

RELAÇÃO ENTRE OS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS MICRÓSPOROS E AS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO BOTÃO FLORAL PARA O CAFEIEIRO (*COFFEA ARABICA* L.)

RELATIONSHIP BETWEEN MICROSPORE DEVELOPMENTAL STAGES AND MORPHOLOGIC CHARACTERISTICS OF COFFEE (*COFFEA ARABICA* L.) FLOWER BUD

Adelaide Siqueira SILVA¹, José Magno Queiroz LUZ², Elisângela Rodrigues FIGUEIRA³, Luciana Nogueira LONDE⁴, Denise Garcia SANTANA⁵, Patrícia Crystie Vieira MUSTAFA⁶, Moacir PASQUAL⁷

RESUMO: Na cultura de anteras, é necessário que se determine o estágio ideal de desenvolvimento das mesmas, que contenha micrósporos que respondam melhor aos processos androgenéticos. Neste sentido, foi avaliada a relação entre os estádios de desenvolvimento dos micrósporos e as características morfológicas do botão floral para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Foram utilizados 3 cultivares, Mundo Novo, Catuaí Vermelho 44 e 99, os botões florais foram coletados e fixados. Posteriormente foram separados de acordo com o seu comprimento, e comprimento da antera, em cinco classes, relacionando-as com as fases de desenvolvimento dos micrósporos. Verificou-se que existe uma relação entre o comprimento do botão floral, das anteras, e destas com o estágio de desenvolvimento dos micrósporos e que o estágio ideal corresponde à fase uninucleada central, encontrada em botões florais que variam de 4,5 à 6,0 mm de comprimento.

UNITERMOS: Micrósporos; Anteras; *Coffea arabica*.

INTRODUÇÃO

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae, na qual o gênero *Coffea* abrange cerca de 60 espécies, apresentando grande heterogeneidade entre elas, sendo que as cultivares possuem características diferenciadas quanto à forma dos frutos e flores, e resistência à diversas moléstias e pragas (GRANER; GODOY JÚNIOR, 1967).

As folhas do cafeeiro apresentam coloração verde escura, são elípticas a lanceoladas, aparecem nos ramos laterais num mesmo plano e em posições opostas, inserindo-se cada uma no ramo por um pecíolo plano na parte superior e convexo na inferior. Cada inflorescência compreende duas a seis flores originadas em ramificações de um eixo floral formado numa axila foliar de um ramo plagiotrópico. Um a três destes eixos florais, correspondentes a outras inflorescências, inserem-se normalmente em cada axila, formando glomérulos (CARDOSO, 1994).

Cada flor tem um pedúnculo, na extremidade do qual se situa o ovário; em coroa sobre este inserem-se as sépalas.

Acima deste sai a corola, constituída por cinco pétalas soldadas na base, formando um tubo cilíndrico. Do ovário sai o estilete que percorre o interior do tubo da corola até sair acima da superfície desta. Na sua extremidade contém o estigma. Os estames são em número de cinco e têm os filetes soldados com a base das pétalas. Nas suas extremidades encontram-se as anteras, que se apresentam sob a forma de bolsas alongadas, contendo os grãos de pólen, que são libertados por uma fenda longitudinal (CARDOSO, 1994).

A cultura de anteras é considerada uma ferramenta importante no melhoramento do cafeeiro, pois possibilita a obtenção rápida de linhas homozigotas e permite acesso a novas formas recombinantes cada antera de café possui aproximadamente de 2.000 à 40.000 micrósporos, os quais podem sofrer combinação durante a meiose (CARNEIRO, 1999). Teoricamente, através da cultura de anteras via microsporogênese, um número considerável de plantas haplóides podem ser produzidas, mas infelizmente o progresso nessa técnica tem sido lento.

¹ Bióloga, Universidade Federal de Uberlândia.

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

³ Mestranda, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia.

⁴ Mestranda, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

⁵ Professora, Doutora, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia.

⁶ Bióloga, Mestre em Fitotecnia.

⁷ Professor, Doutor, Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras.

Received: 07/11/02 Accept: 06/05/03

Segundo Mantell et al. (1994), são possíveis vários tipos de desenvolvimento do grão de pólen *in vitro*, sendo que tanto o núcleo generativo quanto o vegetativo podem se dividir continuamente originando um embrióide haplóide, ou ainda, a primeira mitose produziria dois núcleos semelhantes e estes se dividiriam repetidamente resultando na formação de embrióides haplóides. Após obtidas as plantas haplóides a partir da cultura de anteras, o próximo passo é restabelecer a diploidia das mesmas, levando-as à homozigose. Há vários métodos para duplicar os cromossomos de plantas haplóides, o mais usado é o tratamento com colchicina.

