857
T2 (0 + 1)	1	0,796053	3	5,160714
T3 (0 + 2)	4	1,111842	2	1,446429
T4 (0 + 4)	3	0,164474	1	0,017857
T5 (2 + 0)	3	0,164474	0	0,875
T6 (2 + 1)	3	0,164474	0	0,875
T7 (2 + 2)	4	1,111842	1	0,017857
T8 (2 + 4)	0	2,375	1	0,017857
T9 (4 + 0)	1	0,796053	2	1,446429
T10 (4 + 1)	2	0,059211	0	0,875
T11 (4 + 2)	3	0,164474	1	0,017857
T12 (4 + 4)	1	0,796053	2	1,446429
T13 (8 + 0)	2	0,059211	0	0,875
T14 (8 + 1)	4	1,111842	0	0,875
T15 (8 + 2)	3	0,164474	0	0,875
T16 (8 + 4)	3	0,164474	0	0,875
	38	10	14	15,71429

\* Apenas diferenças > ou = a 2 são significativas

\*\* Apenas diferenças > ou = a 3 são significativas

## CONCLUSÕES

2,4-D sozinho ou combinado com BAP em concentrações iguais ou próximas, é capaz de promover a formação de calos friáveis com pró-embriões.

Os reguladores BAP e 2,4-D não foram eficientes no desenvolvimento dos pró-embriões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. A. S.; SIMIONI, K. C.; FAZUOLI, L. C.; RAMOS, L. C. S. Indução de calos de explantes foliares de genótipos de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos....** Poços de Caldas: EMBRAPA/CAFÉ, 2000. v. 1, p. 145-147.

ARAÚJO, J. S. de. **Calogênese em anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L.** 2004. 41p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

FIGUEIRA, E.R.; LONDE, L.N.; SILVA, A.S.; MARQUES, R.V.; MARQUES, S.V.; LUZ, J.M.Q. Influência do 2,4-D, nitrato de prata e ácido acetilsalicílico no cultivo in vitro de anteras de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) In: 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 15 CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS E 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 23, 2. 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: CBCEARÁ, 2005. p.595.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**. Copenhagen, v.15, n.3, p.473-479, 1962.

SILVA, A. S.; LUZ, J. M. Q.; FIGUEIRA, E. R.; LONDE, L. N.; SANTANA, D. G.; MUSTAFÁ, P. C. V.; PASQUAL, M. Relação entre os estádios de desenvolvimento dos micrósporos e as características morfológicas do botão floral para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Revista Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 20, n. 1, p. 41-46, jan./abr., 2004.

SILVA, H.E., FERREIRA, G.B. **Efeito de diferentes concentrações de BAP na Indução de embriões somáticos em calos oriundos de anteras de café.** In: CONGRESSO REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA – AVANÇOS E APLICAÇÕES, 2006, Uberlândia, **Anais...** Uberlândia: UFU, 2006. p. 38.

USDA/FNP. **Agrianual 2005 Mercado e Perspectiva**, 2005. p. 241-242

#### PALAVRAS-CHAVE

*Coffea arabica*; cultura de anteras; calogênese; reguladores de crescimento.

#### AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG pelo auxílio financeiro e ao CNPq pela concessão de bolsa.