

INDUÇÃO DE CALOS EM ANTERAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) CULTIVADAS *IN VITRO*

MOACIR PASQUAL¹
ANNA LYGIA DE REZENDE MACIEL²
KARINA PEREIRA DE CAMPOS³
EDILENE CARVALHO SANTOS³
RONILDA JULIANA CORDEIRO DE CAMPOS³

RESUMO – Objetivou-se estabelecer uma metodologia para a regeneração de plantas dihaplóides pela cultura de anteras de *Coffea arabica* L. Botões florais com 4,5 - 5,5 cm, correspondendo a anteras com micrósporos na fase uninucleada, foram desinfestados em etanol 70% por 20 seg e hipoclorito de sódio 2% por 10 min. A assepsia das anteras, a utilização do meio MS acrescido de

PVP e de AgNO₃, ou de cinetina e ANA foram avaliadas. A melhor assepsia das anteras foi obtida em hipoclorito de sódio 2% durante 15 min; o uso do PVP na dosagem de 200 mg.L⁻¹ otimizou a formação de calos, bem como diminuiu a oxidação. A adição de AgNO₃, assim como de cinetina e ANA ao meio de cultura induziu à uma redução na formação de calos.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Coffea arabica*, cultura de anteras, androgênese.

CALLUS INDUCTION FROM ANTHHER CULTURES OF COFFEE (*Coffea arabica* L.)

ABSTRACT - The aim of the present work was to establish protocol for the regeneration of dihaploid plants from anther culture of *Coffea arabica* L. Flower buds with 4.5 – 5.5 cm, corresponding to anthers with uninucleate microspores, were desinfested for 20 sec in 70% ethanol and for 10 min in 2% sodium hypochlorite. Different methods of anthers desinfestation were tested, followed by inoculation in MS medium containing

different concentrations of PVP and AgNO₃, or different concentrations of kinetin and NAA. Favourable anther desinfestation was obtained in 2% sodium hypochlorite solution for 15 min; the MS medium containing 200 mg.L⁻¹ PVP optimized the formation of callus and reduced oxidation; addition of AgNO₃, as well as of kinetin and NAA, induced a reduction on the callus formation.

INDEX TERMS: *Coffea arabica*, anther culture, androgenesis.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o principal produtor mundial de café, e as instituições brasileiras de pesquisa vêm desenvolvendo novas cultivares com características de produção associadas à resistência a pragas e doenças e tolerância às condições de estresse.

Por se tratar de uma 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. A cultura de anteras é considerada uma ferramenta importante, pois possibilita a obtenção de linhas homozigóticas em uma única etapa (Andrade, 1998), acelerando drasticamente o processo de obtenção de novas cultivares.

Apoio Financeiro de Consórcio Brasileiro do Café e FAPEMIG.

1. Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Titular do Departamento de Agricultura, UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS (UFLA), Cx. P. 37 – 37200.000 Lavras, MG. E-mail: mpasqual@ufla.br, Bolsista CNPq.

2. Engenheiro Agrônomo, mestranda/UFLA, bolsista CAPES.

3. Acadêmicas de Agronomia/UFLA.

As plantas haplóides, por possuírem apenas um alelo em cada loco gênico, reproduzem rapidamente homozigotos pela duplicação induzida de seus cromossomos, normalmente na presença de colchicina. Esse processo substitui as muitas gerações de autofecundação necessárias à obtenção de linhagens (Peters *et al.*, 1998). Utilizando-se cultura de anteras, o número de plantas necessário para a obtenção de uma nova cultivar é sensivelmente menor, ou seja, é igual à raiz quadrada do número usado em programas convencionais de melhoramento (Dufour *et al.*, 1995). No caso de *Coffea arabica* $2n = 4x = 44$, que é uma planta tetraplóide, a cultura de anteras propiciará a obtenção de plantas dihaplóides com características similares às das plantas haplóides (Raghuramulu & Prakash, 1996).

Para a realização da cultura de anteras, é necessária primeiramente a desinfestação do material vegetal (Trabulsi, 1991). Os principais compostos utilizados são etanol e cloro, e o modo de ação do etanol consiste na rápida desnaturação protéica e dissolução de lipídios, tendo como desvantagem o fato de ser pouco ativo contra esporos fúngicos. O cloro inativa enzimas e age como oxidante, tem efeito sobre bactérias e sua desvantagem é o odor irritante e também sua baixa atividade contra esporos.