Um importante fator para o sucesso da cultura de anteras é conhecer para cada cultura o estágio ideal de desenvolvimento das mesmas a serem cultivadas, de maneira que este estágio contenha os micrósporos em uma fase de desenvolvimento de melhor resposta androgenética. Grandó e Moraes Fernandes (1993) sugerem que o potencial embriogênico do grão de pólen pode ser determinado tanto no período da meiose como no da pré-mitose do micrósporo, pois nestes dois momentos o mesmo ainda teria metabolicamente características esporofíticas, o que permite a diferenciação do grão de pólen em embrião e posterior formação de uma planta. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar, através da microsporogênese, a relação dos estádios de desenvolvimento dos micrósporos com as características morfológicas do botão floral, para identificar o estágio ideal do explante que deve ser utilizado para o cultivo *in vitro* de anteras de cafeeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Citologia da Universidade Federal de Uberlândia. Foram utilizados 3 cultivares de *Coffea arabica* L.: Mundo Novo LCP-379-19; Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44 e Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-99, pertencentes à área experimental da Universidade Federal de Uberlândia.

Aproximadamente 200 botões florais foram coletados no período de 8 à 9 horas da manhã, e em seguida, 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 (sublinhado), 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 da antera e as fases de desenvolvimento dos micrósporos. Para a mensuração do comprimento dos botões florais, bem como do comprimento de suas anteras foi utilizado um paquímetro. Procedeu-se a análise de 3 botões de cada classe para todas as cultivares.

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 acético. A contagem destes foi feita nas fases de tétrade, micrósporo recém liberado de tétrade, micrósporo com núcleo deslocado, com núcleo central e com camada de exina a partir de amostras de 100 micrósporos por lâmina. Estas foram preparadas com o auxílio de lupa e microscópio óptico sob aumento de 1.500 vezes. Já para a mensuração do diâmetro dos micrósporos foi utilizado uma câmera acoplada a um microscópio óptico e estes a um microcomputador (CELERON 300 MHZ), usando o software HLImage 97. Na análise estatística foi utilizado o teste de aderência (χ^2), os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1/2}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existe um sincronismo no desenvolvimento das anteras, do botão floral e estes, estão relacionados com os estádios de desenvolvimento dos micrósporos, ou seja, o diâmetro dos micrósporos evolui de acordo com o crescimento das anteras e do botão floral (Tabela 1). Nas tabelas 2, 3, 4 estão apresentadas as contagens de micrósporos nas diferentes fases de seu desenvolvimento, conforme as classes de comprimento do botão floral das cultivares Mundo Novo, Catuaí Vermelho 44 e Catuaí Vermelho 99, respectivamente.

Os botões florais contêm anteras que apresentam poros em diferentes estádios de desenvolvimento, porém para cada classe, apenas um estágio ocorre em maior porcentagem, como ilustram as tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 1. Média do diâmetro ($1/4m$) dos micrósporos nos seus diferentes estádios de desenvolvimento para a cultivar Catuaí vermelho 99, UFU/Uberlândia-MG, 2002.

Estádios de desenvolvimento dos micrósporos	Tétrade	Recém liberado de tétrade	Núcleo	Núcleo central deslocado	Com exina formada
Diâmetro	0,8	1,2	1,7	1,6	2,0

Tabela 2. 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 para a cultivar Mundo Novo, UFU/Uberlândia-MG, 2002.

Classe	Botão Floral Comprimento	Antera comprimento	Mundo Novo					Total
			Estágios dos micrósporos					
			Tétrade	Recém liberado de tétrade	Núcleo deslocado	Núcleo central *	Com exina formada	
1	1,50;1,72;2,00	1,2-----1,6	87	12	1	0	0	100
2	2,50;2,98;3,50	2,1-----3,3	52	48	0	0	0	100
3	4,00;4,48;5,00	3,1-----4,2	18	57	25	0	0	100
4	4,50;5,30;6,00	4,5-----4,9	2	5	54	39	0	100
5	6,50;7,20;8,00	4,3-----5,0	0	2	0	7	91	100

* Estádio ideal para a utilização da cultura de anteras
 $\chi^2 c = 911.279$ ($P < 0,05$)

Tabela 3. 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 para a cultivar Catuaí Vermelho 44, UFU/Uberlândia-MG, 2002.

Classe	Botão Floral Comprimento	Antera comprimento	Catuaí Vermelho 44					Total
			Estágios dos micrósporos					
			Tétrade	Recém liberado de tétrade	Núcleo deslocado	Núcleo central *	Com exina formada	
1	1,50;1,72;2,00	1,0-----1,5	65	25	3	7	0	100
2	2,50;2,98;3,50	1,0-----2,5	52	35	13	0	0	100
3	4,00;4,48;5,00	2,9-----4,0	20	11	68	2	0	100
4	4,50;5,30;6,00	3,5-----5,5	5	31	49	15	0	100
5	6,50;7,20;8,00	5,2-----6,0	2	17	32	2	47	100

* Estádio ideal para a utilização da cultura de anteras
 $\chi^2 c = 428.629$ ($P < 0,05$)

Tabela 4. 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 para a cultivar Catuaí Vermelho 99, UFU/Uberlândia-MG, 2002.

