

USO DO BAP E 2iP COMBINADOS COM AIB, 2,4-D e ANA NA INDUÇÃO DE CALOS EM FOLHAS DE *Coffea arabica* L.

Lílian de Sousa RIBEIRO – UFLA, liliansr@ufla.br; Anna Lygia de Rezende MACIEL - UFLA; André Barretto PEREIRA – CEPLAC; Moacir PASQUAL – UFLA; Adriano Bortolotti da SILVA – UFLA; Fábio Pereira DIAS – UFLA.

RESUMO: As técnicas de cultivo *in vitro*, apresentam um coeficiente de multiplicação muito mais alto do que as técnicas convencionais, independente dos fatores de estação e clima, pois podem ser utilizadas durante todo o ano, permitindo ainda um crescimento contínuo, quebra da dormência e possibilitando brotação em cascata. Por outro lado, existe toda uma gama de explantes (folhas, pedúnculos florais) que podem ser utilizados em condições *in vitro*, contribuindo para aumentar o coeficiente de multiplicação. Objetivou-se verificar o efeito de AIB, 2,4-D e ANA, associadas com BAP e 2iP na indução de calos em folhas de cafeeiro. Utilizaram-se como explantes, folhas de *Coffea arabica* L. cv. Acaíá Cerrado, oriundas de plântulas cultivadas *in vitro*, durante seis meses. O meio nutritivo utilizado foi MS, fixando-se BAP ($1,1 \text{ mg.L}^{-1}$) em um experimento e 2iP ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) em outro. Os tratamentos foram constituídos de AIB (0,0; 0,1; 0,5 e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), 2,4-D (0,0; 1,1; 5,5 e $11,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e ANA (0,00; 0,001; 0,01 e $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$). O delineamento foi inteiramente casualizado, com 4 repetições e 4 folhas por parcela. O uso da combinação AIB x BAP e 2,4-D x 2iP proporcionaram os melhores resultados na indução e tamanho de calos.

PALAVRAS-CHAVE: Embriogênese somática, propagação vegetativa, regulador de crescimento.

ABSTRACT: *In vitro* culture techniques presents a higher multiplication coefficient than conventional techniques, independent of related to season and climate factors, since may be used throughout the year, permitting yet a continuous growth with a large number of sprouts and break dormancy. On the other hand, there is all kinds of explants (leaves, floral peduncle) which are used on *in vitro* conditions, helping out to increase the multiplication coefficient. The objective of this work was to verify the effect of IBA, 2,4-D and NAA, associated to BAP and 2iP on *Coffea arabica* L. leaves callus induction. It was used as explants, leaves of *Coffea arabica* L. cv. Acaíá Cerrado, originated from seedlings during six months *in vitro* cultivated. The nutritive medium used was MS, fixing the BAP (1.1 mg.L^{-1}) in one experiment and 2iP in other. The treatments performed were IBA (0.0; 0.1; 0.5 and 1.0 mg.L^{-1}), 2,4-D (0.0; 1.1; 5.5 and 11.0 mg.L^{-1}) and NAA (0.00; 0.001; 0.01 and 0.02 mg.L^{-1}). It was used a completely randomized design with 4 replications and 4 leaves per plot. The use of combinations IBA x BAP and 2,4-D x 2iP presented the best results on callus induction and development.

KEY – WORDS: Somatic embryogenesis, vegetative propagation, growth regulator.

INTRODUÇÃO

A multiplicação assexual pelos métodos tradicionais deve se restringir à utilização de fragmentos de ramos ortotrópicos, onde o número é sempre limitado para um clone recentemente selecionado (Dublin, 1984). As dificuldades de multiplicação podem ser minimizadas através da propagação vegetativa *in vitro*. A técnica apresenta grande potencial para multiplicação rápida e seleção de material precoce. A técnica de cultura de tecidos vegetais *in vitro* possibilita a propagação em larga escala e em curto espaço de tempo, sendo importante para as culturas de ciclo longo. Esta técnica é vantajosa quando aplicada em variedades melhoradas que possuam pouco material e necessitam ser propagadas rápida e massivamente, com a finalidade de produção de mudas (Andrade, 1998).

