

CULTURA *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE *Coffea arabica*: INFLUÊNCIA DE NAA E BAP¹

LUCIANA MARQUES DA CUNHA OLIVEIRA ANDRADE²

MOACIR PASQUAL³

ANNA LYGIA DE REZENDE MACIEL⁴

ANDRÉ BARRETTO PEREIRA⁵

JOÃO MAURÍCIO CAVALCANTE-ALVES⁶

RESUMO – Procurou-se determinar as melhores concentrações dos reguladores de crescimento NAA (ácido naftalenacético) e BAP (6-benzilaminopurina) para cultura de embriões *in vitro* de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44. Foram testadas todas as combinações possíveis entre as concentrações (mg.L⁻¹) de NAA (0; 0,01; 0,1 e 1) e BAP (0; 3; 6 e 9) acrescidas ao meio MS. O experimento foi conduzido à temperatura de 26 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 16µM.m⁻².s⁻¹ por 60 dias. Foram utilizados modelos de superfície de resposta, pelos quais pôde-se determinar as concentrações ideais

para as características: número total de brotações, número de brotos maiores que 1cm, número total de folhas, massa da matéria fresca e seca das brotações. O NAA proporciona os melhores resultados na concentração de 1 mg.L⁻¹ para as variáveis número total de brotos, número total de folhas e comprimento de brotos, e na concentração de 0,53 mg.L⁻¹, para a variável massa da matéria fresca da parte aérea. Os melhores resultados com BAP são obtidos com 9 mg.L⁻¹ para número total de folhas, comprimento de brotos e massa da matéria seca da parte aérea, com 7,4 mg.L⁻¹ para número total de brotos e com 6 mg.L⁻¹ para massa da matéria fresca da parte aérea.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Coffea arabica*, regulador de crescimento, micropropagação.

Coffea arabica EMBRYOS CULTURE *IN VITRO*: INFLUENCE OF NAA AND BAP

ABSTRACT – In this work, a methodology for *in vitro* embryos culture of *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44 was evaluated, specifically the best concentrations of growth regulators NAA (naphthaleneacetic-acid) and BAP (6-benzylaminopurine). All the possible combinations were tested among the used

doses. Answer surface models were also used to determine the best concentrations for the characteristics: total shoot number, number of sprouts larger than 1cm, total leaf number, weight of fresh and dry matter of the shoot. The best results were obtained using the concentration of 9 mg.L⁻¹ for BAP and 1 mg.L⁻¹ for NAA.

INDEX TERMS: *Coffea arabica*, growth regulator, micropropagation.

INTRODUÇÃO

Cruzamentos interespecíficos e intergenéricos oferecem aos melhoristas de plantas um método para aumentar a variabilidade genética e para transferir genes desejáveis entre espécies, principalmente das silvestres para as cultivadas. Em tais cruzamentos podem ocorrer

barreiras tanto pré como pós-fertilização, resultando em sementes chochas e embriões abortivos. O uso de hibridação entre espécies diferentes é freqüentemente limitado por falhas no desenvolvimento do endosperma, culminando com degeneração dos embriões antes que atinjam a maturidade. Embriões híbridos podem ser salvos

1. Apoio financeiro de CBP&D Café e FAPEMIG.

2. Bióloga MS.

3. Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Titular do Departamento de Agricultura, UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS - UFLA, Caixa Postal 37, 37200.000, Lavras, MG. E-mail: mpasqual@ufla.br

4. Engenheiro Agrônomo, mestranda, UFLA, bolsista CAPES.

5. Engenheiro Agrônomo, Dr., Pesquisador, CEPLAC/CEPEC/SEGEN, Caixa Postal 7, CEP 456000.000 – Itabuna, BA.

6. Engenheiro Agrônomo, Dr., bolsista recém-doutor FAPEMIG.

se forem removidos antes que ocorra o aborto e cultivados artificialmente em um meio nutritivo. Melhoristas de frutíferas têm tido sucesso no resgate de embriões e posterior obtenção de plantas a partir de frutos sem sementes de videira (Emershad et al., 1989; Gribaudo et al., 1993).

O embrião originado de um processo normal de fecundação pode ser facilmente separado e cultivado sob condições assépticas em meio de cultura adequado, mantendo-se geneticamente estável, produzindo descendentes idênticos a ele. Para a remoção do embrião, basta desinfestar apenas a superfície externa da semente, pelo fato de que o embrião está alojado em região estéril da semente. Assim, o índice de contaminação *in vitro* é muito baixo em relação às demais culturas (Illg, 1986).

