

EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTOS EM BOTÕES FLORAIS E INFLUÊNCIA DO 2,4-D NO CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)

EFFECT OF PRE-TREATMENTS IN FLOWER BUDS AND 2,4-D INFLUENCE AT *IN VITRO* ANTHHER CULTURE OF COFFEE (*Coffea arabica* L.)

Elisângela Rodrigues FIGUEIRA¹; José Magno Queiroz LUZ²; Adelaide Siqueira SILVA³; Luciana Nogueira LONDE⁴; Denise Garcia SANTANA²; Moacir PASQUAL⁵

RESUMO: No Brasil, *Coffea arabica* apresenta poucos progressos quanto à aplicação da cultura de anteras. Foi avaliado o efeito dos pré-tratamentos por choque frio (4°C), de calor (35°C), e à temperatura ambiente de botões florais e a influência do regulador de crescimento 2,4-D na indução de embriões em anteras de cafeeiro. Foram utilizados três cultivares de *Coffea arabica* L., Mundo Novo, Catuaí Vermelho 44 e 99. Os botões florais foram coletados, desinfestados e as anteras inoculadas em meio MS suplementado com 2,4-D nas concentrações 0,005; 0,05; 0,5 e 5,0 μ M. O delineamento experimental foi de blocos casualizados, com 4 repetições por tratamento, constituindo cada placa uma parcela, composta de 20 anteras por placa. A análise das cultivares estudadas demonstrou que em algumas, após o intumescimento, manifestou-se uma pequena calosidade, mas estas e as demais oxidaram e morreram. A cultivar Catuaí vermelho 99 apresentou os melhores resultados. O processo de desinfestação utilizado não foi eficiente, ocorreu um alto índice de oxidação, os pré-tratamentos e o 2,4-D nas concentrações utilizadas não foram eficientes na indução de embriões nas anteras das cultivares estudadas.

UNITERMOS: Auxinas, Anteras, *Coffea arabica*, Cultivo *in vitro*.

INTRODUÇÃO

Coffea arabica L. é considerada uma espécie nobre, com café de boa qualidade, possuindo mais de 40 mutantes e muitas variedades (GRANER; GODOY JÚNIOR, 1967). Em função dos enormes quantitativos atingidos pela procura mundial de café e dos seus preços favoráveis e também da plasticidade de adaptação ecológica revelada pelas suas espécies, variedades e formas cultivadas, o cafeeiro tornou-se, possivelmente, uma das plantas perenes que o homem atualmente cultiva em maior amplitude de condições ecológicas (CARDOSO, 1994).

As espécies mais comuns no mercado são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*; segundo Ferrão et al. (2000), o café arábica corresponde a aproximadamente 70% do café comercializado no mundo

e é produzido principalmente no continente americano. A importância da cafeicultura na economia brasileira pode ser avaliada pelo fato de abastecer o mercado interno e de contribuir com cerca de 6% do total do valor das exportações. Segundo Caixeta (1999), a economia cafeeira movimenta no País, cerca de seis bilhões de reais por ano e gera pelo menos quatro milhões de empregos.

O tempo gasto no melhoramento convencional do cafeeiro *Coffea arabica* L. para que se chegue a um resultado satisfatório, é muito longo, cerca de 15 a 20 anos, até se obter material superior (ANDRADE, 1998). Este tempo pode ser reduzido através da obtenção de haplóides. Apesar da possibilidade da produção dos mesmos por diferentes técnicas como ginogênese, androgênese, tratamento químico, choque térmico e irradiação com raios X ou luz ultravioleta e, ainda, por outras técnicas *in vitro*, até o momento a melhor técnica

¹ Mestranda, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia

² Professor, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia

³ Graduada do Curso de Biologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia

⁴ Bióloga

⁵ Professor, Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras

Received: 07/11/02 Accept: 06/02/03

in vitro para obtenção de haplóides é a cultura de anteras, pois nestas, os micrósporos estão em grande número, e podem desenvolver-se em haplóides por androgênese direta, dando origem a embriões, ou indireta, passando pela fase de calos (MORAES FERNANDES, 1990).

A Cultura de Tecidos é uma técnica que visa obter plantas a partir de explantes, os quais podem ser: meristemas, partes da folha, raízes, caules, anteras ou protoplastos. Essa técnica baseia-se na totipotencialidade celular, ou seja, na capacidade de uma célula qualquer da planta regenerar uma nova planta, visto que possui toda a informação genética necessária para isso (RIBEIRO, 1999).

