

# CALOGÊNESE *IN VITRO* EM ANTERAS DE *Coffea arabica* L.<sup>1</sup>

## *In vitro* callogenesis in anthers of *Coffea arabica* L.

Ednamar Gabriela Palú<sup>2</sup>, Adriano Bortolotti da Silva<sup>3</sup>, Moacir Pasqual<sup>4</sup>

### RESUMO

O café é um dos mais importantes produtos do mercado internacional; porém, o tempo gasto e os recursos despendidos são fatores limitantes para o melhoramento do cafeeiro por meio de métodos convencionais. Contudo, a cultura de anteras surge como uma alternativa viável e de curto prazo para solução desses problemas. Com o presente trabalho, objetivou-se a produção de dihaplóides com a cultura de anteras do cafeeiro (androgênese indireta), buscando um protocolo para a fase de indução de calos. Para tanto, foi efetuada a assepsia dos botões florais e das anteras, que, em seguida, foram inoculadas em meio IC e mantidas no escuro por 8 semanas, sob temperatura de 25°C ± 1. Para induzir a calogênese em anteras da cv. Acaiaí Cerrado, foram testadas as concentrações de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg.L<sup>-1</sup>) x cinetina (0, 2, 4 e 8 mg.L<sup>-1</sup>) e 2,4-D (0; 0,5; 1 e 2 mg.L<sup>-1</sup>) x AIB (0; 0,5; 1 e 2 mg.L<sup>-1</sup>) mais 2iP (2 mg.L<sup>-1</sup>) e, para a cv. Rubi, as concentrações de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg.L<sup>-1</sup>) x cinetina (0, 2, 4 e 8 mg.L<sup>-1</sup>). Foi observado que a maior porcentagem de indução de calogênese em anteras na cv. Acaiaí Cerrado ocorre com as combinações de 2,4-D (2 mg.L<sup>-1</sup>) + cinetina (1,9 mg.L<sup>-1</sup>) e 2,4-D (0,86 mg.L<sup>-1</sup>) + AIB (1 mg.L<sup>-1</sup>) + 2iP (2 mg.L<sup>-1</sup>); para cv. Rubi, a combinação de 2,4-D (1,9 mg.L<sup>-1</sup>) e cinetina (4 mg.L<sup>-1</sup>).

**Termos para indexação:** Cultura de anteras, cafeeiro, calogênese.

### ABSTRACT

The coffee is one of the most important products of the international market, however the time and money wasted in breeding programs are limiting factors for its improvement. However, the anther culture appears as a viable alternative for a short time period solution for this problem. This work aimed to obtain the double haploids production from anther cultures of the coffee plant (indirect androgenesis) aiming to optimize a protocol calluse induction. For this purpose, aseptic conditions of the flower buds and anthers were accomplished, followed by inoculation in IC medium and the tissue were kept for eight weeks at 25°C ± 1 in the dark. To induce callogenesis in anthers of the 'Acaiaí Cerrado' there were tested 2,4-D (0, 1, 2 and 4 mg.L<sup>-1</sup>) x kinetin (0, 2, 4 and 8 mg.L<sup>-1</sup>) and 2,4-D (0; 0,5; 1 and 2mg.L<sup>-1</sup>) x AIB (0; 0,5; 1 and 2mg.L<sup>-1</sup>) plus 2 iP (2 mg.L<sup>-1</sup>) concentrations and for the 'Rubi' 2,4-D (0, 1, 2 and 4 mg.L<sup>-1</sup>) x kinetin (0, 2, 4 and 8 mg.L<sup>-1</sup>) concentrations. It was observed that the highest percentage of callogenesis induction in anthers of the 'Acaiaí Cerrado' was provenient from 2,4-D (2 mg.L<sup>-1</sup>) + kinetin (1,9 mg.L<sup>-1</sup>) and 2,4-D (0,86 mg.L<sup>-1</sup>) + AIB (1 mg.L<sup>-1</sup>) + 2iP (2mg.L<sup>-1</sup>) combinations for 'Rubi' 2,4-D (1,9 mg.L<sup>-1</sup>) and kinetin (4 mg.L<sup>-1</sup>).

