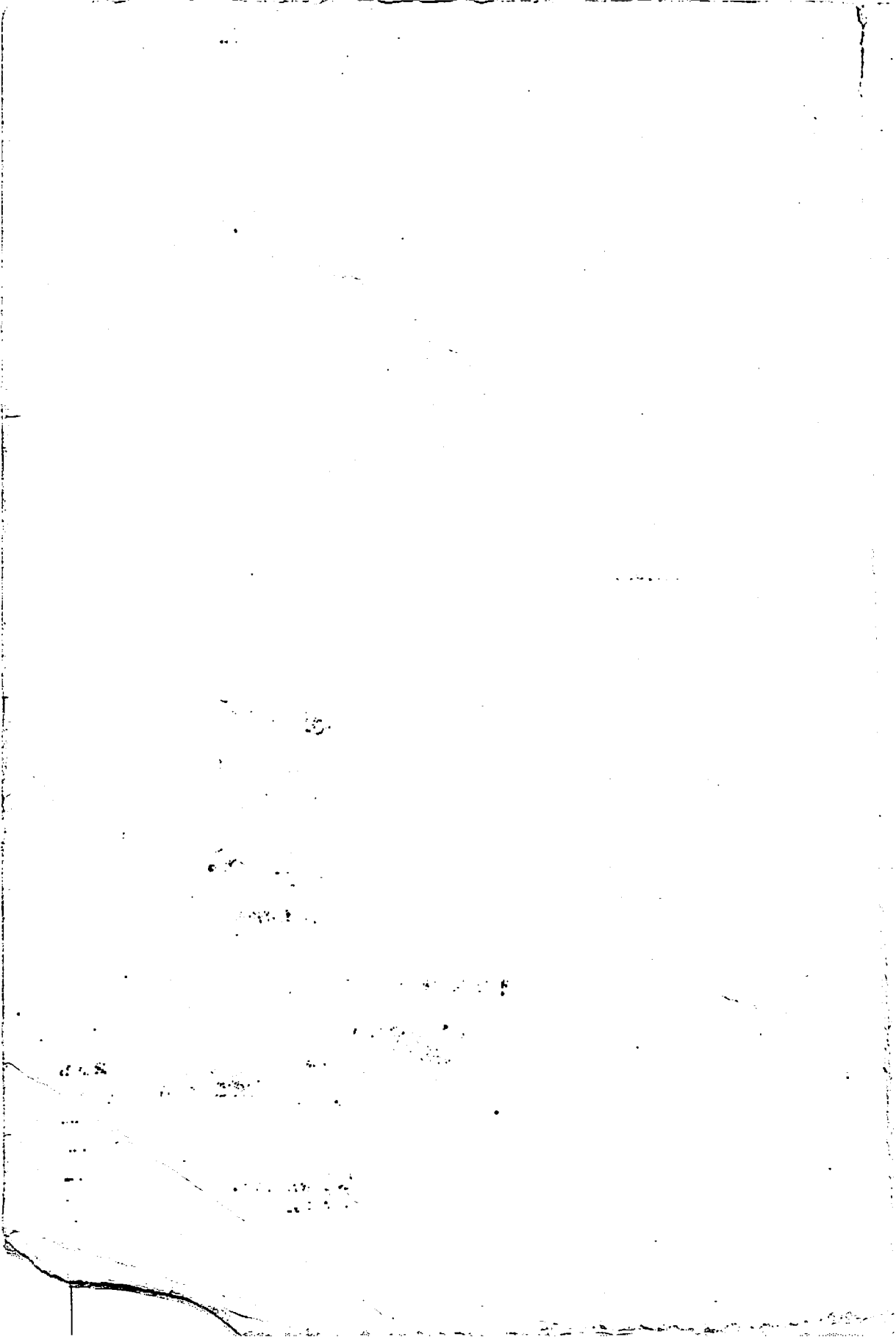




OTIMIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE CULTURA DE  
TECIDOS PARA O CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)

LUCIANA MARQUES DA CUNHA OLIVEIRA ANDRADE

1998



43069

MEU30154

LUCIANA MARQUES DA CUNHA OLIVEIRA ANDRADE<sup>UFLA</sup>

**OTIMIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE CULTURA DE TECIDOS  
PARA O CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de mestrado em Agronomia área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

**Prof. Moacir Pasquãl**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1998**

T63U 53  
cm/ana  
4683

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da  
Biblioteca Central da UFLA

Andade, Luciana Marques da Cunha

Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica*  
L.) / Luciana Marques da Cunha Andrade. — Lavras : UFLA, 1998.  
86 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Café. 2. *Coffea arabica*. 3. Biotecnologia. 4. Cultura de antera. 5. Cultura  
de tecido. 6. Cultura de embrião. 7. Micropropagação. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD-633.733

**LUCIANA MARQUES DA CUNHA OLIVEIRA ANDRADE**

**OTIMIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE CULTURA DE TECIDOS  
PARA O CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)**

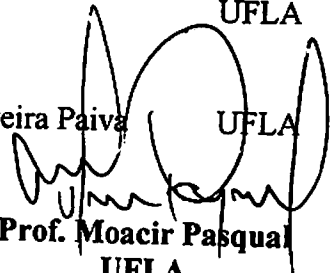
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de mestrado em Agronomia área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 18 de Fevereiro de 1998

Prof. Lisete Chamma Davide UFLA

Prof. Eduardo Bearzoti UFLA

Prof. Patricia Duarte Oliveira Paiva UFLA



Prof. Moacir Pasqual  
UFLA  
(Orientador)

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL**

**EDUARDO, MEU ESPOSO**  
**MEUS FILHOS ENRICO E GIOVANNI**  
**MEUS PAIS HOMERO E DAGMAR**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Á DEUS

Á Universidade Federal de Lavras – M.G.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos Professores: Moacir Pasqual

- Lisete Chamma Davide
- Eduardo Bearzoti
- Patrícia Duarte Oliveira Paiva
- Rubens José Guimarães

Aos funcionários: Zélia, Eduardo, Irundina e Raimunda,

Aos Amigos: Ana Hortência, Iara, Dayse, Renata e Eliseu, Eduardo e Giovana, Juscélio, Cíntia, Jair, Ana Cláudia, Claudinha e Solano, Mívia, Bárbara, Gabriela, Rupert, Edilene, Alexandre, Claret, Vantuil, Evaldo, Juliana, Mariana, Cida, Maria Euvira, Maguinho, Lucivane.

À confraria dos bons amigos: André e Julia, Leonardo e Patrícia, João Cândido e Claudinha, pelo apoio, pela sinceridade e pela amizade sempre presente,.....o meu muito obrigada!

Ao meu querido esposo Eduardo, que sempre ao meu lado, muito me ajudou na realização deste trabalho.

**Aos meus pais, pelo incentivo e por acreditarem e investirem nos meus sonhos tornando-os realidade.**

**Ao meu irmão Adriano**

**Aos meus sogros Guy e Maria José**

**Aos meus cunhados e cunhadas**

**Aos meus sobrinhos**

**A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.**

**“As pedras que encontrei serviram para fortalecer ainda mais o meu ideal,  
e a certeza de que o trabalho continua, sempre”.**

**MUITO OBRIGADA**



## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE SÍMBOLOS.....	viii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>01</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>02</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>04</b>
2.1 Café.....	04
2.2 Cultura de Tecidos.....	05
2.2.1 Metodologias em cultura de tecidos.....	07
A. Cultura de Anteras.....	07
B. Cultura de embriões.....	13
C. Micropropagação.....	15
<b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO 2 – DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DO BOTÃO FLORAL PARA A CULTURA DE ANTERAS NO CAFEIEIRO <i>Coffea arabica</i>, L....</b>	<b>26</b>
<b>1 RESUMO.....</b>	<b>27</b>
<b>2 ABSTRACT.....</b>	<b>28</b>
<b>3 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>38</b>

<b>CAPÍTULO 3 - INFLUÊNCIA DOS REGULADORES DE RESCIMENTO NA CULTURA DE EMBRIÕES "IN VITRO" DA CULTIVAR CATUAÍ VERMELHO LCH 2077-2-5-44. ....</b>		<b>39</b>
1 RESUMO.....		40
2 ABSTRACT.....		41
3 INTRODUÇÃO.....		42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....		44
4.1 Preparação dos embriões.....		45
4.2 Análise estatística.....		45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		47
5.1 Número de brotações:.....		47
5.2 Número de brotos maiores que 1 cm.....		50
5.3 Número total de folhas.....		52
5.4 Peso de matéria fresca e seca da parte aérea das brotações.....		53
6 CONCLUSÃO.....		57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		58
 <b>CAPÍTULO 4 – INFLUÊNCIA DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO NA MICROPROPAGAÇÃO "IN VITRO" DA CULTIVAR CATUAÍ VERMELHO LCH 20 77-2-5-44.....</b>		<b>60</b>
1 RESUMO.....		61
2. ABSTRACT.....		62
3 INTRODUÇÃO.....		63
4 MATERIAL E MÉTODOS.....		65
4.1 Procedimentos gerais.....		65
4.2 Experimento 1: Multiplicação "in vitro" observando-se a influência das concentrações de BAP X GA <sub>3</sub> na cultivar catuaí vermelho LCH 2077-2-5-44.....		66
4.3 Experimento 2: Multiplicação "in vitro" observando-se a influência das concentrações de TDZ X GA <sub>3</sub> na cultivar catuaí vermelho LCH 2077-2-5-44.....		66
4.4 Análises estatísticas.....		66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		68
5.1 Experimento 1: Multiplicação "in vitro" observando-se a influência das concentrações de BAP X GA <sub>3</sub> na cultivar catuaí vermelho LCH2077-44.....		68
5.1.1 Número de brotações.....		68
5.1.2 Comprimento das brotações.....		71

5.1.3 Número total de folhas.....	72
5.1.4 Peso da matéria fresca e seca da parte aérea das brotações.....	74
5.2 Experimento 2: Multiplicação “in vitro” observando-se a influência das concentrações de TDZ X GA <sub>3</sub> na cultivar catuai vermelho LCH 2077-2-5-44.....	77
5.2.1 Número de brotações.....	77
5.2.2 Comprimento das brotações.....	80
5.2.3 Número Total de folhas.....	81
5.2.4 Peso fresco e peso seco da parte aérea das brotações.....	82
6 CONCLUSÃO.....	85
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>FIGURA 1 - Diferentes fases da microsporogênese: A) tétrade meiótica, B) micrósporo recém liberado da tétrade, C) micrósporo vacuolado, D) micrósporo uninucleado, não vacuolado, E) micrósporo com camada de exina. UFLA. Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>34</b>
<b>FIGURA 2 – Superfície de resposta para a característica número total de brotos em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA. Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>48</b>
<b>FIGURA 3 – Diagrama de contornos para a característica número total de brotos em resposta às dosagens de ANA e BAP. UFLA. Lavras, 1998.....</b>	<b>50</b>
<b>FIGURA 4 –Superfície de resposta para a característica comprimento das brotações (brotos maior que 1 cm) em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA. Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>51</b>
<b>FIGURA 5 – Diagrama de contorno para a característica comprimento das brotações (brotos maiores que 1 cm) em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA. Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>51</b>
<b>FIGURA 6 – Superfície de resposta para a característica número total de folhas em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA. Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>52</b>
<b>FIGURA 7 – Diagrama de contornos para a característica número total de folhas em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA. Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>53</b>

<b>FIGURA 8 – Superfície de resposta para a característica peso fresco em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA. Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>54</b>
<b>FIGURA 9 – Diagramas de contornos para a característica peso fresco em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA. Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>55</b>
<b>FIGURA 10 – Superfície de resposta para a característica peso seco em resposta às dosagens dos hormônios ANA e BAP. UFLA, Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>55</b>
<b>FIGURA 11 – Diagrama de contornos para a característica peso seco em resposta às dosagens dos hormônios ANA e BAP. UFLA, Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>56</b>
<b>FIGURA 12 – Superfície de resposta para a característica número total de brotos em resposta às dosagens dos hormônios BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA, Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>70</b>
<b>FIGURA 13 – Diagrama de contorno para a característica número total de brotos em resposta às dosagens dos hormônios BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA, Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>70</b>
<b>FIGURA 14 – Superfície de resposta para a característica brotos maior que 1 cm em resposta às dosagens dos hormônios BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA, Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>71</b>
<b>FIGURA 15 – Diagrama de contornos para a característica brotos maior que 1 cm em resposta às dosagens dos hormônios BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA, Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>72</b>

<b>FIGURA 16 – Superfície de resposta para a característica número total de folhas em resposta às dosagens de BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>73</b>
<b>FIGURA 17 – Diagrama de contornos para a característica número total de folhas em resposta às dosagens de BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA.Lavras,MG,1998.....</b>	<b>73</b>
<b>FIGURA 18 – Superfície de resposta para a característica peso fresco em resposta às dosagens de BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>75</b>
<b>FIGURA 19 – Diagrama de contornos para a característica peso fresco em resposta às dosagens de BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>75</b>
<b>FIGURA 20 – Superfície de resposta para a característica peso seco em resposta às dosagens dos hormônios BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>76</b>
<b>FIGURA 21 – Diagrama de contornos para a característica peso seco em resposta às dosagens dos hormônios BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>76</b>
<b>FIGURA 22 – Superfície de resposta para a característica número total de brotos em resposta às dosagens dos hormônios TDZ e GA<sub>3</sub>.UFLA.Lavras,MG,1998.....</b>	<b>79</b>
<b>FIGURA 23 – Diagrama de contornos para a característica número total de brotos em resposta às dosagens dos hormônios TDZ e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>79</b>
<b>FIGURA 24 – Superfície de resposta para a característica brotos maiores que 1 cm em resposta às dosagens de TDZ e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>80</b>

<b>FIGURA 25</b> – Diagrama de contornos para a característica comprimento das brotações (brotos maiores que 1 cm) em resposta às dosagens de TDZ e GA <sub>3</sub> . UFLA. Lavras, MG, 1998.....	<b>81</b>
<b>FIGURA 26</b> – Superfície de resposta para a característica número total de folhas em resposta às dosagens dos hormônios TDZ e GA <sub>3</sub> . UFLA. Lavras, MG, 1998.....	<b>82</b>
<b>FIGURA 27</b> – Diagrama de contornos para a característica número total de folhas em resposta às dosagens dos hormônios TDZ e GA <sub>3</sub> . UFLA. Lavras, MG, 1998.....	<b>83</b>
<b>FIGURA 28</b> – Superfície de resposta para a característica peso fresco em resposta às dosagens dos hormônios TDZ e GA <sub>3</sub> . UFLA. Lavras, MG, 1998.....	<b>84</b>
<b>FIGURA 29</b> – Diagrama de contornos para a característica peso fresco em resposta às dosagens dos hormônios TDZ e GA <sub>3</sub> . UFLA. Lavras, MG, 1998.....	<b>84</b>

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>TABELA 1 – Estádio de desenvolvimento dos micrósporos, de acordo com as diferentes classes de tamanho em relação ao comprimento e diâmetro dos botões florais e comprimento das anteras (mm), UFLA, Lavras, MG, 1998.....</b>	<b>33</b>
<b>TABELA 2 - Resumo das análises de variância para número total de brotos (NTB), o número de Brotos maior que 1 cm, o número total de folhas (NTF), peso fresco (PF) e peso seco (PS) da parte aérea das brotasses, em função das concentrações de ANA e BAP, em um período de 60 dias de cultivo “in vitro”, UFLA, Lavras, MG. 1998.....</b>	<b>49</b>
<b>TABELA 3 – Resumo das análises de variância para número total de brotos (NTB), o número de Brotos maior que 1 cm (NB&gt;1), o número total de folhas (NTF), peso fresco (PF) e peso seco (PS) da parte aérea das Brotasses, em função das concentrações de BAP e GA<sub>3</sub>, em um período de 90 dias de cultivo “in vitro”, UFLA, Lavras, MG. 1998.....</b>	<b>69</b>
<b>TABELA 4 – Resumo das análises de variância para número total de brotos (NTB), o número de Brotos maior que 1 cm (NB&gt;1), o número total de folhas (NTF), para peso fresco (PF) e peso seco (PS) da parte aérea das brotações em função das concentrações de TDZ e GA<sub>3</sub>, em um período de 90 dias de cultivo “in vitro”, UFLA, Lavras, MG. 1998.....</b>	<b>78</b>



## LISTAS DE SÍMBOLOS

ANA	ácido naftaleno acético
AIA	ácido indol acético
IBA	ácido indol butírico
BAP	6- benzilaminopurina
GA <sub>3</sub>	ácido giberélico
MS	meio de Murashige e skoog
TDZ	N-phenil-N- 1,2,3-thiadiazol-5-iluréia
PVP	polivinilpirrolidone
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2ip	N-isopentenilaminopurina
ZEA	zeatina

## RESUMO

**ANDRADE, L.M.C.O.** Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o melhoramento do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Lavras: UFLA, 1998. 73p. (Dissertação- Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).<sup>1</sup>

Os objetivos deste trabalho foram os de se testar metodologias de cultura de tecidos como a cultura de anteras, a micropropagação e a cultura de embriões para as cultivares de café pertencentes a coleção "in vivo" da Universidade Federal de Lavras. Para isso, foi necessário determinar: o tamanho do botão floral ideal para obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras, determinar, na micropropagação: as melhores concentrações utilizadas dos reguladores de crescimento BAP (6-benzilaminopurina), GA<sub>3</sub> (ácido giberélico) e TDZ (N-phenil-N-1,2,3-thiadiazol-5-iluréia), e na cultura de embriões, determinar quais as melhores concentrações dos reguladores de crescimento ANA (ácido naftalenoacético) e BAP. Foram realizadas análises morfológicas e citológicas em botões florais de 4 cultivares de *Coffea arabica*: cv. Mundo Novo, Catuai, Icatú e Rubí, observou-se que para todos os genótipos, o micrósporo não vacuolado com núcleo central, ideal para a obtenção de haplóides através da cultura de anteras, ocorre com mais frequência em botões florais variando de 4,5 a 6,0 mm de comprimento, contendo anteras que variam de 4,5 a 5,5 mm de comprimento. Para os experimentos de micropropagação, foram utilizadas como explantes, microestacas da cultivar Catuai, onde foram testadas diversas combinações entre os reguladores de crescimento BAP e GA<sub>3</sub> e de TDZ e GA<sub>3</sub> resultando em um fatorial 4x5, dispostos em um delineamento inteiramente casualizado. Para se verificar o efeito das diferentes combinações dos reguladores de crescimento, foram feitas avaliações periódicas com relação ao número de brotações, brotos maiores que um centímetro, número total de folhas, peso da matéria fresca e seca das brotações. Os melhores resultados para a combinação BAP e GA<sub>3</sub> foram obtidos na ausência de GA<sub>3</sub> e presença de BAP. Para a combinação TDZ e GA<sub>3</sub>, os melhores resultados foram obtidos quando a concentração máxima testada de GA<sub>3</sub> foi associado às concentrações mínimas de TDZ. Na cultura de embriões, foram utilizados embriões da cv. Catuai, com os

---

<sup>1</sup> Orientador: Prof. Moacir Pasqual. Membros da banca: Prof<sup>ª</sup>. Lisete Chamma Davide, Prof. Eduardo Bearzoti e Prof<sup>ª</sup>. Patrícia Duarte Oliveira Paiva

quais foram testadas combinações entre concentrações dos reguladores de crescimento ANA e BAP, resultando em um fatorial 4x4, dispostos em um delineamento inteiramente casualizado. Para todas as características avaliadas, os melhores resultados foram observados na concentração de BAP igual a 7,40 mg/l, associado a concentração de ANA igual a 1,0 mg/l.. Modelos de superfície de resposta foram utilizados nos experimentos de micropropagação e cultura de embriões, para otimizar as concentrações dos reguladores de crescimento utilizados. Este trabalho faz parte do programa de melhoramento do cafeeiro da Universidade Federal de Lavras.

## ABSTRACT

### Optimization of techniques of tissue culture for the improvement of the coffee culture (*Coffea arabica* L.).

The purpose of this work were to test tissue culture methodologies of: the anthers culture, the micropropagation and the embryos culture for the coffee cultures "in lives" that belong to the Universidade Federal de Lavras (UFLA). For that, it was necessary to determine the ideal floral bud size for the obtention of haploids plants through the anthers culture. Also, to determine in micropropagation: the best concentrations of the growth regulators BAP (6-benzilaminopurina), GA3 (giberélic acid) and TDZ (N-phenil-N-1,2,3-thiadiazol-5-iluréia). Finally, in the embryos culture: to determine which were the best concentrations of the growth regulators ANA (naftalenacético acid) and BAP(6-benzilaminopurine). For the morphologic and cytological evaluations, were used floral buds of 4 cultivates of *Coffea arabica*: cv.Mundo Novo, Catuai, Icatú and Rubi. Morphologic and cytological analyses were accomplished, by observing that, for all the genotypes, the microspore non vacuolated (with central nucleus, ideal for the haploids obtained through the anthers culture), happens frequently in floral buds they vary in length from 4,5 to 6,0 mm, anthers varying from 4,5 to 5,5 mm length. For the micropropagation experiments, were used like explants microestacas of cultivating Catuai, where several combinations were tested among the growth regulators BAP and GA3 (mg/l) and of TDZ and GA3, resulting in a factor 4x5, disposed entirely in a completely randomized. To verify the effect of the different combinations of the growth regulators, there were made periodic evaluations with there relationship of the total shoot number, larger sprouts than a centimeter, total leaf number, weight of the fresh and dry matter of the shoot. The best results for the combination of BAP and GA3 were obtained in the absence of GA3 and presence of BAP. For the combination TDZ and GA3, the best results were obtained when the maximum concentration of GA3 was associated to the minimum concentrations of TDZ. In the culture of embryos, were used embryos of the cv. Catuai, in which combinations were tested among concentrations of the growth regulators ANA and BAP, resulting in a fator 4x4, disposed entirely in a completely randomized. For all the characteristics, the best results were observed in the concentration of BAP, the same to 7,40 mg/l, associated ANA's concentration, the same to 1,0 mg/l.. Models of answer surface were used in the micropropagation experiments and embryos culture, for optimize the concentrations of the used growth regulators. This work belongs to the program of improvement of the coffee culture of the Universidade Federal de Lavras (UFLA).