A polivinilpirrolidona (PVP) tem ação antioxidante e vem sendo utilizada para prevenir a oxidação de compostos fenólicos, um dos principais problemas em culturas de espécies lenhosas (George & Sherrington, 1988).

O etileno é um gás regulador de crescimento produzido em todas as células das plantas superiores que ocorrem nas regiões meristemáticas. Ele produz efeitos fisiológicos importantes e de grande aplicação comercial, mas no cultivo *in vitro*, a produção e ação desse gás nos recipientes de cultivo afetam diretamente a resposta do explante, sendo ela positiva ou negativa. Por causa da ação negativa, há vários estudos sobre os inibidores do etileno, como, por exemplo o nitrato de prata (AgNO_3) que, a 5 mg.L^{-1} , favoreceu a indução de embriões em anteras de *Capsicum annuum* L. (Luz, 1995). Segundo Auboiron *et al.* (1990), a liberação de etileno e CO_2 ocorre durante o desenvolvimento de calos de seringueira nos primeiros 20 dias de cultivo. A partir de 30 dias, os calos entram em degeneração, o que é acompanhado por mais liberação de etileno. O nitrato de prata, inibidor do etileno, foi o mais efetivo na obtenção de embriões somáticos de seringueira. Em pimenta, Nervo *et al.* (1994) verificaram que a presença de 5 mg.L^{-1} de AgNO_3 , no

meio de indução, teve efeito favorável na androgênese, provavelmente pelo fato de o AgNO_3 bloquear a ação inibitória do etileno endógeno dos embriões, permitindo um maior desenvolvimento dos mesmos.

Objetivou-se com este trabalho estabelecer uma metodologia eficiente para regeneração de plantas dihaplóides por meio da cultura de anteras de *Coffea arabica* L.

MATERIAL E MÉTODOS

Botões florais de *Coffea arabica* L. cv. Rubi foram coletados no campo com 4,5 a 5,5 cm, correspondendo a anteras contendo micrósporos uninucleados (Andrade *et al.*, 1999). Durante a coleta, no período entre 8 e 9 horas, os botões florais foram mantidos em água destilada com 1 g.L^{-1} de PVP e, posteriormente, fora da água em refrigerador durante 24 horas. Os botões florais foram submetidos à desinfestação com etanol 70% por 20 segundos e hipoclorito de sódio 2% por 10 minutos. Em câmara de fluxo laminar, foram lavados por 4 vezes em água destilada e autoclavada contendo 1 g.L^{-1} de PVP. As anteras foram extraídas sob estereomicroscópio por meio de uma incisão em um dos lados dos botões e removidas com auxílio de pinça e bisturi previamente esterilizados.

1. Assepsia das anteras

As anteras foram desinfestadas em etanol 70% durante 5, 10, 20 e 40 segundos e hipoclorito de sódio 2% durante 5, 10 15 e 20 minutos. As anteras foram lavadas 2 vezes em água destilada autoclavada contendo 1 g.L^{-1} de PVP e, em seguida, inoculadas em meio de cultura em placas de petri de $9,0 \times 1,5 \text{ cm}$.

O meio basal foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, 30 mg.L^{-1} de cisteína, 100 mg.L^{-1} de inositol, $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de tiamina e 1 mg.L^{-1} de cinetina. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121°C , 1,2 atm por 20 minutos).

Os explantes foram mantidos por 8 dias no escuro e, posteriormente, transferidos para sala de crescimento com temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $16 \mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4×4 , com 4 repetições e parcelas compostas por 20 anteras. As avaliações foram realizadas após 30 dias pela contagem do número de explantes contaminados por bactérias e fungos.

2. PVP e nitrato de prata

Para avaliar os efeitos do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP), utilizou-se meio basal MS contendo 1 mg.L⁻¹ de ANA, 1 mg.L⁻¹ de cinetina, 50 mg.L⁻¹ de inositol e 1 mg.L⁻¹ de tiamina, adicionando-se PVP em diferentes concentrações: 0, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹. Paralelamente, na ausência de PVP, adicionou-se ao meio de cultura AgNO₃ em diferentes concentrações: 0, 5, 10, 15 e 20 mg.L⁻¹. O meio de cultura teve seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121°C, 1,2 atm por 20 minutos) e foi distribuído em placas de Petri de 9,0 x 1,5 cm.

