

34º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras

2,4-D E BAP NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES EM ANTERAS DE CAFEIEIRO *Coffea*

***arábica* L.**

IV Naves (Graduando em Agronomia do ICIAG/UFU/MG) , JM Luz (Dr em Fitotecnia, Prof do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG) da Universidade Federal de Uberlândia-UFU/MG, Av. Amazonas s/n Bloco 2E sala 14, Bairro Umuarama, Uberlândia, CEP 38405-902, email: jmagno@umuarama.ufu.br), TM Rodrigues (Pós-Doutoranda em Fitotecnia do ICIAG/UFU/MG, e-mail: tatiana_mrodrigues@yahoo.com.br), LO Lino (Graduando em Agronomia do ICIAG/UFU/MG), L de A Dias (Graduanda em Agronomia do ICIAG/UFU/MG), M Pasqual (Dr em Fitotecnia, Prof do Depto de Agricultura da Universidade Federal de Lavras-UFLA/MG)

Por se tratar de cultura perene propagada via semente, os programas de melhoramento do café demandam aproximadamente 25 anos desde a hibridação até a obtenção de uma nova variedade. Sendo assim, a cultura de anteras é considerada uma ferramenta importante, o que leva a rápida produção de plantas homozigóticas, substituindo as gerações de autofecundação. Além dos haplóides serem livres dos problemas de dominância e recessividade, por possuírem apenas um alelo em cada loco gênico, acelerando drasticamente o processo de obtenção de novos cultivares, (ARAÚJO, 2004).

Diante do exposto, o grau de sucesso em qualquer tecnologia que emprega cultura de células, tecidos ou órgãos é dependente de alguns fatores. Um fator significativo é a escolha dos componentes nutricionais e reguladores de crescimento que controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento "in vitro". Cujo o objetivo foi testar concentrações diferentes de 2,4-D em combinação com diferentes concentrações de BAP, na indução, no crescimento e regeneração de embriões somáticos a partir de anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L.

O experimento foi instalado e conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, no período de agosto de 2007 a janeiro de 2008. Foi utilizado o genótipo de cafeeiro *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho 144 advindo do Programa de Melhoramento da Universidade Federal de Lavras, plantados na Fazenda experimental do Glória da Universidade Federal de Uberlândia.

Os botões florais foram coletados quando mediam entre 4,5 a 5,5 mm correspondendo à anteras contendo micrósporos uninucleados e foram desinfestados em álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos e dentro do fluxo laminar, com posterior lavagem tripla em água destilada e autoclavada. As anteras foram retiradas com auxílio de pinças finas e bisturi, previamente autoclavados, sob luz de um microscópio estereoscópio em aumento de 40 vezes, e reunidas em placa de petri esterilizada, tomando-se o cuidado de não feri-las.

As anteras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio MS suplementado com citocinina BAP em diferentes concentrações (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) em combinação com diferentes concentrações

da auxina 2,4-D (1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e o pH ajustado em 5,7, antes da autoclavagem. A incubação foi realizada em sala de crescimento sob condição de obscuridade, com temperatura de 26 ± 2°C.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em fatorial 4 (BAP) x 3 (2,4-D), com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por quatro tubos de ensaio contendo um explante por tubo. A avaliação realizada aos 90 dias após a inoculação foi executada por três avaliadores observando a porcentagem total de calos, porcentagem de calos embriogênicos e massa fresca dos calos.

Os dados obtidos do experimento foram submetidos à análise estatística, com aplicação do teste F a 5% de probabilidade. Para efeito da análise estatística, os dados referentes à massa fresca de calos foram transformados em log (x+100) e todos os dados foram analisados por regressão polinomial, pelo programa Sisvar®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na indução de calo em anteras do cafeeiro *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho 144 diferenças significativas em relação à produção de massa fresca foram encontrados em função da interação das concentrações de BAP e 2,4-D.

Na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP, os tratamentos seguiram uma tendência quadrática, em que a concentração de 2,7 mg L⁻¹ de 2,4-D correspondeu ao ponto máximo da curva, lembrando-se que para efeito da análise estatística, dos dados foram transformados em log (x+100), atingindo o máximo de massa fresca de 0,0304 gramas, de acordo com a equação derivada. Este comportamento quadrático indicou que concentrações acima e abaixo de 2,7 mg L⁻¹ tiveram tendência de redução da massa fresca de calo.

Na indução de calogênese o uso da auxina 2,4-D é freqüente. Santos (1999) verificou para anteras de soja que essa auxina é fundamental na fase de indução e que o uso associado com a citocinina BAP leva ao aumento das taxas de indução de calos. As auxinas atuam na inicialização da divisão celular e controla os processos de crescimento e alongação celular. O 2,4-D atua também no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros que decodificam proteínas para o crescimento, podendo induzir a uma desordenada proliferação celular (GEORGE, 1996).

Magalhães (2006), trabalhando com ápices caulinares de batata-doce, verificou que a maior produção de massa fresca de calo foi obtida em meio com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D. Silva (2003) utilizando *Catharanthus roseus* para obtenção de massa fresca de calo em maior quantidade verificou também, que o uso de 2,4-D combinado com a cinetina (citocinina) proporcionou bons resultados. Isso mostra que a presença de uma citocinina tem grande influência no crescimento de tecido caloso em explantes confirmando os resultados do presente trabalho que é a combinação de 2,7 mg L⁻¹ de 2,4-D combinado com 2,0 mg L⁻¹ de BAP.