... ..

**CAPÍTULO 1**

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Nos programas de melhoramento, as técnicas convencionais têm apresentado resultados promissores na cultura do café, no que se refere ao aumento de produtividade e obtenção de novos cultivares. Após o cruzamento intervarietal são necessárias cerca de 7 a 9 gerações de autofecundação para se chegar à uniformidade genotípica. O tempo, para que se chegue a um resultado satisfatório, é muito longo, cerca de 15 a 20 anos, até se obter material superior. Sendo assim, a técnica de cultura de tecidos pode auxiliar no melhoramento da cultura, pois rompe barreiras de cruzamento existentes nos métodos convencionais. Além disso, a propagação "in vitro" de café apresenta-se como um conjunto de técnicas que podem produzir grandes quantidades de plantas em curto espaço de tempo, se comparado com os métodos convencionais, tendo grande valor nos programas de melhoramento para obtenção de cultivares melhoradas e com grande aplicabilidade na cultura de café.

Várias são as metodologias de cultura de tecidos que auxiliam os programas de melhoramento do café, tais como a cultura de anteras para a obtenção de plantas homozigotas; a cultura de embriões, para a recuperação de embriões provenientes de cruzamentos interespecíficos e para a antecipação da época de plantio; embriogênese somática, através de explantes foliares para obtenção da planta inteira; cultura de meristemas, para obtenção de plantas livres de vírus; micropropagação, com o objetivo de realizar a rápida multiplicação do material melhorado, manutenção de bancos de germoplasma e a multiplicação de híbridos interespecíficos. Neste trabalho optou-se por utilizar a cultura de anteras, a cultura de embriões e a micropropagação através de microestacas. A metodologia utilizada faz parte do programa de melhoramento do cafeeiro da Universidade Federal de Lavras, e as cultivares utilizadas pertencem a coleção "in vivo" da mesma

instituição, as quais foram escolhidas por serem amplamente utilizadas na cafeicultura comercial.

O objetivo deste trabalho foi o de otimizar metodologias de cultura de anteras, micropropagação e de cultura de embriões para as cultivares de café pertencentes a coleção "in vivo" da Universidade Federal de Lavras. Especificamente; buscou-se determinar o tamanho do botão floral ideal para obtenção de haplóides através da cultura de anteras; e também, para a cultura de embriões e micropropagação, os tipos de reguladores de crescimento e as melhores concentrações utilizadas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Café

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae, na qual o gênero *Coffea* abrange cerca de 60 espécies, apresentando grande heterogeneidade entre elas. As espécies mais conhecidas são o *Coffea arabica* var. *arabica* e o *Coffea canephora* var. *robusta*. Trata-se de uma cultura de grande importância econômica, sendo que cerca de 70% do café cultivado em escala comercial é do tipo *arabica* e 30% é do tipo *robusta*. Existem também outras espécies que são utilizadas exclusivamente em programas de melhoramento, mas que em geral possuem uma quantidade relativamente baixa de flores e frutos, e conseqüentemente, baixa produção. No entanto, possuem características diferenciadas quanto à forma dos frutos e flores, e resistência à diversas moléstias e pragas (Graner e Godoy 1967).

*Coffea arabica* é considerada uma espécie nobre, com café de boa qualidade, possuindo mais de 40 mutantes e muitas variedades. É tetraplóide, auto-fértil, ocorrendo 10 a 12% de fecundação cruzada. Apresenta raiz pivotante profunda e raízes secundárias ramificadas. O caule único e os ramos ortotrópicos podem dar origem às folhas e também aos ramos plagiotrópicos. Os ramos plagiotrópicos dão origem às folhas e aos botões florais. As folhas apresentam coloração verde escura, são elípticas e apresentam lâminas brilhantes e domáceas visíveis. Quando maduros, os frutos são drupas amareladas ou avermelhadas, possuindo superfície lisa, exocarpo delgado, mesocarpo carnoso e endocarpo fibroso. O endosperma possui uma película prateada, e na sua base aloja-se o embrião (Graner e Godoy, 1967). No início dos estudos genéticos do gênero *Coffea*, tomou-se como padrão a espécie *Coffea arabica*, sendo primeiramente



denominada de *C. arabica* var. *typica*, descrita por Linneu; atualmente denomina-se *Coffea arabica* var. *arabica* (Carvalho, 1993; Fazuoli, 1986).

*Coffea canephora* é nativo das regiões centrais, tropicais e subtropicais do continente africano, desde a República da Guiné até o Zaire. *Coffea arabica* é nativo da região sudoeste da Etiópia, Sudão e Quênia (Berthaud, 1986). No Brasil, foi introduzido em 1727 pelo Sargento Francisco de Melo Palheta em Belém do Pará, em seguida levado para o Maranhão e Bahia, e posteriormente foi levado para o Rio de Janeiro, expandindo-se para o Vale do Paraíba, Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná, Mato Grosso e Rondônia (Carvalho, 1993).

## 2.2 Cultura de tecidos

Staritsky (1970) foi o primeiro a trabalhar com a cultura de café “in vitro”, tendo utilizado segmentos ortotrópicos de duas espécies de *Coffea*, em meio contendo sais inorgânicos, sacarose, tiamina, cisteína e auxina. O autor obteve rápida produção de calos na espécie *Coffea arabica*, e de embriões e plântulas na espécie *Coffea canephora*. Posteriormente, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos envolvendo o gênero *Coffea* (Bandel et al 1975; Carvalho et al 1974; Custer et al 1980; De Pena, 1983; Monaco et al. 1977; Owuor, 1987; Sondahl et al., 1984 e 1991, Thorpe e Patel, 1984).

Diversos trabalhos foram realizados utilizando cultura de tecidos para propagação de variedades comerciais de café, regenerando plantas através de neoformação de gemas, de secção de entrenós verdes, de ramos ortotrópicos e por indução de embriogênese somática a partir de explantes foliares (Dublin, 1980,1981; Herman e Haas 1975; Pierson et al 1983; Sondahl e Sharp 1977).

O meio básico utilizado em diversas culturas é chamado de “MS”, em referência aos seus autores, Murashige & Skoog (1962). Um meio de cultura deve conter macro e microelementos, água, aminoácidos, vitaminas e reguladores de

crescimento, podendo ainda ser líquido ou sólido através da adição de ágar. Também são utilizados carboidratos como a sacarose, proporcionando um crescimento vigoroso e saudável (Thorpe & Patel, 1984).

Na cultura de tecidos, a adição de hormônios no meio de cultura é de suma importância, pois reproduz o que ocorre naturalmente na planta. Combinações de dosagens dessas substâncias propiciam um melhor crescimento e desenvolvimento do explante, que pode ser uma folha, um embrião, broto, segmento nodal, entre outros.

As auxinas e citocininas são os principais reguladores de crescimento utilizados. A combinação desses dois reguladores promove a diferenciação celular e também a organogênese (George e Sherrington, 1984). Algumas substâncias naturais, por conterem auxinas, citocininas e giberelinas, são também utilizadas com função hormonal, tais como: água de côco, extratos de malte, e extratos de diferentes frutas (Krikorian et al, 1987).

As auxinas, por estarem diretamente relacionadas com o crescimento e diferenciação celular, crescimento caulinar, foliar e de raízes, são amplamente utilizadas na micropropagação. As principais auxinas utilizadas são: ácido indol acético (AIA), ácido 2,4- diclorofenoacético (2-4 D), ácido indol butírico (IBA), e ácido naftaleno acético (ANA) (George, 1993).

As citocininas são substâncias importantes na cultura de tecidos “in vitro” para o crescimento e a morfogênese em inúmeras espécies. Elas atuam diretamente na diferenciação, alongamento celular, crescimento e senescência foliar, dominância apical, germinação, entre outros. Este hormônio influencia a divisão celular, sendo necessário na regulação da síntese de proteínas que estão diretamente relacionadas com a formação das fibras do fuso mitótico (George e Sherrington, 1984). As principais citocininas utilizadas são: 6-benzilaminopurina (BAP), N-isopentenilaminopurina (2ip), e zeatina (Zea) (George, 1993).

O TDZ (N-phenil-N-1,2,3-thiadiazol-5-iluréia) é um regulador de crescimento que possui ação citocinínica, e por esta razão é muito utilizado na cultura de tecidos como indutor “in vitro” de calos, brotos e embriões, e na proliferação de brotos axilares (Visser et al., 1992; Lu, 1993).

Existem alguns métodos principais já determinados de multiplicação “in vitro” de café: micropropagação através de ramos ou segmentos de gemas, cultura de embrião e cultura de anteras (Owuor, 1987; Staritsky, 1981).

## 2.2.1 Metodologias em cultura de tecidos

### A. Cultura de anteras

Por ser uma cultura perene, os programas de melhoramento do café demandam muito tempo. A cultura de anteras é considerada uma ferramenta importante em programas de melhoramento, pois possibilita a obtenção de linhas homozigotas em curto espaço de tempo. A obtenção de plantas puras em gerações segregantes acelera o processo de obtenção de novos cultivares em vários anos. As plantas haplóides, possuidoras da metade do número de cromossomos característico da espécie, ficam livres dos problemas de dominância e recessividade. Por possuírem apenas um alelo em cada loco gênico, permitem a rápida produção de plantas homozigotas através da duplicação dos cromossomos numa única etapa substituindo as muitas gerações de autofecundação necessárias no processo usual de obtenção de linhagens (Moraes Fernandes, 1990).

O melhoramento de *C. arabica*, por métodos convencionais, tem sido realizado através de hibridação, seguida da seleção das populações segregantes pelo método genealógico, até a obtenção de linhagens. A partir da hibridação e seleção são necessários aproximadamente trinta anos para obtenção de uma nova

cultivar. A cultura de anteras se apresenta como uma ferramenta importante no melhoramento do cafeeiro pois possibilita a redução desse tempo (Ascanio e Arcia, 1994).

O primeiro trabalho com sucesso em uma espécie economicamente importante, foi obtido com arroz, *Oryza sativa*, por Niizeki e Oono (1968), citado por Vasil (1979). Este trabalho despertou grande interesse nos pesquisadores chineses, que através desta técnica já produziram uma série de cultivares de alto valor comercial.

Atualmente já foram obtidos haplóides de 153 espécies de 52 gêneros e 23 famílias, incluindo as monocotiledôneas e dicotiledôneas (Mahsehwi et al., 1983). Em gramíneas, os trabalhos de Schazffer et al. (1979), Ouyang et al (1983) em trigo, Chen, Chen e Lin (1982) e Tian e Chen (1983) em arroz, são apenas alguns exemplos da produção haplóide via cultura de anteras.

Segundo Nitsch (1983), alguns fatores influenciam a obtenção de plantas haplóides viáveis através da cultura de anteras ou de pólen, tais como : a viabilidade do pólen, vigor que a planta apresenta no estágio homozigoto e a reação das plantas haplóides em relação aos agentes duplicadores dos cromossomos.

As plantas haplóides podem ser obtidas tanto diretamente por embriogênese quanto indiretamente, via formação de calos. Na androgênese direta, o micrósporo se comporta como um zigoto passando por vários estádios de embriogenia, semelhantes ao que ocorre "in vivo". Na androgênese indireta, os micrósporos se dividem e formam calo. As plantas derivadas de calos podem apresentar variações genéticas (Pasqual e Pinto, 1988).

O meio básico utilizado é o "MS", acrescido de reguladores de crescimento, tiamina e sacarose, sendo solidificado com ágar. As anteras utilizadas necessitam de choque térmico. O tratamento a frio das anteras, pode

aumentar a capacidade de produzir calos ou plantas regeneradas. A temperatura ótima varia de espécie para espécie (Hu e Zeng, 1985).

O efeito do tratamento a frio é indireto. O aumento na androgênese é atribuído principalmente ao fato de que a baixa temperatura retém a viabilidade do pólen por mais tempo, retarda a senescência, sincroniza as células e previne o aborto do pólen, portanto, aumenta o número de grãos de pólen viáveis, os quais são destinados a formar embriões (Bajaj, 1984).

Segundo Ascanio e Arcia (1994), o efeito do choque térmico pode estar relacionado com o atraso do envelhecimento da parede da antera e a desorientação do fuso mitótico, levando a um aumento na viabilidade do micrósporo.

Nitsch (1983) observou que, anteras de *Datura* tratadas a 3° C por 48 horas apresentaram uma frequência de pólenes viáveis de 92 %, contra 62% do material não tratado. Resultado semelhante foi obtido com *Nicotina*, sendo que o material não tratado apresentou 45% de grãos de pólen viáveis depois de 5 dias de cultura, contra 68% das anteras tratadas por 48 horas a 5 ° C.

O choque frio em arroz proporcionou uma maior viabilidade do grão de pólen, ativando algumas enzimas e posterior formação de calos (Zapata e Torrizo, 1986). Normalmente utiliza-se botões florais envoltos em papel alumínio e tratamento a frio por alguns dias. Em batata, foram utilizados botões mantidos a 4 °C por 3 a 4 dias. Em aveia utilizou-se água destilada a 4°C durante 2 a 3 semanas (Calleberg e Johansson, 1993; Islam et al, 1992).

Em café, foram testados tratamento a frio e a altas temperaturas, em vários períodos de tempo. Verificou-se que, em tratamentos como: 5° C à 24 h, 48 h e 72h e a 25° C nos mesmos tempos, os melhores resultados foram obtidos em 5 ° C à 48 h (Ascanio e Arcia, 1994).

Existe uma relação entre o genótipo e o desenvolvimento da planta haplóide através da cultura de antera. É importante observar as características do

gênero, da espécie, bem como dos parentais das sementes e do pólen. Zapata 1985, observou que em arroz as melhores respostas foram obtidas em híbridos F1 do que com seus pais endogâmicos. Em aspargo, verificou-se uma interação entre genótipo, temperatura de incubação e a data da semeadura (Wolyn e Feng, 1993).

Em trabalhos com café os meios mais utilizados são meios básicos, indutores de calos, embriogênese e meio para desenvolvimento do embrião. O meio básico é o "MS", contendo basicamente 100 mg/l de inositol, 0,4 mg/l de tiamina, 30 mg/l de cisteína, 30 g de sacarose e sólificado com ágar. Para o meio indutor de calos utiliza-se o meio básico acrescido de 2mg/l de IBA e 8mg/l de BAP. Para o meio embriogênico basta adicionar 5% de água de coco, 05 mg/l de AIA e 1,0 mg/l de 2ip. Para completar o desenvolvimento do embrião propriamente dito, adiciona-se ao meio "MS", ½ concentração de inositol, tiamina, sacarose, 5% de água de coco e 3 mg/l de BAP (Ascanio e Arcia, 1994).

Segundo Ascanio e Arcia 1994, os melhores resultados para indução de calos e embriões, foram obtidos quando as anteras foram mantidas em ambiente escuro, com temperatura variando de 25°C a 26° C e umidade relativa entre 60 a 70 %. O desenvolvimento do embrião deve ser em ambiente claro, com fotoperíodo de 12 horas.

Para a utilização dessa metodologia, é necessário que se determine o estágio de desenvolvimento da antera que contenha micrósporos que respondam melhor aos processos androgenéticos. Vários trabalhos indicam que a melhor fase é aquela em que o micrósporo foi recém liberado da tétrade meiótica até, no máximo, seu estágio binucleado, pois nesta fase o micrósporo ainda possui características esporofíticas que permitem a diferenciação do grão de pólen em embrião (Moraes Fernandes, 1990; Sibi et al 1979; Luz et al, 1995; Raghuramulu, 1989).

Estudos têm demonstrado que o RNA ribossômico e de transferência do grão de pólen inativam-se 24 horas após a primeira mitose. Após este momento,

não é mais possível reverter o desenvolvimento e a célula segue o seu caminho normal para a formação do grão de pólen. As células “in vitro”, quando em condições adequadas e antes de atingirem este ponto, seriam capazes de originar embriões através do processo de embriogênese (Mascarenhas, 1971; Vasil et al, 1979).

Em *Hyoscyamus nigr* foram observadas alterações estruturais no micrósporo, o qual apresentou-se com núcleo e nucléolo grandes e cromatina dispersa. Essas alterações ocorreram rapidamente após 6 horas da inoculação, e referem-se ao início da indução para a formação dos embriões (Reynolds, 1990).

Os embriões haplóides podem tanto ser originados do núcleo vegetativo, quanto do núcleo reprodutivo após a divisão contínua destes; ou ainda, a partir dos dois núcleos originados da mitose (Mantell, Mathews e Mckeil, 1994).

Segundo Calleberg e Johansson (1993), em batata (*Solanum tuberosum L.*), a melhor fase para que ocorra regeneração, corresponde àquela em que os micrósporos encontram-se uninucleados e recém liberados de tétrades, retirados de botões com tamanhos variando entre 4 e 6 mm. Em couve-de-bruxelas, a fase ideal corresponde a botões que variam de 4 a 5 mm (Ockendo, e McClenaghan, 1993).

A fase de tétrade, à qual corresponde a um micrósporo uninucleado, foi o melhor estágio observado em amendoim para a indução e regeneração de plântulas (Willcox et al, 1991).

Em milho, Moro (1987) verificou que o melhor estágio do botão é aquele em que o micrósporo apresentava-se com um núcleo central, o qual corresponde à fase em que o pendão encontrava-se como cartucho. Pretova et al (1993) também observaram que nesta espécie somente ocorre regeneração quando se utiliza micrósporo com um núcleo central. Na cultura do trigo, a melhor fase também correspondeu ao micrósporo em estágio uninucleado ( Zhou, Konzak 1992; Zhou, Ball e Kozank 1992).

Em arroz, o estágio ideal é aquele que apresenta micrósporo uninucleado após a fase de tétrade, pois, durante esta fase o micrósporo é prematuro, podendo ocorrer deficiências durante o processo, não respondendo, portanto, satisfatoriamente à indução (Chen, Chen e Lin 1982, Karin et al 1985, Mercy e Zapata 1986).

Segundo Yang, Chauvin e Herve (1992), o maior número de embriões obtidos em anteras de diferentes genótipos de couve flor, ocorre a partir dos micrósporos uninucleados de botões que possuíam pétalas e anteras com comprimento de 0,5 e 0,8 mm, respectivamente.

Em pimentão (*Capsicum annum L.*), foram observados micrósporos uninucleados próximos da primeira mitose em anteras de botões com pétalas e sépalas de mesmo tamanho (Sibi, Dumas de Vaulx e Chambonnet 1979). Nervo et al (1994) utilizaram anteras cujos botões florais e pétalas apresentavam o mesmo tamanho. Luz (1995) utilizou 3 genótipos de pimentão, sendo que o ideal para a cultura de anteras foi a utilização de botões que apresentavam pétalas e sépalas com comprimentos aproximadamente iguais e que continham micrósporos em estágio uninucleado.

Wolyn e Feng (1993) trabalharam com aspargos e verificaram que as anteras que apresentavam micrósporos uninucleados e próximos da primeira mitose foram as que proporcionaram maior índice de regeneração.

As anteras submetidas a uma condição de estresse podem sofrer uma alteração na divisão celular, favorecendo a formação de dois núcleos iguais depois da primeira mitose, ao invés da ocorrência da formação de um núcleo vegetativo e um reprodutivo. Os gametófitos que apresentam dois núcleos iguais possuem uma capacidade maior para o processo embriogênico (Swanson, 1990).

Em trabalhos com *Coffea arábica L.* variedade Garnica, Ascanio e Arcia (1994) obtiveram a regeneração a partir de anteras de botões florais que mediam



entre 3 a 4 mm de comprimento, contendo micrósporos uninucleados, submetidos a uma temperatura de 5 °C por um período de 48 horas.

A fase uninucleada responde positivamente ao processo embriogênico porque, nesta fase, os micrósporos apresentam uma parede celular delgada, o que a torna mais receptiva aos fatores externos. Em estádios mais avançados da microsporogênese, ocorre um engrossamento da parede celular, sendo esta uma característica do grão de pólen maduro em café, prejudicando o processo de regeneração (Ascanio e Arcia, 1994).

Determinar o tamanho do botão floral, bem como de suas anteras que contenham o estágio uninucleado, se faz necessário, pois otimiza o processo para a obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras.

## **B. Cultura de embriões**

A cultura de embriões “in vitro” é utilizada para a obtenção de embriões em cruzamentos interespecíficos, multiplicação rápida do material selecionado e antecipar a época de plantio. Vários são os fatores que afetam a cultura de embriões “in vitro”, tais como a escolha do meio nutritivo adequado, os reguladores de crescimento utilizados, as substâncias fenólicas liberadas e a própria remoção inadequada do embrião.

Balaga e De Guzman (1972) trabalharam com cultura de embriões de plantas de côco, utilizando meio nutritivo solidificado com ágar, adicionando água de côco autoclavado. Com esta metodologia não foi possível completar o ciclo que vai do embrião, até a formação da plântula. Esta mesma técnica proporcionou sucesso quando o meio sólido foi mudado para meio líquido, pois este último favorece a formação de raízes, devido à maior dispersão das substâncias fenólicas, que são responsáveis pela inibição do crescimento e também pelo aumento na absorção dos nutrientes. Fisher e Tsa (1978) utilizaram carvão ativado adicionado

ao meio, o qual funcionou como um mecanismo de absorção e diluição das substâncias fenólicas liberadas. Na cultura do café, os embriões “in vitro” passam por um processo de oxidação, onde são liberadas substâncias fenólicas que impedem o desenvolvimento e crescimento do embrião. Essas substâncias podem atuar como inibidores do metabolismo celular, pois no processo de oxidação ocorre queda na quantidade de oxigênio disponível ao embrião, inibindo o seu desenvolvimento (Bewley e Black, 1982).

A composição do meio de cultura é extremamente importante para o desenvolvimento do embrião “in vitro”. É necessário que se determine as concentrações ótimas dos componentes do meio de cultura, tais como os macro e microelementos, a sacarose e os reguladores de crescimento. Segundo Monnier (1978), a concentração ótima de sacarose para embriões imaturos é de 60 g/l, atingindo alta osmolaridade no meio “MS”; se o meio estiver deficiente em sacarose, formam-se plântulas disformes com baixa probabilidade de sobrevivência, ou a não germinação dos embriões.