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 (ANDRADE, 1998). A composição do meio de cultura e dos reguladores de crescimento presentes no mesmo, estão dentre os importantes fatores que determinam a regeneração de embriões haplóides (MORAES FERNANDES, 1990).

No Brasil, o *Coffea arabica* ainda apresenta poucos progressos com relação à aplicação da cultura de anteras. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos pré-tratamentos por choque frio, choque de calor e temperatura ambiente (experimento controle) de botões florais e analisar a influência do 2,4-D na indução de embriões em anteras de cafeeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de cultura de tecidos vegetais da Universidade Federal de Uberlândia. Foram utilizadas as cultivares de cafeeiro plantadas na área experimental do Campus Umuarama dessa universidade. Foram coletados botões florais das cultivares Mundo Novo, Catuaí Vermelho 44 e Catuaí Vermelho 99 de 4,5 à 6,0 mm de comprimento, aferidos com o auxílio de um paquímetro e colocados em geladeira (4°C) por 48 horas, em estufa (35°C) por 24 horas e no ambiente do laboratório (21°C) por 24 horas. Os mesmos foram desinfestados com álcool 70% por 1 segundo e hipoclorito de Na (1%) por 15 minutos sob agitação e em fluxo laminar foram lavados 3 vezes em água destilada e autoclavada. No pré-tratamento por choque frio, foram evidenciados altos índices de contaminação quando comparado aos demais experimentos; na tentativa de resolver tal problema, a metodologia durante o processo de inoculação foi alterada

para a realização dos experimentos controle e do pré-tratamento por choque de calor; onde as anteras, após serem retiradas dos botões florais, eram imersas, antes de serem inoculadas, em uma solução de hipoclorito de sódio à 0,2% e em uma solução de ácido ascórbico à 3,4 mM, na tentativa de diminuir a oxidação. As anteras foram retiradas dos botões florais com lupa, pinça e bisturi. Logo após, foram inoculadas em placas de Petri, contendo 25 ml do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com pH ajustado para 5.9 e previamente autoclavado, suplementado com 2,4-D, nas concentrações 0,005; 0,05; 0,5 e 5,0 µM. Após a inoculação, as anteras permaneceram em sala de crescimento com 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas de luz com intensidade luminosa de 2500 lux.

O delineamento experimental foi de blocos casualizados em esquema fatorial com 4 repetições sendo a parcela constituída por uma placa com 20 anteras. Na análise estatística, os dados foram transformados em $\sqrt{x+1/2}$. Os dados foram submetidos à análise de variância e conforme a significância foi feita a regressão para as concentrações do 2,4-D e teste de Tukey para cultivares e pré-tratamentos.

Aos 30 dias após a inoculação, procedeu-se o transplante das anteras, provenientes do experimento controle e do pré-tratamento por choque de calor, para doses de 10 e 15 µM de 2,4-D. Foram realizadas três avaliações parciais dos índices de oxidação, contaminação e intumescimento, em intervalos de 10 dias cada, para ambos os pré-tratamentos, inclusive após as anteras terem sido transplantadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 30 dias após a inoculação das anteras do pré-tratamento por choque frio, a média geral de contaminação foi de 66 % das anteras inoculadas, verificou-se também uma média de 56 % de anteras oxidadas (Tabela 1). Esses índices de contaminação e oxidação são bem superiores aos relatados por Carneiro (1999), em trabalho com anteras de Catuaí cultivadas em meio MS com diferentes auxinas, mas a autora não relata qual processo de desinfestação foi efetuado, bem como se usou ou não algum antioxidante. Em todas as três avaliações, a cultivar mais responsiva ao intumescimento foi a Catuaí vermelho 99 (Tabela 2). Segundo Andrade (1998), o pré-tratamento à frio das anteras, pode aumentar a capacidade de produzir calos ou plantas regeneradas. Ocorreu a formação de um calo para a cultivar Mundo Novo na concentração de 0,05 µM 2,4-D. Carneiro (1999),

em trabalho com anteras de Catuaí cultivadas em meio MS com diferentes auxinas, usou concentrações de 2,4-D de 9,1 e 13,6 μM , bem maiores que o presente trabalho,

conseguiu 95,0 e 59,2% de anteras com calos e embriogênicas, respectivamente, mas estes resultados foram conseguidos em 12 semanas de cultivo.