Com relação à porcentagem de calos totais a partir de anteras da cv. Catuaí Vermelho 144 de *Coffea arabica* L. no presente trabalho foram verificadas diferenças significativas em função da interação das concentrações de BAP e 2,4-D.

Na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP, os tratamentos seguiram uma tendência quadrática, em que a concentração de 2,25 mg L⁻¹ de 2,4-D correspondeu ao ponto máximo da curva, atingindo o máximo de

calos em 98,36 %, de acordo com a equação derivada. Este comportamento quadrático indicou que concentrações acima e abaixo de 2,25 mg L⁻¹ tiveram tendência de redução do número de calos formados.

Silva (2007) testou a combinação de 2,4-D com AAS (ácido acetil salicílico) e Marques et al., (2005) testaram a combinação de 2,4-D com TDZ e ambos obtiveram o mesmo resultado. Em que ao adicionar isoladamente 2 mg L⁻¹ de 2,4-D no meio de cultivo, foi verificado a eficiência desta concentração para a formação de calos a partir de anteras de cafeeiro da cv. Catuaí Vermelho 44.

Marques (2006), trabalhando com a cv. Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44 da espécie *Coffea arabica* L. constatou que a combinação de auxina com citocinina (2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L⁻¹ de BAP) foi aquela que respondeu melhor na formação de calo, embora não diferindo estatisticamente das combinações de 2 mg L⁻¹ de Cinetina + 1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2 mg L⁻¹ de 2,4-D+ 0,5 mg L⁻¹ TDZ, porém numericamente foi mais eficiente que as demais. Assim como também detectamos no presente trabalho a eficiência da combinação destes dois hormônios de crescimento.

Donato et al.(2000) trabalhando com Couve-comum verificou que as combinações entre 2,4-D e BAP, em que até mesmo na presença das mais reduzidas concentrações de BAP, como nos meios suplementados com 0,01 e 0,05 mg L⁻¹, os calos apresentavam melhor desenvolvimento. Os dados para a cv. Catuaí Vermelho 144 de *Coffea arabica* L. corroboram os este resultado, com ressalva para concentrações acima de 2,25 mg L⁻¹ de BAP em que ocorre um decréscimo na porcentagem de calos formados.

E para a indução de calos embriogênicos a partir do cultivo de anteras de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho 144 foi verificado diferenças significativas em relação porcentagem deste tipo de calo em função da interação das concentrações de BAP e 2,4-D.

Na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, os tratamentos seguiram uma tendência quadrática, em que a concentração de 2,31 mg L⁻¹ de BAP correspondeu ao ponto máximo da curva, atingindo o máximo de calos em 64,26 %, de acordo com a equação derivada. Este comportamento quadrático indicou que concentrações acima e abaixo de 2,31 mg L⁻¹ tiveram tendência de redução do número de calos embriogênicos formados (Figura 3).

Magalhães (2006), trabalhando com ápices caulinares de batata-doce, verificou que a maior porcentagem de calos embriogênicos formados foram obtidos em meio com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D para as cvs. '92'; '94'; '188'; '449'; '594'; 'White Star'; 'Jewel' favorecendo a maturação dos embriões somáticos.

Já para a cv. Catuaí Vermelho 144 de *Coffea arabica* L. a adição somente de 2,4-D para a obtenção de calos embriogênicos foi ineficiente com 4,21% de calos embriogênicos, valor muito baixo, porém com a adição da citocinina BAP houve um acréscimo significativo até a concentração 2,31 mg L⁻¹ que corresponde a 64,26%.

Bispo et al. (2007) verificou que para *Avena sativa* L. houve a influência do genótipo na frequência de calos embriogênicos onde a cultivar "OR3" produziu a mais alta frequência deste tipo de calo (66,7%). Flores et al., (2006) também verificou que a formação de calos em *Pfaffia tuberosa* também foi induzida em 27% dos explantes foliares quando cultivados em meio com 1 mM de 2,4-D.

Em todos os trabalhos analisados constatou-se que o 2,4-D é importante para indução calos, e a combinação com o BAP proporciona um incremento significativo na obtenção de calos embriogênicos, ficou também constado nesse trabalho.

Nas condições descritas neste trabalho: Para produção de massa fresca em anteras do cafeeiro *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho 144, recomenda-se o uso de meio MS acrescido de 2,7 mg L⁻¹ de 2,4-D combinado com 2,0 mg L⁻¹ de BAP; Com relação à porcentagem de calos totais a partir de anteras da cv. Catuaí Vermelho 144 de *Coffea arabica* L, recomenda-se o uso de meio MS acrescido de 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 2,25 mg L⁻¹ de 2,4-D; Quanto à formação de calos embriogênicos formados a partir de anteras cv. Catuaí Vermelho 144 de *Coffea arabica* L recomenda-se o uso de meio MS acrescido 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,31 mg L⁻¹ de BAP. Mas outros trabalhos deverão ser realizadas dentro da técnica de cultura de anteras, que se obtenha novos resultados e venha contribuir para a essa linha de pesquisa para que ocorra a obtenção de plântulas haplóides.