Os reguladores de crescimento são amplamente utilizados na cultura de embriões, quando estes são muito jovens. Estas substâncias possuem a capacidade de suprir as necessidades para a germinação, desenvolvimento e crescimento do embrião. Krasnyanski et al (1992) cultivaram embriões de *Heliantus giganteus* L., em meio contendo “MS” com e sem a adição dos reguladores de crescimento, constatando a importância dessas substâncias no microcultivo dessa espécie, que se mostraram essenciais para o seu desenvolvimento.

Os diferentes tipos de auxinas apresentam respostas diferentes quanto à sua ação, e se mostram instáveis em relação à ocorrência da organogênese. Na cultura do café este hormônio se mostrou muito eficaz na formação de embriões e na formação de calos (Guevara, 1987). George (1993) observou que altas concentrações de auxinas induzem à formação do embrião, porém o seu desenvolvimento se dá com baixas concentrações de auxinas.

As giberelinas atuam no processo de germinação, quebra de dormência e no crescimento de embriões. As mais conhecidas e utilizadas são: ácido giberélico GA<sub>3</sub> e o GA<sub>4+7</sub>. Vários trabalhos mostram o efeito positivo das giberelinas quando adicionadas ao meio de cultura, proporcionando a iniciação e o desenvolvimento da zona meristemática radicular, e ainda estimulando o desenvolvimento da radícula já existente (Raghavan, 1976; Ackerson, 1984).

Segundo Válio (1976), na cultura do café, baixas concentrações de ácido giberélico e altas de citocininas promovem a germinação de embriões. Este mesmo autor verificou que altas concentrações de ácido giberélico podem causar a morte do embrião.

Raghuramulu (1989) utilizou frutos imaturos da cultivar Sam Ramon cv. 573 (*C.arabica* L.), esterelizados com 0,5% de HgCl<sub>2</sub> por dois minutos, com embriões na fase de torpedo. O meio básico continha "MS" suplementado com 1,0 mg/l de BAP e 1,0 mg/l de AIA. O processo de esterilização apresentou 100% de eficiência e foi similar ao utilizado em gemas axilares de *Coffea arabica* cv.catuai, realizado por Sondahl et al (1984). Observou-se a presença de folhas na segunda semana de desenvolvimento e o primeiro par de folhas após a sétima semana. Colona (1972) e Sondahl et al (1984) obtiveram grande sucesso com embriões de robusta, dewerei, arábica e arabusta.

### C. Micropropagação

A micropropagação do cafeeiro se perfila como sendo uma tecnologia para a conservação dos recursos genéticos através de bancos de germoplasma e propagação e distribuição do material híbrido selecionado. Segundo Berthouly e Echeveri, (1987), a partir de uma microestaca pode-se obter de 7 a 9 micronós a cada 80 dias, totalizando cerca de 20.000 plântulas por ano. O sucesso na micropropagação está diretamente relacionado com os componentes utilizados no

meio de cultura, sendo que o regulador de crescimento utilizado é considerado fator preponderante.

Zok e Dublin (1991) verificaram que as citocininas atuam diretamente no metabolismo fisiológico da planta, promovendo o início das brotações em diferentes espécies de *Coffea*. Estes autores constataram que as citocininas BAP e IBA são mais eficazes que as cinetinas no que se refere à formação e ao crescimento de gemas por explante.

Altas concentrações de citocininas, em café, inibem o desenvolvimento de raízes e proporcionam o crescimento de gemas axilares, existindo uma concentração máxima para que se tenha uma resposta satisfatória no desenvolvimento de brotos, igual a 10 mg/l, segundo Guevara (1987). Acima deste valor ocorre uma inibição no desenvolvimento.

Segundo Raghuramulu (1989), o maior problema na cultura "in vitro" de café é a oxidação provocada por fenóis, que induzem a produção de substâncias inibidoras do desenvolvimento celular, sendo necessária a utilização de substâncias antioxidantes, tais como: cisteína, carvão ativado e o polivinilpirrolidone (PVP). Este mesmo autor, trabalhando com ramos ortotrópicos de aproximadamente 2 a 3 mm de comprimento de cultivares de *C. arabica* L. e *C. canephora*, verificou que as melhores combinações dos reguladores de crescimento foram, 1,0 mg/l de BAP e 1,0 mg/l de AIA, promovendo um maior crescimento e desenvolvimento do explante.

Dublin (1980) verificou um aumento no número de brotasses, quando utilizou BAP em concentrações que variaram de 1,0 a 10,0 mg/l, sendo eficiente na multiplicação do híbrido interespecífico de Arabusta.

Segundo Lu (1993), o TDZ também pode ter uma ação auxínica; trabalhando com hipocótilo de gerânio, verificou bons resultados na embriogênese somática, utilizando este hormônio em substituição à auxina utilizada. Este mesmo autor verificou que ao adicionar TDZ ao meio de cultura, o número de brotos foi

maior que o observado em meio contendo citocinina, e as concentrações necessárias foram mínimas, variando de 0,002 mg/l a 0,09 mg/l. Zhou et al (1994) verificaram que, utilizando meio contendo 0,02 mg/l de TDZ e 0,50 mg/l a 1,01 mg/l de 2,4-D, ocorria um aumento na indução de calos embriogênicos, e quando os calos eram transferidos para meio contendo TDZ ou TDZ+ANA, observaram um aumento de 25% na formação de embriões em relação ao meio utilizado sem o TDZ.

Inneco (1993), trabalhando com indução de brotações e calos em cotilédone de pimentão, utilizou 0,15 mg/l de TDZ, o qual apresentou o mesmo efeito que 4,00 mg/l de BAP. O TDZ possui uma maior atividade em relação às citocininas, pois ele não é facilmente degradado, sendo portanto, mais estável e mais ativo.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


- ASCANIO, E.C.E.; ARCIA, M.A.M. Efecto del estado de desarrollo de las anteras y de un shock térmico sobre la androgénesis en *Coffea arábica L. Var. Garnica*. **Café Cacao Thé**, v:28, n.2 p.75-79. 1994.
- ACKERSON, R.C. Abscisic acid and precocious germination in soybean. **Journal Experimental of Botany**, v. 35, n.152, p.414-21. 1984
- BAJAJ, Y.P.S. In vitro production of haploides. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (eds). **Handbook of plant cell culture; Techiques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1984. v.1, p.228-287.
- BALAGA, H. Y.; DE GUZMAN, E. V.; The growth and development of coconut "Makapuno" embryos "in vitro". Increased root incidence and growth in response to media composition and to sequential culture from liquid to solid medium. **Philippines Agriculture**. V.53 p.551-565. 1972.
- BANDEL, G.; CARVALHO, F.J.P.C.; CROCOMO, OJ.; SHARP, W.R.; GUTIERREZ, L.E.; CARVALHO, P.C.T. Aspectos citológicos da diferenciação de tecidos de cafeeiros cultivados "in vitro". **Anais da "Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v.32. p.717-724. 1975.
- BERTHAUD, J. Les ressources génétiques pour l'amélioration des caféiers africains diploides. In: **Collection travaux et Documents**, n:118, ORSTOM, Paris 374p. 1986.
- BERTHOULY, M.; ECHEVERI, J.H. Multiplicacion assexual de diferentes lineas de Catimor: Inducion "in vitro" de yemas axilares latentes. In: **Congresso Latino Americano de Tecnologia Cafeeira**, v.1, Campinas, 1987. Resumos... Rio de Janeiro, MIC/IBC, p.279-283, 1987.
- BEWLEY, J.D., BLACK. **Physiology and Biochemistry of seeds in Relation to germination**. Berlin: Springer- Verlag, v.2, 375p. 1982.

- CALLEBERG, E.K.; JOHANSSON, L.B. The effect of starch and incubation temperature on anther culture of potato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.27-34, 1993.
- CARVALHO, F.J.P.C., CARVALHO, P.C.T., CROCOMO, O.J. **Cultura de tecidos de explantes de café** In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Poços de Caldas, Resumos..., Rio de Janeiro, v.2, p. 299-300, 1974
- CARVALHO, A. Histórico do desenvolvimento da cultura do café no Brasil. **Instituto Agrônomo de Campinas**. Campinas. v. 9, n. 34, 7p., 1993. (documento IAC)
- CHEN, C.M.; CHEN, C.C.; LIN, M.H. Genetics analysis of anther derived plants of rice. **The Journal of Heredity**, Washington, v.72 p.49-52, 1982.
- COLONNA, J.P. Contribution a l'étude de la culture "in vitro" d'embryos de cafeiers. **Action de la cafeine. Café, Cacao, Thé**, v.16, p. 193 – 203, 1972.
- CUSTER, J.B.M.; VAN, E.G.; BUIJS, L.C. Clonal propagation of *Coffea arabica* by nodal culture. In: **International Science Colloquium on Coffee 9**. Londres- Paris Asic. p.586-96. 1980.
- DE PENA, M. Somatic embryo induction and plant regeneration from *Coffea canephora* and *C. arabica*. In: **Proc. Simpósio sobre ferrugens do Cafeeiro**. CIFC. Oeiras, Portugal, p. 493 – 512, 1983.
- DUBLIN, P. Multiplication vegetative "in vitro" de l'arabusta. **Caffé, Cacao, Thé**, v.24, p.281-290, 1980
- DUBLIN, P. Embryogenesis somatique directe sur fragments de fenilles de cafeier Arabusta. **Caffé, Cacao, Thé**. v. 25, p. 237 – 241, 1981.
- FAZUOLI, L.C. Genética e Melhoramento do Cafeeiro. In: RENA, A B. ed. **Cultura do cafeeiro – fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, Associação Brasileira de Pesquisa Potassa e fosfato. 1986.
- FISHER, J.B.; TSAI, J.H. In vitro growth of embryos and callus of coconut palm. **In vitro**, v.14, p.307-311, 1978.
- GRANER, E.A., GODOY JUNIOR, C., **Manual do Cafeicultor** ed. Universidade de São Paulo, 320p., 1967.

- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part. 1 The Technology 2ed. Edington: Exegetics, 574p., 1993.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part. 2 The Technology 2ed. Edington: Exegetics, 1361p., 1996.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd (Grande-Bretane), 709p. 1984.
- GUEVARA, E.B. **Reguladores de crescimento**. In: II Curso de Cultivo de Tejidos, Turrialba, Costa Rica, p.58-79, 1987.
- HERMAN, E.B.; HASS, G.J. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. **Hort Science**, Urigenia, v.10, n.6, p.588-589, Dec. 1975.
- HU, H.; ZENG, J.Z. Development of new varieties via anther culture. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; YAMADA, V. eds. Handbook of plant cell culture; **Crop Species**. v.3, New York. Macmillan Publishing Company, p.65-90, 1985.
- ⑥ INNECO, R. **Propagação vegetativa de pimentão (*Capsicum annum* L.) através de métodos in vitro e estacas**. Lavras, UFLA, 105p. 1993 (Dissertação Mestrado em Fitotecnia).
- ISLAM, M.R.; KINTZIOS, S. & FISCHBECK, G. Anther culture responsiveness of *Hordeum spontaneum* derived spring barley lines and a genetic analysis of plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 29, p. 235-239, 1992.
- KARIN, N.H.; SHAHJAHAN, A.K.M.; MIAH, A.; MIAH, S.A. Response of rice anthers to callus induction and plant regeneration. **International Rice Research Newsletter**, Manila, v.10, n.3, p.21-22, 1985.
- KRASNYANSKI, S.; POLGÁR, Z.; NÉMETH, G.; MENEZEL, L. Plant regeneration for callus and protoplast of *Heliantus giganteus* L. **Plant Cell Reports**, v.11, p.7-10. 1992.
- KRIKORIAN, A. D.; KELLY, K.; SMITH, D.L. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Daris, p.j; ed. **Plant Hormones and their role in plant growth and development**. New York, p.591-613, 1987.



- LU, C.Y. The use of thidiazuron in tissue culture. *In vitro Cell . Dev. Biol.*, local, v.29, p.92-96, Apr. 1993.
- LUZ, J.M.Q. **Embriogênese somática "in vitro" em anteras de Pimentão (*Capsicum annum* L.)** (Tese de doutorado). 1995, 115p. Lavras - M.G.-UFLA.
- MAHESHWARI, S.C.; RASHID, A.; TYAGI, A.K. Anther / pollen culture for production of haploids and their utility. *Rice News*, v.41, p.2-9, 1983.
- MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios da biotecnologia em plantas: Uma introdução à engenharia genética em plantas.** Ribeirão Preto, SBG, 1994. 333p.
- MASCARENHAS, J.P. **RNA and protein synthesis during pollen development and tube growth.** In: Heslop-HARRISSON, J., ed. *Pollen development and physiology.* London, Butterworth, p.201-222, 1971.
- MERCY, S. T. & ZAPATA, F. J. Effect of pollen development stage on callus induction and its relation to auricle distance in two rice varieties. *International Rice Research Newsletter*, Manila, v.11, n.4, p.23-24, August, 1986.
- MONACO, L.C.; SONDAH, M.R.; CARVALHO, A. CROCONO, A.J.; SHARP, W.R. Applications of tissue culture in the improvement of Coffee. In: *Applied and Fundamental Aspects of plant cell, tissue and organ culture.* (Reinert J. and Bajaj, Y.P.S.) Springer-Verlag, Berlin, p.109-129, 1977.
- MONNIER, M. Culture of zygotic embryos. In: THORPE, T.A. (ed). *Frontiers of plant tissue culture.* International Association for Plant Tissue Culture, Calgary, Canadá p.277-295. 1978.
- MORAES FERNANDES, M.I.B. de **Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras.** In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. eds. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília, ABCTP/EMBRAPA/CNPH, p.311-332, 1990.
- MORO, J.R. **Biotecnologia e melhoramentos genético de milho.** In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. eds. **Melhoramento e produção do milho.** Campinas, FUNDAÇÃO CARGILL, v.2, p.343-72, 1987.

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

NERVO, G.; CARANNANTE, G.; AZZIMONTI, M.T.; ROTINO, G.L. Use of anther culture method in pepper breeding: factors affecting plantlets production. In: **INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE**, Firenze. 1994. Anais...Firenze: IAPTC, 1994. v.8, p.92.

NITSCH, C. Progress In anther and pollen culture technique. **In: Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement**. Beijing, 1981. **Proceedings...**Beijing: Beijing Science Press, p.1-10, 1983.

OCKENDO, D.J.; McCLENAGHAN, R. Effect of silver nitrate and 2,4-D on anther culture of brussels sprouts (*Brassica oleracea* var.gemnifera). **Plant Cell tissue and organ culture**, Dordrecht, v.32, p.41-46, 1993.

OWUOR, J.B.O. In vitro initiation of arabusta Coffee hybrids. **Kenya Coffee**, p.59-62, mach 1987.

OUYANG, J.; ZHOU, S.; JIA, S. The reponse of anther culture to culture temperature In *Triticum aestivum*. **Theor Appl. Genet.** v.66, p.101-109, 1983.

PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P. **Melhoramento de café (*Coffea arabica* L.) através de métodos de cultura de tecidos**. Lavras, 1988, 13p.

→PIERSON, E.S.; VAN LAMMEREN,; SCHEL, J.H.; STARITSKY, G. In vitro development of embryoids from punched leaf disc of *Coffea canephora*. **Protoplasma** (Vienne), v.115, n.2-3, p.208-216, 1983.

PRETOVA, A.; RUIJTER, N.C.A. de; LAMMEREN, A.A.M.; SCHEL, J.H.N. Structural observations during androgenic microspore culture of the 4c1 genotype of *Zea mays* L. **Euphytica**, v.65 p.61-9, 1993.

→RAGHAVAN, V. **Experimental embryogenesis in vascular plants**. Academic Press, New York, 376 p. 1976.

RAGHURAMULU, Y. Anther and endosperm culture of Coffee. **Journal of Research**. v:19, n.2 p.71-81, 1989.

- REYNOLDS, T.L. **Ultrastructure of pollen embryogenesis.** In: BAJAJ Y.P.S. *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* Berlin: Springer-Verlag, v.12, p. 66-82, 1990
- SCHAEFFER, G.W.; BAENZIGER, S.; WORLEY, J. Haploid plant development from anthers and "In viro" embryo culture of wheat. *Crop science*, v.19, p.697-702, 1979.
- SIBI, M.; DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET Obtention de plantas haplóides por androgenése "in vitro" chez le Piment (*Capsicum annum L.*). *Ann. Amelion. Plants* v: 29, n.5, p.583-606, 1979.
- SONDAHL, M.R.; SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in culture leaf explante of *Coffea arabica L.* *Zeitschrift fuer pflanzen physiologie*, Zurich., v.81, n.4, p.395-408, 1977.
- SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; MEDINA Filho, H.P.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C.; COSTA, W.R. *Coffee.* In: Ammyrato e McMillen, eds. *Handbook of plant cell culture.* New York, p.564-590., 1984.
- SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W.R. Propagation in vitro del café. In: Roca, W.R. e Mroginski, L.A. , eds. *Cultivo de tejidos em la Agricultura, Fundamentos e Aplicaciones.* Turrialba, p.621-642, 1991.
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissue of coffee. *Acta Botanica Neerlandica*, Netherlands, v.19, n.4, p.509-514, august, 1970.
- STARITSKY, G., Van HASSELT, G.A.M. **The sinchronesid mass propagation of *Coffea canephora* "in vitro".** 9° Colloque Scientifique International sur le café. Londres, juin, Asic. (Paris). p.597-602, 1981.
- SWANSON, E. Microspore culture in Brassica. IN: *Plant Cell and Tissue Culture.* Ed. Pollard, J.W. y Walker, J.M., Humana Press, Clifton - N.J., p. 159 - 169, 1990.
- THORPE, A. T.; PATEL, K.R. Clonal propagation: Adventitious Buds. In: Vasil, J.K.; ed. *Cell Culture and Somatie Cell Genetics of Plant.* Orlando, p.49-60, 1984. Thorpe & Patel, 1984
- TIAN, W.; CHEN, Y. The Factors affecting induction and differentiation of callus in rice anther float culture. *Acta Genetics sin*, v.10, p.362-368, 1983.

- VALIO, I. F.M. Germination of coffee seeds (*Coffes arabica* L.) cv. Mundo Novo. **Journal of Experimental Botany**, Oxford v. 27, n.100, p. 983 –999, oct – nov., 1976.
- VASIL, I.K.; AHUJA, M.R.; VASIL, V. Plant Tissue Culture in genetics and plant breeding. **Advances in genetics**. v.20, p.138-149, 1979.
- VASIL, I.K., AHUJA, M.R., VASIL, V. Plant Tissue Culture in genetics and plant breeding. **Advances Genetics**. v. 20, p. 127-215, 1979.
- VISSER, C.; QURESHI, J.A.; RAVINDER, G.; SAXENA, P.K. Morphoregulatory role of thidiazuron. **Plant Physiology**, Maryland, v.99, p. 1704-1707, 1992.
- WILLCOX, M.C.; REED, S.M.; BURNS ,J.A.; WYNNE, J.C. Effect of microspore stage and media on anther culture of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.24, p.25-28, 1991.
- WOLYN, D.J.; FENG, X. Genotype temperature and sampling date affect embryogenesis in asparagus anther culture. **Hort Science**, v.28, n.3, p.316-317, 1993.
- YANG, O.; CHAUVIN, J.E.; HERVE, Y. A study of factors affecting anther culture of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.28, p.229-296, 1992.
- ZAPATA, F.J. **Biotechnology in international Agricultural Research**. Manilas, International Rice Research Institute. p. 85-95, 1985.
- ZAPATA, F.J. & TORRIZO, L.B. Heat treatment to increase callus induction efficiency in anther culture of IR 42. **International Rice Research Newsletter**; Manila, v.11, n.4, p.25-26, August 1986.
- ZHOU, J.; MA, H.; GUO, F.; LUO, X. Effect of Thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.36, p.73-79.1994
- ZHOU, H.; BALL, S.T.; KONZAK, C.F. Functional properties of ficoll and their influence on anther culture responses of wheat. **Plant Cell, tissue and Organ Culture**, v.30, p.77-83, 1992.

ZHOU, H.; KONZAK, C.F. Genetic control of green plant regeneration from anther culture of wheat. **Genome**, v.35, p. 957-961, 1992.

ZOK, S., DUBLIN, P. Multiplication Végétative in vitro par culture D'Apex chez *Coffea arabica* L. Action de Solutions Minérales et de Regulateurs de croissance. **Café, Cacao, Thé**, v. 14, n 4, oct-dec., 1991.

## **CAPÍTULO 2**

### **DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DO BOTÃO FLORAL PARA A CULTURA DE ANTERAS NO CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)**

## 1 RESUMO

ANDRADE, L.M.C.O. **Determinação do tamanho do botão floral para a cultura de anteras do cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Lavras: UFLA, 1998. (Dissertação- Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

Em programas de melhoramento de plantas perenes são necessárias várias gerações para se atingir a homozigose. A cultura de anteras em café é de suma importância pois possibilita a redução desse tempo. O objetivo deste trabalho foi verificar a relação entre o tamanho do botão floral e da antera e o estágio de desenvolvimento dos micrósporos para obtenção de plântulas haplóides através da cultura de anteras. Foram utilizados botões florais de 4 cultivares de *Coffea arabica*, sendo: cv. Mundo Novo LCP-37919, Catuaí LCH-2077-2-5-44, Rubi MG-1192 e Icatú LC-3282, pertencentes a coleção "in vivo" da Universidade Federal de Lavras. Os botões florais foram fixados em álcool 70%, e o estágio de desenvolvimento do micrósporo foi analisado através da coloração do mesmo com carmin propiônico a 1%. A análise citológica evidenciou a existência de um sincronismo entre o desenvolvimento da antera, o comprimento do botão floral e os estádios de desenvolvimento do micrósporo. Nas 4 cultivares avaliadas, verificou-se que a maior percentagem de micrósporos apresentando um núcleo central, ideal para a obtenção de plantas haplóides "in vitro", encontra-se em anteras que variam de 4,5 a 5,5 mm de comprimento, presentes em botões florais que variam de 4,5 a 6,0 mm de comprimento.