Classe	Botão Floral Comprimento	Antera comprimento	Catuaí Vermelho 99					Total
			Estágios dos micrósporos					
			Tétrade	Recém liberado de tétrade	Núcleo deslocado	Núcleo central *	Com exina formada	
1	1,50;1,72;2,00	1,0 ----- 1,6	46	33	15	6	0	100
2	2,50;2,98;3,50	1,5 ----- 2,6	31	55	14	0	0	100
3	4,00;4,48;5,00	3,0 ----- 3,4	16	24	55	5	0	100

* Estádio ideal para a utilização da cultura de anteras
 $\chi^2 c = 72.849$ ($P < 0,05$)

Os botões florais da classe 1 com comprimento de 1,50 a 2,00 mm apresentaram, para a cultivar Mundo Novo, anteras de 1,2 à 1,6 mm de comprimento. Nestas, a maioria dos micrósporos, cerca de 87%, encontravam-se envolvidos pela calose, formando a tetrade meiótica, e os 12% restantes, encontravam-se recém liberados da tetrade (Tabela 2). Já para a cultivar Catuaí Vermelho 44, as anteras dos botões florais pertencentes a classe 1 apresentaram comprimento de 1,0 a 1,5 mm. Estas apresentaram micrósporos predominantemente na fase de tetrade meiótica, cerca de 65%, e os demais distribuídos nos outros estádios de desenvolvimento (Tabela 3). Para a cultivar Catuaí Vermelho 99, tais anteras apresentaram comprimento de 1,0 à 1,6 mm. Nestas, a maioria dos micrósporos, cerca de 46%, encontravam-se na fase de tetrade meiótica (Tabela 4).

Para a cultivar Mundo Novo, as anteras dos botões florais pertencentes a classe 1, apresentaram micrósporos nas fases de tetrade, recém liberado da mesma e núcleo deslocado, diferentemente do que ocorreu para as cultivares Catuaí vermelho 44 e 99, considerando-se a mesma classe, onde foram encontrados micrósporos nas fase de tetrade, recém liberado de tetrade, micrósporo com núcleo deslocado ou vacuolado e micrósporo com núcleo central ou não vacuolado.

Para a cultivar Mundo Novo, na classe 2 que corresponde aos botões que variam de 2,50 à 3,50 mm de comprimento e anteras de 2,1 a 3,3 mm, houve presença de cerca de 52% dos micrósporos na fase de tetrade meiótica e cerca de 48% dos micrósporos recém liberados da tetrade (Tabela 2). Para a cultivar Catuaí Vermelho 44, as anteras da mesma classe, variaram de 1,0 a 2,5 mm de comprimento, sendo que estas apresentaram cerca de 52% dos micrósporos na fase de tetrade meiótica, e os demais distribuídos nos outros estádios de desenvolvimento (Tabela 3). Já para a cultivar Catuaí Vermelho 99, tais anteras mediam de 1,5 a 2,6 mm de comprimento, com predominância de micrósporos recém liberados de tetrade, cerca de 55% (Tabela 4).

Os micrósporos foram predominantemente encontrados na fase de tetrade meiótica, com cerca de 52% para as cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho 44. Estes dados apresentam divergências em relação aqueles observados por Andrade (1998), onde foi verificada a predominância de micrósporos na fase recém liberado de tetrade. Para a cultivar Mundo Novo, os micrósporos encontravam-se somente nas fases de tetrade meiótica e recém liberado de tetrade; já na cultivar Catuaí Vermelho 44, estes foram encontrados nas duas fases citadas acima; além da fase de micrósporo com núcleo deslocado ou vacuolado. Na cultivar Catuaí Vermelho 99, os micrósporos também foram encontrados nestas três fases, entretanto houve predominância na fase de recém liberado de tetrade.

Para a cultivar Catuaí Vermelho 44, na classe 3, as anteras variaram de 2,95 a 4,00 mm de comprimento, sendo

que os micrósporos encontravam-se de forma predominante, com cerca de 68% na fase de micrósporo com núcleo deslocado ou vacuolado (Tabela 3).

Para a cultivar Catuaí Vermelho 99, ainda na classe 3, o comprimento das anteras oscilou de 3,0 à 3,4 mm. Cerca de 55% dos micrósporos foram encontrados com núcleo deslocado, ou seja, na fase de micrósporo vacuolado (Tabela 4).