**Index terms:** Anther culture, coffee, callogenesis.

(Recebido para publicação em 18 de agosto de 2003 e aprovado em 27 de outubro de 2003)

## INTRODUÇÃO

O café é um dos mais importantes produtos do mercado internacional, representando importante fonte de renda para milhões de pessoas em mais de 50 países, nas regiões tropicais da América Latina, África e Ásia. Além do aspecto econômico, a cafeicultura apresenta relevante importância social como atividade geradora de empregos e fixadora de mão-de-obra no campo.

Do ponto de vista comercial, somente duas espécies do gênero *Coffea* são cultivadas extensivamente: *Coffea arabica* L. (Arábica) e *Coffea canephora*

Pierre (Robusta), sendo o tipo arábica responsável por cerca de 75% dos plantios comerciais de cafeeiro do mundo (CARNEIRO, 1999). No Brasil, cerca de 82% da produção são provenientes de lavouras formadas com cultivares da espécie *Coffea arabica* e 18%, de cultivares da espécie *Coffea canephora* (MELO et al., 1998).

Os programas de melhoramento genético do cafeeiro no Brasil têm alcançado sucesso na obtenção de cultivares produtivas, elevando em cerca de 200% a produtividade das atuais cultivares em relação à primeira variedade plantada no Brasil. Porém, o tempo gasto e os recursos despendidos são fatores limitantes para o

1. Parte da dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras/UFLA – Caixa Postal 37 – 37200-000 – Lavras, MG, pelo primeiro autor, como um dos requisitos do curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal. Apoio Financeiro CAPES.

2. Engenheira Agrônoma, Mestre do Departamento de Agricultura/UFLA.

3. Engenheiro Agrônomo, Mestre, Bolsista/FAPEMIG – Departamento de Agricultura.

4. Orientador, Doutor, Departamento de Agricultura/UFLA.

melhoramento do cafeeiro por métodos convencionais, uma vez que, nos últimos anos, surgiram novos problemas, como doenças, pragas, nematóides e maior exigência em qualidade pelo mercado consumidor (MENDES, 1997). Contudo, a multiplicação vegetativa *in vitro* surge como uma alternativa viável e de curto prazo para a solução desses problemas.

Entre as técnicas de cultivo *in vitro*, a cultura de anteras apresenta-se como uma ferramenta de grande utilidade em programas de melhoramento, principalmente por reduzir o tempo necessário para a obtenção de linhagens homocigóticas, substituindo as inúmeras gerações de autofecundação necessárias no processo convencional e permitir o estudo de mutações recessivas, visto que indivíduos haplóides e duplo-haplóides, por se constituírem de apenas um complemento cromossômico, não apresentam problemas de dominância e recessividade (BAJAJ, 1984; FERNANDES, 1987).

As plantas haplóides podem ser obtidas de duas maneiras, por androgênese direta ou por androgênese indireta. Na androgênese direta, o micrósporo comporta-se como um zigoto e passa por vários estádios de embriogênese, semelhante ao que ocorre *in vivo*. Os embriões, principalmente no estágio globular, são liberados, os cotilédones desenvolvem-se e as plantas emergem das anteras de 4 a 8 semanas. Na androgênese indireta, os micrósporos, em vez de passarem pela embriogênese, dividem-se algumas vezes, formando calos, os quais emergem através da parede da antera. Normalmente a regeneração de plantas via calo se dá com maior frequência (PETERS et al., 1998).

No presente trabalho, objetivou-se buscar um protocolo para fase de indução de calos em anteras de cafeeiro, para que por meio da androgênese indireta, possa ocorrer a produção de plantas dihaplóides de *Coffea arabica* L.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras/UFLA, Lavras – MG.

Os experimentos foram instalados em condições assépticas, utilizando câmara de fluxo laminar horizontal e tiveram o pH do meio de cultura ajustado para  $5,6 \pm 1$ , antes de ser autoclavado a  $120^\circ\text{C}$ , 1,2 atm, durante 20 minutos.

