

INFLUENCIA DE CINETINA E ÁCIDO INDOL BUTÍRICO NA INDUÇÃO DE CALOS EM ANTERAS DE CAFEIEIRO

José Sérgio DE ARAUJO¹, E-mail: jsaraujo@axtelecom.com.br; Moacir Pasqual

¹ Centro Superior de Ensino e Pesquisa de Machado, Machado, MG, Universidade Federal de Lavras, MG.

Resumo:

Objetivou-se com este trabalho avaliar diferentes concentrações de cinetina e ácido indol butírico na indução de calos em anteras de cafeeiro, oriundas de uma população segregante *F₂ C. arabica* L. O experimento foi instalado em condições assépticas, utilizando o meio de cultura "IC" (indução de calos). Os tratamentos constituíram de diferentes concentrações de cinetina (0, 2, 4 e 8 mg L⁻¹) e ácido indol butírico (0; 0,5; 1 e 2 mg L⁻¹) e com acréscimo de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D ao meio de cultura. Para controle da contaminação causada por microrganismos, foram acrescidos ao meio de cultura 10 mg L⁻¹ de benomyl e 50 mg.L⁻¹ de cloranfenicol. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 4 com 4 repetições e 30 anteras por repetição. A variável analisada foi massa fresca de calos e os dados submetidos à análise estatística. Os resultados permitiram concluir que a ação combinada entre uma auxina e citocinina é necessária para a indução de calos em anteras, sendo que combinações de cinetina e AIB atuam favoravelmente na indução de calogênese em anteras de *C. arabica* L.

Palavras-chave: calogênese, cafeeiro, reguladores de crescimento

INFLUENCE OF KINETIN AND INDOL BUTYRIC ACID IN THE CALLUS INDUCTION IN COFFEE ANTERS

Abstract:

This work was carried out to evaluate different concentrations of kinetin and Indol Butyric Acid in the induction of callus in coffee anthers from a *C. arabica* L. segregated population. The experiment was installed in asepsis conditions, using the medium IC (callus induction). The treatments had different concentrations of kinetin (0, 2, 4 and 8 mg.L⁻¹), indol butyric acid (0; 0,5; and 2 mg.L⁻¹) and 2 mg.L⁻¹ of 2,4-D in the medium. To control microorganisms contamination it was added to the medium 10 mg.L⁻¹ of Benomyl and 50 mg.L⁻¹ of chloramphenicol. The experimental design used here was randomized factorial scheme 4x4 with 4 repetitions and 30 anthers per repetition. The results allow us to conclude that the combination action between the auxin and cytokine is necessary to the induction of callogenesis in anthers, and that the combination of kinetin and AIB acts very much favorable in anthers callogenesis from *Coffea arabica* L.

Key-words: callogenesis, coffee, androgynies, growth regulator

Introdução

O meio de cultura é um dos fatores mais importantes para o sucesso da cultura de anteras e sua composição varia conforme a espécie. Os meios mais amplamente usados na cultura de anteras são o "MS" (Murashige e Skoog, 1962) e "W63" (White, 1963) e "N-H" (Nitsch e Nitsch, 1969) ou suas modificações com vários aditivos. Basicamente o meio é composto por sais minerais, sacarose, vitaminas, reguladores de crescimento e ágar (Moraes-Fernandes, 1990). Para estimular o desenvolvimento e a regeneração são utilizados reguladores de crescimento, tais como as auxinas, citocininas e giberelinas.

A embriogênese é estimulada pelos reguladores de crescimento, sendo que a presença destes, especialmente as auxinas e citocininas no meio de cultura, aumentam a divisão celular. Para se obter plantas di-haplóides, via antrogênese, é necessário adaptar a composição do meio de cultura ao açúcar ou aminoácidos junto com os reguladores de crescimento (Nitsch, 1981).

Em muitas espécies, por razões não conhecidas, a embriogênese direta é rara e as plantas têm que ser diferenciadas a partir de calos. Para indução destes, geralmente é necessário uma auxina, e para regeneração de plantas, um simples meio básico é suficiente, ou o uso de citocininas junto com baixas concentrações de auxinas (Maheshwari, Rashid e Tyage, 1982). Clapham (1973) mostrou que, em cereais, altas concentrações de auxinas como 2,4-D são necessárias, e que usualmente ANA, AIA e citocininas podem ajudar na indução de calos.