Para a cultivar Mundo Novo ainda na classe 3, foram encontrados micrósporos nas fases de tetrade, recém liberado de tetrade e micrósporo com núcleo deslocado. Para as cultivares Catuaí Vermelho 44 e 99, foram encontrados micrósporos nas fases de tetrade, recém liberado da tetrade, micrósporo com núcleo deslocado e micrósporo com núcleo central, sendo esta última em pequena percentagem. Os botões na classe 4, variaram de 4,50 à 6,00 mm de comprimento e apresentaram anteras de 4,5 a 4,9 mm de comprimento para a cultivar Mundo Novo (Tabela 2); 3,5 a 5,5 mm de comprimento para a cultivar Catuaí Vermelho 44 (Tabela 3) e para a cultivar Catuaí Vermelho 99 não foram encontrados botões florais de comprimentos pertencentes as classes 4 e 5; devido a inexistência de botões florais de tais comprimentos na área onde foram coletados (Tabela 4). Na cultivar Mundo Novo, considerando-se a classe 4, os micrósporos foram predominantemente encontrados, cerca de 54%, na fase com núcleo deslocado e cerca de 39% dos micrósporos em estágio com núcleo central (Tabela 2). Para a cultivar Catuaí Vermelho 44, foram encontrados cerca de 49% dos micrósporos no estágio com núcleo deslocado e 15% dos micrósporos em estágio com núcleo central (Tabela 3).

Na classe 5, os botões variaram entre 6,5 à 8,0 mm de comprimento e suas anteras de 4,3 à 5,0 mm de comprimento para a cultivar Mundo Novo (Tabela 2) e de 5,2 à 6,0 mm de comprimento para a cultivar Catuaí Vermelho 44 (Tabela 3). Nesta fase os micrósporos já se encontravam maduros, com a exina completamente formada, e corresponde à uma fase inadequada para a cultura de anteras, pois já se inicia a formação do grão – de – pólen (ANDRADE, 1998; ASCANIO; ARCIA, 1994). Cerca de 91% dos micrósporos estavam no estágio onde a exina já estava formada para a cultivar Mundo Novo. Já para a cultivar Catuaí Vermelho 44, cerca de 47% dos micrósporos encontravam-se nesta fase.

Segundo Andrade (1998), na classe 4 são encontrados os botões florais que devem ser utilizados para a cultura de anteras. 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 do café, prejudicando o processo de regeneração (ASCANIO ; ARCIA, 1994).

Em trabalhos com *Coffea arabica* 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.

Neuenschwander e Baumann (1995), em um trabalho com *Coffea arabica* L cultivares Catuaí e Catimor, demonstraram que o estágio crucial durante a microsporogênese, adequado para a androgênese *in vitro* comprovou ser o uninucleado, presente em botões florais medindo de 13 – 15 mm de comprimento, dois ou três dias antes da antese.

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 (ANDRADE, 1998).

CONCLUSÕES

O estágio ideal dos micrósporos que devem ser utilizados na cultura de anteras *in vitro* corresponde à fase onde estes ainda estejam de forma uninucleada central, e tais são encontrados em botões florais que variam de 4,5 à 6,0 mm de comprimento.

ABSTRACT: In anther culture, it is necessary to determine the ideal developmental stage of anthers, which should have microspores that show a better response to the androgenesis process. The relationship between microspore developmental stage and morphologic characteristics of coffee flower bud (*Coffea arabica* L.) was evaluated. Cultivars Mundo Novo, Catuaí Vermelho 44 and Catuaí Vermelho 99 were evaluated. Flower buds were collected and fixed. Subsequently, they were separated by length, in 5 categories of flower bud length and anther length, relating them with the phase of microspore development. Cultivar analysis demonstrated that there is a relationship between flower bud length, anther length with microspore development stage. The ideal stage is the central unique nucleus, which was found in flower buds from 4.5 to 6.0 mm of length.

UNITERMS: Microspores, Anthers, *Coffea arabica*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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 arabica* L. var. *Garnica*. **Café Cacao Thé**, v. 28, n. 2, p.75-79, 1994.

CARDOSO, A. P. S. **Café: cultura e tecnologia primária**. Local.: 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, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR, 1999. p. 55-60.

GRANDO, M. F.; MORAES FERNANDES, M. I. B. Proposta de um modelo para explicar a embriogênese do grão de pólen *in vitro*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1993, Brasília. **Anais...** Brasília: Redbio, 1993. v. 1.

GRANER, E.A.; GODOY JUNIOR, C. **Manual do cafeicultor**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1967. 320p.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1994. 333p.

NEUENSCHWANDER, B.; BAUMANN, T.W. Increased frequency of dividing microspores and improved maintenance of multicellular microspores of *Coffea arabica* in medium with coconut milk. **Plant cell, tissue organ cult.** Dordrecht, v. 40, n.01, p. 49-54, 1995.