Foram utilizados botões florais de *Coffea arabica* com cerca de 5 anos de idade, cultivares Rubi e Acaia

Cerrado, mantidas no campo experimental do Setor de Cafeicultura da UFLA.

Os botões florais foram coletados com 4,5 mm a 6 mm de comprimento, entre 8 e 9 horas da manhã (REZENDE et al., 2000). A assepsia dos botões florais foi realizada na seguinte seqüência: (1°) lavagem em água corrente durante 5 minutos; (2°) imersão por 1 minuto em álcool 70%; (3°) imersão por 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio 1,4%; (4°) imersão durante mais 20 minutos em solução de 25% PPM<sup>TM</sup> [5-Chloro-2-methyl-3-(2H)-isothiazolone + 2-Methyl-3-(2H)-isothiazolone] (v/v) (DIGONZELLI et al., 2001); por último, em câmara de fluxo laminar, três lavagens com água destilada autoclavada.

As anteras, com o auxílio de lupa estereoscópica, foram extraídas dos botões ainda fechados, por meio de uma incisão em um dos seus lados, e reunidas em placa de Petri esterilizada contendo solução de 600 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico. As anteras danificadas foram descartadas e, nas restantes, foi realizada assepsia com solução de 25% (v/v) do anti-contaminante PPM<sup>TM</sup> por 2 minutos; em seguida, foram inoculadas 30 anteras por placa de Petri contendo o meio "IC" (BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE, 1996), considerando-se cada placa uma parcela e 4 placas por tratamento. Após a inoculação das anteras, as placas foram tampadas, vedadas com parafilme e mantidas no escuro por 8 semanas, sob temperatura de 25°C.

Os experimentos foram conduzidos em placas de Petri de poliestireno (100 mm de diâmetro), previamente desinfetadas em formol em que o meio foi adicionado, na câmara de fluxo laminar, após ser autoclavado.

Para induzir a calogênese em anteras da cv. Acaia Cerrado, foram testadas as concentrações de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg.L<sup>-1</sup>) x cinetina (0, 2, 4 e 8 mg.L<sup>-1</sup>) e 2,4-D (0; 0,5; 1 e 2 mg.L<sup>-1</sup>) x AIB (0; 0,5; 1 e 2 mg.L<sup>-1</sup>) mais 2iP (2 mg.L<sup>-1</sup>) e, para a cv. Rubi, as concentrações de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg.L<sup>-1</sup>) x cinetina (0, 2, 4 e 8 mg.L<sup>-1</sup>).

A variável observada foi porcentagem de indução de calos (IC %) e massa de calos frescos (MCF) e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições e 30 anteras por parcela.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa para 2,4-D e cinetina na indução de calos para a cultivar Acaia Cerrado, enquanto, para massa de calos frescos, somente houve efeito significativo dos fatores isolados.

O aumento da produção de calos ocorreu até a concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, ponto a partir do qual o regulador de crescimento passou a inibir a produção de calos, provavelmente devido a um efeito fitotóxico promovido por concentrações superiores a essa. A melhor resposta para indução de calos foi promovida pela interação entre 2,4-D (2 mg.L<sup>-1</sup>) e cinetina (1,9 mg.L<sup>-1</sup>) (Figura 1).

Observou-se acréscimo na massa de calos frescos com adição de até 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, com subsequente decréscimo com o aumento das concentrações (Figura 2).

O mesmo comportamento foi observado até 3,86 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina, em que também ocorreu um decréscimo na massa de calos frescos com o aumento das concentrações de cinetina adicionadas ao meio de cultura (Figura 3). Esse decréscimo na massa de calos frescos ocorreu, provavelmente, devido a um efeito fitotóxico que esses reguladores de crescimento passam a exercer acima dessas concentrações.

Houve interação significativa para 2,4-D e AIB para porcentagem de indução de calos e massa de calos frescos em anteras da cultivar Acaia Cerrado.

