

## Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* em função dos reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ.

Luz, José Magno Queiroz<sup>1</sup>; Marques, Soraia Viegas<sup>1</sup>; Marques, Raquel Viegas<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

Por se tratar de cultura perene propagada via semente, os programas de melhoramento do cafeeiro *Coffea arabica* demandam aproximadamente 25 anos desde a hibridação até a obtenção de uma nova variedade. Sendo assim, a cultura de anteras é considerada uma ferramenta importante, uma vez que pode auxiliar no melhoramento da cultura, pois permite 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. Além dos haplóides serem livres dos problemas de dominância e recessividade, por possuir apenas um alelo em cada loco gênico, acelerando drasticamente o processo de obtenção de novas cultivares (Andrade, 1998).

No Brasil, o *C. arabica* apresenta poucos progressos com relação à aplicação da cultura de anteras. Com isso objetivou-se com este trabalho avaliar, em diferentes épocas, o efeito dos reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ na indução de calos em anteras de *Coffea arabica*.

### 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.

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 os reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ nas combinações das concentrações 2, 4, 6 e 8 mgL<sup>-1</sup> x 0 e 0,5 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente. 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 e presença de luz.

Após 30, 60 e 90 dias da inoculação dos explantes, foram avaliadas as variáveis oxidação e calosidade assim como a interferência dos dias nas mesmas.

Utilizou-se o delineamento experimental de blocos casualizados, em esquema fatorial 4 x 2 x 3 (concentrações de 2,4-D e TDZ, respectivamente e época de avaliação)

### AGRADECIMENTOS

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

com quatro repetições por tratamento, sendo cada três tubos uma repetição, com cinco anteras por tubo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização do programa SANEST e as médias das concentrações de TDZ foram analisados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e as concentrações de 2,4-D e o fator época de avaliação foram analisadas por regressão polinomial.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contaminação se manteve baixa em todo o experimento não interferindo nos resultados. Com relação à variável oxidação, as combinações dos reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ não diferiram estatisticamente. Porém a que apresentou o maior número de anteras oxidadas foi a concentração de 8 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D associada à 0,5 mgL<sup>-1</sup> de TDZ.

A alta concentração do regulador 2,4-D pode ter influenciado numa maior oxidação. Giri et al. (1993) afirmaram que a presença de 2,4-D no meio de cultura está associada a uma maior oxidação do tecido. Figueira (2002), trabalhando com subcultivo de anteras de cafeeiro em doses menores de 2,4-D também obteve 100% de anteras oxidadas. A presença do regulador de crescimento TDZ no meio de cultura também pode influenciar no processo de oxidação das anteras.

A época de avaliação também interferiu significativamente, sendo que quanto maior o período de avaliação, maior foi o número de anteras oxidadas (Figura 1)

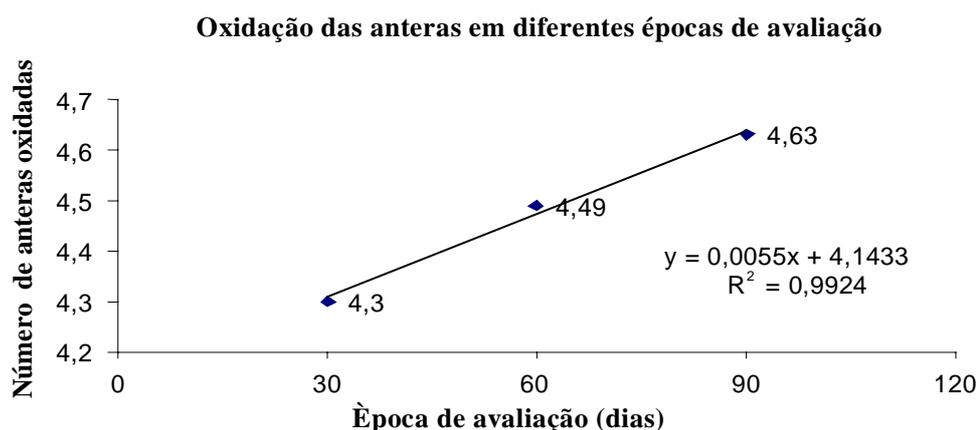


Figura 1: Número de anteras oxidadas aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação das anteras da cultivar Catuaí vermelho 44.

Houve diferença significativa entre as concentrações de 2,4-D em relação à variável calosidade de forma que a concentração de 2mgL<sup>-1</sup> resultou em uma maior média de calosidade. A partir desta, foi observado um decréscimo significativo de calosidade nas concentrações de 4 e 6mgL<sup>-1</sup>, seguido de um aumento da mesma na concentração de 8mgL<sup>-1</sup>, porém ainda se mantendo abaixo da primeira (Figura 2).