Tabela 1. Percentagem de oxidação e contaminação nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí vermelho 44 (CV44) e Catuaí vermelho 99 (CV99) para o pré-tratamento por choque frio. UFU/Uberlândia-MG, 2002.

Cultivares	Doses de 2,4-D (μM)							
	0,005		0,05		0,5		5,0	
	% cont.	% oxi.	% cont.	% oxi.	% cont.	% oxi.	% cont.	% oxi.
MN	37,5	37,5	50,0	37,5	85,7	85,7	80,0	80,0
CV 44	71,4	71,4	75,0	50,0	57,0	57,0	83,4	50,0
CV 99	66,7	66,7	100,0	57,0	37,5	25,0	50,0	50,0
Média de oxidação	56,0							
Média de contaminação	66,0							

Tabela 2. Intumescimento de anteras de cafeeiro nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí vermelho 44 (CV44) e Catuaí vermelho 99 (CV99) para o pré-tratamento por choque frio. UFU/Uberlândia-MG, 2002.

Cultivares	Intumescimento		
	Avaliação 1	Avaliação 2	Avaliação 3
MN	0.7071 b	0.7071 b	0,0000 b
CV 44	0.7071 b	0.7071 b	0,0000 b
CV 99	1.4235 a	1.4235 a	1,5263 a

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

Aos 30 dias após a inoculação das anteras do pré-tratamento por choque de calor, a média geral de oxidação foi de 84,42%, e a de contaminação foi de 15,44%. A média geral de intumescimento foi de 3,87%; após o transplante, a média geral de oxidação foi de 100%, a de contaminação 14,79% e a de intumescimento 7,84% (Figura 1). Analisando-se as doses de 2,4-D, para a

cultivar Mundo Novo, verificou-se que à medida que se aumenta essas concentrações, há um acréscimo em média de 2,83 anteras oxidadas por parcela (Figura 2). Já para a cultivar Catuaí vermelho 99, a oxidação decresce com o aumento das dosagens até 0,5 μM ; quando a dosagem foi 5,0 μM , o contrário aconteceu (Figura 3).

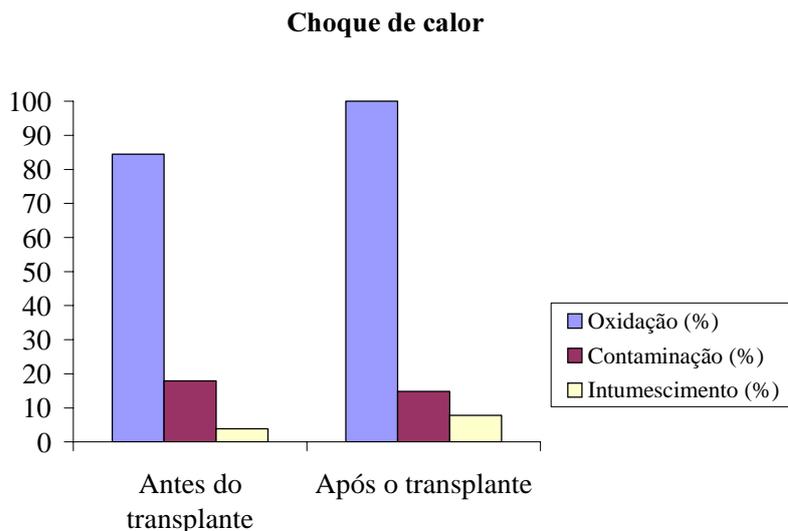


Figura 1. Média geral de oxidação, contaminação e intumescimento de anteras de cafeeiro antes e após o transplante no pré-tratamento por choque de calor. UFU/Uberlândia-MG, 2002.

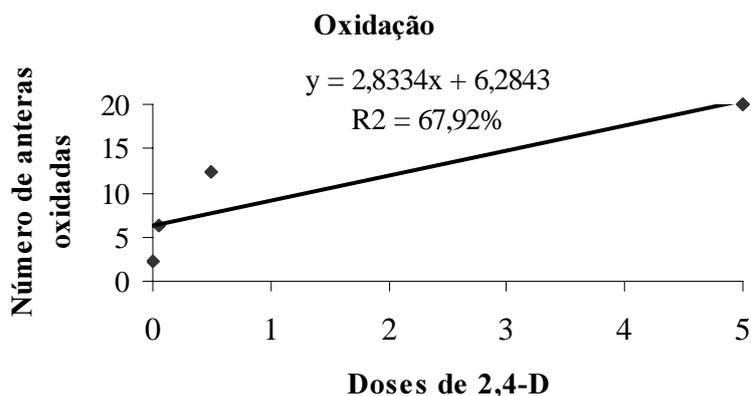


Figura 2. Primeira avaliação da oxidação de anteras de cafeeiro em diferentes doses de 2,4-D (μM) para a cultivar Mundo Novo no pré-tratamento por choque de calor. UFU/Uberlândia-MG, 2002.