Os primeiros trabalhos conhecidos de embriogênese somática no gênero *Coffea* foram obtidos por Starisky (1970), que obteve rápida proliferação de calos nas espécies *C. arabica* e embriões e plântulas com explantes de *Coffea canephora*. Desde então se tem desenvolvido pesquisas sobre a embriogênese somática no gênero *Coffea* em diversos países (Hermann e Hass, 1975; Sondahl, 1978; Lanaud, 1981; Pierson et al., 1983; Sreenath et al., 1995; Boxtel e Berthouly, 1996; Berthouly e Michaux-Ferriere, 1996).

A implementação de técnicas de embriogênese somática ocorre a partir de explantes de origem diversa como: fragmentos de ramos ortotrópicos, ramos plagiotrópicos, folhas e tegumento de óvulos. Destacando-se as folhas para a embriogênese somática no cafeeiro, principalmente por serem abundantes e de fácil desinfecção (Dublin, 1991).

O surgimento dos primeiros embriões, a taxa de embriogênese (porcentagem de explantes que produzem embriões) e o número de embriões produzidos por explante depende de vários fatores, entre eles, as combinações de auxina/citocinina utilizadas na etapa de indução, da duração desta etapa, da origem do explante e do estado fisiológico da planta que se retirou os explantes (Dublin, 1991).

Sharp et al. (1973), usando diferentes tipos de explantes de *C. arabica* cv. Mundo Novo e Bourbon Amarelo, em um meio semelhante ao de Staritsky (1970), acrescido de leite de coco a 5%, observaram um desenvolvimento de calos precoce para altas concentrações de auxina (4 ou 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D). Por outro lado, Carvalho et al. (1974), observaram que aumentando a concentração de sacarose para 40 g.L⁻¹ e caseína 2 g.L⁻¹, com 0,1 mg.L⁻¹ de cinetina e 2,4-D encontraram calos no 13º dia, quando incubados no escuro a 24º C. Herman e Hass (1975) também utilizando o mesmo meio e 0,1 mg.L⁻¹ de cinetina e 0,1 mg.L⁻¹ de 2,4-D observaram baixo crescimento de calos.

Yasuda et al. (1995) estabeleceram embriogênese somática em *Coffea arabica* e *canephora*, de explantes de folha de árvores maduras usando citocinina como único hormônio. As espécies *arabica* e *canephora* reagem de diferentes maneiras. Em *canephora*, embriões somáticos formam-se nas bordas cortadas do explantes de folhas jovens em um meio contendo citocinina. Como *canephora* é autoincompatível, este procedimento é muito valioso para sua propagação. Em *arabica*, calos embriogênicos foram induzidos depois de cultivados por longo tempo por citocinina e seus embriões somáticos formaram calos embriogênicos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, em Lavras – MG.

Os explantes utilizados foram folhas de *Coffea arabica* L. cv. Acaíá Cerrado, oriundas de plântulas cultivadas *in vitro*, a partir do cultivo de embriões zigóticos, que já se encontravam estabelecidas *in vitro*, durante seis meses.