## 2 ABSTRACT

### **DETERMINATION OF THE SIZE OF THE FLOWERS BUD FOR THE CULTURE OF ANTHERS IN COFFEE CULTURE** *(Coffea arabica L.)..*

In improvements programs of perennial plants, it is necessary several generations to reach the homozygote. The anthers culture in coffee is very important, because it facilitates the reduction of the time, to reach the homozygote. The objective of this work was to verify the relationship among the size of the flowers bud, the anther and the microspore development stadium, aiming to obtaining haploids plantlets through the culture of anthers. Flowers buds of 4 cultivars of *Coffea arabica*: cv Mundo novo LCP-37919, Catuai LCH-2077-2-5-44, Rubi MG-1192 and Icatú LC-3282, belonging to the collection "in lives" of the Universidade Federal de Lavras. The flowers buds were fastened in alcohol 70%, and the microspore development stadium was analyzed through the coloration of the same with propionic carmin at 1%. The cytological analysis shows the existence of a sincronismo in the anther development and in the length of the flowers bud. This is related to the microspore development stadium. In the 4 cultivars appraised, it was verified that the largest microspore percentage present in the central nucleus ideal for the obtaining of haploids plants "in vitro", meets in anthers that varies in length from 4,50 to 5,00 mm and present in flowers buds ranging in length from 4,50 to 6,00 mm.



### 3 INTRODUÇÃO

Por ser uma cultura perene, os programas de melhoramento do cafeeiro demandam muito tempo. A cultura de anteras é considerada uma ferramenta importante no melhoramento, pois possibilita a obtenção rápida de linhas homozigotas.

Segundo Moraes Fernandes (1990), a obtenção de plantas haplóides seguida pela duplicação dos cromossomos através da utilização de colchicina resulta em linhas homozigóticas em curto espaço de tempo, se comparada com os métodos convencionais. Além da redução de tempo, esta técnica pode ser utilizada em estudos genéticos, pela obtenção de recessivos e indução de mutações. A cultura de anteras para a obtenção de plantas homozigotas em gerações segregantes acelera o processo de geração de novos cultivares em vários anos, além de facilitar a análise genética, eliminando a complexidade do estado heterozigoto. As plantas haplóides, possuidoras da metade do número de cromossomos característico da espécie, ficam livres dos problemas de dominância e recessividade por possuírem apenas um alelo em cada loco gênico, permitindo a rápida produção de plantas homozigotas através da duplicação dos cromossomos numa única etapa, substituindo as muitas gerações de autofecundação necessárias no processo usual de obtenção de linhagens.

Para a prática de cultura de anteras, é necessário que se determine o estágio ideal de desenvolvimento das mesmas, sendo que o estágio utilizado deve conter micrósporos que respondam melhor aos processos androgenéticos. Inúmeros trabalhos indicam que a melhor fase é aquela em que o micrósporo está recém liberado da tétrade meiótica até, no máximo, o estágio binucleado. Nesta fase, o micrósporo ainda possui características esporofíticas que permitem a diferenciação

do grão de pólen em embrióides “in vitro” (Moraes Fernandes, 1990; Sibi et al., 1979; Luz, 1995; Raghuramulu, 1989).

As células “in vitro” são capazes de originar embriões através da embriogênese, quando submetidas à condições adequadas, antes da primeira mitose. Após esse período ocorre a inativação dos RNAs ribossômicos e de transferência e o desenvolvimento segue o caminho normal para a formação do grão de pólen (Mascarenhas, 1971; Vasil et al, 1979).

O objetivo deste trabalho foi o de relacionar os estádios de desenvolvimento dos micrósporos com as características morfológicas do botão floral, determinando o tamanho do botão floral ideal para obtenção de haplóides através da cultura de anteras de cafeeiro.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Citologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Foram utilizados 4 cultivares de *Coffea arabica* L.: Mundo Novo LCP-37919 ; Catuaí LCH-2077-2-5- 44; Rubi MG-1192 e Icatú LC-3282., pertencentes ao Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Lavras.

Aproximadamente 200 botões florais foram coletados no período de 8 à 9 horas da manhã, em seguida foram fixados em álcool etílico e ácido acético na proporção de 3:1 durante 24 horas, sendo posteriormente armazenados em álcool 70% e mantidos a uma temperatura de 4°C.

Os botões florais foram separados de acordo com o seu comprimento, em cinco classes distintas, de acordo com os valores mínimos, máximos e médias, a saber: classe 1 (1,5; 1,72; 2,0 mm); classe 2 (2,5; 2,98; 3,5 mm); classe 3 (4,0; 4,48; 5,0 mm); classe 4 (4,5; 5,30; 6,0 mm); classe 5 (6,5; 7,20; 8,0 mm), as quais foram correlacionadas com o comprimento do botão floral, comprimento da antera e as fases de desenvolvimento do micrósporo.

Foi utilizado um paquímetro para a medição do comprimento dos botões florais, bem como do comprimento de suas anteras. Foram analisados 3 botões de cada classe para todos os genótipos.

O estágio de desenvolvimento dos micrósporos foi avaliado pela confecção de duas lâminas por botão, sendo duas anteras por lâmina, cujos micrósporos foram corados com carmin propiônico 1%. Determinou-se a contagem de micrósporos nas fases de tétrade, recém liberado de tétrade, núcleo central, núcleo deslocado e espessa camada de exina, a partir de amostras de 200 micrósporos por lâmina por cultivar.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A evolução da antera, em relação ao comprimento do botão floral, evidenciou a existência de um sincronismo no desenvolvimento e que este está relacionado com os estádios de desenvolvimento do micrósporo. Na Tabela 1, estão apresentadas as contagens de micrósporos nas diferentes fases de seu desenvolvimento, conforme as classes de comprimento do botão floral. O teste de contingência ( $\chi^2$ ) foi altamente significativo, evidenciando que o estágio de desenvolvimento do micrósporo está correlacionado com as classes de botões florais.

Os botões florais contêm anteras que apresentam micrósporos em diferentes estádios de desenvolvimento, porém para cada classe, apenas um estágio ocorre em maior percentagem (Tabela 1).

Os botões florais da classe 1 apresentaram comprimento de 1,50 a 2,00 mm contendo anteras de 1,00 a 2,00 mm de comprimento. Nestas, a maioria dos micrósporos, cerca de 88%, encontravam-se envolvidos pela calose, formando a tétrade meiótica, e o restante, recém liberado da tétrade, para todas as cultivares (Tabela 1 e Figura 1A e 1B). A classe 2 corresponde aos botões que variam de 2,50 a 3,50 mm de comprimento e anteras de 2,00 a 3,50 mm, sendo que estas apresentaram micrósporos predominantemente recém liberados da tétrade, com cerca de 65% dos micrósporos nesta fase, e os demais distribuídos nos outros estádios de desenvolvimento (Tabela 1 e Figura 1B). A classe 3, na qual os botões florais mediam de 4,00 a 5,00 mm de comprimento e anteras variando de 3,50 a 4,00 mm de comprimento, as 4 cultivares apresentaram cerca de 66% dos micrósporos vacuolados e com núcleo não central.

**TABELA 1 - Estádio de desenvolvimento dos micrósporos, de acordo com as diferentes classes de tamanho em relação ao comprimento (mm) e média dos botões florais (mm) e comprimento (mm) das anteras, UFLA, Lavras, MG, 1998**

Classe	Botão Floral	Antera	Estágios dos Micrósporos					TOTAL OBS.
	Comprimento	Comprimento	Tétrade	Recém liberado de tétrade	Núcleo deslocado	*Núcleo central	Com exina formada	
1	1,50; <u>1,72</u> ; 2,00	1,0 - 2,0	176	24	0	0	0	200
2	2,50; <u>2,98</u> ; 3,50	2,0 - 3,5	26	130	20	20	4	200
3	4,00; <u>4,48</u> ; 5,00	3,5 - 4,0	0	10	132	52	6	200
4	4,50; <u>5,30</u> ; 6,00	4,5 - 5,5	0	10	50	140	0	200
5	6,50; <u>7,20</u> ; 8,00	6,0 - 8,0	0	0	0	20	180	200

\* - Estádio ideal para utilização na cultura de anteras

$$\chi^2_c = 2.146,29 (P < 0,01)$$

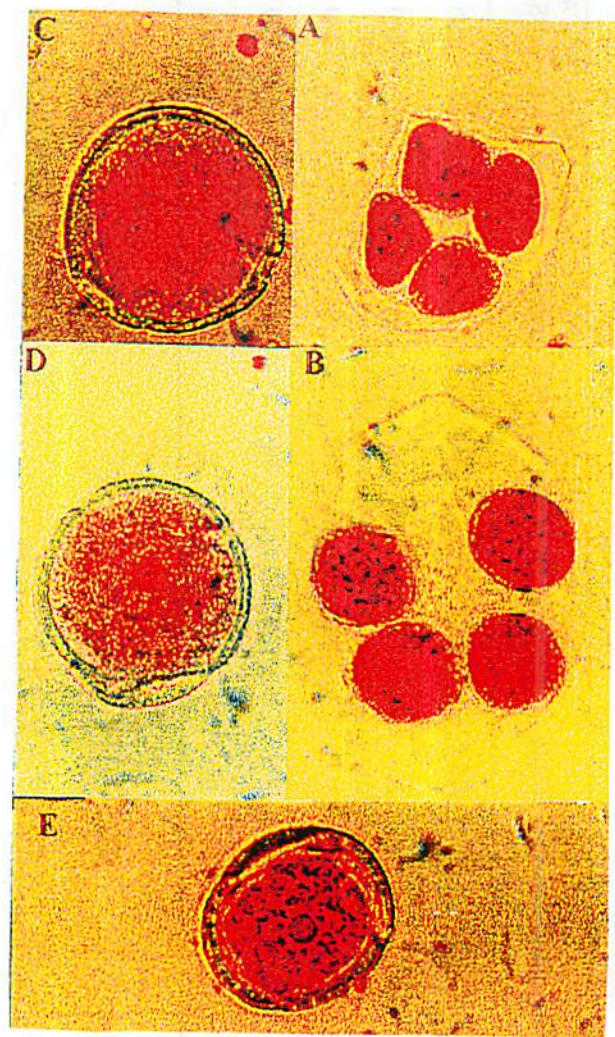


Figura 1. Diferentes fases da microsporogênese: A) tétrede meiótica, B) micrósporo recém liberado da tétrede, C) micrósporo vacuolado, D) micrósporo uninucleado, não vacuolado, E) micrósporo com espessa camada de exina. (A. T. = 1376X)

Observou-se também a presença de micrósporos nos estádios recém liberado da tetrade, até o estádio onde o micrósporo já apresentava camada de exina formada, porém, em pequena percentagem (Tabela 1 e Figura 1C). Os botões, na classe 4, variaram de 4,50 a 6,00 mm de comprimento e apresentando anteras de 4,50 a 5,50 mm de comprimento, apresentaram cerca de 70% dos micrósporos em estádio uninucleado central (Tabela 1 e Figura 1D). Esta é a classe, cujos botões deverão ser utilizados para a cultura de anteras. Estes dados apresentam divergências em relação àqueles observados por Ascanio e Arcia (1994), para anteras de *Coffea arabica* var. Garnica, onde verificaram a presença da fase uninucleada central em botões com tamanho de 3,00 a 4,00 mm de comprimento. Na classe 5, os botões variaram entre 6,50 a 8,00 mm de comprimento e suas anteras de 6,50 a 8,00 mm de comprimento. Nesta fase os micrósporos já se encontravam maduros, com a exina completamente formada (Tabela 1 e Figura 1E). Este resultado também foi verificado por Ascanio e Arcia (1994), e corresponde a uma fase inadequada para a cultura de anteras, pois já se inicia a formação do grão de pólen. Nesta fase, o processo de desenvolvimento não pode ser mais revertido, pois ocorre uma inativação dos RNAs ribossômicos e de transferência do grão de pólen. O micrósporo já apresenta uma grossa camada de exina que corresponde a um estádio mais avançado da microsporogênese, onde ocorre um engrossamento da parede celular, prejudicando o processo de regeneração (Mascarenhas, 1971; Vasil et al, 1979; Ascanio e Arcia, 1994).

Uma vez definido o tamanho do botão floral ideal para a cultura de anteras, procedeu-se os experimentos. Estes foram realizados segundo metodologia utilizada por Ascanio e Arcia, 1994. Os botões florais foram submetidos ao processo de desinfecção e posteriormente passaram por um pré-tratamento a frio, sendo de 0;24;48 e 72 horas, foi utilizado como antioxidante, a solução de PVP(polivinilpirrolidone), para minimizar o efeito das substâncias

fenólicas liberadas. O meio básico utilizado foi o “MS” acrescido de reguladores de crescimento. As anteras foram inoculadas em 3 meios específicos, sendo: meio para indução de calos; meio embriogênico e meio para desenvolvimento dos embrióides. Apesar da metodologia ser bem definida, a cultura de anteras não apresentou resultados satisfatórios, mesmo quando se testou os outros tamanhos diferentes de botão floral. O problema de oxidação foi o fator limitante para o desenvolvimento das anteras. Trabalhos estão sendo conduzidos para se determinar uma metodologia específica para eliminar ou reduzir os efeitos das substâncias fenólicas liberadas.



## 6 CONCLUSÃO

Nas 4 cultivares de *C.arabica* avaliadas, verificou-se que a maior percentagem de micrósporos apresentando um núcleo central, ideal para a obtenção de plantas haplóides “in vitro”, encontra-se em anteras que variam de 4,5 a 5,5 mm de comprimento, presentes em botões florais que variam de 4,5 a 6,0 mm de comprimento.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASCANIO, E.C.E; ARCIA, M.A.M. Efecto del estado de desarrollo de las anteras y de un shock térmico sobre la androgénesis en *Coffea arábica L. Var. Garnica*. **Café Cacao Thé**, v:28, n.2 p.75-79. 1994.
- LUZ, J.M.Q. **Embriogênese somática "in vitro" em anteras de Pimentão (*Capsicum annum L.*)** (Tese de doutorado). 1995, 115p. Lavras – M.G.-UFLA.
- MASCARENHAS, J.P. **RNA and protein synthesis during pollen development and tube growth**. In: Heslop-HARRISSON, J., ed. *Pollen development and physiology*. London, Butterworth, p.201-222, 1971.
- MORAES FERNANDES, M.I.B. de **Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras**. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. eds. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/EMBRAPA/CNPH, p.311-332, 1990.
- RAGHURAMULU, Y. **Anther and endosperm culture of Coffee**. **Journal of Research**. v:19, n 2, p.71-81, 1989.
- SIBI, M.; DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET **Obtention de plantas haplóides por androgenése "in vitro" chez le Piment (*Capsicum annum L.*)**. **Ann. Amelion. Plants** v: 29, n5,:583-606, 1979.
- VASIL, I.K., AHUJA, M.R., VASIL, V. **Plant Tissue Culture in genetics and plant breeding**. **Advance Genetics**. v. 20, p. 127-215, 1979.

### **CAPÍTULO 3**

**INFLUÊNCIA DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO NA  
CULTURA DE EMBRIÕES “IN VITRO” DA CULTIVAR CATUAÍ  
VERMELHO LCH 2077-2-5-44.**

## 1 RESUMO

ANDRADE, L.M.C.O. **Influência dos reguladores de crescimento na cultura de embriões “In vitro” da cultivar catuaí vermelho LCH 2077-2-5-44.** Lavras: UFLA, 1998.

A cultura de embriões “in vitro” permite a recuperação de embriões provenientes de cruzamentos interespecíficos, multiplicação rápida do material selecionado e com isso antecipar a época de plantio. Neste trabalho, foi determinado metodologia de cultura de embriões “in vitro” do *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44, pertencente a coleção “in vivo” da Universidade Federal de Lavras. Especificamente, buscou-se determinar as melhores concentrações dos reguladores de crescimento ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (ácido 6-benzilaminopurina). Para isso, foram testadas todas as combinações possíveis entre as dosagens utilizadas, resultando em um fatorial 4x4, disposto em um delineamento inteiramente casualizado. Foram também utilizados modelos de superfície de resposta, onde pode-se determinar as concentrações ideais para as características, número total de brotações, número de brotos maiores que 1cm, número total de folhas, peso da matéria fresca e seca das brotações. Para todas as características avaliadas, observa-se que os melhores resultados foram obtidos utilizando-se BAP na concentração de 7,40 mg/l e ANA na concentração de 1,00 mg/l. Este trabalho participa do programa de melhoramento do cafeeiro da Universidade Federal de Lavras-MG.

## 2 ABSTRACT

### **INFLUENCE OF THE GROWTH REGULATORS IN THE CULTURE OF EMBRYOS "IN VITRO" OF CULTIVATING CATUAÍ VERMELHO LCH 2077-2-5-44**

The culture of embryos "in vitro" it facilitates the recovery of coming embryos of interespecíficos crossings, fast multiplication of the selected material and anticipation of the plantation time. In this work, methodology of culture of embryos was determined "in vitro" of *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44, belonging the collection "in lives" of the Universidade Federal de Lavras. Specifically, it was looked for to determine the best concentrations of the growth regulators ANA (naftalenoacético-acid) and BAP (6-benzilaminopurina). For that, all the possible combinations were tested among the used dosagens, resulting in a factorial 4x4, arranged in a completely randomized. They were also used models of answer surface, where it can be determined the ideal concentrations for the characteristics, total shoot number, number of larger sprouts than 1cm, total leaf number, weight of the fresh and dry matter of the shoot. For all the appraised characteristics, it is observed that the best results were obtained being used BAP in the concentration of 7,40 mg/l and ANA in the concentration of 1,00 mg/l. This work belongs to the program of improvement of the coffee culture of the Universidade Federal de Lavras-MG.

### 3 INTRODUÇÃO

A cultura de embriões “in vitro” é uma técnica importante pois, tanto possibilita o estudo mais detalhado dos problemas nutricionais e fisiológicos do embrião, como também promovem o desenvolvimento de híbridos interespecíficos que normalmente não sobrevivem; permite realizar a clonagem de plantas selecionadas com o objetivo de antecipar a época de plantio, e também obter plantas a partir de embriões imaturos, ou seja, em estágio precoce do fruto.

O embrião originado de um processo normal de fecundação pode ser facilmente separado e cultivado em condições assépticas em meio de cultura adequado. Este mantém-se geneticamente estável, produzindo descendentes idênticos a ele. Para a remoção do embrião, basta desinfetar apenas a superfície externa da semente, devido ao fato de que o embrião está alojado em região estéril da semente. Assim o índice de contaminação “in vitro” é muito baixo em relação às demais culturas (Illg, 1985).

O meio de cultura adequado, tanto para propagação, quanto para a cultura de embriões deve ser adaptado para cada espécie. Trabalhando com tabaco, Murashige & Skoog (1962) determinaram um meio complexo e rico em nutrientes. Este meio possibilitou um desenvolvimento das culturas cinco a sete vezes mais ativo que outros utilizados.

Os primeiros estudos envolvendo meio de cultura para embriões usaram amplamente a solução de Snop (Andreoli, 1985). Embora diferentes meios sejam capazes de manter os microcultivos de embriões, o mais freqüentemente utilizado é o “MS” (Murashige & Skoog, 1962), embora outros meios tenham mostrado grande eficiência.

O cafeeiro, como outras culturas, libera substâncias fenólicas no meio de cultura e por esta razão deve-se adicionar ao meio de cultura substâncias



antioxidantes, tais como: carvão ativado, Polivinilpirrolidone (PVP), ácido ascórbico e ácido cítrico.

O objetivo deste trabalho foi determinar as melhores concentrações dos reguladores de crescimento ANA(ácido naftalenoacético) e BAP(6-benzilaminopurina), utilizados na cultura de embriões "in vitro" da cultivar Catuai vermelho LCH 2077-2-5-44.



#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - UFLA, em Lavras - Minas Gerais.

O material vegetal utilizado foi *Coffea arábica* L. cv. Catuai Vermelho LCH 2077-2-5-44, sendo utilizados frutos no estágio de cereja para a extração de sementes.

O meio nutritivo básico utilizado foi o de Murashige e Skoog (1962), sendo que o pH foi ajustado para 5,9, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCL). Para a solidificação do meio foi utilizado ágar na proporção de 7g/l.

Após o preparo, foram distribuídos cerca de 10 ml de meio por tubo de ensaio (2,5 x 15 cm), os quais foram vedados com tampa de polipropileno. O meio foi esterilizado utilizando-se autoclavagem à temperatura de 121 °C, durante 20 minutos e 1 atm de pressão.

O processo de inoculação foi realizado assepticamente em câmaras de fluxo laminar horizontal. Após o processo de inoculação, o material foi transferido para sala de crescimento com temperatura igual a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 2500 lux, suprida por lâmpadas Grow-lux e Branca-fria, na proporção de 1:1, permanecendo nestas condições por um período de 60 dias. Em todos os experimentos foram realizadas avaliações visuais nos primeiros 30 dias após a instalação, e foram avaliadas as variáveis número total de brotos, número total de folhas, comprimento dos brotos (cm), peso da matéria fresca e peso da matéria seca (mg).



#### **4.1 Preparação dos embriões:**

Os embriões foram extraídos de sementes oriundas de frutos em estágio de cereja. Após a retirada do pergaminho, as sementes permaneceram em água destilada por 15 horas. Após este período elas foram mergulhadas em hipoclorito de sódio por 1 minuto, e posteriormente em álcool 70% por meia hora. Os embriões foram extraídos sobre placas de petri, sob estereomicroscópio, mantendo-os intactos. Em seguida foram inoculados no meio, colocando-se um embrião por tubo de ensaio, correspondendo à parcela experimental.

O meio utilizado foi o "MS" acrescido de 6mg/l de GA<sub>3</sub>. Os tratamentos foram constituídos de todas as combinações possíveis entre as concentrações de ANA (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg/l) e de BAP (0,0; 3,0; 6,0 e 9,0 mg/l), resultando num fatorial 4 x 4, utilizando-se delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições..