O meio de cultura adequado, tanto para propagação quanto para a cultura de embriões, deve ser adaptado para cada espécie. Estudos envolvendo meio de cultura para embriões usaram amplamente a solução de Knop (Andreoli, 1986). Embora diferentes meios sejam capazes de manter os microcultivos de embriões, o mais freqüentemente utilizado é o MS (Murashige & Skoog, 1962).

De modo geral, baixas concentrações de auxinas têm favorecido o crescimento normal de embriões, enquanto altas concentrações tanto apresentaram efeito inibitório quanto favoreceram a formação de calos (Raghavan & Srivastava, 1982). Citocininas têm usualmente inibido o crescimento (Raghavan & Torrey, 1964) apesar de Pinfield & Stobar (1972) terem registrado estímulo ao crescimento de embriões de *Acer pseudoplatanus* L. pelo uso de cinetina.

O cafeeiro, como outras culturas, libera substâncias fenólicas e, por essa razão, deve-se adicionar ao meio de cultura substâncias anti-oxidantes, tais como: carvão ativado, polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico e ácido cítrico.

A cultura de embriões possibilita a recuperação de híbridos de cruzamentos incompatíveis, micropropagação, superação de dormência e esterilidade de sementes (Hu & Ferreira, 1988), além do estudo detalhado dos problemas nutricionais e fisiológicos do embrião, permitindo a clonagem de plantas selecionadas com o objetivo de antecipar a época de plantio em culturas como o café.

Com este trabalho objetivou-se determinar as melhores concentrações dos reguladores de crescimento NAA (ácido naftalenoacético) e BAP (6-

benzilaminopurina), na cultura de embriões *in vitro* de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí vermelho LCH 2077-2-5-44.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais/Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras/Minas Gerais.

O material vegetal utilizado foi *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44, sendo utilizados frutos no estágio de cereja para a extração de embriões. O meio nutritivo básico utilizado foi o de Murashige & Skoog (1962), acrescido de 6 mg.L⁻¹ de GA₃, pH ajustado para 5,9 e solidificado com ágar na proporção de 7g.L⁻¹.

Após o preparo, foram distribuídos 10 mL de meio por tubo de ensaio (2,5 x 15 cm), os quais foram vedados com tampa de polipropileno. O meio foi esterilizado à temperatura de 121°C, durante 20 minutos e 1,2 atm.

O pergaminho foi retirado e as sementes mantidas em água destilada por 15 horas, sendo, após esse período, mergulhadas em álcool 70% por 1 minuto, e posteriormente em hipoclorito de sódio 2,5% por meia hora. Os embriões foram extraídos intactos em placas de Petri, sob estereomicroscópio e, em seguida, inoculados no meio, colocando-se um embrião por tubo de ensaio, correspondendo à parcela experimental.

O processo de inoculação foi realizado assepticamente em câmaras de fluxo laminar horizontal. Posteriormente, o material foi transferido para sala de crescimento com temperatura de 26 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 16 µM.m⁻².s⁻¹, suprida por lâmpadas grow-lux e branca-fria, na proporção de 1:1, permanecendo nessas condições por um período de 60 dias. Foram realizadas avaliações nos primeiros 30 dias após a instalação através das variáveis: número total de brotos, número total de folhas, número de brotos maiores que 1cm, massa da matéria fresca e seca da parte aérea (mg).

Os tratamentos foram constituídos de todas as combinações possíveis entre as concentrações de NAA (0; 0,01; 0,1 e 1 mg.L⁻¹) e de BAP (0; 3; 6 e 9 mg.L⁻¹), resultando num fatorial 4 x 4, utilizando-se delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições.

Para a análise estatística, foram utilizadas duas maneiras de decompor a variação entre tratamentos: a primeira delas correspondeu ao desdobramento em fatores principais e interação entre eles, típico de ensaios fatoriais; a outra maneira fez uso do ajustamento a modelos de superfície de resposta (Box & Draper, 1987), quando as diferenças entre os tratamentos mostraram-se significativas pelo teste F. O método de “backward” (Draper & Smith, 1981) foi utilizado para a seleção de modelos de regressão múltipla envolvendo os fatores testados no experimento. Uma vez determinado o modelo, testava-se a significância dos desvios de regressão para verificar a adequabilidade do modelo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo das análises de variância, para as características avaliadas, estão representadas na Tabela 1, considerando a partição da variação entre