O meio nutritivo utilizado foi os sais de Murashige e Skoog (1962), acrescidos de tiamina (10 mg.L⁻¹), ácido nicotínico (1,0 mg.L⁻¹), piridoxina (1,0 mg.L⁻¹), sendo o pH ajustado para 5,6. Para a solidificação do meio foi utilizado Phytigel (2 g.L⁻¹). Em um experimento utilizou-se o BAP (1,1 mg.L⁻¹) e em outro 2iP (1,0 mg.L⁻¹) e os tratamentos foram constituídos de testemunha sem auxina e AIB (0,1; 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹), 2,4-D (1,1; 5,5 e 11,0 mg.L⁻¹) e ANA (0,001; 0,01 e 0,02 mg.L⁻¹), com 4 repetições e quatro folhas por frasco, num delineamento inteiramente casualizado (DIC). As avaliações dos experimentos ocorreram aos 60 dias, através das seguintes variáveis: número de folhas com calos e tipo de calos (notas de 1-5, em função do tamanho dos calos). Os dados originais foram analisados estatisticamente e as médias comparadas segundo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos sessenta dias de indução à calogênese em explantes foliares, observou-se que os tratamentos que continham AIB combinado com BAP (1,1 mg.L⁻¹), apresentaram maior número de folhas com presença de calos e maior tamanho, quando comparados aos demais tratamentos (Figuras 1 e 2), discordando de Crocomo et al. (1979), os quais concluíram que a auxina 2,4-D combinada com uma citocinina são essenciais à proliferação de calos de explantes foliares e de entrenós. A associação auxina/citocinina em meio de cultura para a indução de calos, apresentam resultados diferentes aos de Cordeiro (1999) que obteve melhores resultados utilizando explantes foliares de *Coffea arabica* L. induzidos primeiramente com apenas BAP. Os tratamentos com 2,4-D associado a 2iP apresentaram maior número de folhas com calos e calos de maior tamanho, quando comparados aos demais tratamentos (Figuras 3 e 4), de maneira semelhante aos resultados obtidos por Crocomo et al. (1979).

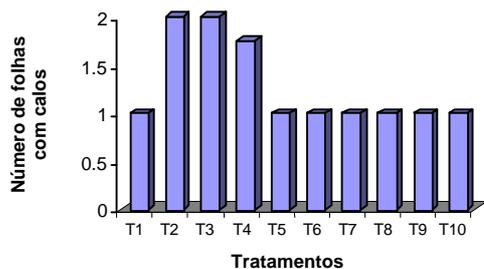


Figura 1: Número médio de folhas com calos, por parcela, de folhas cultivadas *in vitro* em meio MS com 1,1 mg.L⁻¹ de BAP e diferentes concentrações de auxinas em mg.L⁻¹ (T1 = Testemunha; T2 = 0,1 AIB; T3 = 0,5 AIB; T4 = 1,0 AIB; T5 = 1,1 2,4-D; T6 = 5,5 2,4-D; T7 = 11,0 2,4-D; T8 = 0,001 ANA; T9 = 0,01 ANA; T10 = 0,02 ANA).

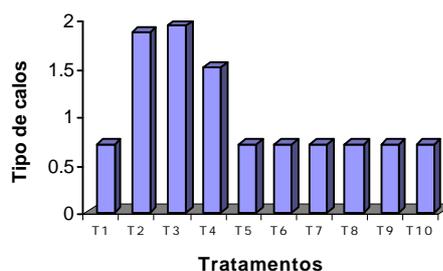


Figura 2: Tipos de calos em folhas de *Coffea arabica* cultivadas *in vitro* em meio MS com 1,1 mg.L⁻¹ de BAP e diferentes concentrações de auxinas em mg.L⁻¹ (T1 = Testemunha; T2 = 0,1 AIB; T3 = 0,5 AIB; T4 = 1,0 AIB; T5 = 1,1 2,4-D; T6 = 5,5 2,4-D; T7 = 11,0 2,4-D; T8 = 0,001 ANA; T9 = 0,01 ANA; T10 = 0,02 ANA).

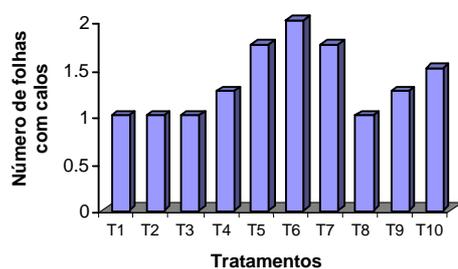


Figura 3: Número médio de folhas com calos, por parcela, de folhas cultivadas *in vitro* em meio MS com 1,0 mg.L⁻¹ de 2iP e diferentes concentrações de auxinas em mg.L⁻¹ (T1 = Testemunha; T2 = 0,1 AIB; T3 = 0,5 AIB; T4 = 1,0 AIB; T5 = 1,1 2,4-D; T6 = 5,5 2,4-D; T7 = 11,0 2,4-D; T8 = 0,001 ANA; T9 = 0,01 ANA; T10 = 0,02 ANA).