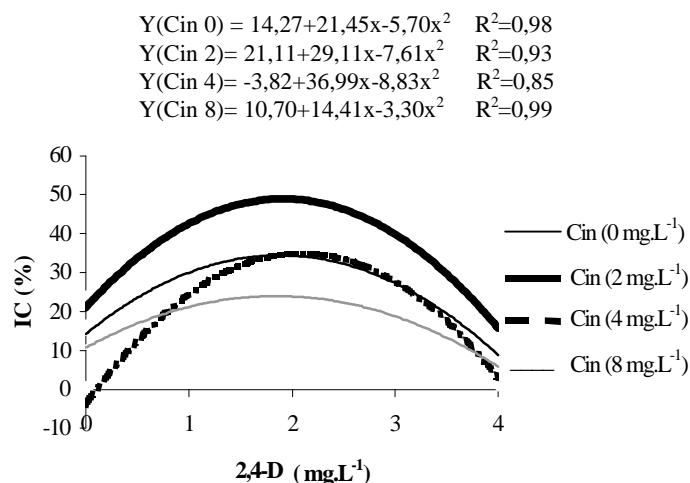
As maiores porcentagens de indução de calos ocorreram com 2 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, na ausência de 2,4-D, com 0,86 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D combinado com a concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup> de AIB e com 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, na

ausência de AIB (Figura 4). Assim, observou-se que, a partir de determinadas concentrações, as auxinas passam a inibir a indução de calos em anteras da cultivar Acaia Cerrado, provavelmente por causa de um efeito fitotóxico causado por essas.

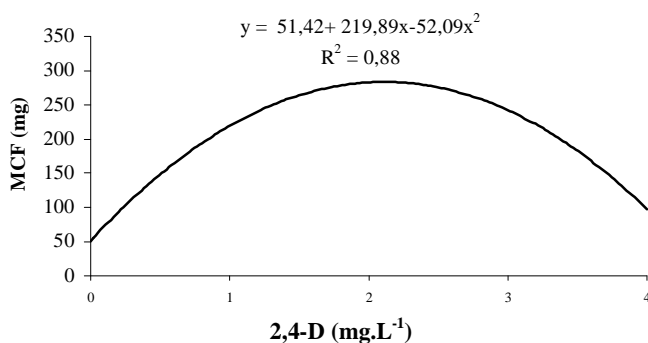
Maior massa de calos frescos foi observada na interação entre 0,92 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, alcançando massa de aproximadamente 240 mg (Figura 5). Houve aumento na massa de calos frescos na ausência de AIB à medida que aumentaram as concentrações crescentes de 2,4-D. Entretanto, para a concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, verifica-se uma diminuição na massa de calos frescos quando é combinada com concentrações crescentes de 2,4-D.

Observou-se a interação significativa entre as concentrações de 2,4-D e cinetina para a porcentagem de indução de calos e massa de calos frescos na cultivar Rubi. A combinação entre 1,9 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 4 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina promoveu a maior indução de calos, com valor aproximado de 40% de indução (Figura 6). Posteriormente, verificou-se que, após um máximo, a concentração do regulador de crescimento passou a inibir a indução de calos.

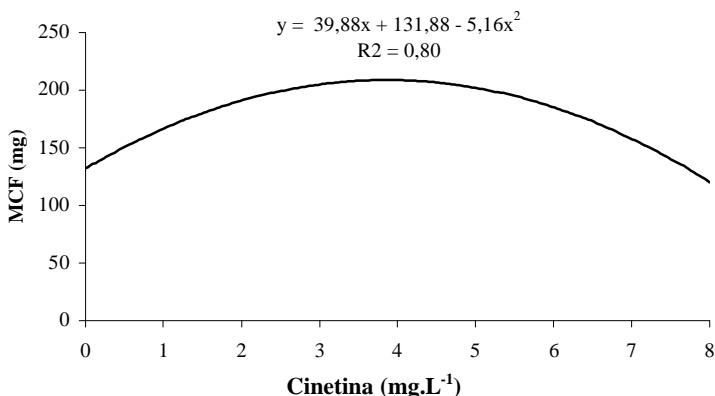
O maior acréscimo na massa de calos frescos foi observado quando se utilizou a concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina combinada com 1,31 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D (Figura 7), após o qual houve um decréscimo.