Os explantes foram mantidos por 8 dias no escuro e, posteriormente, transferidos para sala de crescimento, com temperatura de 26 ± 1°C, sob fotoperíodo de 16 horas, com intensidade luminosa de 16 µM.m⁻².s⁻¹.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, contendo 4 tratamentos para PVP e 5 para AgNO₃, 4 repetições e parcelas compostas por 20 anteras. As avaliações foram realizadas após 30 dias pela porcentagem de anteras oxidadas e porcentagem de calos formados nas anteras. Foi usado o teste estatístico de regressão polinomial a 5%, sendo os dados analisados em porcentagem transformados para arco sen \sqrt{x} .

3. Reguladores de crescimento

As anteras foram inoculadas em meio basal MS com 50 mg.L⁻¹ de inositol e 1 mg.L⁻¹ de tiamina. O meio teve o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem

(121°C, 1,2 atm por 20 minutos) e foi acrescido de diferentes combinações de cinetina (0, 1, 2 e 4 mg.L⁻¹) e ANA (0, 1, 2 e 4 mg.L⁻¹). As avaliações de cultura foram idênticas ao descrito no item anterior. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 X 4, com 4 repetições e parcelas compostas por 20 anteras. O experimento foi avaliado 30 dias após a instalação, pela porcentagem de calos formados a partir dos explantes. Para efeito de análise estatística, os dados foram transformados para arco sen \sqrt{x} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Assepsia das anteras

O tempo ótimo de imersão em hipoclorito de sódio 2% para desinfestação de anteras é de 15 minutos (Figura 1). Embora a porcentagem de contaminação observada seja alta (50%), os resultados obtidos são inferiores àqueles relatados por outros pesquisadores (Dufour *et al.*, 1995).

2. Efeito do antioxidante PVP

Pela Figura 2 verifica-se que a adição de PVP ao meio de cultura aumentou significativamente a indução de calos em anteras de cafeeiro, atingindo um máximo de 67% na dosagem de 200 mg.L⁻¹. Dosagens superiores a 200 mg.L⁻¹ passaram a apresentar efeito prejudicial.

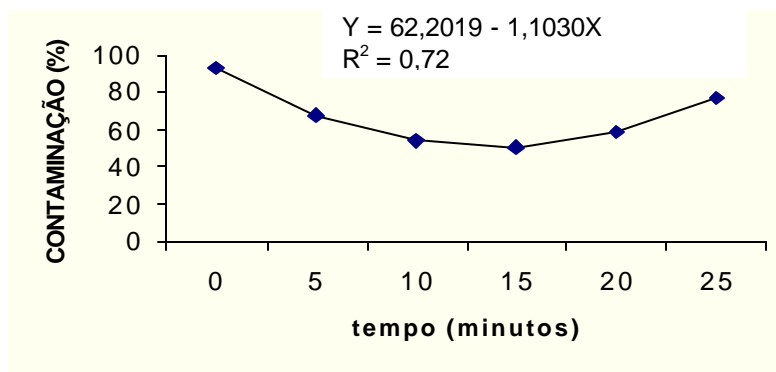


FIGURA 1 – Contaminação causada por bactérias em anteras de cafeeiro em diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio.

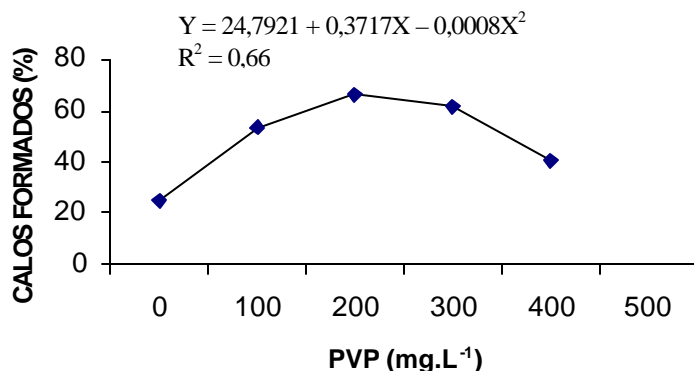


FIGURA 2 – Calos formados a partir de anteras de cafeeiros em diferentes concentrações de PVP (mg.L⁻¹).

Na Figura 3 constata-se que a melhor dosagem de PVP para a formação de calos (200 mg.L⁻¹) proporcionou também a menor oxidação às anteras. Resultados similares foram obtidos por Rezende (1996), trabalhando com fitoreguladores, um antioxidante e defensivos na propagação vegetativa *in vivo* e *in vitro* de *Coffea arabica* L. Por outro lado, Cocozza *et al.* (1995) verificaram a ineficiência de antioxidantes, entre eles o PVP, na propagação *in vitro* de *Dioscorea alata*.