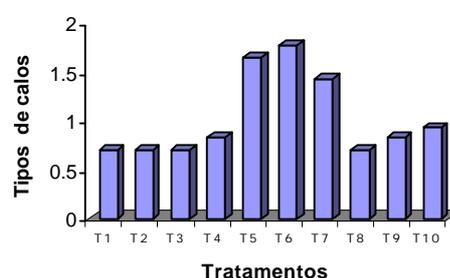


Figura 4: Tipos de calos em folhas de *Coffea arabica* cultivadas *in vitro* em meio MS com 1,0 mg.L⁻¹ de 2iP e diferentes concentrações de auxinas em mg.L⁻¹ (T1 = Testemunha; T2 = 0,1 AIB; T3 = 0,5 AIB; T4 = 1,0 AIB; T5 = 1,1 2,4-D; T6 = 5,5 2,4-D; T7 = 11,0 2,4-D; T8 = 0,001 ANA; T9 = 0,01 ANA; T10 = 0,02 ANA).

CONCLUSÃO

O uso da combinação AIB x BAP e 2,4-D x 2iP proporcionaram os melhores resultados na indução e tamanho de calos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, L.M.da C. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. (Dissertação de mestrado). 1998, 86p. Lavras – M.G. – UFLA.
- BOXTTEL, J.V.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.44, p.7-17, 1996.
- BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N.M. High frequency somatic embryogenesis from *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.44, p.169-176, 1996.
- CARVALHO, F.J.P.C.; CARVALHO, P.C.T.; CROCOMO, O.J. Cultura de tecidos de explantes de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, Poços de Caldas, **Resumos...**, Rio de Janeiro, v.2, p.299-300, 1974.
- DUBLIN, P. Techniques de reproduction végétative "in vitro" et amelioration génétique chez les caféiers cultivés. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v.28, n.4, p.231-244, 1984.
- DUBLIN, P. Multiplicación vegetativa de café, hevea e cacao. In ROCA, N.M.; MROGINSKI, L.A., eds. **Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos e Aplicaciones**. Turrialba, p.612-642, 1991.
- HERMANN, E.B.; HASS, G.J. Clonal propagation of *C. arabica* L. from callus culture. **Hort Science**, v.10, n.6, p.588-589, 1975.
- LANAUD, C. Production de plantules de *C. canephora* par embryogénese somatique réalisée à partir de culture *in vitro* d'ovules. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v.25, n.4, p.231-236, 1981.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 15(3):473-97, 1962.

- PIERSON, E.S. et al. In vitro development of embryoids from punched leaf disc of *Coffea canephora*. **Protoplasma**, v.115, p.208-216, 1983.
- SHARP, W.R.; CALDAS, L.S.; CROCOMO, O.J.; MONACO, L.C.; CARVALHO, A. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. **Phyton**, Buenos Aires, v.31, n.2, p.67-74, 1973.
- SONDAHL, M.R. Interações de citoquininas e auxinas no crescimento e embriogenese de explantes de *Coffea* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 6., Ribeirão Preto, 1978. **Resumos...** Rio de Janeiro, IBC, 1978. p.67.
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus culture tissue of coffea. **Acta Botanica Neerlandica**, Netherlands, v.19, n.4, p.509-514, 1970.
- YASUDA, T.; TAHARA, M.; HATANAKA, T.; NISHIBATA, T.; YAMAGUCHI, T. Clonal propagation through somatic embryogenesis of *Coffea* species. **Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC)**, 16, Kyoto, v.2, p.537-541, 1995.

AVISO

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS
SEGUINTE ENDEREÇOS:

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV
Viçosa - MG
Cep: 36571-000
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485
Fax : (31) 3891-3911

EMBRAPA CAFÉ

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)
Edifício Sede da Embrapa - sala 321
Brasília - DF
Cep: 70770-901
Tel: (61) 448-4378
Fax: (61) 448-4425