**FIGURA 1** – Porcentagem de indução de calos (IC) em anteras de *Coffea arabica* cv. Acaia Cerrado, em diferentes concentrações de cinetina e 2,4-D. UFLA, Lavras-MG.



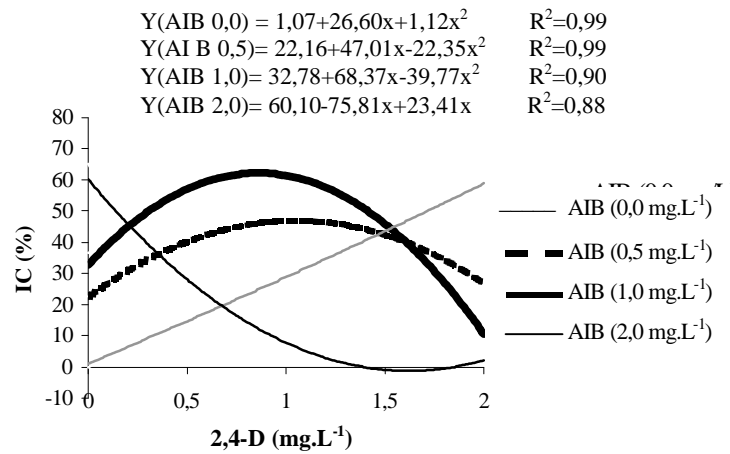
**FIGURA 2** – Massa de calos frescos (MCF) oriundos de anteras de *Coffea arabica* cv. Acaia Cerrado, em diferentes concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras-MG.



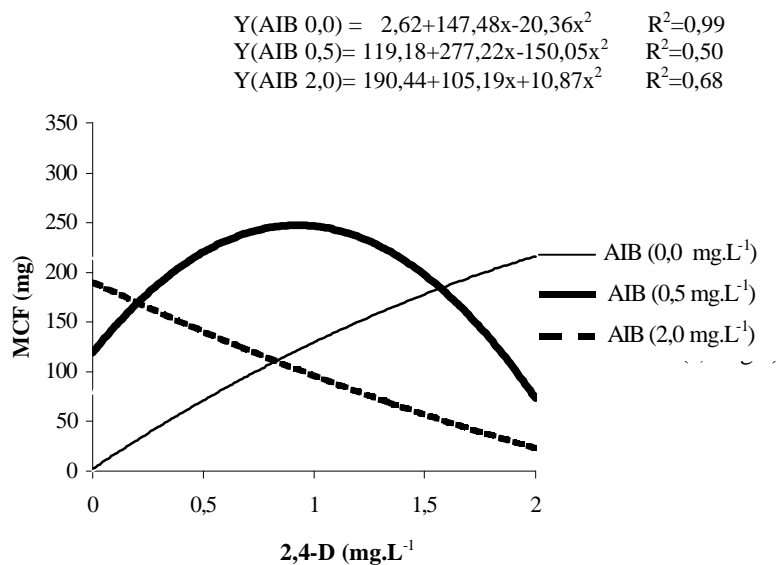
**FIGURA 3** – Massa de calos frescos (MCF) oriundos de anteras de *Coffea arabica* cv. Acaia Cerrado, em diferentes concentrações de cinetina. UFLA, Lavras-MG.

Pelos resultados obtidos para indução de calos em anteras de cafeeiro, observa-se que é necessária uma auxina juntamente com citocininas, concordando com Maheshawari et al. (1982). O efeito da combinação entre auxina e citocinina para essa característica em *Coffea arabica* também foi observada por Rezende et al. (2000), os quais verificaram que o regulador de crescimento ANA combinado com cinetina não é eficiente na indução de calos em anteras dessa espécie. Observa-se, com isso, a necessidade de um estudo específico com cada regulador de crescimento, além da observação de cada um e de suas concentrações em diferentes genótipos e até mesmo dentro da mesma espécie (SILVA