Alguns trabalhos mostraram grande potencial na formação de calos ou embriões, através da cultura de anteras, tais como: anteras de milho inoculadas e mantidas por uma semana a 14°C e depois passadas para luz contínua a 28°C (Moro, 1987); trigo inoculado em meio líquido contendo 2,4-D e 20g de sacarose, mantidos em condições de escuro, com temperaturas variando em 26 e 28°C (Zhou, Ball e Konzak, 1992); aspargo em meio "MS" contendo caseína hidrolisada, glutamina, ANA, BAP, 5% de sacarose e a 35°C; batata com as anteras inoculadas em meio gelatinizado contendo amido e batata a 3% com: BAP a 0,013 mM, AIA a 0,02 mM (Calleberg e Johansson, 1993).

Em trabalhos com cafeeiro, os meios mais utilizados são os básicos, indutores de calos, embriogênese e meio para desenvolvimento do embrião. O meio básico é o "MS" contendo 100 mg.L⁻¹ de inositol, 0,4 mg.L⁻¹ de tiamina, 30 mg.L⁻¹

de cisteína e 30 g de sacarose de consistência sólida. Para o meio indutor de calos utiliza-se o meio básico acrescido de 2 mg.L⁻¹ de AIB e 8 mg.L⁻¹ de 2-isopentil adenina (2ip).

Araújo et al. (2003 a) obtiveram respostas de calogênese, em anteras de *C. arabica* cv. Acaíá Cerrado, utilizando o meio básico “MS” acrescido de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D combinado com 2 mg L⁻¹ de cinetina. Resultados promissores também foram obtidos pelos mesmos autores, quando adicionaram ao meio “MS” 1 mg L⁻¹ de 2,4-D juntamente com 1 mg L⁻¹ AIB.

Entretanto, Araújo et al. (2003 b), verificando calogênese em *C. arabica* cv. Rubi, observaram interação significativa entre 2,4-D e cinetina para porcentagem de indução de calos e peso da matéria fresca, sendo que as melhores respostas foram obtidas quando empregaram 2 mg L⁻¹ de 2,4-D e 4 mg L⁻¹ de cinetina. Pelos resultados obtidos para calogênese em anteras de cafeeiro, independente do material genético, puderam concluir que é necessária uma auxina juntamente com uma citocinina, e ainda que ambos os materiais respondem de forma diferente às concentrações dos reguladores de crescimento.

Além dos reguladores de crescimento, compostos orgânicos são adicionados ao meio de cultura, para suprirem as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células. De todos os aditivos, a água de coco é o que tem sido mais utilizada para um grande número de espécies “in vitro”, não somente para estimular o crescimento do calo, mas também para aumentar a formação de embriões.

Objetivou-se com este trabalho avaliar diferentes concentrações de cinetina e ácido indol butírico na indução de calos em anteras de cafeeiro, oriundas de uma população segregante F₂ *C. arabica* L.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. Plantas matrizes, mantidas pelo setor de cafeicultura da UFLA e oriundas do cruzamento entre ‘Catucaí e Catuaí’, constituíram a população segregante F₂. Foram realizadas todas as recomendações agrônômicas necessárias para o controle fitossanitário nas plantas matrizes.

Botões florais desta população segregante F₂ de *C. arabica* L., com 4,5 mm a 6 mm de comprimento, foram coletados entre 8 e 9 horas da manhã e lavados em água corrente durante 5 minutos, mantidos por 1 minuto em álcool 70%, durante 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio 1,4% e, finalmente, em câmara de fluxo laminar, lavados três vezes com água destilada autoclavada. Em câmara de fluxo laminar, os experimentos foram instalados em placas de petri de poliestireno de 100 mm de diâmetro, previamente desinfetadas com formol, nas quais 20 ml do meio de cultura após ser autoclavado foram adicionados. As anteras foram extraídas dos botões ainda fechados, por meio de uma incisão em um dos seus lados. O experimento foi instalado em condições assépticas, utilizando meio de cultura “IC” proposto por Berthouly e Michaux-Ferriere (1996) suplementado com diferentes concentrações de cinetina (0, 2, 4 e 8 mg.L⁻¹), ácido indol butírico (0; 0,5; 1 e 2 mg.L⁻¹) e acrescido de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

Ao meio nutritivo sólido “IC”, foi acrescido de 600 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico e o pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes de ser autoclavado a 120°C, 1,2 atm, durante 20 minutos. Após a autoclavagem, quando o meio apresentava a temperatura de aproximadamente 40°C, acrescentaram-se 50 mg.L⁻¹ de cloranfenicol e 10 mg.L⁻¹ de benomyl.