#### **4.2 Análise estatística:**

Para a análise estatística, foram utilizadas duas maneiras de decompor a variação entre tratamentos. A primeira delas correspondeu ao desdobramento em fatores principais e interação entre eles, típico de ensaios fatoriais. A outra maneira fez uso do ajustamento a modelos de superfície de resposta (Box e Draper, 1987), quando as diferenças entre os tratamentos mostraram-se significativas pelo teste F. O método de 'backward' (Draper e Smith, 1981) foi utilizado para a seleção de modelos de regressão múltipla envolvendo os fatores testados no experimento, utilizando-se o resíduo da análise de variância para testar a significância dos coeficientes de regressão. Uma vez determinado o modelo, testava-se a significância dos desvios de regressão para verificar a adequabilidade do modelo.

O modelo inicial de regressão múltipla, utilizado no método de 'backward' foi o seguinte:

$$Y_{ij} = \alpha + \beta_1 X_{1ij} + \beta_2 X_{2ij} + \beta_3 X_{1ij}^2 + \beta_4 X_{2ij}^2 + \beta_5 X_{1ij} X_{2ij} + \beta_6 X_{1ij} X_{2ij}^2 + \beta_7 X_{1ij}^2 X_{2ij} + \beta_8 \sqrt{X_1} + \beta_9 \sqrt{X_2} + \beta_{10} \sqrt{X_1} X_{2ij} + \beta_{11} X_{1ij} \sqrt{X_2} + \beta_{12} \log X_{2ij} + \delta_{ij} + e_{ij}$$

$Y_{ij}$  : valor observado na parcela que recebeu o tratamento i na repetição j;

$\alpha$  : intercepto;

$\beta_k$  : coeficiente de regressão k;

$X_{1ij}$  : concentração de ANA presente na repetição j do tratamento i;

$X_{2ij}$  : concentração de BAP presente na repetição j do tratamento i;

$\delta_{ij}$  : desvio de regressão associado à parcela que recebeu o tratamento i na repetição j;

$e_{ij}$  : erro experimental associado à parcela que recebeu o tratamento i na repetição j.

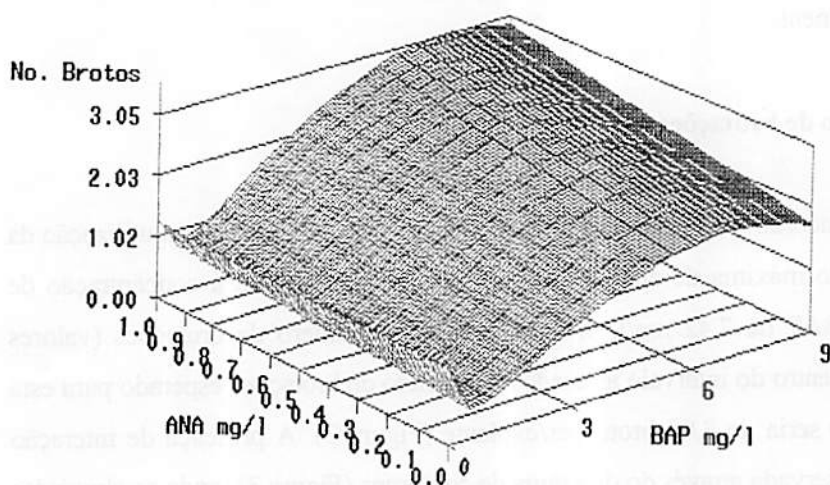
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo das análises de variância, para as características avaliadas, estão representadas nas Tabela 2, considerando a partição da variação entre tratamentos segundo o esquema fatorial, e nas variações devido ao modelo de regressão múltipla ajustado e devido aos desvios de regressão. Observa-se que para as características número total de brotos, número total de folhas, brotos maiores que 1 centímetro, peso fresco e peso seco, houve uma interação significativa entre os reguladores de crescimento utilizados. O desvio de regressão, para todas as variáveis, não foi significativo, evidenciando que os modelos foram ajustados satisfatoriamente.

### 5.1 Número de brotações

De acordo com o modelo de superfície de resposta ajustado, a utilização da concentração máxima de auxina (ANA=1,00 mg/l), associada à concentração de citocinina BAP de 7,42 mg/l, promoveu o maior número de brotações (valores estimados dentro do intervalo avaliado). O número de brotações esperado para esta combinação seria de 3,00 brotações/explante (Figura 2). A presença de interação pode ser observada através do diagrama de contornos (Figura 3), onde os elipsóides não apresentaram uma tendência clara de paralelismo entre seus eixos e os eixos dos fatores independentes. Não houve interação entre os reguladores de crescimento ANA e BAP, através da análise fatorial (Tabela 2), porém, o mesmo não foi observado pelo modelo de regressão múltipla ajustado (Figura 2), pois neste, ocorre a presença de termos envolvendo os dois fatores, o que demonstra a presença de interação. Os desvios de regressão para esta variável, mostraram-se não

significativos, evidenciando que os modelos ajustados utilizados foram satisfatórios (Tabela 2). Concentrações elevadas de auxina, associadas à concentrações elevadas de citocinina, promoveram um aumento no número de brotações. O contrário foi observado por George (1994), em cujo trabalho, concentrações elevadas de auxina, inibiam o desenvolvimento do embrião. Raghuramulu (1989), também obteve grande êxito em *C. arabica*, quando utilizou concentrações de 1,00 mg/l de ambos reguladores de crescimento. Concentrações acima ou abaixo destas não foram satisfatórias. As concentrações acima de 1,00 mg/l de auxina foram consideradas tóxicas, promovendo morte do embrião.

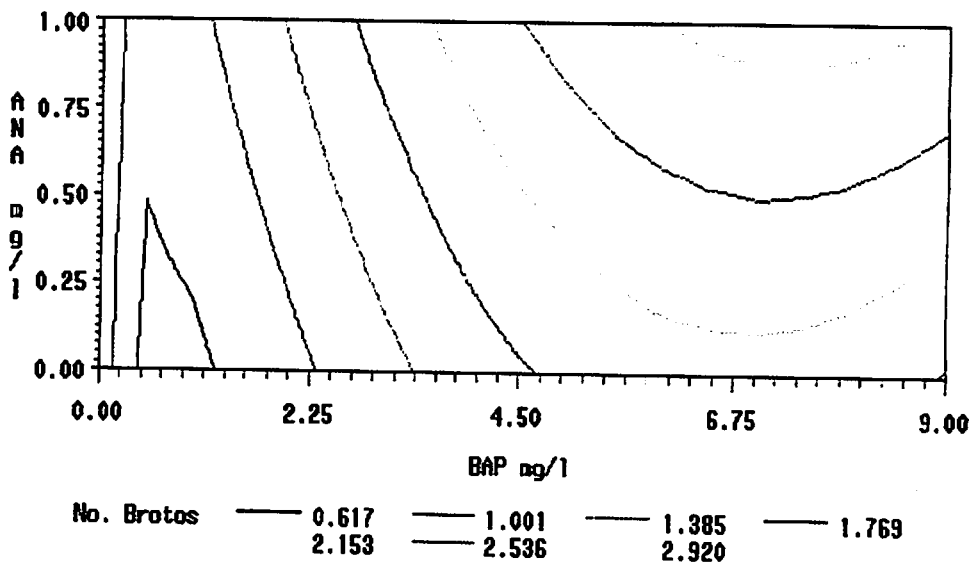


$$Y = 1,224745 + 1,378642 X_2 - 0,072996 X_2^2 - 1,989705 \sqrt{X_2} + 0,379332 X_1 \sqrt{X_2}$$

FIGURA 2 – Superfície de resposta para a característica número total de brotos em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA, Lavras, MG, 1998

**TABELA 2** Resumo das análises de variância para número total de brotos (NTB), número de Brotos maior que 1 cm (NB>1), número total de folhas (NTF), peso fresco (PF) e peso seco da parte aérea das brotações (PS) em fungão das concentrações de ANA e BAP, em um período de 60 dias de cultivo "in vitro", UFLA, Lavras, MG, 1998.

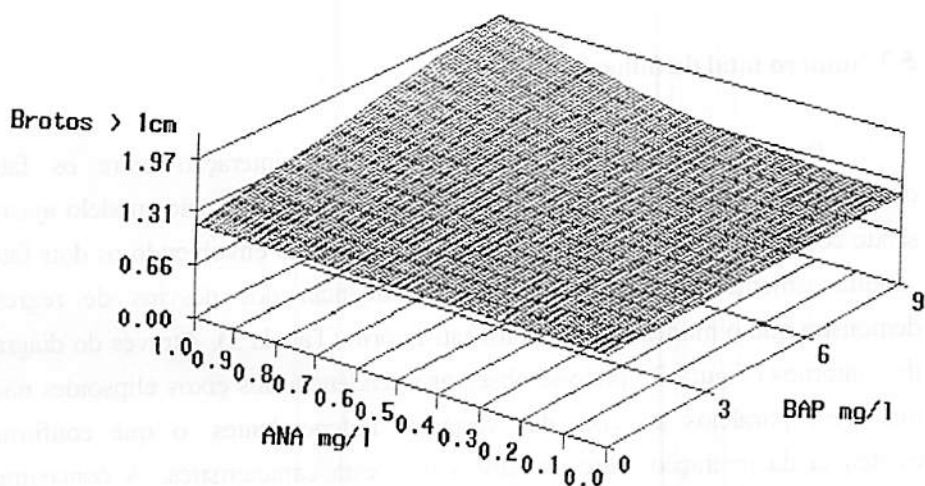
Causa da variação	NTB <sup>1</sup>		NB>1 <sup>1</sup>		NTF <sup>1</sup>		PF <sup>1</sup>		PS <sup>1</sup>	
	GL	Q.M.	GL	Q.M.	GL	Q.M.	GL	Q.M.	GL	Q.M.
Treatamentos	(15)	1,3098**	(15)	0,3091**	(15)	75,6338**	(15)	3027,7500**	(15)	80,9784
ANA	3	1,8018**	3	0,6563**	3	10,8965**	3	3158,3439**	3	96,3355
BAP	3	3,8671**	3	0,2998*	3	8,9978**	3	7126,3501**	3	170,8920*
ANA x BAP	9	0,2933	9	0,1965*	9	1,7723**	9	1618,0186*	9	45,8882
Regressão	4	4,7187**	1	3,5211**	4	17,5756**	4	7607,1770**	5	209,0624**
Desvio	11	0,0701	14	0,0797	11	0,4847	11	1362,5038	10	16,9364
Resíduo	48	0,1748	48	0,0891	48	0,6240	48	741,2335	48	50,7636
C.V.(%)	23,94		23,85		30,42		47,43		71,60	



**FIGURA 3 – Diagrama de contorno para a característica número total de brotos em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA. Lavras, MG, 1998**

### 5.2 Número de brotos maiores que um centímetro

O modelo de superfície de resposta ajustado demonstrou que o número máximo de brotações maiores que 1,00 cm foram obtidas com concentrações hormonais em sua dosagem máxima (ANA = 1,00 mg/l e BAP = 9,00 mg/l) como pode ser observado na Figura 4, em um período de 60 dias de cultivo. Para esta característica houve interação entre os fatores (Tabela 2), o que pôde ser confirmado pela presença de termos no modelo envolvendo os dois fatores, simultaneamente (Figura 4). O mesmo pode ser observado pelo diagrama de contornos (Figura 5), em que se evidencia uma relação de dependência entre os fatores, pela tendência dos eixos dos elipsóides manterem-se não paralelos aos eixos das variáveis independentes. Inúmeros trabalhos mostram que o sucesso na cultura de embriões está associado a diversos fatores, incluindo o comprimento do explante, que deve ser igual ou superior a 1,00 cm, permitindo uma maior sobrevivência (Colona, 1972; Krasnyanski et al, 1992; Raghuramulu, 1989; Sondahl et al, 1984).



$$Y = 1,147714 + 0,091410 X_1^2 X_2$$

FIGURA 4 – Superfície de resposta para a característica comprimento das brotações (brotos maior que 1 cm) em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA. Lavras, MG, 1998

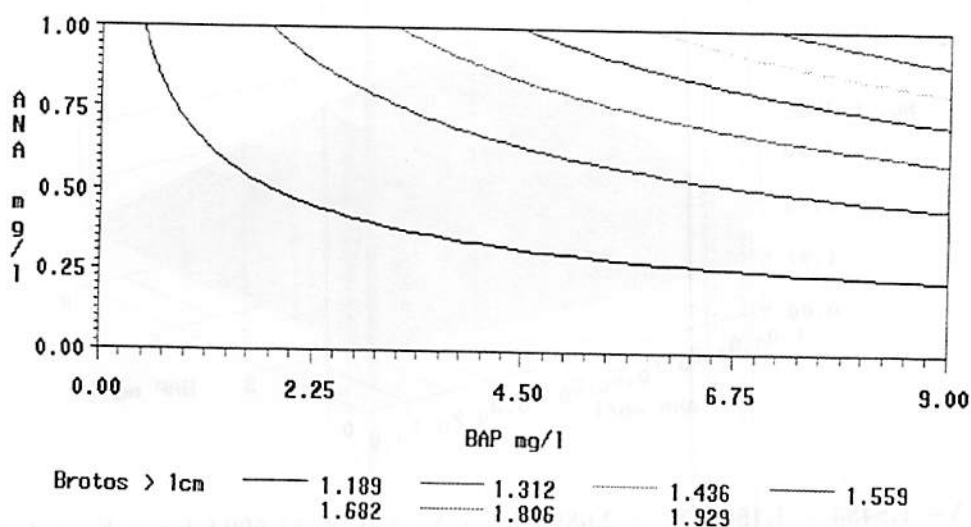
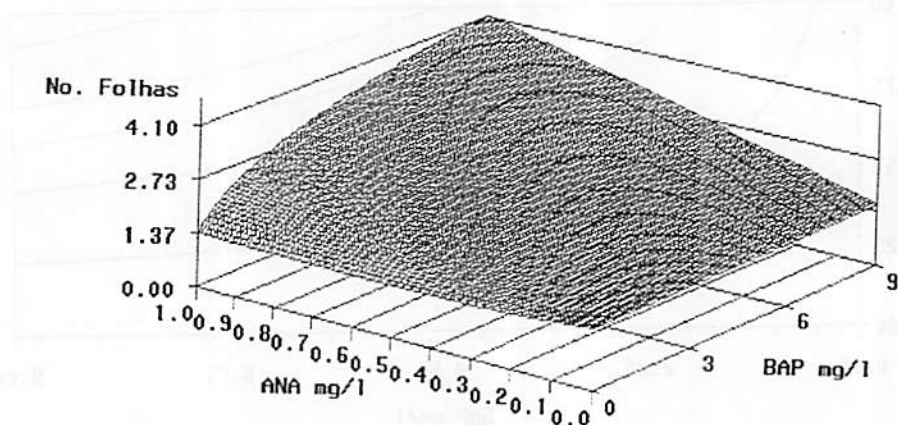


FIGURA 5 – Diagrama de contorno para a característica comprimento das brotações (brotos maiores que 1 cm) em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA. Lavras, MG, 1998

### 5.3 Número total de folhas

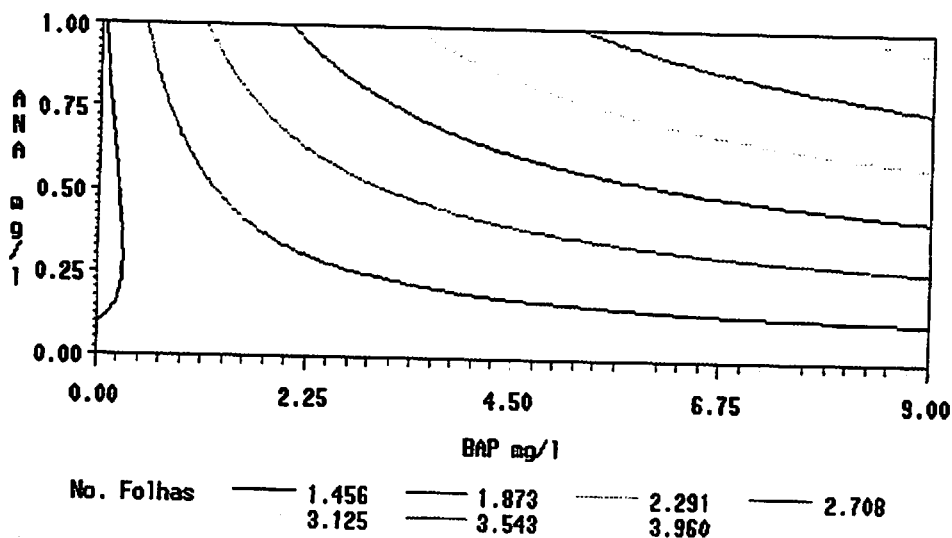
Para o número total de folhas, ocorreu interação entre os fatores demonstrado, tanto pela análise fatorial (Tabela 2), quanto pelo modelo ajustado, sendo confirmado pela existência de termos no modelo envolvendo os dois fatores simultaneamente (Figura 6). A não significância dos desvios de regressão demonstra que o modelo utilizado foi satisfatório (Tabela 2). Através do diagrama de contornos (Figura 7), pode-se observar a tendência dos eixos elipsóides não se manterem paralelos ao eixo das variáveis independentes, o que confirma a existência da interação entre os fatores para esta característica. A concentração máxima de auxina (ANA = 1,00 mg/l), juntamente com 7,39 mg/l de citocinina (BAP) resultou num maior número de folhas por explante. Segundo o modelo de superfície de resposta ajustado para estas concentrações, espera-se que o número total de folhas seja de 12 folhas por explante.



$$Y = 1,5484 - 1,1504 X_1 + 2,0890 \log ( X_1 + 1 )^2 + 1,6904 \log ( X_1 + 1 ) \log(X_2+1)$$

FIGURA 6 – Superfície de resposta para a característica número total de folhas em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA. Lavras, MG, 1998.





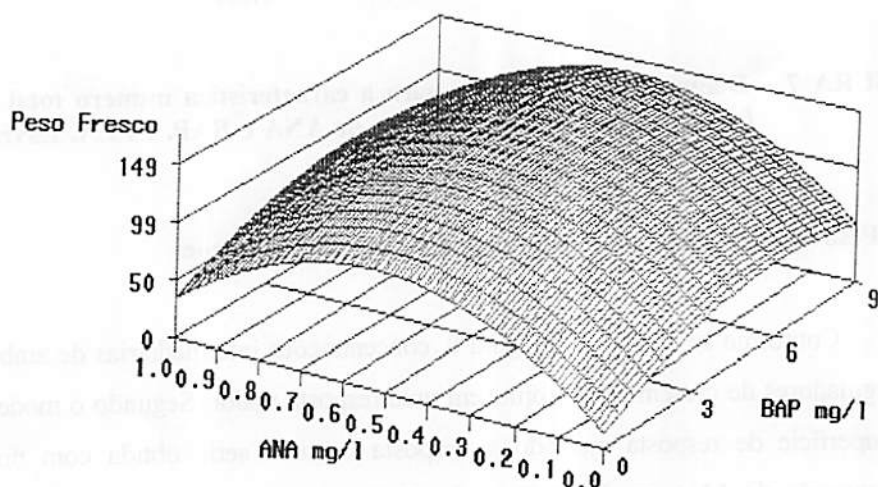
**FIGURA 7 – Diagrama de contornos para a característica número total de folhas em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA. Lavras, MG, 1998.**

#### 5.4 Peso de matéria fresca e seca da parte aérea das brotações

Conforme se observa na Figura 8, concentrações intermediárias de ambos os reguladores de crescimento promovem uma resposta maior. Segundo o modelo de superfície de resposta ajustado, a resposta máxima seria obtida com uma concentração de ANA igual a 0,53 mg/l e BAP igual a 6,00 mg/l, obtendo em média, um peso de 148,53 mg/explante. Apesar da significância entre os fatores, o modelo de regressão múltipla ajustado (Figura 8) não apresentou termos contendo os dois fatores simultaneamente, sugerindo que a interação não seja forte. No diagrama de contornos também pode-se observar esta tendência (Figura 9). Para esta variável, o desvio de regressão foi não significativo, portanto o modelo ajustado foi satisfatório (Tabela 2).

Na análise do ensaio fatorial (Tabela 2), para a característica peso da matéria seca, não houve interação entre os reguladores de crescimento ANA e

BAP, porém no modelo de regressão múltipla ajustado observa-se a presença de termos envolvendo apenas um dos fatores (Figura 10), o regulador de crescimento BAP, demonstrando que as dosagens crescentes deste fator influenciaram na resposta para o aumento do peso seco. O mesmo pôde ser observado pelo diagrama de contornos (Figura 11), em que evidencia-se a tendência do eixo elipsóide manter-se paralelamente ao eixo da variável independente ANA. O desvio de regressão não foi significativo (Tabela 2), portanto, o modelo ajustado foi satisfatório.



$$Y = 14,024855 + 322,720961 X_1 + 16,2252219 X_2 - 303,235632 X_1^2 - 1,352865 X_2^2$$

FIGURA 8 – Superfície de resposta para a característica peso fresco em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA. Lavras, MG, 1998.

