

## EFEITOS DA DECAPITAÇÃO E DO TIBA UTILIZADOS PARA A INDUÇÃO DE BROTAÇÕES ORTOTRÓPICAS AXILARES SOBRE A ANATOMIA DO NÓ EM CAFEIROS CATUCAÍ<sup>1</sup>

Paula Cristina da Silva Angelo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Trabalho desenvolvido com suporte financeiro da FAPEMIG (APQ-00149/15) e do Consórcio de Pesquisa em Café

<sup>2</sup> Pesquisadora, D.Sc., Embrapa Café – Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), Londrina – PR, paula.angelo@embrapa.br

**RESUMO:** O cafeeiro produz ramos ortotrópicos e plagiotrópicos. Plantas clonadas *in vitro* e aclimatizadas podem ser, ainda em casa de vegetação, induzidas a emitir brotações ortotrópicas axilares com o objetivo de obter segmentos nodais (micro-estacas) úteis para a propagação vegetativa de genótipos selecionados de cafeeiro. A indução das brotações pode ser realizada decapitando-se os ramos ortotrópicos principais (eixos principais) e tratando o restante da planta com ácido tri-iodobenzoico (TIBA), um inibidor de translocação de auxinas. Plantas produzidas por micro-estacas oriundas de vitroplantas aclimatizadas de cafeeiro Catucaí foram, a partir dos seis meses depois do estabelecimento (enraizamento e retomada do crescimento), tratadas por decapitação e aspersão com solução de TIBA a 600 mg/L em etanol 50%. Duas aplicações desse tratamento com intervalo de dois meses entre aplicações induziram brotações ortotrópicas axilares na grande maioria das axilas foliares das plantas tratadas, que não produziram ramos plagiotrópicos. Por outro lado, plantas controle não tratadas, produziram apenas ramos plagiotrópicos, a partir do momento em que apresentaram seis a oito nós no eixo principal. Esses ramos plagiotrópicos das plantas controle emergiram de nós delgados à distância bem maior das axilas foliares do que o fizeram as brotações ortotrópicas axilares produzidas pelos nós espessos das plantas tratadas. A espessura, além de outros aspectos, tornou a anatomia dos nós de plantas tratadas e não tratadas bastante característica de cada condição. Os entrenós de plantas tratadas também apresentaram comprimento reduzido em relação a entrenós de plantas controle. Além disso, apenas em plantas tratadas foram observadas conexões vasculares entre a base das brotações ortotrópicas axilares e os feixes vasculares acessórios do pecíolo. Essa conexão entre feixes vasculares acessórios e ramos “supranumerários” assemelha-se ao que é observado em mutantes *max4* de *A. thaliana*, que super-expressam a proteína PIN1 de transporte polar de auxinas e apresentam ramificações com muito maior frequência do que plantas selvagens da mesma espécie. O caráter de pulso do tratamento para a indução de brotações ministrado às plantas jovens do cafeeiro ficou demonstrado porque nenhum resquício do efeito do TIBA foi observado em plantas oriundas de micro-estacas utilizadas como controle no presente trabalho, que apresentaram arquitetura e fisiologia do crescimento comuns, como as que estão registradas na literatura concernente ao cafeeiro.

**PALAVRAS-CHAVE:** reguladores de crescimento vegetal, dominância apical, propagação vegetativa, clonagem, *Coffea arabica*.