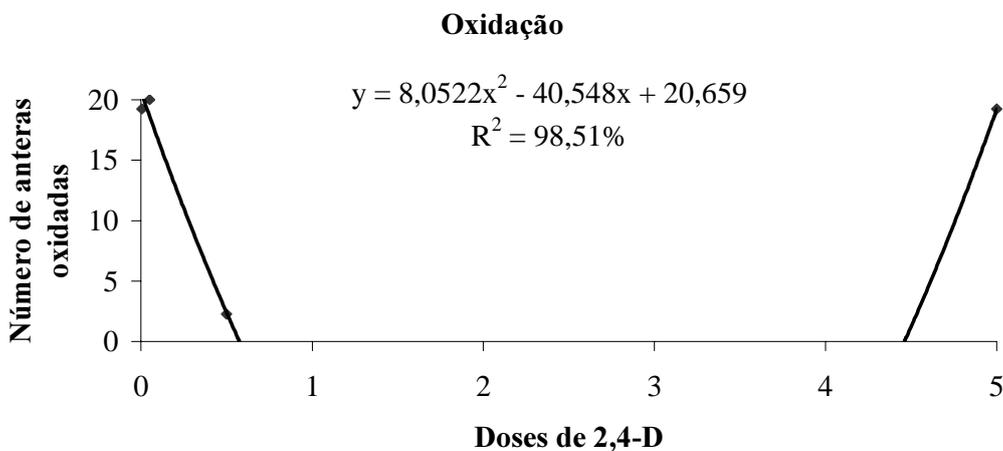


Figura 3. Primeira avaliação da oxidação de anteras de cafeeiro em diferentes doses de 2,4-D (μM) para a cultivar Catuaí vermelho 99 no pré-tratamento por choque de calor. UFU/Uberlândia-MG, 2002.

Aos 30 dias após a inoculação das anteras do experimento controle (temperatura ambiente), a média geral de oxidação foi de 76,23 %, a de contaminação foi de 11,23%; verificou-se também uma média de 18,10%

de anteras intumescidas; após o transplante, a média geral de oxidação foi de 96,86%, a de contaminação foi de 19,82% e a de intumescimento foi de 32,66% (Figura 4).

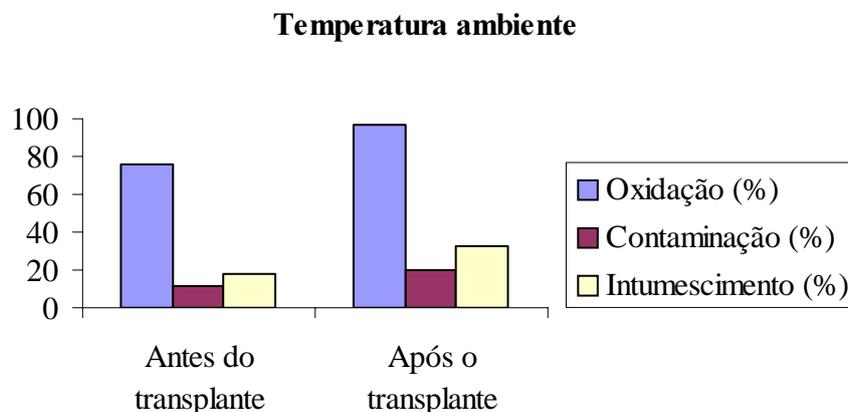


Figura 4. Média geral de oxidação, contaminação e intumescimento de anteras de cafeeiro antes e após o transplante no experimento controle (temperatura ambiente). UFU/Uberlândia-MG, 2002.

De qualquer forma, é de se esperar que ocorra uma contaminação maior na cultura de anteras em cafeeiro, já que as plantas fornecedoras dos botões florais se encontram em condições de campo. No presente trabalho em algumas anteras, após o intumescimento, manifestou-se uma pequena calosidade, mas em seguida

estas e as demais oxidaram e morreram. Se for considerado o intumescimento das anteras como um possível início de formação de calos, a diferença de manifestação entre os genótipos, é comum na técnica de cultura de anteras, prevendo-se então que o Catuaí seja mais responsivo (tabela 3).