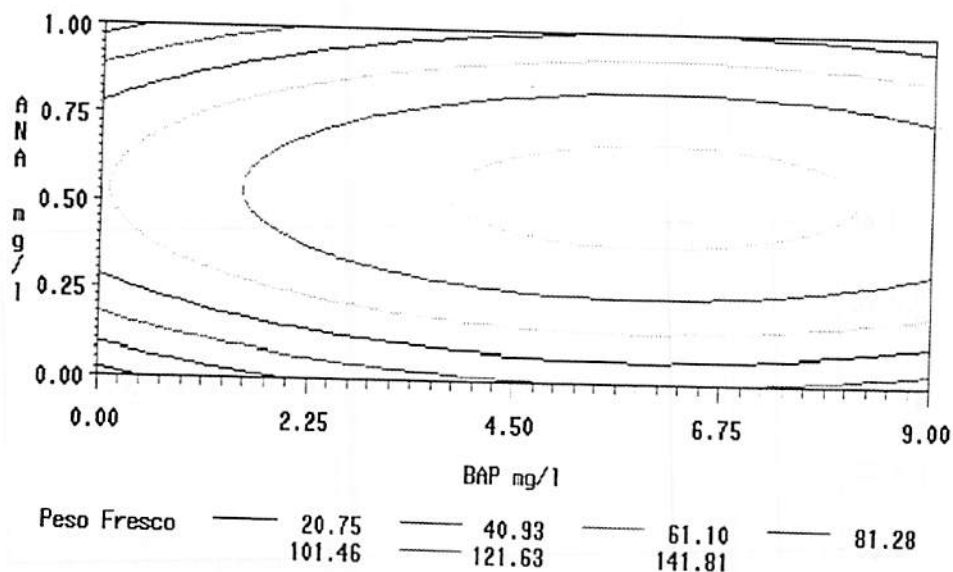
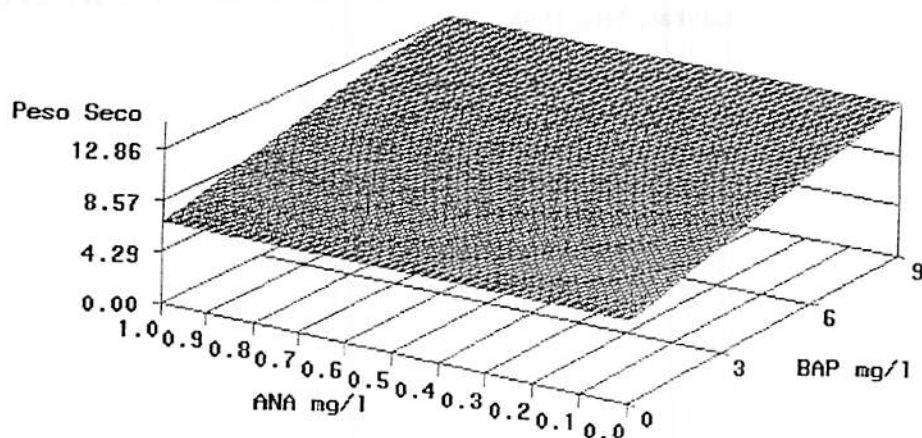
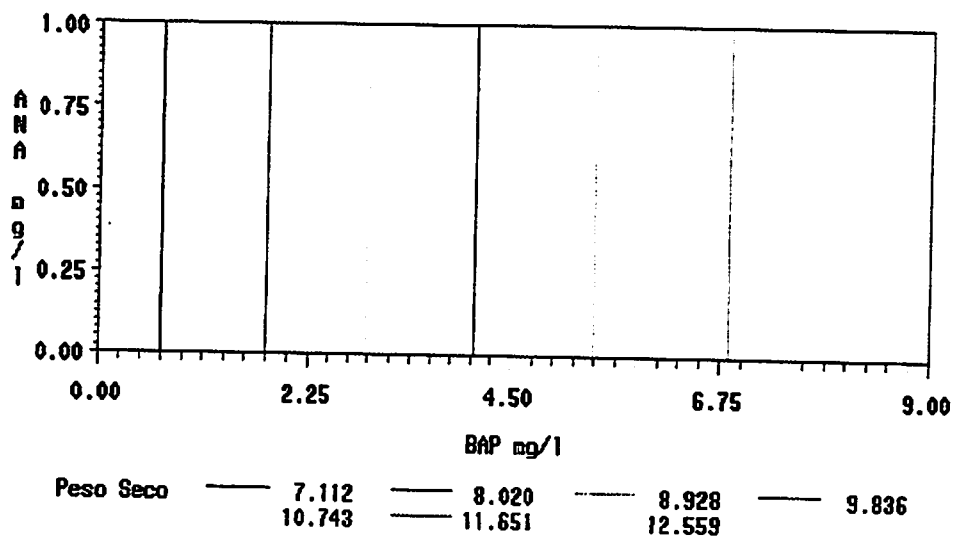


FIGURA 9 – Diagrama de contornos para a característica peso fresco em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA, Lavras, MG, 1998.



$$Y = 6,8095 + 1,1415 \log (X_2 + 1)^2$$

FIGURA 10 – Superfície de resposta para a característica peso seco em resposta às dosagens dos hormônios ANA e BAP. UFLA, Lavras, MG, 1998.



**FIGURA 11 – Diagrama de contornos para a característica peso seco em resposta às dosagens dos hormônios ANA e BAP. UFLA, Lavras, MG, 1998.**

## 6 CONCLUSÕES

Para todas as características avaliadas, a concentração máxima de ANA(1,00mg/l) foi a que proporcionou os melhores resultados, com exceção ao peso fresco, cuja concentração de ANA foi estimada como sendo 0,53 mg/l, e ao peso seco, que não foi afetado pelo ANA. Para o número de brotações e folhas, as concentrações ideais de BAP foram semelhantes, em torno de 7,40 mg/l. A concentração de BAP igual a 9,00 mg/l maximizou o número de brotos maiores que 1cm, mas altas respostas também foram observadas com dosagens acima de 6,00 mg/l. Neste caso, pode-se utilizar uma determinada combinação adequada para todas as características, sendo esta de BAP = 7,40 mg/l e ANA = 1,00 mg/l.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANDREOLI, C. Cultura de embrião. In: **SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS**, 1, Brasília, 1985. Anais... Brasília:ABCTP/EMBRAPA, 1986. p. 25-28.
- BERTHOULY, M.; ECHEVERI, J.H. Multiplicación asexual de diferentes líneas de Catimor: Inducción "in vitro" de yemas axilares latentes. In: **CONGRESO LATINO AMERICANO DE TECNOLOGIA CAFEEIRA**, 1, Campinas, 1987. Resumos... Rio de Janeiro, MIC/IBC, p.279-283, 1987.
- BOX,G.E.P.; DRAPER, N.R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: John Wiley e Sons, 1987. 669p.
- COLONNA, J.P. Contribution a l'étude de la culture "in vitro" d'embryos de caféiers. Action de la caféine. **Café, Cacao, Thé**, v.16, p. 193 – 203, 1972.
- DRAPER, N.R.; SMITH,H. **Applied regression analysis**. 2.ed. New York: John Wiley e Sons, 1981. 709p.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part. 1 The Technology 2ed. Edington: Exegetics, 574p., 1993.
- ILLG,R.D. Metodologia de seleção in vitro para resistência a fatores causadores de estresse. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS**, I. EMBRAPA - Brasília, 1985. p.45-47.
- KRASNYANSKI, S.; POLGÁR, Z.; NÉMETH, G.; MENEZEL, L. Plant regeneration for callus and protoplast of *Heliantus giganteus* L. **Plant Cell Reports**, v.11, p.7-10. 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**. v.15, p.473-479. 1962.
- RAGHURAMULU, Y. Anther and endosperm culture of Coffee. **Journal of Research**. v:19, n.2 p.71-81, 1989.

SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; MEDINA Filho, H.P.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C.; COSTA, W.R: **Coffee**. In: Ammyrato e McMillen, eds. Handbook of plant cell culture. New York, p.564-590., 1984

ZOK, S., DUBLIN, P. Multiplication Végétative in vitro par culture D'Apex chez *Coffea arabica* L. Action de Solutions Minérales et de Régulateurs de croissance. **Café, Cacao, Thé**, v. 14, n. 4, oct-dec., 1991.

## **CAPÍTULO 4**

**INFLUÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NA  
MICROPROPAGAÇÃO “IN VITRO” DA CULTIVAR CATUAÍ  
VERMELHO LCH 20 77-2-5-44**



## 1 RESUMO

ANDRADE, L.M.C.O. Influência dos reguladores de crescimento na micropropagação "in vitro" da cultivar Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44. Lavras: UFLA, 1998.

A micropropagação "in vitro", promove a multiplicação rápida em curto espaço de tempo, sendo importante para cultivares melhoradas de ciclo longo, que possuam pouco material, portanto necessitam serem propagadas rápida e massivamente. O objetivo deste trabalho foi avaliar metodologias de micropropagação para o *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44, pertencentes a coleção "in vivo" da Universidade Federal de Lavras. Para isso, foi necessário determinar quais as melhores concentrações dos reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP), ácido giberélico ( $GA_3$ ) e TDZ (N-phenil-N-1,2,3-thiadiazol-5-iluréia). Foram testadas todas as combinações possíveis entre as dosagens utilizadas de BAP X  $GA_3$  e TDZ X  $GA_3$ , resultando em um fatorial 4x5 disposto em um delineamento inteiramente casualizado. Foram também utilizados modelos de superfície de resposta, onde pode-se determinar as concentrações ideais para as características, número total de brotações, número de brotos maiores que 1cm, número total de folhas, peso da matéria fresca e seca das brotações. Para todas as características avaliadas, observa-se que os melhores resultados, para o primeiro experimento, foram obtidos utilizando-se mínimas concentrações de BAP na ausência do  $GA_3$ . Os melhores resultados para o experimento utilizando TDZ e  $GA_3$  foram obtidos quando o TDZ estava na sua dosagem mínima associado a dosagem máxima de  $GA_3$ . Este trabalho faz parte do programa de melhoramento do cafeeiro da Universidade Federal de Lavras -MG.

## 2 ABSTRACT

### INFLUENCE OF THE GROWTH REGULATORS IN THE MICROPROPAGATION "IN VITRO" OF CULTIVATING CATUAÍ VERMELHO LCH 2077-2-5-44

The "in vitro" micropropagation, it promotes the fast multiplication in short space of time, being important for you cultivate improved of long cycle, that possess not very material, therefore they need they be spread fast and massively. The objective of this work went evaluate micropropagation methodologies for *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44, belonging the collection "in lives" of the Universidade Federal de Lavras. For that, it was necessary to determined which the best concentrations of the regulators of growth 6-benzilaminopurina (BAP), giberélic acid (GA<sub>3</sub>) and TDZ (N-phenil-N-1,2,3-thiadiazol-5-iluréia). With that all the possible combinations were tested among the used dosagens, for both experiments, resulting entirely in an arranged fatorial 4x5 in acompletely randomized. They were also used models of answer surface, where it can be determined the ideal concentrations for the characteristics, total shoot number, number of larger sprouts than 1cm, total leaf number, weight of the fresh and dry matter of the shoot. For all the appraised characteristics, it is observed that the best results, for the first experiment, they were obtained being used minimas concentration of the BAP in the ausencia of the GA<sub>3</sub>. The goods resulted to the experiment utilizing TDZ of the GA<sub>3</sub> the obtaing being were to the TDZ (estava na sua dosagem m'nima associado a dosagem máxima de GA<sub>3</sub>). This work is part of the program of improvement of the culture of coffee of the Universidade Federal de Lavras-MG.

### 3 INTRODUÇÃO

As dificuldades de multiplicação podem ser minimizadas através da propagação vegetativa "in vitro". A técnica apresenta grande potencial para a multiplicação rápida e seleção de material precoce, sendo muito aplicada em escala industrial (Walyaro, 1984; Van Der Vonen, 1985)

A técnica de cultura de tecidos vegetais "in vitro" possibilita a propagação em larga escala e em curto espaço de tempo, sendo importante para as culturas de ciclo longo. Esta técnica é vantajosa quando aplicada em variedades melhoradas que possuam pouco material e necessitam ser propagadas rápida e massivamente, com a finalidade de produção de mudas.

No processo "in vitro", o meio de cultura é de essencial importância, pois, fornece todas as substâncias necessárias para o desenvolvimento e crescimento de células, tecidos ou órgãos. O aumento na proliferação e a qualidade do material multiplicado a cada subcultivo estão diretamente relacionado aos componentes utilizados no meio de cultura. Respostas positivas e satisfatórias são obtidas no desenvolvimento até a formação de microplântula quando se processa uma composição variável dos componentes do meio de cultura atingindo um perfeito equilíbrio entre eles (Cambrony & Snoeck, 1983).

A micropropagação de ramos ortotrópicos tem sido realizada em muitas espécies cultivadas pertencentes ao gênero *Coffea*. Brotos apicais e brotos axilares são utilizados, mas nesse caso a esterilização do explante é a maior barreira na cultura "in vitro", pois, ainda não é totalmente eficiente (Sondahl, 1984). A ocorrência natural de determinados hormônios é insuficiente para suprir as necessidades da planta, portanto é necessário a adição suplementar dessas

substâncias para se obter resultados satisfatórios e promissores em relação à micropropagação (Pasqual e Pinto, 1988).

Curster (1980) foi um dos primeiros a trabalhar com micropropagação em *Coffea arabica*, obtendo sucesso com a propagação de brotos ortotrópicos e plagiotrópicos em meio de cultura contendo MS, concentrações elevadas de auxinas e baixas concentrações de citocininas, tendo resultados semelhantes aos obtidos pelos métodos convencionais “in vivo”, sendo que a maior dificuldade correspondeu à contaminação e a oxidação dos explantes utilizados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das concentrações dos reguladores de crescimento BAP, GA<sub>3</sub> e TDZ na micropropagação da cultivar Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - UFLA, em Lavras - Minas Gerais.


O material vegetal utilizado foi *Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho LCH 2077-2-5-44, sendo que as plântulas já se encontravam estabelecidas "in vitro", com cerca de seis meses de vida.

### 4.1 Procedimentos gerais

O meio nutritivo básico utilizado foi o de Murashige e Skoog (1962), sendo que o pH foi ajustado para 5,9 utilizando hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCL). Para a solidificação do meio foi utilizado ágar na proporção de 7g/l.

Após o preparo, foram distribuídos cerca de 10 ml de meio por tubo de ensaio (2,5 x 15 cm), os quais foram vedados com tampa de polipropileno. O meio foi esterilizado utilizando-se autoclavagem à temperatura de 121 °C 1atm, durante 20 minutos.

O processo de inoculação foi realizado assepticamente em câmaras de fluxo laminar horizontal. Após o processo de inoculação, o material foi transferido para sala de crescimento com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 2500 lux, suprida por lâmpadas Grow-lux e Branca-fria, na proporção de 1:1, permanecendo nestas condições por um período de 90 dias. Foram conduzidos dois experimentos, nos quais foram avaliadas as variáveis



número total de brotos, número de folhas, número de brotos maiores que 1cm, peso de matéria fresca e peso da matéria seca (mg).

Os explantes utilizados foram retirados de plântulas isentas de contaminantes, desprezando-se as folhas e a gema apical, utilizando-se sempre uma microestaca por tubo com 2 gemas e estas foram inoculadas verticalmente no meio.

#### **4.2 Experimento 1: Multiplicação “in vitro” variando-se as influências das concentrações de BAP e GA<sub>3</sub> no cultivar Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44.**

Esse experimento foi realizado conforme descrito no item 4.2.1, sendo que os tratamentos utilizados foram constituídos de todas as combinações possíveis entre as concentrações de BAP: 0,0; 3,0; 6,0 e 9,0 mg/l e de GA<sub>3</sub>: 0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 mg/l, resultando em um fatorial 4 x 5, disposto em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 4 repetições.

#### **4.3 Experimento 2: Multiplicação “in vitro” variando-se as concentrações de TDZ e GA<sub>3</sub> no cultivar Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44.**

Esse experimento também foi realizado conforme o anterior, sendo que os tratamentos foram constituídos de todas as combinações possíveis entre as concentrações de TDZ: 0,0; 3,0; 6,0 e 9,0 mg/l e de GA<sub>3</sub>: 0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 mg/l, resultando em um fatorial 4 x 5, disposto em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 4 repetições.

#### **4.4 Análises estatísticas**

Para a análise estatística, foram utilizadas duas maneiras de compor a variação entre tratamentos. A primeira delas correspondeu ao desdobramento em

fatores principais e interação entre eles, típico de ensaios fatoriais. A outra maneira fez uso do ajustamento a modelos de superfície de resposta (Box e Draper, 1987) quando as diferenças entre os tratamentos mostraram-se significativas pelo teste F. O método de 'backward' (Draper e Smith, 1981) foi utilizado para a seleção de modelos de regressão múltipla envolvendo os fatores testados no experimento, utilizando-se o resíduo da análise de variância para testar a significância dos coeficientes de regressão. Uma vez determinado o modelo, testava-se a significância dos desvios de regressão, para verificar a adequabilidade do modelo.

O modelo inicial de regressão múltipla, utilizado no método de 'backward' foi o seguinte:

$$Y_{ij} = \alpha + \beta_1 X_{1ij} + \beta_2 X_{2ij} + \beta_3 X_{1ij}^2 + \beta_4 X_{2ij}^2 + \beta_5 X_{1ij} X_{2ij} + \beta_6 X_{1ij} X_{2ij}^2 + \beta_7 X_{1ij}^2 X_{2ij} + \beta_8 \sqrt{X_1} + \beta_9 \sqrt{X_2} + \beta_{10} \sqrt{X_1} X_{2ij} + \beta_{11} X_{1ij} \sqrt{X_2} + \beta_{12} \log X_{2ij} + \delta_{ij} + e_{ij}$$

$Y_{ij}$  : valor observado na parcela que recebeu o tratamento  $i$  na repetição  $j$ ;

$\alpha$  : intercepto;

$\beta_k$  : coeficiente de regressão  $k$ ;

$X_{1ij}$  : concentração de BAP presente na repetição  $j$  do tratamento  $i$ ;

$X_{2ij}$  : concentração de GA3 (para o experimento 1) e TDZ (para o experimento 2) presente na repetição  $j$  do tratamento  $i$ ;

$\delta_{ij}$  : desvio de regressão associado à parcela que recebeu o tratamento  $i$  na repetição  $j$ ;

$e_{ij}$  : erro experimental associado à parcela que recebeu o tratamento  $i$  na repetição  $j$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Experimento 1: Multiplicação "in vitro" variando-se as concentrações de BAP e GA<sub>3</sub> no cultivar catuaí vermelho LCH2077-44.

O resumo das análises de variância, para as características avaliadas, está apresentado nas tabela 3. Observa-se que nas três primeiras características, número total de brotos, número de brotos maiores que 1cm e número total de folhas, houve interação significativa entre os reguladores de crescimento BAP e GA<sub>3</sub>.

#### 5.1.1 Número de brotações

O modelo de superfície de resposta ajustado (Figura 12) demonstra que para a maximização no número de brotações, a dosagem adequada de citocinina (BAP) deve ser igual a 0,99 mg/l em ausência de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) dentro do intervalo avaliado. O número de brotações esperado para esta combinação é de 2,42 brotações/explante. Nota-se também que, sob concentrações crescentes de GA<sub>3</sub>, associadas a uma dosagem constante de BAP igual a 0,99 mg/l, ocorre uma redução no número de brotações. Este fato evidencia que o ácido giberélico, para esta característica não mostrou-se eficiente. A análise, considerando a estrutura fatorial (Tabela 3), demonstra que há interação entre os reguladores de crescimento. A presença de termos presentes no modelo, envolvendo os dois fatores simultaneamente, confirma a existência de interação (Figura 12). Através do diagrama de contornos, pode-se observar que não há um paralelismo claro entre os eixos dos elipsóides e os eixos das variáveis independentes (Figura 13). O desvio de regressão, não significativo, mostra que o modelo ajustado utilizado foi tido como satisfatório (Tabela 3).

Segundo Zok e Dublin (1991), são necessárias altas concentrações de citocinina (BAP) para aumentar o número de brotações. Realizando experimentos com *Coffea arabica*, caturra e bourbon, a dosagem de 10 mg/l de BAP foi satisfatória, sendo que a interação desse hormônio com auxina e ácido giberélico mostrou-se desfavorável, reduzindo consideravelmente o número de brotações /explante.



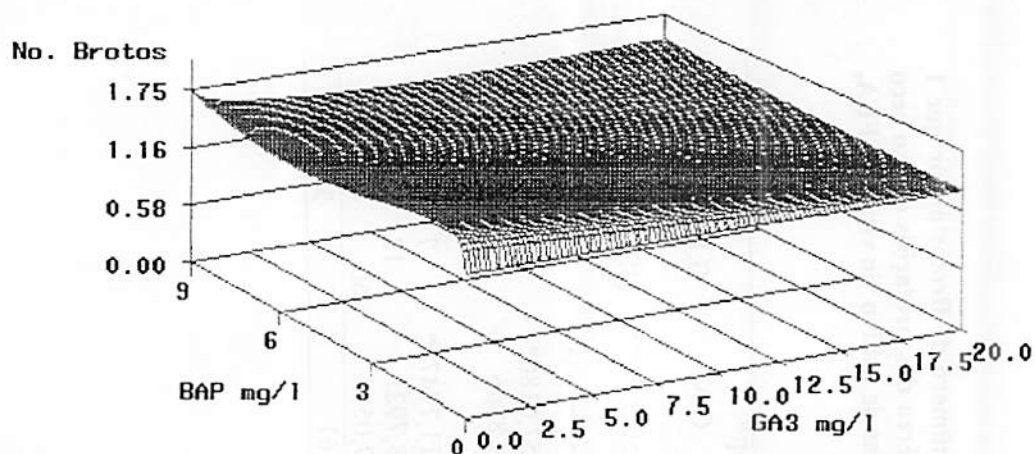
**TABELA 3** Resumo das análises de variância para número total de brotos (NTB), o número de Brotos maior que 1 cm (NB>1), o número total de folhas (NTF), peso fresco (PF) da parte aérea das brotações e peso seco (PS) em função das concentrações de BAP e GA<sub>3</sub>, em um período de 90 dias de cultivo "in vitro", UFLA, Lavras, MG. 1998.

Causa da variação	NTB <sup>1/</sup>		NB>1 <sup>1/</sup>		NTF <sup>1/</sup>		PF <sup>1/</sup>		PS <sup>1/</sup>	
	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.
Tratamentos	(19)	0,4546**	(19)	0,1035**	(19)	7,1285**	(19)	2050,9436**	(19)	20,6766**
BAP	3	1,1601**	3	0,1620**	3	17,6153**	3	5433,7389**	3	73,2475**
GA <sub>3</sub>	4	0,7969**	4	0,0969	4	11,9004**	4	3357,0180**	4	17,0217**
BAP x GA <sub>3</sub>	12	0,1641*	12	0,0911*	12	2,9162*	12	769,8866	12	8,7523
Regressão	7	1,0853**	8	0,1535**	8	14,4832**	7	5311,7747**	7	51,7043**
Desvio	12	0,0867	11	0,0672	11	1,7796	12	148,7921	12	2,5960
Resíduo	60	0,0725	60	0,0404	60	1,5170	60	407,0558	60	4,6009
C.V.(%)		16,74		16,69		41,50		46,61		37,38

<sup>1/</sup> Observações transformadas segundo  $\sqrt{(X + 0,5)}$ .