## EFFECTS OF TIBA AND DECAPITATION WHILE ORTHOTROPIC AXILLARY SPROUT INDUCERS ON CATUCAÍ COFFEE PLANT NODE ANATOMY

**ABSTRACT:** Coffee plants display plagiotropic and orthotropic branches. The induction of axillary orthotropic sprouts can be accomplished to obtain nodal segments useful for the vegetative propagation of coffee genotypes selected in reason of their agronomic potential. The induction can be attained decapitating the main orthotropic branches and treating the plants with tri-iodobenzoic acid (TIBA), an auxin transport inhibitor. Plants grown from micro-cuttings collected from Caucaí plants that were cloned *in vitro* through somatic embryogenesis were treated, from the 6<sup>th</sup> month ahead by decapitation and aspersion of 600 mg/L TIBA in 50% ethanol. Two applications of this treatment with an interval of two months between applications induced orthotropic axillary sprouts on most of the leaf axils in treated plants, which did not produce plagiotropic branches. On the other hand, control plants produced only plagiotropic branches, by the time they had six to eight nodes in the main orthotropic stem. These plagiotropic branches in control plants emerged from thin nodes at a greater distance from the leaf axils than did the orthotropic branches from the thick nodes of the treated plants, providing, besides other aspects, distinct node anatomy for treated and non-treated plants. The internodes of treated plants became shorter when compared to internodes in control plants as well. In addition, only in the treated plants, connections between the vascular bundles in the base of the axillary orthotropic branches and the accessory vascular bundles of the petioles were observed. This connection between the petiole accessory vascular bundles and “supernumerary” branches resembles the characteristics of *A. thaliana max4* mutants, which overexpress the auxin polar transporter PIN1 and display higher branching frequency than wild type plants. The pulse property of

the treatment to induce orthotropic sprouts became clear because no TIBA residual effect was observed in plants grown from micro-cuttings used as control plants in the present work, which displayed ordinary architecture and physiology of growth, reported for young coffee plants on the specialized literature.

**KEY WORDS:** plant growth regulators, apical dominance, vegetative propagation, cloning, *Coffea arabica*.

## INTRODUÇÃO

Algumas plantas lenhosas apresentam heterogeneidade e produzem ramos plagiotrópicos e também ramos ortotrópicos, segundo o hábito que adquirem durante o crescimento. Os ortotrópicos são eixos verticais, que produzem folhas e ramificam com o padrão de simetria radial, em todas as direções. Ramos plagiotrópicos crescem em posição horizontal ou decumbente e ramificam e produzem flores e folhas seguindo padrão de simetria bilateral, em um plano apenas (Barthélémy and Caraglio 2007).

O eixo principal do cafeeiro é um ramo ortotrópico e produz ramos plagiotrópicos por silepsis ou imediatamente, isso é, sem que a gema axilar original passe por períodos de inatividade. Por outro lado, ramos ortotrópicos axilares ou acessórios ou de reposição são produzidos por prolepsis, isto é, após uma pausa, durante a qual a diferenciação dos meristemas ou gemas originais fica inibida (Moens, 1968; de Reffye, 1981; Barthélémy e Caraglio, 2007).

Em trabalhos anteriores, tratamentos para induzir a produção de brotações ortotrópicas axilares por decapitação e aplicação de ácido tri-iodobenzoico (TIBA) foram testados em vitroplantas aclimatizadas. Os segmentos nodais das brotações ortotrópicas foram utilizados como micro-estacas, para aumentar o número de propágulos em cada clone gerado *in vitro* e contribuir para reduzir o custo final das mudas. As micro-estacas retomaram o crescimento da parte aérea e desenvolveram raízes noventa dias depois do plantio (Angelo et al., 2018a e b).

O objetivo do presente trabalho foi analisar os efeitos dos tratamentos para indução de brotações sobre os tecidos e células envolvidos na produção das brotações ortotrópicas axilares, utilizando plantas oriundas de micro-estacas, tratadas e não tratadas/controle a partir de seis meses de idade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de cafeeiro Catucaí 567 foram clonadas *in vitro* por embriogênese somática (Rezende et al., 2012). As plântulas transferidas para a casa de vegetação passaram por três meses de aclimatização e em seguida receberam pulsos sucessivos de indução para a produção de brotações ortotrópicas. As brotações foram utilizadas para o preparo de micro-estacas que enraizaram e retomaram o crescimento da parte aérea em noventa dias (Angelo et al., 2018a e b). Plantas oriundas das micro-estacas, aos seis meses depois do plantio, foram decapitadas e aspergidas com solução de TIBA a 600 mg/L em etanol a 50%. Plantas controle foram apenas aspergidas com etanol a 50%. Dois meses após esse primeiro pulso do tratamento para indução de brotações, as plantas foram novamente decapitadas e aspergidas com solução de TIBA a 600 mg/L. Três meses depois do segundo pulso de tratamento, as plantas foram coletadas, fotografadas, fixadas em álcool 70% e mantidas em refrigerador até a realização de cortes à mão-livre. Os cortes foram corados com fucsina a 0,1% em etanol 50% e montados em lâminas de vidro para exame ao microscópio de campo claro, no mesmo dia ou no dia imediatamente subsequente ao preparo das lâminas. As imagens foram preservadas como arquivos JPG.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nenhum ramo plagiotrópico foi produzido por plantas do grupo submetido ao tratamento para indução de brotações, mas essas plantas produziram pelo menos uma brotação por axila foliar em cada nó (Figuras 1a e c) e raramente duas (Figura 1b) ou até mesmo três brotações ortotrópicas.