Tabela 3. Intumescimento de anteras de cafeeiro nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí vermelho 44 (CV44) e Catuaí vermelho 99 (CV99) à temperatura ambiente (experimento controle). UFU/Uberlândia, 2002.

Intumescimento			
Cultivares	Avaliação 1	Avaliação 2	Avaliação 3
MN	0,3777 b	0,0468 b	0,0468 b
CV 44	0,1328 b	0,0000 b	0,1761 b
CV 99	9,4680 a	6,5074 a	3,7279 a

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

No pré-tratamento por choque de calor e no tratamento controle, ou seja, à temperatura ambiente do laboratório (21°C), as anteras apresentaram intumescimento a partir da 1ª avaliação, entretanto, a partir da 2ª, estas também estavam oxidadas. Após o transplante, a partir da 1ª avaliação, todas as anteras que estavam intumescidas também encontravam-se oxidadas.

A partir dos resultados obtidos, notou-se que os

maiores valores de oxidação e os menores de intumescimento ocorreram para o pré-tratamento por choque de calor quando comparados ao tratamento controle (temperatura ambiente), provavelmente, isso está ligado ao fato da maior temperatura (35°C) ao qual as anteras foram submetidas. O tratamento controle (temperatura ambiente) foi mais eficaz quando comparado ao pré-tratamento por choque de calor.

CONCLUSÕES

- O processo de desinfestação utilizado não foi eficiente;
- Ocorreu um alto índice de oxidação;
- Os pré- tratamentos e o 2,4-D nas concentrações utilizadas não foram eficientes na indução de embriões nas anteras das cultivares estudadas.

ABSTRACT: In Brazil, *Coffea arabica* L. has had little progress in anther culture. The effect of pre-treatments by cold shock (4°C), heat shock (35°C) and environmental temperature in flower buds and 2,4-D influence at induction of embryo formation in coffee anthers was evaluated. The cultivars used were Mundo Novo, Catuaí vermelho 44 and Catuaí vermelho 99. Flower buds were collected and desinfested, after which the anthers were inoculated in basal MS medium, supplemented with 2,4-D (0.005, 0.05, 0.5 or 5.0 µM). The experimental design was of randomized blocks with 4 replications per treatment. Each Petri dish had 20 anthers and was one plot. The cultivar analysis demonstrated that, after the anthers intumescenced, there was some callus formation, however these anthers oxidated and died. The cultivar Catuaí vermelho 99 had the best results. The desinfestation process wasn't efficient, it had a high level of oxidation, the pre-treatments and 2,4-D concentrations used were not efficient at induction of embryos in anthers of the cultivars evaluated.

UNITERMS: Auxins, anthers, *Coffea arabica*, *In vitro* culture.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, Luciana Marques da Cunha Oliveira. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica*)**. 1998. 86 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.
- CAIXETA, G. Z. C. Economia cafeeira, mercado de café, tendência e perspectivas. In: ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ DE QUALIDADE, 1., 1999, Viçosa. **Livro de Palestras...** Viçosa: UFV, 1999. p. 3-21.
- CARDOSO, A. P. S. **Café: cultura e tecnologia primária**. [S.l.]: Ministério do Planejamento e da Administração do Território. Secretaria de Estado da Ciência e Tecnologia. Instituto de Investigação Científica Tropical, 1994. 169 p.
- CARNEIRO, M. F. Advances on coffee androgenesis. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR, 1999. p. 55-60.
- FERRÃO, M. A. G.; FONSECA, A. F. A. da; FERRÃO, R. G.; ROCHA, A. C.; ANDRADE NETO, A. P. M.; FORNAZIER, M. J. Desempenho de progênies de café arábica na região de Montanhas do Estado do Espírito Santo. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos...** Brasília: Embrapa Café/Minasplan, 2000. p. 426-429.
- GRANER, E. A.; GODOY JUNIOR, C. **Manual do cafeicultor**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1967. 320 p.
- MORAES FERNANDES, M I. B. de. Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/ EMBRAPA/CNPH, 1990. p. 311-332.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-97, 1962.

RIBEIRO, Ana Paula de Oliveira. **Definição de meio de cultura para morfogênese indireta em alface variedades Verônica e Maioba.** 1999. 39 f. Monografia (Conclusão do Curso de graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1999.