As anteras de *C. arabica* foram inoculadas assepticamente em meio nutritivo e transferidas para estufa tipo BOD, com temperatura de 27 ± 1°C.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 4, com 4 repetições e 30 anteras por repetição.

Aos 90 dias após a instalação do experimento, analisou-se o peso da massa fresca dos calos.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com aplicação do teste de F a 5% de probabilidade e as médias analisadas por regressão polinomial.

Resultados e Discussão

O resumo da análise de variância está apresentado na Tabela 1. Pode-se observar que a interação entre os fatores foi significativa a 5% de probabilidade para a variável analisada.

TABELA 1. Resumo da análise de variância para a característica peso da massa fresca de calos (mg). UFLA, Lavras, MG, 2004.

Causas de variação	GL	Quadrado médio (massa fresca de calos em mg)
Cinetina	3	0,003637 ns
AIB	3	0,000384 ns
Cinetina*AIB	9	0,005338 *
Resíduo	48	0,002287

C.V.(%) 15,32
Média geral: 0,3121406

ns - não significativo

* significativo a 5 % de probabilidade, pelo teste de F.

O resultado da análise de variância para o desdobramento de cinetina dentro de cada concentração de AIB está apresentada na Tabela 2. Observa-se a significância nas concentrações de 0 e 1 mg L⁻¹ de AIB, sendo que para a concentração de 1 mg L⁻¹ foi significativo a 6% de probabilidade.

TABELA 2. Resumo da análise de variância do desdobramento de concentrações de cinetina dentro de cada concentração de AIB. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Causas de variação	Conc. de AIB mg L ⁻¹	GL	Quadrado médio
Cinetina	(0)	3	0,009794 **
Cinetina	(0,5)	3	0,002199 ns
Cinetina	(1,0)	3	0,006189 ¹ *
Cinetina	(2,0)	3	0,001471 ns
Resíduo		48	0,002287

ns - não significativo

¹* e ** significativo a 6 e 1% de probabilidade respectivamente pelo teste de F.

O resultado da análise de variância para o desdobramento de AIB dentro de cada concentração de cinetina está apresentado na Tabela 3. Observa-se que foram significativas apenas as concentrações de 0 e 8 mg L⁻¹ de cinetina.

Analisando-se a Figura 1 observa-se que a maior resposta no aumento da massa fresca de calos ocorreu até a concentração de 8 mg L⁻¹ de cinetina, sendo esta a concentração máxima utilizada no experimento, combinada com 1 mg L⁻¹ de AIB. Contudo, neste experimento empregaram-se 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, partindo-se do pressuposto que esta é a melhor concentração deste regulador de crescimento, conforme analisado por Maciel (2001), Palú (2002) e Palú et al. (2002). A presença desta auxina ajuda a explicar a pouca variação do peso dos calos, quando se utilizou 0 mg L⁻¹ de AIB, combinado com as diferentes concentrações de cinetina.

TABELA 3. Resumo da análise de variância do desdobramento de concentrações de AIB dentro de cada concentração de cinetina. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Causas de variação	Conc. de cinetina mg L ⁻¹	GL	Quadrado médio
AIB	(0)	3	0,006527 *
AIB	(2)	3	0,001162 ns
AIB	(4)	3	0,001476 ns
AIB	(8)	3	0,007234 *
Resíduo		48	0,002287