Em alguns dos calos notou-se formação de embriões, que após transferência para meio de regeneração, poderão dar origem a plântulas.

3. Efeito do nitrato de prata

As diferentes concentrações de nitrato de prata influenciaram negativamente a porcentagem de calos

formados a partir de anteras de cafeeiro (Figura 4), resultado antagônico aos observados por Auboiron *et al.* (1990) em calos de seringueira, e por Luz (1995) na indução de embriões a partir da cultura de anteras de pimentão.

4. Efeito dos reguladores de crescimento ANA e cinetina

A adição de cinetina e ANA ao meio de cultura teve influência negativa na formação de calos a partir de anteras de cafeeiro (Figura 5). A medida que aumenta a dosagem dos reguladores de crescimento decresce a formação de calos.

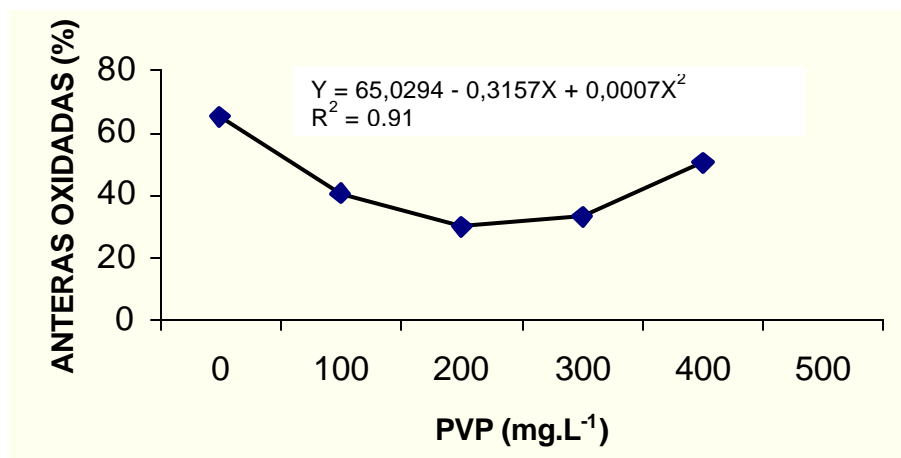


FIGURA 3 – Oxidação de anteras de cafeeiros em diferentes concentrações de PVP (mg.L^{-1}).

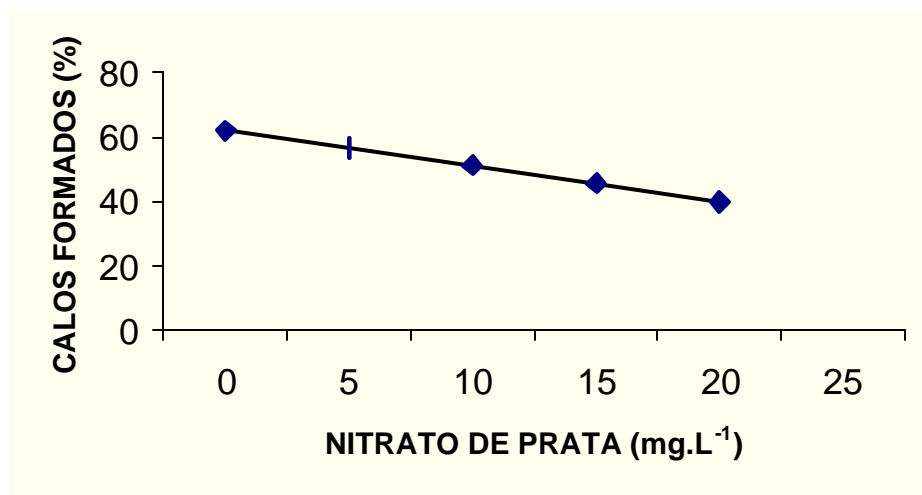


FIGURA 4 – Porcentagem de calos formados em anteras de cafeeiros em diferentes concentrações de nitrato de prata.