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.



$$Y = 1,346708 - 1,311925 X_1 + 0,074922 X_1^2 + 0,080191 X_1 X_2 + 2,312803 \sqrt{X_1} - 0,003522 X_1^2 X_2 - 0,116088 \sqrt{X_1} X_2 - 0,063887 X_1 \sqrt{X_2}$$

FIGURA 12 – Superfície de resposta para a característica número total de brotos em resposta às dosagens dos hormônios BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA, Lavras, MG, 1998.

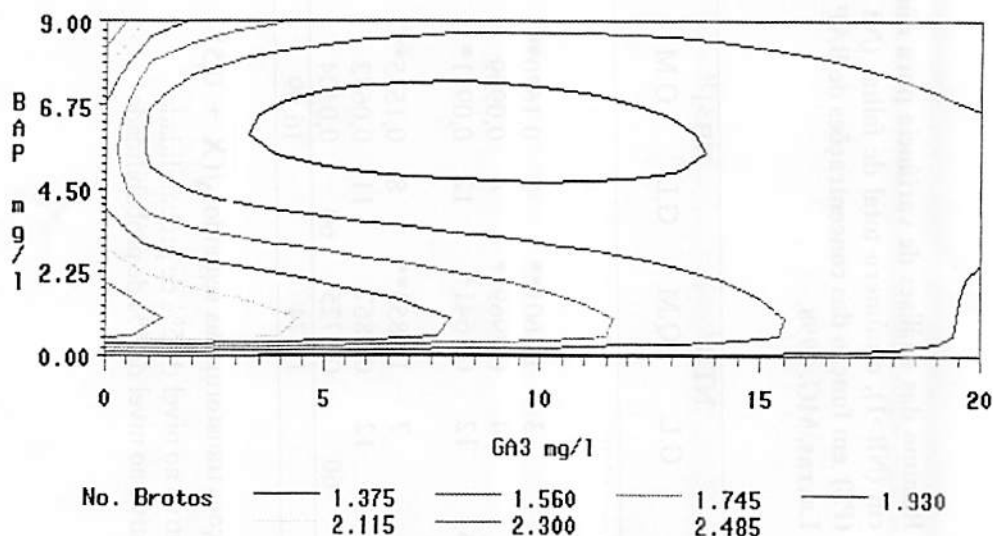
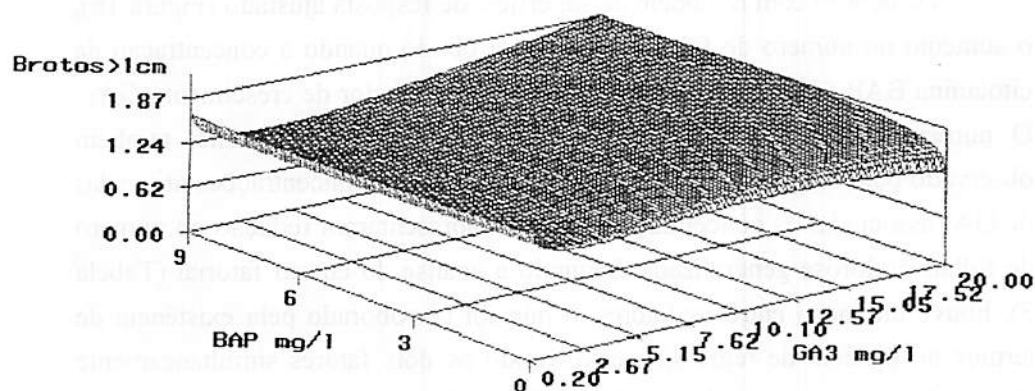


FIGURA 13 – Diagrama de contorno para a característica número total de brotos em resposta às dosagens dos hormônios BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA, Lavras, MG, 1998.

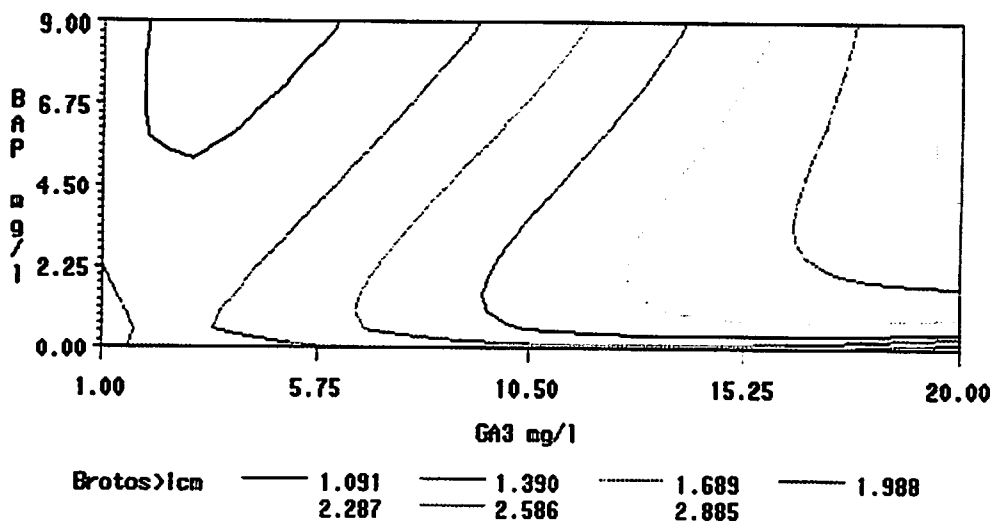
### 5.1.2 Número de brotos maiores que 1 cm

Para a característica brotos maiores que 1,00 cm, observou-se a presença de interação entre os fatores (Tabela 3), sendo que esta interação foi confirmada pela presença de termos no modelo de regressão, envolvendo os dois fatores simultaneamente (Figura 14). Os desvios de regressão, não significativos, demonstram que o modelo ajustado foi satisfatório (Tabela 3). O maior número de brotações maiores que 1,00 cm foi verificado, utilizando concentração máxima de ácido giberélico ( $GA_3 = 20,00$  mg/l) associado à concentração máxima de citocinina (BAP = 9,00 mg/l), de acordo com o modelo de superfície de resposta ajustado (Figura 14), também verificado pelo diagrama de contornos (Figura 15). Estas dosagens foram utilizadas em um período de 90 dias de cultivo. O mesmo foi verificado por Berthouly (1995), quando utilizou ácido giberélico ( $GA_3$ ) associado à citocinina (BAP), onde o  $GA_3$  foi responsável pela elongação dos explantes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, por um período de 90 dias de cultivo.



$$Y = 1,249868 - 0,079592 X_1 + 0,252262 X_2 - 0,008429 X_2^2 + 0,008183 X_1^2 - 0,038604 X_1 X_2 - 0,59319 \log X_2 + 0,001103 X_1 X_2^2 + 0,081159 \sqrt{X_1} X_2$$

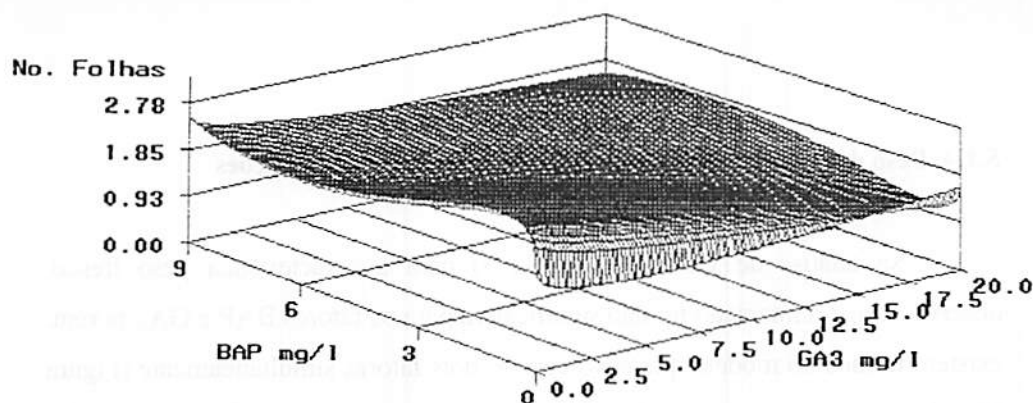
FIGURA 14 – Superfície de resposta para a característica brotos maior que 1 cm em resposta às dosagens dos hormônios BAP e  $GA_3$ . UFLA, Lavras, MG, 1998.



**FIGURA 15 – Diagrama de contornos para a característica brotos maior que 1 cm em resposta às dosagens dos hormônios BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA, Lavras, MG, 1998.**

### 5.1.3 Número total de folhas

De acordo com o modelo de superfície de resposta ajustado (Figura 16), o aumento no número de folhas/explante foi obtido quando a concentração da citocinina BAP era de 0,95mg/l na ausência do regulador de crescimento GA<sub>3</sub>. O número total de folhas estimado seria de 12 folhas/explante, também observado pelo diagrama de contornos (Figura 17). As concentrações utilizadas de GA<sub>3</sub> associadas às concentrações de BAP apresentaram redução no número de folhas e clorose generalizada. Segundo a análise do ensaio fatorial (Tabela 3), houve interação entre os fatores, o que foi corroborado pela existência de termos no modelo de regressão, envolvendo os dois fatores simultaneamente (Figura 16). O mesmo pôde ser observado no diagrama de contornos, onde os eixos elipsóides não apresentam tendência de paralelismo em relação ao eixo das variáveis independentes, confirmando a presença de interação (Figura 16). A ausência de significância dos desvios de regressão demonstra que o modelo ajustado foi satisfatório (Tabela 3).



$$Y = 2,68576 - 5,611487 X_1 + 0,220338 X_2 + 0,295645 X_1^2 + 0,388906 X_1 X_2 + 9,835233 \sqrt{X_1} - 1,131497 \sqrt{X_2} + 0,02063 X_1^2 X_2 - 0,65975 \sqrt{X_1} X_2$$

FIGURA 16 – Superfície de resposta para a característica número total de folhas em resposta às dosagens de BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998.

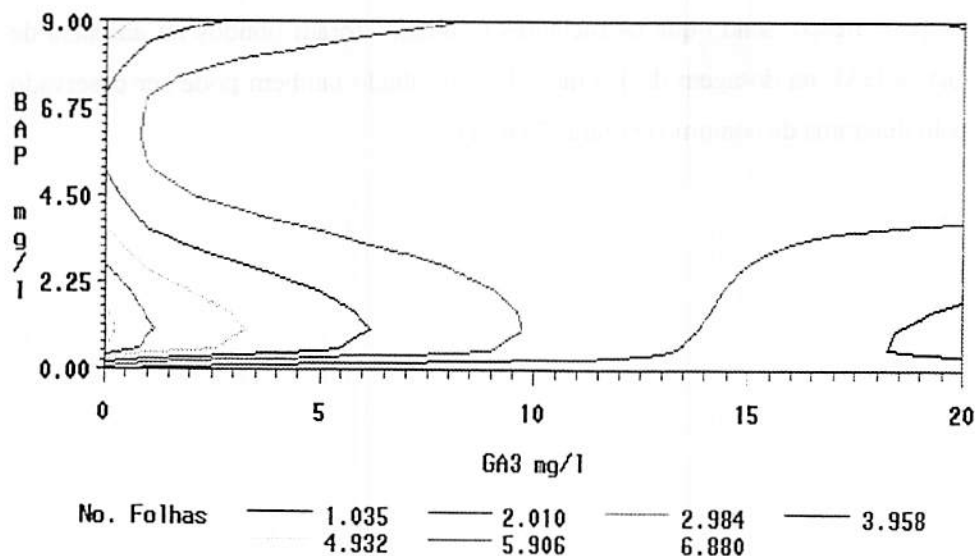
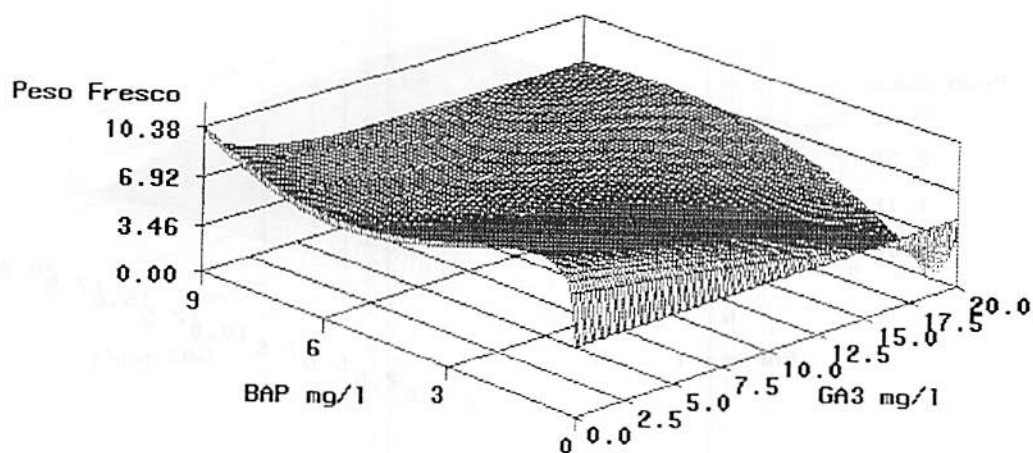


FIGURA 17 – Diagrama de contornos para a característica número total de folhas em resposta às dosagens de BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998

#### **5.1.4 Peso da matéria fresca e seca da parte aérea das brotações**

Na análise de variância (Tabela 3) para a característica peso fresco, observa-se que a interação foi não significativa para os fatores BAP e GA<sub>3</sub>, porém, existem termos no modelo que envolvem os dois fatores simultaneamente (Figura 18), demonstrando que o modelo detectou interações que a análise fatorial não havia detectado. Os desvios de regressão não foram significativos, portanto, o modelo ajustado utilizado foi satisfatório (Tabela 3). Segundo o modelo de superfície de resposta ajustado e pelo diagrama de contorno (Figuras 18, 19), houve um aumento no peso fresco das brotações quando o hormônio GA<sub>3</sub> estava ausente e o BAP na concentração de 0,96 mg/l, podendo neste caso atingir o peso fresco médio de 105,79 mg/l. A variável peso seco apresentou resposta semelhante ao peso fresco, sendo que os melhores resultados foram obtidos na ausência de GA<sub>3</sub> e BAP na dosagem de 1,0 mg/l. Este resultado também pode ser observado pelo diagrama de contorno (Figuras 20 e 21).



$$Y = 23,4715 - 102,267681 X_1 + 5,775792 X_1^2 + 8,133517 X_1 X_2 + 178,788197 \sqrt{X_1} - 0,392375 X_1^2 X_2 - 12,072789 \sqrt{X_1} x X_2 - 4,090548 X_1 x \sqrt{X_2}$$

FIGURA 18 – Superfície de resposta para a característica peso fresco em resposta às dosagens de BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998.

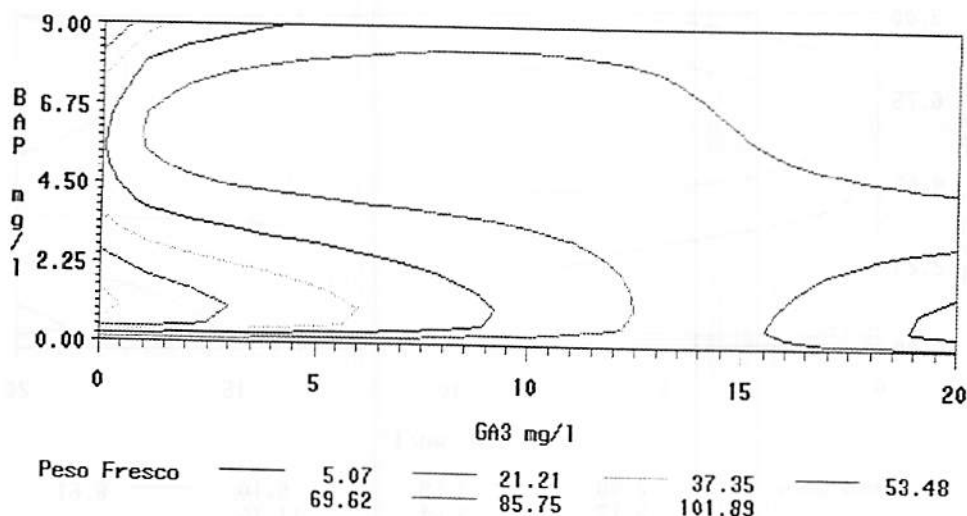
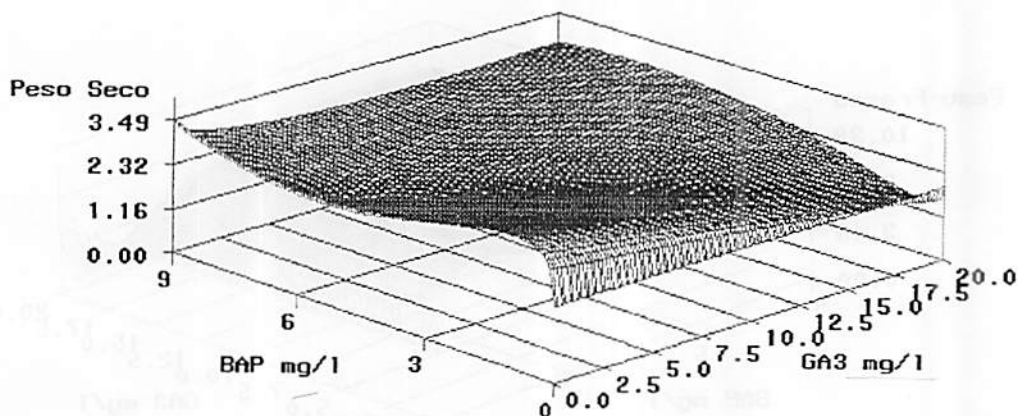


FIGURA 19 – Diagrama de contornos para a característica peso fresco em resposta às dosagens de BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998



$$Y = 3,2305 - 9,169987 X_1 + 0,521034 X_1^2 + 0,736664 X_1 X_2 + 16,250175 \sqrt{X_1} - 0,036637 X_1^2 X_2 - 1,066672 \sqrt{X_1} X_2 - 0,354967 X_1 \sqrt{X_2}$$

FIGURA 20 – Superfície de resposta para a característica peso seco em resposta às dosagens dos hormônios BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998.

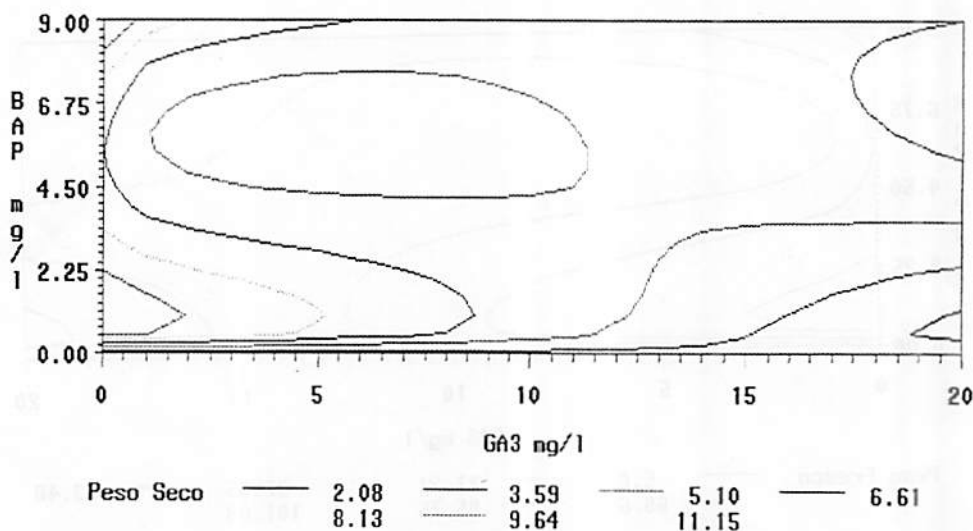


FIGURA 21 – Diagrama de contornos para a característica peso seco em resposta às dosagens dos hormônios BAP e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998.



## 5.2 Experimento 2: Multiplicação “in vitro” variando-se as concentrações de TDZ e GA<sub>3</sub> no cultivar Catuaí vermelho LCH 2077-2-5-44.

Os resultados obtidos para as características avaliadas no experimento 2 estão apresentados na Tabela 4. Todas as características, exceto peso seco, foram influenciadas pela interação entre os reguladores de crescimento TDZ e GA<sub>3</sub> (Tabela 4).

### 5.2.1 Número de brotações

O maior número de brotações estimado, segundo o modelo de superfície de resposta ajustado e o diagrama de contorno, é obtido quando a concentração de GA<sub>3</sub> atinge o sua dosagem máxima (GA<sub>3</sub> = 20 mg/l) interagindo com a dosagem de 0,94 mg/l de TDZ, sendo o número de brotações estimado de 2,15 brotações/explante (Figuras 22 e 23). A interação entre os reguladores de crescimento foi verificada pela análise de variância (Tabela 4). O modelo de regressão múltipla ajustado confirmou essa interação através da presença de termos no modelo, envolvendo os dois fatores simultaneamente (Figura 22). O desvio de regressão para esta característica não foi significativo, o que indica que o modelo ajustado foi satisfatório (Tabela 4). Através do diagrama de contornos, pode-se observar uma tendência de não paralelismo dos eixos elipsóides em relação aos eixos das variáveis independentes, o que confirma a interação presente entre os reguladores de crescimento TDZ e GA<sub>3</sub>.

Neste experimento houve uma maior influência do hormônio GA<sub>3</sub>, aumentando o número de brotações, ao contrário do ocorrido no experimento 1, no qual, a ausência deste hormônio provocou os melhores resultados. A citocinina, BAP e o TDZ, em ambos os experimentos, determinaram uma melhor resposta sob semelhantes concentrações, sendo de 0,99 mg/l para o experimento 1 e 0,94 mg/l para o experimento 2, correspondendo a resultados semelhantes.