Por outro lado, ramos ortotrópicos axilares não foram produzidos por plantas controle. Essas plantas passaram a produzir ramos plagiotrópicos (Figura 2a) quando atingiram seis a oito nós no ramo ortotrópico principal, o que está de acordo com dados previamente registrados para o desenvolvimento de plantas e mudas de cafeeiros Arabica (Moens, 1968; Arcila-Pulgarin et al., 2012).

O comprimento dos entrenós de plantas tratadas foi de 1 cm enquanto em plantas não tratadas o entrenó mediu aproximadamente 1,5 cm. A anatomia dos tecidos do nó em plantas tratadas e não tratadas diferiu também (Figuras 1 e 2). O espessamento dos nós em que ocorre o acúmulo de gemas axilares, causado pelo acúmulo de tecido similar à uma casca ("cork") foi prenunciado por Moens (1968) e observado em plantas tratadas induzidas a produção brotações no presente trabalho. Nessas plantas tratadas, houve diferenciação de gemas axilares em ramos ortotrópicos como informado acima, mas, simultaneamente foram observadas nas mesmas axilas foliares, mais de uma gema vegetativa, que apesar do estímulo para a diferenciação, ficaram retidas em estágios iniciais de desenvolvimento, sob ramos ortotrópicos axilares que se desenvolveram (Figura 1b, ga). Nos pequenos espaços restantes sob os ramos ortotrópicos

axilares desenvolvidos e os pecíolos das folhas, uma vez que nós e entrenós ficaram bastante encurtados nas plantas tratadas, essas gemas foram sempre observadas.

Por outro lado, uma série de gemas axilares, com arranjo e distribuição característicos, em diferentes estágios de desenvolvimento foi observada nas axilas foliares de plantas não tratadas (Figura 2b, ga e m). Essas últimas seriam as “buds of the series” que, segundo Moens (1968), estão presentes, pelo menos duas por axila foliar e algumas vezes três ou quatro, desde o terceiro nó basal e em nós superiores, do eixo principal dos cafeeiros jovens. As “buds of series” ficam em dormência e preparadas para produzir ramos ortotrópicos de reposição, por prolepsis, quando necessário. A gema axilar “head of the series” deve dar origem aos ramos plagiotrópicos em cada nó, por silepsis, o que certamente ocorreu na planta que foi dissecada para a aquisição das imagens na Figura 2a.

