

Etileno e Nitrato de prata na indução e regeneração de embriões em anteras de *Coffea arabica* L.

Luz, José Magno Queiroz¹; Silva, Adelaide Siqueira¹; Bittar, Cecília Alves¹; Lino, Leandro de Oliveira¹; Rodrigues, Tatiana Michlovská¹.

¹Instituto 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.

INTRODUÇÃO

A cafeicultura tem se expandido de tal forma, que cada vez mais têm se exigido melhores padrões na qualidade da bebida, na produtividade dos grãos, na maturação uniforme em épocas diferenciadas de colheita e resistência e, ou, tolerância a doenças, pragas e a condições adversas do meio ambiente e ainda a obtenção de novos cultivares adaptados às diferentes regiões cafeeiras e aos sistemas de cultivo. O uso de cultivares melhoradas geneticamente pode ser a solução, uma vez que os programas de melhoramento têm apresentado resultados promissores na cultura do café, no que se refere ao aumento de produtividade e obtenção de novos cultivares. As técnicas convencionais de melhoramento têm sido amplamente utilizadas neste propósito. 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.

A redução deste tempo é possível por meio da produção de linhagens homozigóticas oriundas de dihaplóides. Existem alguns métodos para a obtenção de di-haplóides, 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. Para se obter plantas dihaplóides, via androgênese, é necessário adaptar a composição do meio de cultura ao açúcar ou aminoácidos junto com os reguladores de crescimento (Nitsch, 1981).

Uma das linhas que está sendo explorada com o contínuo aumento dos estudos com o cultivo *in vitro* de vegetais é a composição e a influência de gases nos recipientes de cultivo. O etileno é um regulador de crescimento gasoso natural da planta. No cultivo *in vitro*, a produção e ação desse gás nos recipientes de cultivo afetam diretamente a resposta do explante, sendo ela positiva ou negativa (Pasqual et al., 2002). Por causa da ação negativa, há vários estudos sobre os inibidores do etileno, como por exemplo o nitrato de prata (AgNO_3).

Neste sentido este trabalho teve o objetivo estudar o efeito do etileno e do nitrato de prata na indução e regeneração *in vitro* de embriões em anteras de *Coffea arabica* L.

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 99 plantado na área experimental da Universidade Federal de Uberlândia.

Os botões florais foram coletados e desinfestados. As anteras foram retiradas e inoculadas em placas de petri esterilizadas com meio MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 2 mgL^{-1} de 2,4-D na ausência e presença de 5 mgL^{-1} de nitrato de prata. Após a inoculação foi colocada no centro de cada placa uma gota de ETHREL[®] com auxílio de uma seringa previamente esterelizada. As placas foram lacradas e colocadas no escuro por diferentes períodos (testemunha, 2, 4, 6, e 8 dias). Logo após cada período, as placas foram abertas em câmara de fluxo laminar para que o ETHREL[®] fosse completamente evaporado e em seguida lacradas novamente e colocadas no escuro até 8 dias. Em seguida foram levadas para a sala de crescimento com temperatura de 26°C com 16 h de luz, onde permaneceram até 12º dia após a inoculação.

Ao final dos 12 dias, as anteras foram transferidas para um meio de regeneração intitulado de meio R pelos autores (Sibi et al., 1979), acrescido de $0,108 \text{ mgL}^{-1}$ de cinetina, permanecendo nele por 30 dias.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), num fatorial de 5×2 , sendo o 1º fator: dias na presença com etileno (2, 4, 6, 8 dias e testemunha) e 2º fator: ausência e presença de 5 mgL^{-1} de AgNO_3 , num total de 10 tratamentos, com 4 repetições, sendo cada placa de Petri uma parcela contendo 25 anteras por placa. Após 12 dias da inoculação, avaliou-se a percentagem de anteras oxidadas, contaminadas e com calosidades, e aos 30 dias pós-inoculação no meio R fez-se outra avaliação considerando-se os mesmos caracteres e o número de pró-embriões. 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 $\sqrt{x + 1/2}$; e SISVAR, com aplicação do teste de F, a 5% de probabilidade e teste de Tukey para comparação das médias e regressão polinomial para estudo do etileno nos diferentes dias avaliados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A oxidação e contaminação das anteras foram menores no tratamento que não continha etileno (Tabela 1), que provavelmente contribuiu para maior oxidação e necrose das anteras.

Tabela 1. Percentagem de anteras oxidadas e contaminadas da cultivar Catuaí Vermelho 99 em função dos dias em meio de cultura em contato com etileno (ETHREL®).

| | Tempo de contato com o Etileno (Dias) | | | | | Média |
|--------------|---------------------------------------|---------|---------|---------|---------|-------|
| | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | |
| OXIDAÇÃO | 11,74 b | 23,65 a | 20,63 a | 22,36 a | 21,52 a | 19,96 |
| CONTAMINAÇÃO | 34,61 b | 17,31 a | 17,70 a | 16,52 a | 13,96 a | 20,01 |

Médias seguidas por letras distintas na linha diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A contaminação também foi influenciada significativamente pelo nitrato de prata, sendo 41,6% e 58,4% na presença e ausência de nitrato de prata, respectivamente. Uma hipótese para este resultado é que a presença de nitrato inibiu a proliferação de contaminantes, como fungos ou bactérias. Marques (2005) também obteve uma contaminação considerada alta, equivalente a 35,87%, quando comparada a 2% obtidos por Palú (2002) com o uso de solução de PPM™ a 25% (v/v). Araújo (2004) visando a calogênese em anteras oriundas de uma população segregante F2 de *C. arabica* L. verificou que a adição de fungicida e bactericida ao meio de cultura reduziu consideravelmente a contaminação causada por microrganismos. Entretanto, o uso destes produtos *in vitro* têm sido limitados devido a grande toxicidade para as células de plantas (Arruda, 2000).