A interação entre as concentrações de 2,4D e TDZ foi significativa na indução de calos em anteras. Em termos de valores absolutos a combinação dos reguladores 2,4-D e TDZ nas concentrações de 2,0 mgL<sup>-1</sup> e 0,0 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente, foi a que resultou no maior número de anteras com calos, apesar de não diferir das demais combinações, com exceção daquela em que se utilizou 6,0 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,0 mgL<sup>-1</sup> de TDZ, a qual estatisticamente proporcionou uma menor calosidade nas anteras inoculadas (Tabela 1).

## AGRADECIMENTOS

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

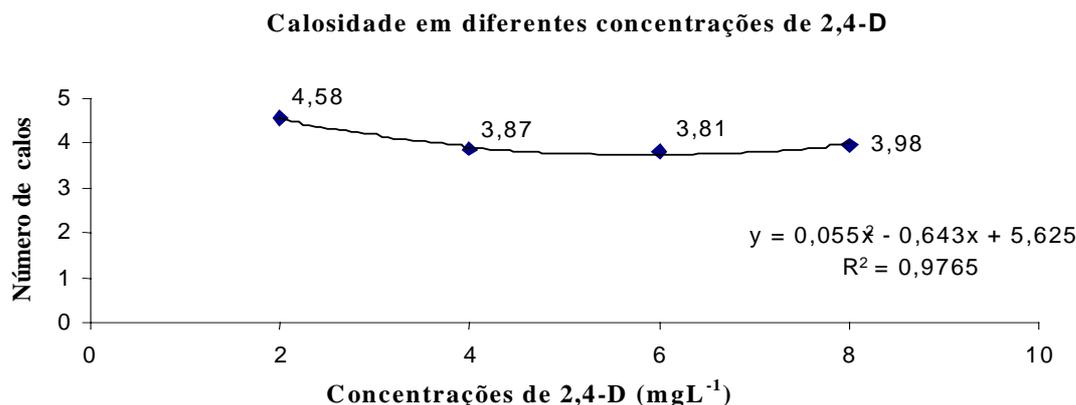


Figura 2: Número de anteras com calos sob diferentes concentrações de 2,4D, cultivar Catuaí Vermelho 44.

Tabela 1. % de calosidade de anteras, cultivar Catuaí vermelho 44, submetidas à diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ,

Reguladores de Crescimento		Médias Originais	Média(%)
2,4-D (mgL <sup>-1</sup> )	TDZ (mgL <sup>-1</sup> )		
2	0	4,66 a	93,2
	0,5	4,51 a	90,2
4	0	4,05 a	81
	0,5	3,71 a	74,2
6	0	3,28 b	65,6
	0,5	4,37 a	87,4
8	0	4,35 a	87
	0,5	3,63 a	72,6

Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

De acordo com Figueira et al (2005), os reguladores de crescimento 2,4-D (6 mgL<sup>-1</sup>) e TDZ (0,5 mgL<sup>-1</sup>) foram eficientes na indução de calos; porém não promoveram a regeneração dos mesmos para a cultivar Catuaí Vermelho.

Maciel (2001) e Palú (2002) citam que pelos resultados obtidos para a indução de calogênese em anteras de cafeeiro, observa-se que é necessária uma auxina juntamente com uma citocinina. Dentre as auxinas sintéticas, o 2,4-D é sem dúvida a mais adequada a indução e manutenção do calo (Gamborg et al., 1976).

Essas citações confirmam os resultados do presente trabalho onde a interação dos reguladores de crescimento 2,4-D, que é uma auxina, e o TDZ, que é um regulador de crescimento com ação citocinínica, mostrou-se eficiente à indução de calos. Além disso, o regulador de crescimento 2,4-D apresenta caráter indutor para o intumescimento e calosidade conforme proposto por Torres et al. (1998).

#### AGRADECIMENTOS

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

## CONCLUSÕES

2,4-D na concentração de 2,0 mgL<sup>-1</sup> sem TDZ foi a que resultou no maior número de anteras com calos.

O aumento do período de avaliação proporcionou um maior número de anteras oxidadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L.M.C.O. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica*)**. 1998. 86p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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.

GAMBORG, O. L.; MURASHIGE, T.; THORPE, T. A.; VASIL, I.K. Plant tissue culture media. **In vitro**, v.12, n.7., p. 473-478, 1976.

GIRI, A.; AHUJA, P.S.; AJAYKUMAR, P.V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Aconitum heterophyllum* Wall. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v.32, p.213-218, 1993.

MACIEL, A.L. de R. **Embriogênese somática indireta em *Coffea arabica* L.** 2001. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, MG.

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.

PALÚ, E. G. **Indução in vitro de calogênese em anteras e brotações em segmentos nodais de *Coffea arabica* L.** 2002. 47 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 1.ed. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH, v.1, 1998. 509p.

## PALAVRAS-CHAVE

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

## AGRADECIMENTOS

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