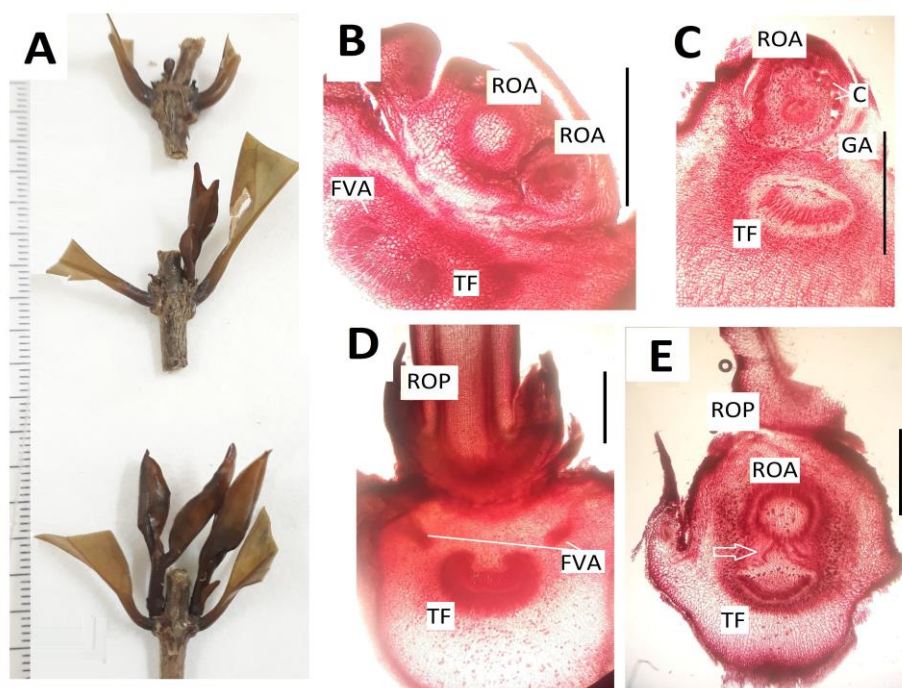


Fig. 1. Brotações ortotrópicas axilares induzidas por decaptação e tratamento com TIBA sobre plantas de *C. arabica* cv. Catucaí 567, oriundas de micro-estacas (plantas tratadas). A – em sentido descendente, brotações induzidas em nó apical, intermediário e basal, respectivamente, do ramo ortotrópico principal. B – corte longitudinal de nó, no plano da base de dois ramos ortotrópicos axilares diferenciados. Os feixes vasculares dos dois ramos ortotrópicos axilares são observados em secção transversal porque sua inserção no ortotrópico principal se dá quase que perpendicularmente ao eixo longitudinal da planta, na região do nó. Esses ramos crescem verticalmente, em paralelo ao ortotrópico principal, porque apresentam ângulos próximos a 90° em suas bases. C – corte longitudinal de nó no plano da base de um ramo ortotrópico axilar diferenciado e de uma gema axilar não ativada. D – corte longitudinal do ramo ortotrópico principal e do nó, em plano medial, para observação do traço foliar e dos feixes vasculares acessórios do pecíolo. E – corte longitudinal tangencial do ramo ortotrópico principal e do nó em um plano onde é possível observar a conexão (seta) entre os feixes vasculares da base de um ramo ortotrópico axilar com os feixes vasculares acessórios do pecíolo, que geralmente convergem com o feixe principal da folha em sua inserção na vasculatura do ramo principal. C = “colleters”, FVA = feixe vascular acessório, GA = gema axilar, ROA = ramos ortotrópico axilar (feixes vasculares em corte transversal), ROP = ramo ortotrópico principal, TF = traço foliar. Barras = 1 mm.

Uma outra diferença interessante entre plantas tratadas e não tratadas foi observada: delicadas fileiras de células vasculares de conexão entre os feixes vasculares acessórios do pecíolo (Figuras 1d-e, fva) e a base dos feixes vasculares de ramos ortotrópicos axilares já desenvolvidos (Figura 1, roa). Conexões entre feixes vasculares acessórios e ramificações “supranumerárias” foram observadas mais frequentemente em mutantes *max4* de *Arabidopsis thaliana* do

que em plantas selvagens daquela espécie. Esses mutantes super-expressam as proteínas PIN1, que são as principais integrantes do sistema PATS (“polar auxin transport system”), responsável pela translocação da auxina AIA (ácido indol-3-acético) no sentido basípeto. Os mutantes *max4* também são reconhecidos pela alta frequência de ramificações da parte aérea (Bennett et al., 2006). Diferentemente, as células do pró-câmbio (Figura 2b, pc), estrutura que antecede a organização dos feixes vasculares e surge concomitantemente com o início da diferenciação das gemas (Evert, 2006), são derivadas principalmente do feixe vascular principal do ramo ortotrópico, nas plantas não tratadas (Figura 1e x 2c). O comprimento encurtado dos nós e entrenós e a conexão direta entre feixes vasculares acessórios do pecíolo e ramos ortotrópicos axilares, indicam que os tratamentos com o TIBA, que é um inibidor de translocação de auxinas (Tanaka et al. 2006), além da decapitação que reduz a concentração de auxinas no ramo ortotrópico principal (Muller e Leysler, 2011), foram efetivos para perturbar o gradiente natural de auxinas no ramo ortotrópico principal e ativar algumas das gemas axilares nas plantas tratadas. Essas gemas axilares diferenciaram-se em ramos ortotrópicos axilares, ou de reposição.