De maneira geral os melhores resultados para a formação de calos nas anteras ocorreram nos tratamentos que tinham AgNO_3 e com relação ao etileno, a ausência e os primeiros dias de inoculação em contato com este, no meio de cultura, mostraram-se mais responsivos quanto à formação dos calos e à medida que o tempo de permanência no etileno aumentou o número de calos (Figura 1). Segundo Figueira (2005), o etileno, provavelmente, exerce um efeito benéfico na sua indução em cultura de anteras em café.

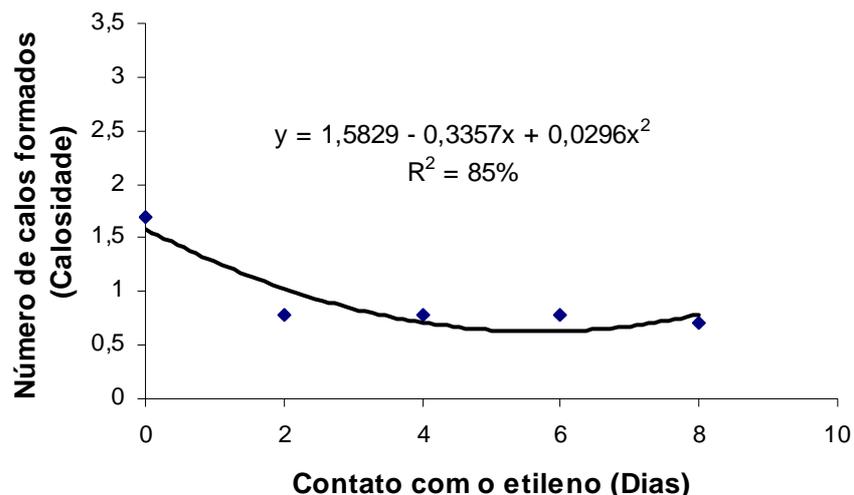


Figura 1. Número de calos formados, em contato com etileno em diferentes dias de inoculação.

Aos 30 dias de cultivo em meio R foi observado uma possível embriogênese direta nas anteras provenientes dos tratamentos com e sem AgNO_3 e que não tiveram contato com o etileno. De acordo com Kumar et al. (2006) os efeitos do nitrato de prata na embriogênese somática sustenta a hipótese de que este composto age como um agente promotor da embriogênese somática direta e da formação de calos na embriogênese somática indireta, que podem estar atribuídos na regulação do etileno durante a ação em estágios específicos na embriogênese de *Coffea*. De acordo com os resultados, provavelmente, o AgNO_3 juntamente com o 2,4-D foi quem ocasionou a embriogênese direta em anteras que não tiveram contato com o etileno, ao contrário dos outros resultados que mostram que o etileno é um bom agente indutor da embriogênese, sendo o nitrato de prata benéfico em alguns casos e contrários em outros. Trabalhos como os de Figueira (2005) e Gurel et al. (2000), relatam esta discordância da ação do nitrato de prata na indução de pró-embriões, não conseguindo induzir a formação dos mesmos.

CONCLUSÕES

O AgNO_3 age como inibidor de contaminantes e juntamente com etileno, favorece a calosidade das anteras da cv. Catuaí Vermelho 99.

O AgNO_3 juntamente com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D podem promover embriogênese direta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

GÜREL, S.; GÜREL, E.; KAYA, Z. Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, p. 1155-1159, 2000.

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

MARQUES, R.V. Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* em função de diferentes reguladores de crescimento. 2006. P. 29. Monografia (Graduação Agronomia)- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

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.

NITSCH, C. Production of isogenic lines: basic technical aspects of androgenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). **Plant tissue culture methods and applications in agriculture**. New York: Academic Press, 1981. p. 241-252.

PASQUAL, M., MACIEL, A.L.R. de., CAMPOS, K.P. de., SANTOS, E.C., CAMPOS, R.J.C. de. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica* L.) cultivadas *in vitro*. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.26, n.1, p.71-76, 2002.

SIBI, M., DUMAS DE VAULX, R., CHAMBONNET, D. Obtention de plantes haplóides par androgenèse *in vitro* chez lê piment (*Capsium annum* L.). **Annales de l' Ameriolátion dès plantes**, v. 29, n. 5, p. 583-606, 1979.

SILVA, A. S. **Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* L., cultivadas *in vitro* na presença ou ausência de luz em meio com 2,4-D, BAP, TDZ, e cinetina**. 2003. 15p. Monografia (Graduação em Biologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

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, 2003. p. 38.

PALAVRAS-CHAVE

Coffea arabica; cultura de anteras; embriogênese; etileno; AgNO₃.

AGRADECIMENTOS

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