FILHO, 1989). Diferentes genótipos podem ter diferentes condições ótimas de crescimento, pré-tratamento, composição de meio de cultura e condições físicas de cultura (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 1995). Nakamura et al. (1997), trabalhando com anteras de sorgo, conseguiram induzir 39,4% de calos utilizando concentrações de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina + 3 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Em amoreira, Jain et al. (1996) relatam a indução de calos com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Valentim Neto et al. (2001) observaram que a maior porcentagem de indução de calos em anteras de Cajueiro-Anão (*Anacardium occidentale* L.) ocorre com concentrações de 2,2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1,12 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

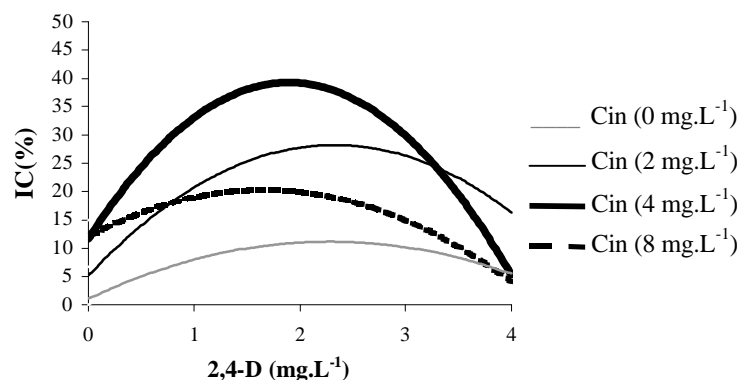


**FIGURA 4** – Porcentagem de indução de calos (IC) em anteras de *Coffea arabica* cv. Acaiá Cerrado, em diferentes concentrações de AIB e 2,4-D. UFLA, Lavras-MG.



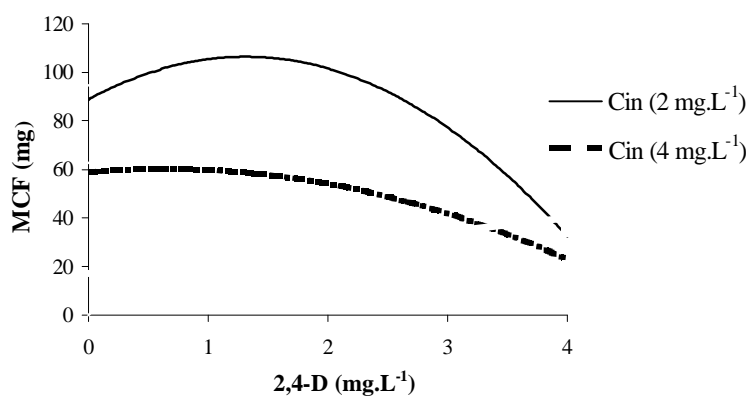
**FIGURA 5** – Massa de calos frescos (MCF) oriundos de anteras de *Coffea arabica* cv. Acaiá Cerrado, em diferentes concentrações de AIB e 2,4-D. UFLA, Lavras-MG.

$$\begin{aligned}
 Y(\text{Cin } 0) &= 1,07 + 8,85x - 1,94x^2 & R^2 &= 0,79 \\
 Y(\text{Cin } 2) &= 5,14 + 19,85x - 4,26x^2 & R^2 &= 0,91 \\
 Y(\text{Cin } 4) &= 11,66 + 29,09x - 7,67x^2 & R^2 &= 0,85 \\
 Y(\text{Cin } 8) &= 12,05 + 9,89x - 2,97x^2 & R^2 &= 0,98
 \end{aligned}$$



**FIGURA 6** – Porcentagem de indução de calos em anteras de *Coffea arabica* cv. Rubi em diferentes concentrações de cinetina e 2,4-D. UFLA, Lavras-MG.

$$\begin{aligned}
 Y(\text{Cin } 2) &= 88,78 + 26,86x - 10,23x^2 & R^2 &= 0,88 \\
 Y(\text{Cin } 4) &= 58,90 + 4,12x - 3,27x^2 & R^2 &= 0,83
 \end{aligned}$$



**FIGURA 7** – Massa de calos frescos (MCF) oriundos de anteras de *Coffea arabica* cv. Rubi, em diferentes concentrações de cinetina e 2,4-D. UFLA, Lavras-MG.