Além disso, pode-se deduzir que cada aplicação do tratamento apresentou efeito de pulso, porque nos ramos ortotrópicos axilares produzidos e nas micro-estacas preparadas com segmentos nodais desses ramos não restou qualquer anomalia quanto à arquitetura dos nós, formação e diferenciação de gemas axilares ou dominância apical, o que pode ser observado durante as dissecções de plantas controle para preparo das lâminas. Esses resultados indicaram que, passado um curto período de tempo após a decapitação e a aplicação do TIBA, houve o restabelecimento do transporte polar de auxinas. Em ervilhas, esse período é de cerca de 10 horas (Tanaka et al., 2006). O restabelecimento do gradiente de auxinas e da dominância apical explica também a ocorrência de gemas ativadas em dormência nos nós de plantas tratadas, nas mesmas axilas foliares onde houve a diferenciação de ramos ortotrópicos axilares.

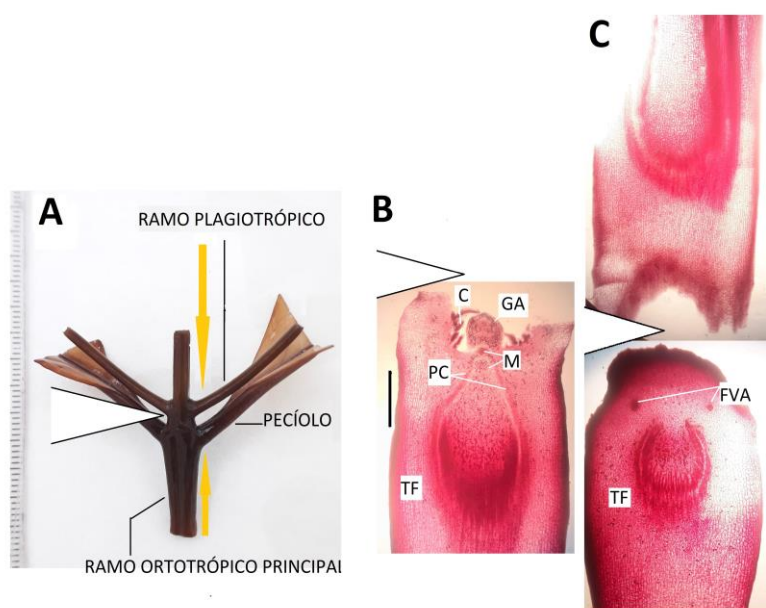


Fig. 2. Brotação plagiotrópica em planta de *C. arabica* cv. Catucaí 567, oriunda de micro-estaca, não tratada (planta controle). A – ramo plagiotrópico sobre axila foliar. O “recorte” branco à esquerda da imagem indica a região do nó em que as estruturas em B e C foram observadas. As setas amarelas indicam o plano longitudinal em que os cortes em B e C foram realizados. B – corte longitudinal do entrenó do ramo ortotrópico principal abaixo do “recorte”, com gema axilar ativada na região do nó. C – entrenós do ramo ortotrópico principal, acima e abaixo do “recorte”, respectivamente. No entrenó superior (acima do “recorte”), observa-se o feixe vascular do ramo ortotrópico principal em secção longitudinal. No entrenó inferior (abaixo do “recorte”), observa-se a inserção do feixe vascular da folha (traço foliar) e a inserção dos feixes vasculares acessórios do pecíolo no ramo principal. As secções dos entrenós superior e inferior separam-se durante a manipulação dos cortes, porque os tecidos de conexão apresentaram-se em camada muito fina na região do nó onde se alojava a gema axilar em diferenciação observada em A. C = “colleters”, FVA = feixe vascular acessório do pecíolo, GA = gema axilar em dormência, M = meristema axilar, PC = células do pró-câmbio, TF = traço foliar. Barras = 1 mm.

Nos experimentos realizados anteriormente, aplicando pulsos de tratamento para indução de brotações com intervalos de três a cinco meses entre dois pulsos consecutivos foi possível obter, em média, 7,5 plantas oriundas de micro-estacas

para cada vitroplanta aclimatizada por ano (Angelo et al. 2018a e b). O resultado obtido com a aplicação de dois pulsos no intervalo de dois meses, o que foi realizado no presente trabalho, indica que intervalos de tempo curtos entre pulsos podem induzir a diferenciação de pelo menos duas gemas axilares por nó e ativar todos os nós das plantas jovens tratadas, o que resultaria, para plantas com cinco nós funcionais, na estimativa de produção de 10 brotações a cada seis meses e em um número maior de micro-estacas produzidas por planta por ano. No entanto, a qualidade, o vigor e o tempo necessário para o desenvolvimento do grande número de brotações induzidas/gemas ativadas por esse último regime de aplicação do tratamento precisam ser melhor avaliadas. Aparentemente, o número de ramos axilares produzidos pareceu ser inversamente proporcional ao tempo necessário para que todos se desenvolvam.