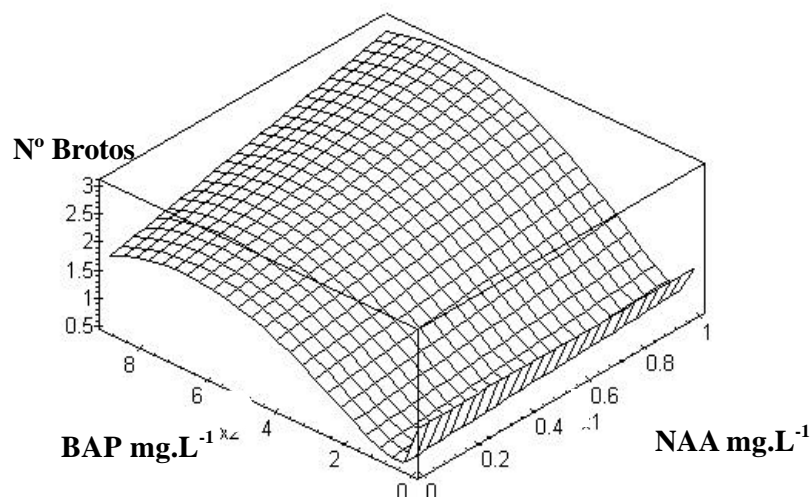
tratamentos segundo o esquema fatorial, e nas variações devido ao modelo de regressão múltipla ajustado e devido aos desvios de regressão. Observa-se que para as características número total de brotos, de folhas, número de brotos maiores que 1 cm, massa da matéria fresca e seca, houve interação significativa entre os reguladores de crescimento utilizados. O desvio de regressão, para todas as variáveis, não foi significativo, evidenciando que os modelos foram ajustados satisfatoriamente.

Número total de brotos: A utilização da concentração máxima de NAA (1 mg.L⁻¹), associada a 7,42 mg.L⁻¹ de BAP, promoveu o maior número total de brotos. O esperado para essa combinação seria de 3 brotações/explante (Figura 1). Concentrações elevadas de auxina, associadas a concentrações elevadas de citocinina, promoveram um aumento no número total de brotos.

TABELA 1 - Resumo das análises de variância para número total de brotos (NTB), número de brotos maiores que 1 cm (NB>1), número total de folhas (NTF), massa da matéria fresca (MF) e massa da matéria seca da parte aérea das brotações (MS) em função das concentrações de NAA e BAP, em um período de 60 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG.

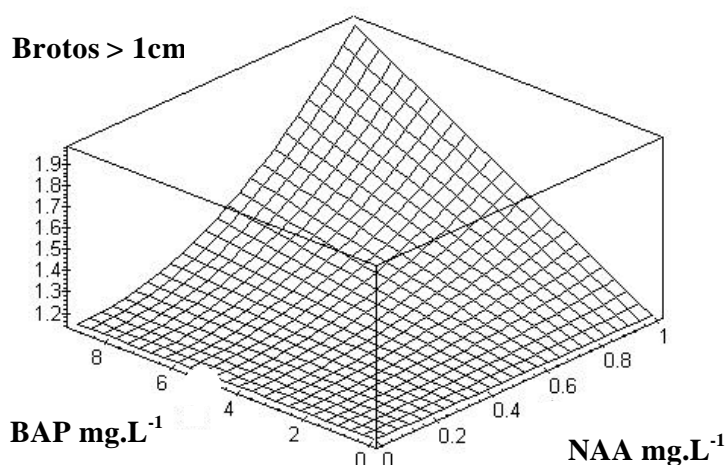
Causa da variação	QM					
	GL.	NTB ^{1/}	NB>1 ^{1/}	NTF ^{1/}	MF ^{1/}	MS ^{1/}
Tratamentos	(15)	1,3098**	0,3091**	75,6338**	3027,7500**	80,9784
NAA	3	1,8018**	0,6563**	10,8965**	3158,3439**	96,3355
BAP	3	3,8671**	0,2998*	8,9978**	7126,3501**	170,8920*
NAA x BAP	9	0,2933	0,1965*	1,7723**	1618,0186*	45,8882
Regressão	4	4,7187**	3,5211**	17,5756**	7607,1770**	209,0624**
Desvio	11	0,0701	0,0797	0,4847	1362,5038	16,9364
Resíduo	48	0,1748	0,0891	0,6240	741,2335	50,7636
C.V.(%)		23,94	23,85	30,42	47,43	71,60

* e ** significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente.