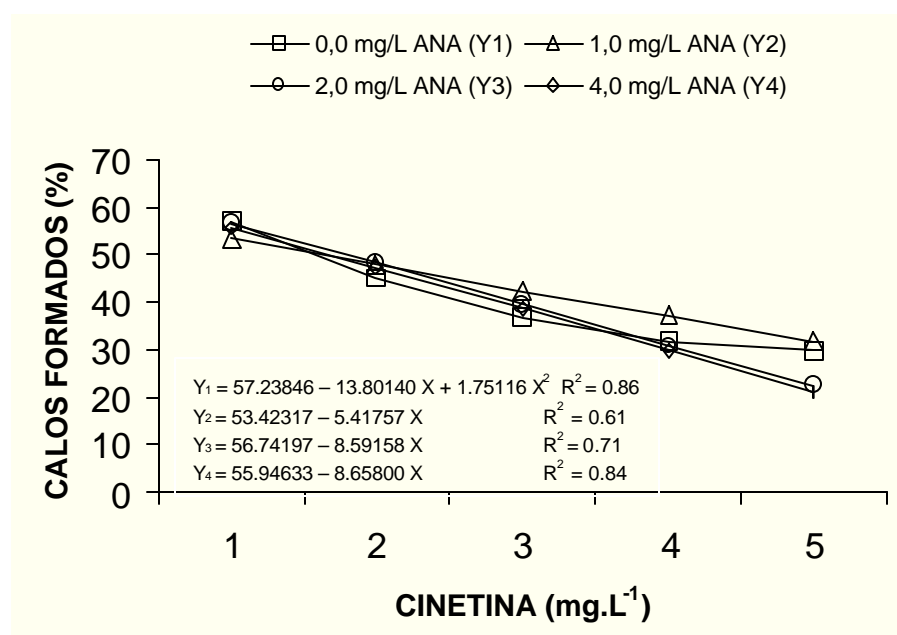


FIGURA 5 – Percentagem de calos formados em anteras de cafeeiros em diferentes concentrações de cinetina e ANA.

CONCLUSÕES

- a) A melhor assepsia das anteras de cafeeiro é obtida em hipoclorito de sódio 2%, durante 15 minutos;
- b) o uso do antioxidante PVP no meio de cultura na dosagem de 200 mg.L⁻¹ otimiza a formação de calos, bem como diminui a oxidação dos explantes;
- c) A porcentagem de formação de calos diminui com a adição de nitrato de prata e é inibida com adição dos reguladores de crescimento cinetina e ANA em cultivo *in vitro* de anteras de cafeeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, L.M.C.O. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1998. 84 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ANDRADE, L.M.C.O.; PEREIRA, A.B.; SANTOS, E.; PASQUAL, M. Determinação do tamanho do botão floral para a cultura de anteras do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina, PR. **Anais...** Londrina: UFPR/IAPAR, 1999. p.66.
- AUBOIRON, E.; CARRON, M.P.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Influence of atmospheric gases, particularly ethylene, on somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.21, p.31-37, 1990.
- COCOZZA, F.B.M.; KASECKER-JUNIOR, J.; PINTO, J.E.B.P. Efeito de antioxidante na micropropagação *in vitro* de cará (*Dioscorea alata*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1995. p.194.
- DUFOUR, M.; JIMENEZ, M.; DURIS, D. Haplomethods: factors controlling callus obtention on *Coffea arabica* anthers. In: COLLOQUE DE L'ASIC, 16., 1995, Kyoto. **Anais...** Kyoto, 1995. p.765-770.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. England: Eastem Press, 1988. v.2, p.117-131.
- LUZ, J.M.Q. **Embriogênese somática in vitro em anteras de pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1995. 115 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for growth and tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- NERVO, G.; CARANNANTE, G.; AZZIMONTI, M.T.; ROTINO, G.L. Use of anther culture method in pepper breeding: factors affecting plantlets production. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 8., 1994, Florence, Italy. **Annals...** Firenze: IAPTC, 1994. v.8, p.92.
- PETERS, J.A.; BOBROWSKI, V.L.; ROSINHA, G.M.S. Produção de haplóides e duplohaplóides. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 569-612.
- RAGHURAMULU, Y.; PRAKASH, N.S. Haploidy in coffee. In: JAIN, S. M.; SOPORY, S. K.; VEILLEUX, R. E. (Ed.). **In vitro haploid production in higher plants**. Netherlands: Kluwer Academic, 1996. v.3, p.349-363.
- REZENDE, R.A. **Efeitos de fitorreguladores, antioxidante e defensivos na propagação vegetativa in vivo e in vitro de *Coffea arabica* L.** 1996. 51 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991. 386 p. (Biomédica: textos para universidade).