## CONCLUSÃO

1 - Conclui-se que o tratamento com TIBA, um inibidor da translocação de auxinas, e a decapitação, que provoca redução no conteúdo de auxina circulante no ramo ortotrópico principal, induzem a ativação de gemas axilares do ramo principal de cafeeiros jovens oriundos de micro-estacas coletadas de vitroplantas, porque causam a inibição temporária da translocação basípeta de auxinas e da disponibilidade de auxinas nos segmentos nodais subapicais. Também foi possível inferir, por comparação entre observações do material vegetal utilizado para o presente trabalho e os resultados obtidos com trabalhos anteriores de produção e estabelecimento de micro-estacas de cafeeiro oriundas de vitroplantas, que intervalos de dois meses entre pulsos de indução de brotações foram mais efetivos para ativar as gemas axilares do que intervalos de três ou seis meses. E por fim pode-se considerar que o caráter do tratamento de indução de brotações utilizado é de um pulso no tempo, porque brotações/ramos ortotrópicos axilares e micro-estacas são isentos de efeitos do TIBA.

## AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG pelo financiamento do projeto APQ-00149/15 e ao Consórcio de Pesquisa Café/Embrapa Café.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELO, P. C. S., BALDIM, D. S., NEVES, P. F. C., LACERDA, J. R., SILVA, J. M. D., COUTO, I. E., BUENO, I. F., CARVALHO, C.H.S., BORATO, P.B. & PAIVA, A.C.R.S. Sprouting induction for micro-cutting on *in vitro* cloned Arabica coffee plants. *Coffee Science*, v. 13, n. 4, p. 489 - 497, 2018a.
- ANGELO, P.C.S., FERREIRA, I.B., REIS, A.M., BARTELEGA, L., CARVALHO, C.H.S., PAIVA, A.C.R.S. & MATIELLO, J.B. Use of TIBA and BAP on *Coffea arabica* clones to induce sprouting for micro-cutting. *Acta Hort.* ISHS, v. 1224, 2018b. DOI 10.17660/ActaHortic.2018.1224.10.
- ARCILA-PULGARÍN, J., BLEIHOLDER, H., MEIER, U. & WICKE, H. . Application of the extended BBCH scale for the description of the growth stages of coffee (*Coffea* spp.). *Annual Applied Biology*, v. 141, p. 19-27, 2002.
- BARTHELEMY, D. & CARAGLIO, Y. Plant Architecture: A Dynamic, Multilevel and Comprehensive Approach to Plant Form, Structure and Ontogeny. *Annals of Botany*, v. 99, p. 375-407, 2007.
- BENNETT, T., SIEBERER, T. & WILLETT, B. The *Arabidopsis* MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Current Biology*, v. 16, p. 553-563, 2006.
- De REFFYE, P. Modèle mathématique aléatoire et simulation de la croissance et de l'architecture du caféier Robusta. I. Etude du fonctionnement des méristèmes et de la croissance des axes végétatifs. *Café, Cacao, Thé*, v. 25, p. 83-104, 1981.
- EVERT, R F. Esau's Plant Anatomy. 3<sup>rd</sup> Edition. Wiley. 2006 pp.
- MOENS, P. Investigaciones morfológicas, ecológicas y fisiológicas sobre cafetos. *Turrialba*, p. 209-233, 1968.
- MÜLLER, D. & LEYSER, O. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of Botany*, v. 107, p. 1203-1212, 2011.
- REZENDE, J. C. D., CARVALHO, C.H.S., PAIVA, A.C.R.S., PASQUAL, M., & TEIXEIRA, J.B. Multiplication of embryogenic calli in *Coffea arabica* L. *Acta Scientiarum*, v. 34, p. 93-98, 2012.
- TANAKA, M., TAKEI, K., KOJIMA, M., SAKAKIBARA, H. & MORI, H. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal*, v. 45, p. 1028-1036, 2006.