$$Y = 1,224745 + 1,378642 X_2 - 0,072996 X_2^2 - 1,989705 \sqrt{X_2} + 0,379332 X_1 \sqrt{X_2}$$

FIGURA 1 – Superfície de resposta para número total de brotos em embriões de cafeeiro submetidos a diferentes concentrações de NAA e BAP. UFLA, Lavras, MG.



$$Y = 1,147714 + 0,091410 X_1^2 X_2$$

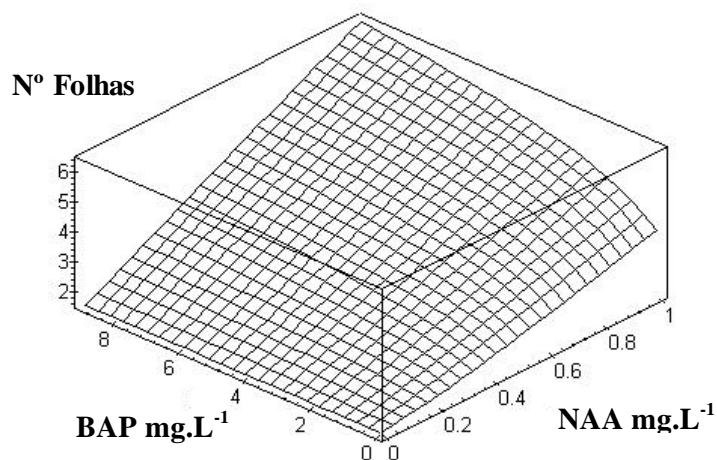
FIGURA 2 – Superfície de resposta para número de brotos maiores que 1 cm, em embriões de cafeeiro submetidos a diferentes concentrações de NAA e BAP. UFLA, Lavras, MG.

Número de brotos maiores que um centímetro:
O número máximo de brotações maiores que 1 cm foi obtido com concentrações máximas de NAA (1 mg.L⁻¹) e BAP (9 mg.L⁻¹) (Figura 2). Para essa

característica, houve interação entre os fatores (Tabela 1), o que pôde ser confirmado pela presença de termos no modelo envolvendo os dois fatores simultaneamente (Figura 2).

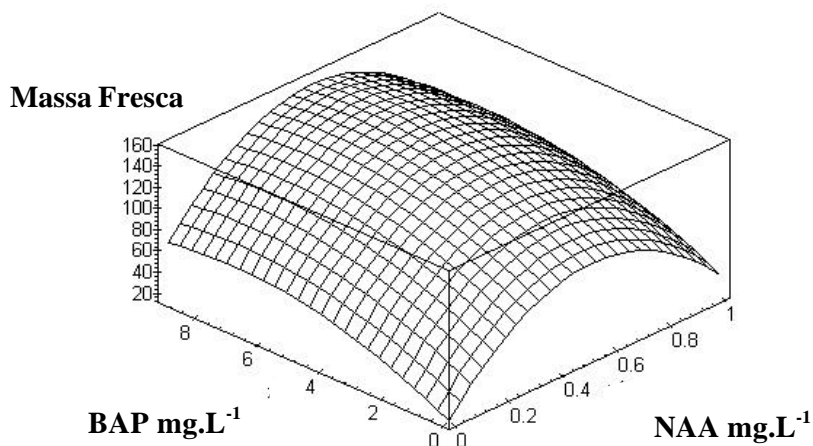
Número total de folhas: Ocorreu interação entre os fatores, demonstrado tanto pela análise fatorial (Tabela 1) quanto pelo modelo ajustado, sendo confirmado pela existência de termos no modelo envolvendo os dois fatores simultaneamente (Figura 3). A concentração máxima de NAA (1 mg.L^{-1}), juntamente com 9 mg.L^{-1} de BAP, resultou num maior número total de folhas por explante. Segundo o modelo de superfície de resposta ajustado para essas concentrações, espera-se que o número total de folhas seja de 12 por explante.