ns - não significativo

* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

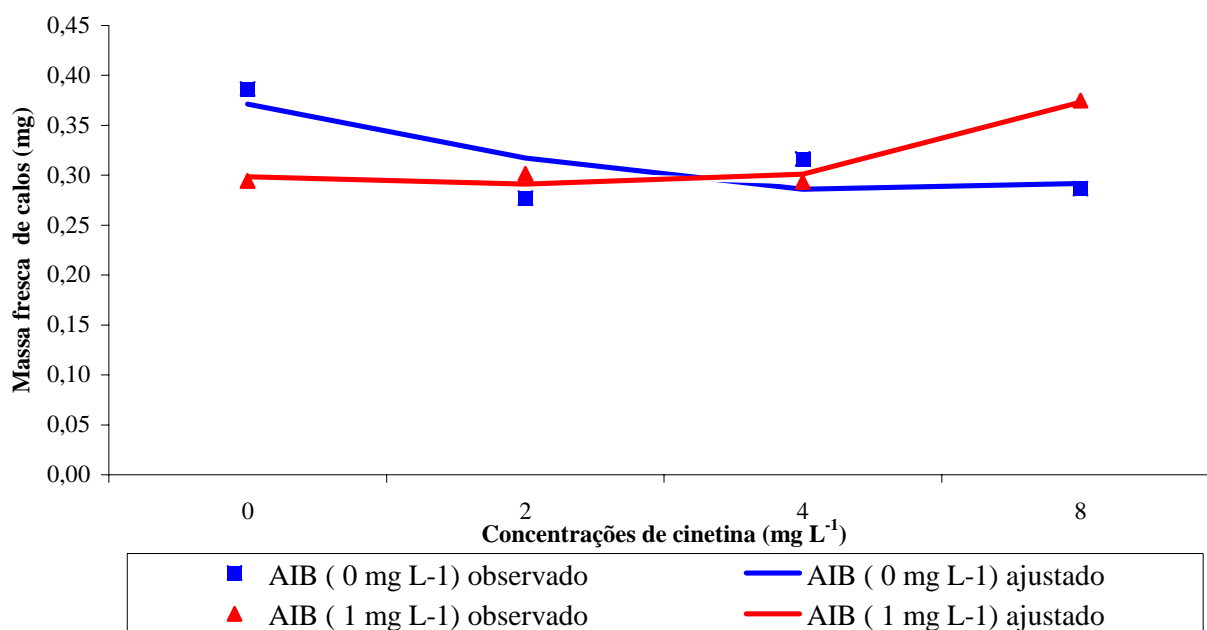


FIGURA 1. Massa fresca de calos em anteras de *C. arabica* L. população segregante F₂ em diferentes concentrações de cinetina e AIB. UFLA, Lavras - MG, 2004.

Observações semelhantes podem ser feitas na Figura 2, quando houve o desdobramento de concentrações de AIB dentro de cada concentração de cinetina. Cabe ressaltar que a melhor resposta foi obtida quando se combinou 1 mg L⁻¹ de AIB com 8 mg L⁻¹ de cinetina. Entretanto, pôde-se observar baixa variação no peso dos calos. Estes dados, discordam daqueles encontrados por Palú et al. (2002) e Araújo et al. (2003a), os quais verificaram que a maior porcentagem de calos ocorreu na presença de 2 mg L⁻¹ de AIB, na ausência de 2,4-D e com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D combinado com 1 mg L⁻¹ de AIB e com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, na ausência de AIB. Verificaram, ainda, que concentrações de AIB acima de 2 mg L⁻¹ promoveram uma diminuição no peso da massa fresca dos calos, principalmente quando combinadas com concentrações crescentes de 2,4-D.

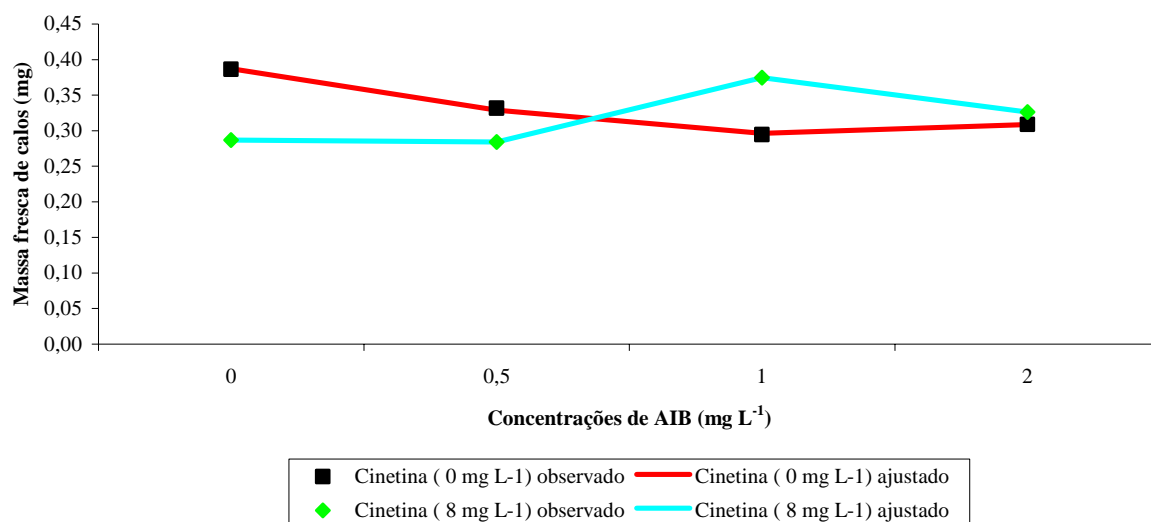


FIGURA 2. Massa fresca de calos em anteras de *C. arabica* L. população segregante F₂ em diferentes concentrações de AIB e cinetina. UFLA, Lavras – MG, 2004.