### CONCLUSÕES

Para cultivar Acaia Cerrado, as combinações mais eficientes entre os reguladores de crescimento são 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D x 1,9 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina e 0,86 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D x

1 mg.L<sup>-1</sup> de AIB e, para cultivar Rubi, 1,9 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D x 4 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Portanto, as duas cultivares de *Coffea arabica* respondem de forma diferente às concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D, AIB e cinetina, na indução de calos em anteras.

Tanto para cultivar Acaia Cerrado como para a Rubi a produção de calos foi suficiente para passar para próxima etapa na obtenção de dihaplóides.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAJAJ, Y. P. S. In vitro production of haploids. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. U.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Mcmillan, 1984. v. 1, cap. 6, p. 229.
- 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.
- CARNEIRO, M. F. Advances in coffee biotechnology. **AgBiotechNet**, [S.l.], v. 1, p. 12-13, 1999. Disponível em: <<http://www.agbiotecnet.com>>. Acesso em: 12 jan. 2002.
- DIGONZELLI, P.; DÍAZ, L.; BELLONE, S. C.; LATIFE, J.; SOSA, S. Diferentes dosis de PPM para controlar la contaminación bacteriana y sus efectos sobre el crecimiento *in vitro* de caña de azúcar en la etapa de multiplicación. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL, 2001, Goiânia, GO. **Resumos...** Goiânia: REDBIO, 2001. p. 90.
- FERNANDES, M. I. B. de M. Perspectivas da biotecnologia para o melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 881-896, 1987.
- JAIN, A. K.; SARKAR, A.; DATTA, R. K. Induction of haploid callus and embryogenesis in "in vitro" cultured anthers of mulberry (*Morus indica*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 44, n. 2, p. 143-147, Feb. 1996.
- MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; AVOZANI, O. A.; PETERS, J. A.; VIÉGAS, J.; TERRES, A. L.; ABIBI, F. R. Colchicine effect on chromosome duplication of irrigated rice haploids obtained from anther culture. In: ENCUESTRO LATINO AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., 1995, Puerto Iguazu. **Resumos...** Puerto Iguazu: REDBIO, 1995. p. 76.
- MAHESHAWARI, C.; GUHA, S.; PATEL, K. R.; LOH, W. H. T. Embryogenesis and plant regeneration in anther culture. **Euphytica**, Wageningen, v. 103, n. 1, p. 1-7, 1982.
- MELO, B.; BATHOLO, G. F.; MENDES, A. N. G. Café: variedades e cultivares. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 193, p. 92-96, 1998.
- MENDES, A. N. G. Economia cafeeira: o agrobusiness. In: MENDES, A. N. G.; RUBENS, J. G. (Eds.). **Café-cultura empresarial: produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. v. 1, p. 1-59.
- NAKAMURA, S.; NGUYEN, D. C.; YOSHIDA, T. Study on callus induction from anther and inflorescence culture of Sorghum. **Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University**, Fukuoka, v. 42, n. 1, p. 1-9, 1997.
- PETERS, J. A.; BOBROWSKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. Produção de haplóides e duplo haplóides. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSCO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. [S.l.: s.n.], 1998. v. 2, p. 569-612.
- REZENDE, D. F.; MACIEL, A. L. R.; PASQUAL, M.; PALÚ, E. G.; ALVES, J. M. C.; PEREIRA, A. R. Callus induction from *in vitro* culture of coffee (*Coffea arabica* L.) anthers. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL, 2001, Goiânia, GO. **Resumos...** Goiânia: REDBIO, 2000. p. 66.
- SILVA FILHO, M. C. **Efeito de cultivares e meios de cultura na indução de calos de anteras de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1989. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1989.
- VALENTIM NETO, P. A.; BUENO, D. M.; CORREIA, D.; FIALHO, J. S. Meios de cultura para o crescimento *in vitro* de anteras de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.). In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL, 2001, Goiânia, GO. **Resumos...** Goiânia: REDBIO, 2001. p. 73.