Massa de matéria fresca e seca da parte aérea: Conforme se observa na Figura 4, concentrações intermediárias de ambos os reguladores de crescimento promovem uma resposta maior para massa da matéria fresca da parte aérea. Segundo o modelo de superfície de resposta ajustado, a resposta máxima seria obtida com uma concentração de $0,53 \text{ mg.L}^{-1}$ de NAA e 6 mg.L^{-1} de BAP, obtendo, em média, uma massa de matéria fresca da parte aérea de $148,53 \text{ mg/explante}$.



$$Y = 1,5484 - 1,1504 X_1 + 2,0890 \log(X_1 + 1) + 1,6904 \log(X_1 + 1) \log(X_2 + 1)$$

FIGURA 3 – Superfície de resposta para número total de folhas em embriões de cafeeiro submetidos a diferentes concentrações de NAA e BAP. UFLA, Lavras, MG.



$$Y = 14,024855 + 322,720961 X_1 + 16,2252219 X_2 - 303,235632 X_1^2 - 1,352865 X_2^2$$

FIGURA 4 – Superfície de resposta para a massa da matéria fresca da parte aérea (mg) em embriões de cafeeiro submetidos a diferentes concentrações NAA e BAP. UFLA, Lavras, MG.

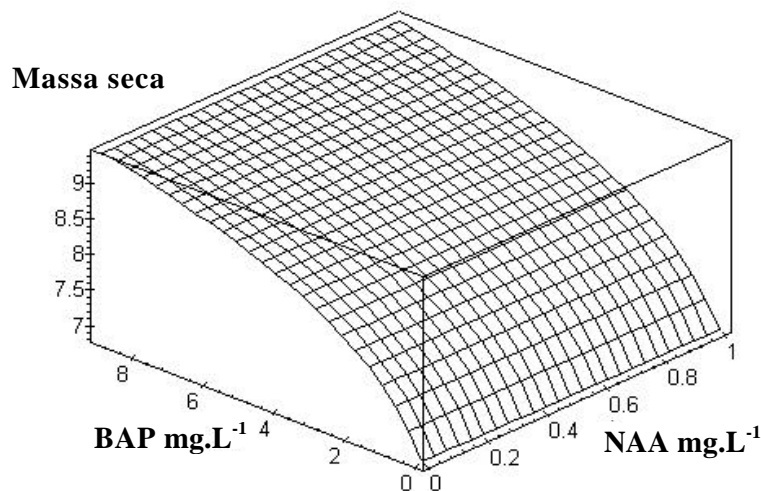
Para a característica massa da matéria seca da parte aérea, não houve interação entre os reguladores de crescimento NAA e BAP (Tabela 1). No modelo de regressão múltipla ajustado, observa-se que concentrações crescentes de BAP influenciaram na resposta para o aumento da massa da matéria seca da parte aérea (Figura 5).

Embora reguladores de crescimento como GA₃, auxinas, citocininas, etc. sejam extensivamente usados, observa-se que seus efeitos têm sido um tanto inconsistentes e, às vezes, contraditórios. Desde que os efeitos não sejam nutricionais, é provável que a concentração osmótica e a ação dessas substâncias sejam ligadas de alguma forma com permeabilidade da célula e incorporação de íons.

Resultados contrastantes aos deste experimento foram registrados por George (1993), em cujo trabalho constatou-se que concentrações elevadas de auxina inibiram o desenvolvimento de embriões. Em geral, baixas concentrações de auxinas têm favorecido o crescimento normal, enquanto suas altas concentrações mostraram ser tanto inibitórias quanto favoreceram o crescimento de calos desorganizados em cultura de embriões (Raghavan & Srivastava, 1982).

Êxito na cultura de embriões de *C. arabica* foi verificado também por Raghuramulu (1989), com o uso de auxinas e citocininas na concentração de 1 mg.L⁻¹. Concentrações superiores ou inferiores não foram satisfatórias. Para esse autor, concentrações acima de 1 mg.L⁻¹ de auxina foram consideradas tóxicas e promoveram a morte de embriões. Efeitos de citocininas têm usualmente resultado em inibição do crescimento (Raghavan & Torrey, 1964), apesar do estímulo obtido com uso de cinetina (Pinfield & Stobar, 1972). Inúmeros trabalhos mostram que o sucesso na cultura de embriões está associado a diversos fatores, incluindo o tamanho do explante, luz, temperatura, pH e composição do meio de cultura (Colonna, 1972; Sondahl et al., 1984; Hu & Ferreira, 1988; Raghuramulu, 1989; Krasnyanski et al., 1992; Sondahl & Lauritis, 1992). Estudos da influência da concentração de reguladores de crescimento na cultura *in vitro* de embriões de café têm sido feitos recentemente (Campos et al., 1998; Santos et al., 1998).