Conclusões

Combinações de citocinina e AIB atuam favoravelmente na indução de calogênese em anteras de *C. arabica* L. sendo que as melhores respostas foram obtidas quando adicionou 8 mg L⁻¹ de citocinina combinada com 1 mg L⁻¹ de AIB.

Referências Bibliográficas

ARAÚJO, J. S. de.; REZENDE, J. C. de.; PEREIRA, A. R.; RIBEIRO, B. de C.; PASQUAL, M. Calogênese em anteras de cafeeiro ‘Acaia cerrado’ utilizando 2,4-D, cinetina e AIB. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro. **Resumos...** Porto Seguro: EMBRAPA/CAFÉ, 2003a. p. 88.

ARAÚJO, J. S. de.; RIBEIRO, B. de C.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de PASQUAL, M. Calogênese em anteras de cafeeiro ‘Rubi’ utilizando 2,4-D e cinetina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Resumos...** UFLA/FAEPE, 2003b. p. 123.

ARAÚJO, J. S. de.; RIBEIRO, B. de C.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de PASQUAL, M. Indução de calogênese em anteras de cafeeiro, população segregante F₂ em função de 2,4-D e água de coco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Resumos...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2003c. p. 124.

ARAÚJO, J. S. de.; RIBEIRO, B. de C.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de PASQUAL, M. Indução “in vitro” de calogênese em anteras de cafeeiro utilizando diferentes níveis de 2,4-D e citocinina. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro. **Resumos....** Porto Seguro: EMBRAPA/CAFÉ, 2003d. p. 99.

ASCANIO, E. C. E.; ARCIA, M. A. M. Efecto del estado de desarrollo de las anteras y de um shock térmico sobre la androgênese en *Coffea arabica* L. var. *Garnica*. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v. 28, n. 2, p. 75-79, avr./juin. 1994.

- BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. M. High frequency somatic embryogenesis from *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 44, n. 2, p. 169-176, Feb. 1996.
- CALLEBERG, E. K.; JOHANSSON, L. B. The effect of starch and incubation temperature on anther culture of potato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 32, n. 1, p. 27-34, Jan. 1993.
- CLAPHAM, D. Haploid *Hordeum* plants from anthers *in vitro*. **Zeitung Pflanzenzüchtung**, Hamburg, v. 69, n. 2, p. 142-155, 1973.
- MACIEL, A. L. de R. **Embriogênese somática indireta em *Coffea arabica* L.** 2001. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, MG.
- MAHESHWARI, S. C.; RASHID, A.; TYAGI, A. K. Anther/pollen culture for production of haploids and their utility. **Rice News**, New Delhi, v. 41, n. 1, p. 2-9, 1982.
- 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, 1990. p. 311-332.
- MORO, J. R. Biotecnologia e melhoramento genético de milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. (Ed.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: FUNDAÇÃO CARGILL, 1987. v. 2, p. 343-372.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Haploids plants from pollen grains. **Science**, Washington, v. 163, n. 3862, p. 85-87, Jan. 1969.
- PALÚ, E. G. **Indução *in vitro* de calogênese em anteras e brotações em segmentos nodais de *Coffea arabica* L.** 2002. 47 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PALÚ, E. G.; REZENDE, J. C. de; PASQUAL, M.; ARAÚJO, J. S. de; PEREIRA, A. R.; ARAÚJO, J. S. de; LUZ, J. M. Q. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, cinetina e AIB na indução de calos em anteras de cafeeiro Acaíá Cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 28., 2002, Caxambu. **Resumos...** Caxambu: EMBRAPA/CAFÉ, 2002. p. 195.
- WHITE, P. R. **The cultivation of animal and plant cells**. 2. ed. Nova York: Ronald Press, 1963. 228 p.
- 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**, Dordrecht, v. 30, p. 77-83, 1992.