**TABELA 4** Resumo das análises de variância para número total de brotos (NTB), o número de Brotos maior que 1 cm (NB>1), o número total de folhas (NTF), peso fresco (PF) e peso seco (PS) da parte aérea das brotações em função das concentrações de TDZ e GA<sub>3</sub>, em um período de 60 dias de cultivo “in vitro”, UFLA, Lavras, MG. 1998.

Causa da variação	NTB <sup>1/</sup>		NB>1 <sup>1/</sup>		NTF <sup>1/</sup>		PF		PS	
	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.
Tratamentos	(19)	0,2299**	(19)	0,1216**	(19)	1,8523**	(19)	849,2742**	(19)	22,1848
TDZ	3	0,9435**	3	0,2312**	3	7,0486**	3	1560,2744**	3	13,1864
GA <sub>3</sub>	4	0,0112	4	0,0432	4	0,2700	4	608,6828*	4	28,6297
TDZ x GA <sub>3</sub>	12	0,1243**	12	0,1203**	12	1,0807**	12	751,7214**	12	22,2860
Regressão	5	0,7230**	3	0,4440**	6	4,9759**	9	1198,2081**	-	-
Desvio	14	0,0537	16	0,0611*	13	0,4107	10	535,2338**	-	-
Resíduo	60	0,0516	60	0,0316	60	0,2910	60	187,2945	60	12,7290
C.V.(%)		16,14		15,21		22,33		30,44		48,46

<sup>1/</sup> Observações transformadas segundo  $\sqrt{(X + 0,5)}$ .

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

FIGURA 23 - Diagrama de contornos para a característica número total de brotos em resposta às dosagens dos hormônios TDZ e GA<sub>3</sub>. UFLA, Lavras, MG, 1998.

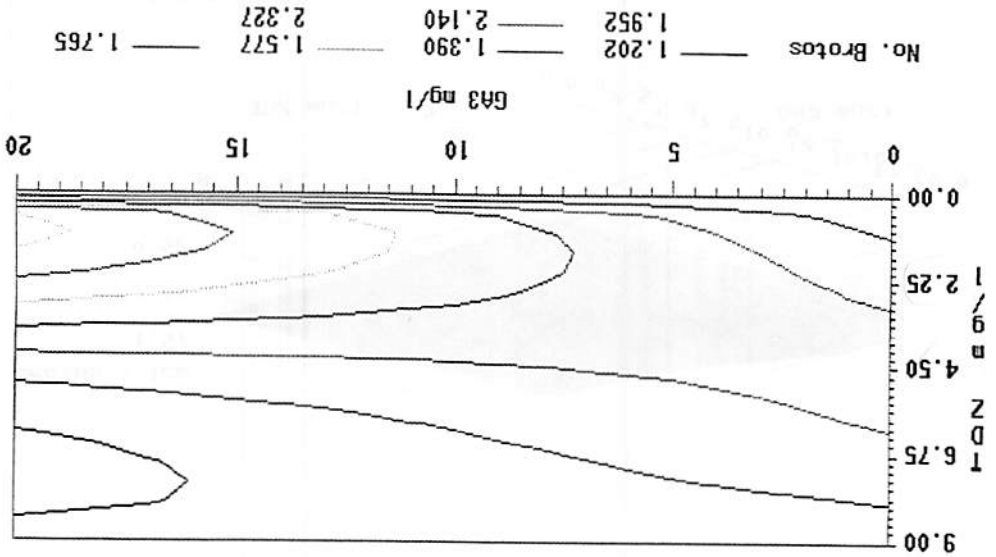
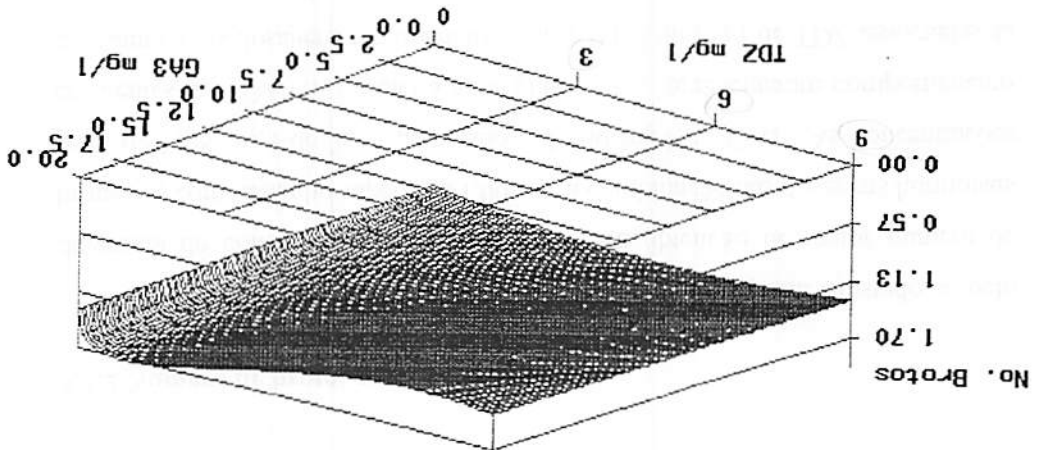


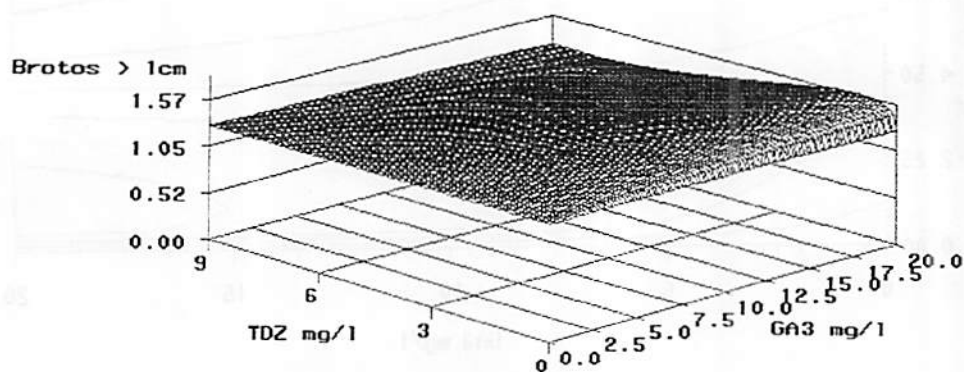
FIGURA 22 - Superfície de resposta para a característica número total de brotos em resposta às dosagens dos hormônios TDZ e GA<sub>3</sub>. UFLA, Lavras, MG, 1998.

$$Y = 1,219206 + 0,180836 X_1 - 0,019904 X_1^2 - 0,080515 X_1 X_2 + 0,004286 \sqrt{X_1} X_2$$



### 5.2.2 Número de brotos maiores que 1 cm

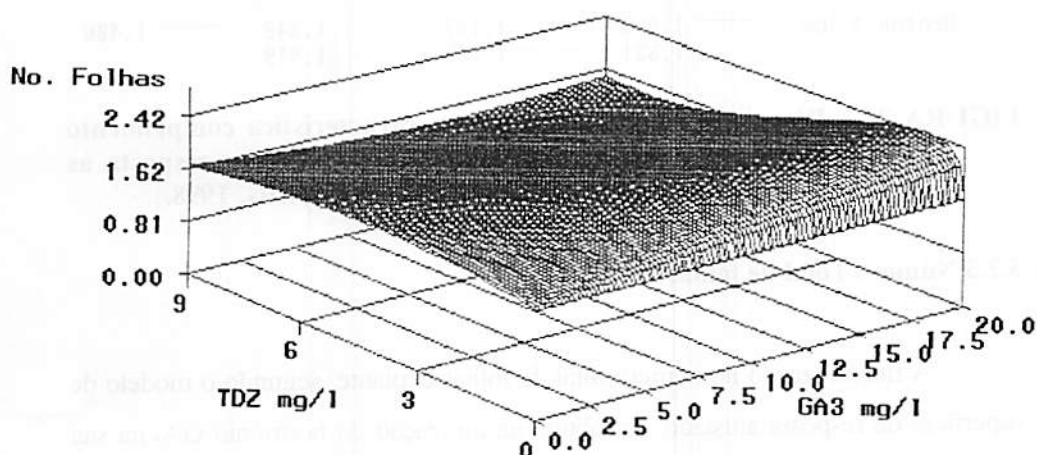
De acordo com o modelo de superfície de resposta ajustado e pelo diagrama de contorno (Figuras 24 e 25), para obtenção de maior número de brotações com tamanho superior a 1,00 cm, a combinação das dosagens hormonais seria de 0,98 mg/l de TDZ associado a 20,00 mg/l de GA<sub>3</sub>. As concentrações crescentes de TDZ em relação à ausência de GA<sub>3</sub> apresentaram comportamento constante, e as dosagens intermediárias entre 0 e 3,00 mg/l de TDZ associadas às crescentes dosagens de GA<sub>3</sub> apresentaram respostas satisfatórias. Pela análise de variância (Tabela 4), pode-se observar a presença de interações entre os reguladores de crescimento TDZ e GA<sub>3</sub> para a característica brotos maiores que 1 cm. Este fato é comprovado pela existência de termos presentes no modelo regressão, envolvendo os dois fatores (Figura 24). Os desvios de regressão, contudo, foram significativos. Apesar das inúmeras tentativas, não foi possível encontrar um modelo de regressão que melhor se ajustasse.



$$Y = 1,129212 - 0,048927 X_1 X_2 + 0,002097 X_1^2 X_2 + 0,088739 \sqrt{X_1} X_2$$

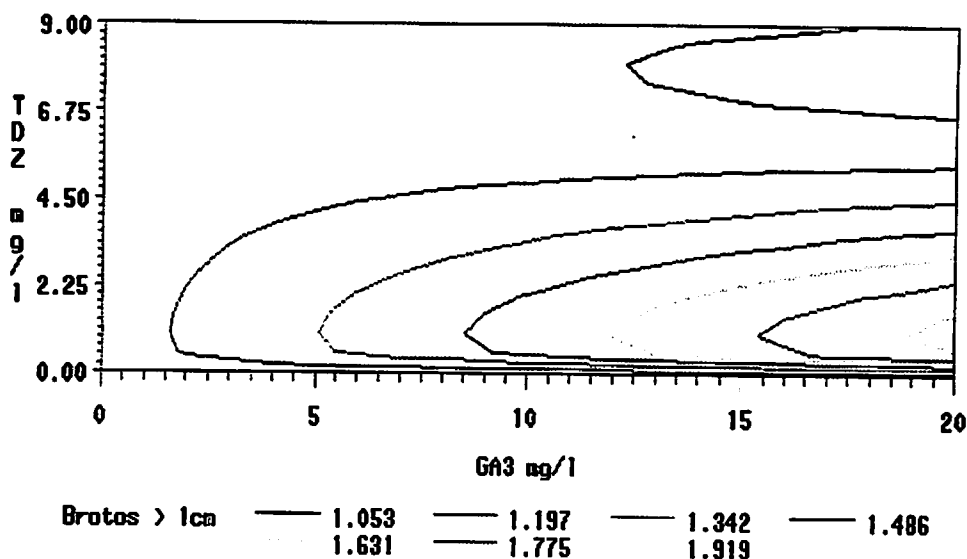
FIGURA 24 – Superfície de resposta para a característica brotos maiores que 1 cm em resposta às dosagens de TDZ e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998

Através dos experimentos, pode-se observar que a utilização de BAP, ao invés de TDZ, é mais apropriada, pois não foi influenciada pela adição do GA<sub>3</sub>, e também por ter tido melhor resposta na maximização do número total de folhas, sendo 11 folhas/explante no experimento 1, em relação ao experimento 2, que apresentou cerca de 5 folhas/explante. Portanto o TDZ em relação ao BAP, não mostrou-se eficiente.



$$Y = 2,129930 + 0,354233 X_1 - 0,037502 X_1^2 - 0,218986 X_1 X_2 + 0,000556 X_1 X_2^2 + 0,009986 X_1^2 X_2 + 0,344469 \sqrt{X_1} X_2$$

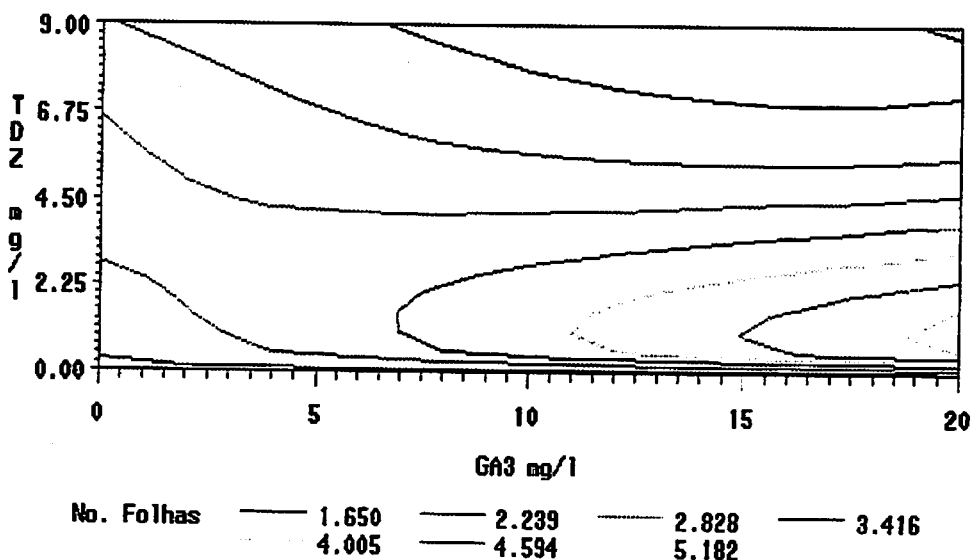
FIGURA 26 – Superfície de resposta para a característica número total de folhas em resposta às dosagens dos hormônios TDZ e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998.



**FIGURA 25 – Diagrama de contornos para a característica comprimento das brotações (brotos maiores que 1 cm) em resposta às dosagens de TDZ e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998.**

### 5.2.3 Número Total de folhas

A maximização no número total de folhas/explante, segundo o modelo de superfície de resposta ajustado, foi obtida na utilização do hormônio GA<sub>3</sub> na sua dosagem máxima (GA<sub>3</sub> = 20mg/l), interagindo com TDZ na dosagem de 0,98 mg/l. Neste caso o número total de folhas seria de 5 folhas/explante, também observado pelo diagrama de contorno (Figuras 26 e 27). No resumo da análise de variância (Tabela 4) para esta característica observa-se que houve uma interação entre os fatores, e esta foi confirmada através do modelo ajustado (Figura 26), ocorrendo a presença de termos no modelo, envolvendo os dois fatores. Os desvios de regressão não foram significativos, o que indica que o modelo ajustado foi satisfatório. O diagrama de contornos (Figura 27) não apresentou tendência ao paralelismo entre os eixos dos elipsóides e os eixos das variáveis independentes, confirmando a ocorrência de interação entre os reguladores de crescimento

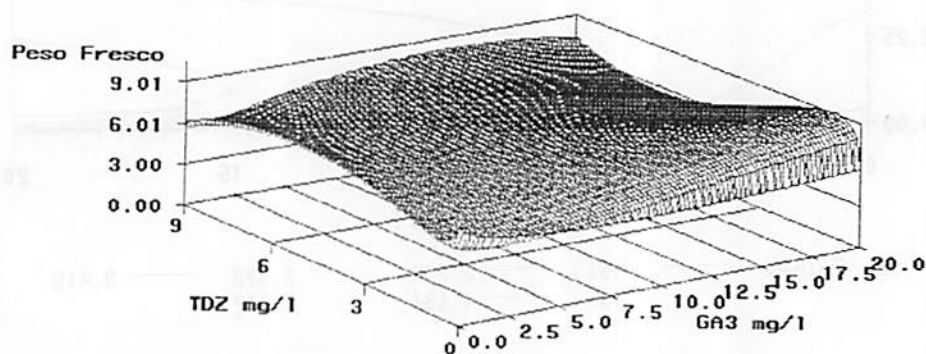


**FIGURA 27 – Diagrama de contornos para a característica número total de folhas em resposta às dosagens dos hormônios TDZ e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998.**

#### 5.2.4 Peso fresco e peso seco da parte aérea das brotações

A interação entre os fatores pode ser observada através da análise de variância (Tabela 4) e pelo modelo de superfície ajustado (Figura 28), onde nota-se a presença de termos no modelo envolvendo os dois fatores. O mesmo pode ser observado pelo diagrama de contornos (Figuras 29), onde pode-se observar que não existe uma tendência ao paralelismo entre os eixos elipsóides e os eixos das variáveis independentes, confirmando a presença de interação entre os fatores. Os desvios de regressão foram significativos ao nível de 1%. Neste caso, apesar de inúmeras tentativas não foi possível encontrar um modelo que se ajustasse satisfatoriamente. O aumento no peso fresco das brotações, através do modelo de superfície de resposta ajustado, foi obtido com concentração de TDZ igual a 0,84 mg/l associado à dosagem máxima de GA<sub>3</sub>: 20 mg/l, correspondendo a um peso fresco estimado de 80,71 mg.

O peso seco da parte aérea das brotações não apresentou diferenças significativas entre as concentrações dos reguladores de crescimento.



$$Y = 47,864191 + 38,328415 X_1 + 2,65558 X_2 - 2,532073 X_1^2 - 4,622082 X_1 X_2 - 50,275195 \sqrt{X_1} - 15,656972 \sqrt{X_2} - 0,035551 X_1 X_2^2 + 0,308524 X_1^2 X_2 + 8,219728 \sqrt{X_1} X_2$$

FIGURA 28 – Superfície de resposta para a característica peso fresco em resposta às dosagens dos hormônios TDZ e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998.

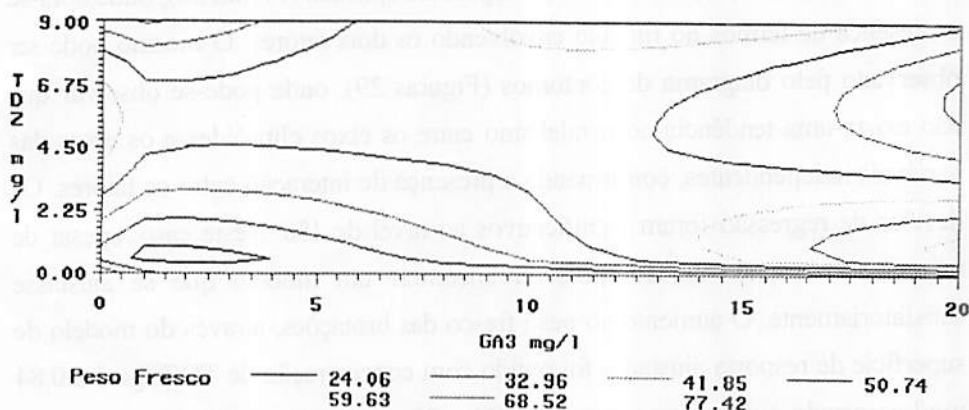


FIGURA 29 – Diagrama de contornos para a característica peso fresco em resposta às dosagens dos hormônios TDZ e GA<sub>3</sub>. UFLA. Lavras, MG, 1998.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOX, G.E.P.; DRAPER, N.R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: John Wiley e Sons, 1987. 669p.
- BERTHOULY, M.; DUFOUR, M.; ALVARD, D.; CARASCO, C.; ALEMANN, L.; TEISSON, C. Coffee micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. In: **16<sup>th</sup> International Scientific Colloquium on Coffee**, Kyoto, Japan, 9-14 apr. V.2, p.514-519, 1995.
- \*CAMBRONY, H.D.; SNOECK, J. Hormones et regulateurs de croissance dans les cultures de caféiers et de cacaoyers. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v.27, n.2, p.113-119, 1983.
- CUSTER, J.B.M.; van EE, G; BUIJS, L.C.; Clonal propagation on *Coffea arabica* L. by nodal culture. In: **PROC. IX INTERN. SCIENT. CELL. COFFEE**. ASIC., London, p. 588 - 596, 1980
- DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 2.ed. New York: John Wiley e Sons, 1981. 709p.
- PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B. Cultura de embriões. In: **NOTÍCIAS DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS**, Brasília, v.2, p.2-12. 1988.
- \*SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; MEDINA Filho, H.P.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C.; COSTA, W.R. **Coffee**. In: Ammyrato e McMillen, eds. **Handbook of plant cell culture**. New York, p.564-590., 1984.
- VAN DER VOSSEN, H.A.M. Coffee Selection and Breeding. In: Clifford M. N. and Wilson K.C. eds. **Coffee**. Botany Biochemistry and Production of beans and berrage. The Avis Publishing Company. In: Westport Connecticut, p.48-96, 1985.
- \*ZOK, S., DUBLIN, P. Multiplication Végétative in vitro par culture D'Apex chez *Coffea arabica* L. Action de Solutions Minerales et de Regulateurs de croissance. **Café, Cacao, Thé**, v. 14, n° 4, oct-dec., 1991.

## 6 CONCLUSÃO

As melhores concentrações para as características avaliadas, corresponderam à ausência do hormônio  $GA_3$  em associação com concentrações mínimas de BAP. As concentrações do hormônio BAP para as características nº total de folhas, peso fresco, nº total de brotos e peso seco foram 0,95, 0,96, 0,99 e 1,00 mg/l respectivamente. Os melhores resultados, para a característica nº de brotos maiores que 1,0 cm, foram obtidos quando as concentrações máximas de BAP e  $GA_3$  foram utilizadas.

Na relação entre os hormônios TDZ e  $GA_3$ , para todas as características avaliadas, é recomendada a utilização da concentração máxima de  $GA_3$  (20,00mg/l) associada às concentrações mínimas de TDZ variando de 0,84 a 0,98 mg/l. As concentrações que apresentaram os melhores resultados para TDZ, nas seguintes características, foram: peso fresco (0,84 mg/l), número de brotações (0,94 mg/l) e número total de folhas e brotos maiores que 1,0 cm (0,98 mg/l)