A técnica do cultivo de embriões é relativamente simples e representa um grande potencial no que diz respeito ao resgate de embriões desejáveis, os quais degenerariam se não fossem extraídos dos frutos em desenvolvimento e cultivados *in vitro*.



$$Y = 6,8095 + 1,1415 \log (X_2 + 1)^2$$

FIGURA 5 – Superfície de resposta para a massa da matéria seca da parte aérea (mg) em embriões de cafeeiro submetidos a diferentes concentrações de NAA e BAP. UFLA, Lavras, MG.

CONCLUSÕES

O NAA proporciona os melhores resultados na concentração de 1 mg.L⁻¹ para as variáveis número total de brotos, de folhas e de brotos maiores que 1 cm, e na concentração de 0,53 mg.L⁻¹ para a variável massa da matéria fresca da parte aérea.

Os melhores resultados com BAP são obtidos com 9 mg.L⁻¹ para número total de folhas, número de brotos maiores que 1 cm e massa da matéria seca da parte aérea, com 7,4 mg.L⁻¹ para número total de brotos e com 6 mg.L⁻¹ para massa da matéria fresca da parte aérea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOLI, C. Cultura de embrião. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. **Anais...** Brasília: ABCTP/ EMBRAPA, 1986. p.25-28.
- BOX, G.E.P.; DRAPER, N.R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: J. Wiley, 1987. 669 p.
- CAMPOS, K.P.; PASQUAL, M.; MACIEL, A.L.R.; PEREIRA, A.B.; SANTOS, E.C.; MENDES, A.N.G. Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado e NAA sobre embriões de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 24., 1998, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: MAA/CBP&D-Café/MICT/SAMG, 1998. p.246.
- COLONNA, J.P. Contribution a l'étude de la culture *in vitro* d'embryos de cafeiers. Action de la cafeine. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v.16, n.1, p.193-203, jan. 1972.
- DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 2.ed. New York: J. Wiley, 1981. 709 p.
- EMERSHAD, R.L.; RAMMING, D.W.; SERPE, M.D. In ovulo embryo development and plant formation from stenospermocarpic genotypes of *Vitis vinifera*. **American Journal of Botany**, Columbus, v.76, n.4, p.397-402, Apr. 1989.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**: part. 1. The Technology. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 574 p.
- GRIBAUDO, I.; ZANETTI, R.; BOTTA, R.; VALLANIA, R.; EYNARD, I. In óvulo embryo culture of stenospermocarpic grapes. **Vitis**, Siebeldingen, v.32, n.1, p.9-14, Jan. 1993.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1988. p.371-394.
- ILLG, R.D. Metodologia de seleção *in vitro* para resistência a fatores causadores de estresse. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. **Anais...** Brasília: ABCTP/ EMBRAPA, 1986. p.45-47.
- KRASNANSKI, S.; POLGÁR, Z.; NÉMETH, G.; MENEZEL, L. Plant regeneration for callus and protoplast of *Heliantus giganteus* L. **Plant Cell Reports**, Secaucus, v.11, n.1, p.7-10, Jan. 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.6, p.473-479, June 1962.
- PINFIELD, N.J.; STOBAR, A.K. Hormonal regulation of germination and early seedling development in *Acer pseudoplatanus* L. **Planta**, Berlin, v.104, n.3, p.134-145, Mar. 1972.
- RAGHAVAN, V.; SRIVASTAVA, P.S. Embryo culture. In: JOHRI, B. M. (Ed.). **Experimental embryology of vascular plants**. Berlin: Springer Verlag, 1982. p.195-230.
- RAGHAVAN, V.; TORREY, J.G. Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid, *Cattleya*. **American Journal of Botany**, Columbus, v.51, n.3, p.264-274, Mar. 1964.
- RAGHURAMULU, Y. Anther and endosperm culture of Coffee. **Journal of Research**, Bombay, v.19, n.2, p.71-81, Feb. 1989.
- SANTOS, E.C.; PASQUAL, M.; CAMPOS, K.P.; CAMPOS, R.J.C.; MACIEL, A.L.R.; MENDES, A.N.G. Efeito de diferentes concentrações de GA₃ e NAA sobre a cultura de embriões de *Coffea arabica* L. *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 24., 1998, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: MAA/CBP&D-Café/MICT/SAMG, 1998. p.248.

SONDAHL, M.R.; LAURITIS, J.A. Coffee. In:
HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. (Ed.).
Biotechnology of perennial fruit crops. Berlin:
Springer Verlag, 1992. p.401-420.

SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; MEDINA FILHO,
H.P.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C.; COSTA, W.R.
Coffee. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP,
W.R.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell
culture.** New York: MacMillan, 1984. p.564-590.