

MICROPROPAGAÇÃO DO CAFEEIRO COM CONCENTRAÇÕES DE BAP EM MEIO DE PRÉ-CULTIVO E DE BAP E TDZ EM MEIO DE SUBCULTIVO¹

Adriana Madeira Santos Jesus²
Samuel Pereira de Carvalho²
Moacir Pasqual²
Mychelle Carvalho²
Leonardo Ferreira Dutra²

RESUMO

A multiplicação *in vitro* possibilita a obtenção de grande número de plantas e a garantia da uniformidade genética. Objetivou-se avaliar o efeito residual do BAP no meio de pré-cultivo e BAP e TDZ no de subcultivo, sobre proliferação de brotos axilares. Segmentos nodais de cafeeiro 'Caturra Amarelo' estabelecidos *in vitro* foram pré-cultivados em meio MS sem regulador de crescimento ou em MS acrescido de 6 mg.L⁻¹ de BAP. Após 180 dias os explantes foram inoculados em meio de cultivo MS acrescido de 0, 6, 9, 12 e 15 mg.L⁻¹ de BAP (experimento 1). No segundo experimento, segmentos nodais foram inoculados em meio MS acrescido de 0; 0,05; 0,15; 0,45 e 1,35 mg.L⁻¹ de TDZ. O meio foi ajustado para pH 5,8 e solidificado com ágar 0,7%. Os explantes foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 27°C±1, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 32µM.m⁻².s⁻¹ durante 120 dias. Há efeito residual do BAP adicionado ao meio de pré-cultivo. A adição de 9-10 mg.L⁻¹ de BAP e 0,15-1,35 mg.L⁻¹ de TDZ no meio de subcultivo incrementa o número total de brotações, o número de brotações entre 0,5 cm e 1cm e maiores que 1cm e o peso da matéria fresca das brotações.

Palavras-chaves: *Coffea arabica*, cultura de tecidos, segmentos nodais, citocinina.

¹ Aceito para publicação em 22.04.2002.

² Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 37, 37200-000 Lavras, MG. amadeira@ufla.br; samuelpc@ufla.br; mpasqual@ufla.br; leodutra@ufla.br

ABSTRACT

EFFECT OF BAP CONCENTRATIONS IN PRE-CULTURE MEDIUM AND BAP AND TDZ IN SUB-CULTURE MEDIUM ON COFFEE MICROPROPAGATION

In vitro multiplication allows in the obtainment of a great number of plants and the warranty of genetic uniformity. The residual effects of BAP in a pre-culture medium and BAP and TDZ in a sub-culture medium on axillary bud proliferation were evaluated. 'Caturra Amarelo' coffee nodal segments established *in vitro* were pre-cultivated in MS medium without growth regulators or in MS medium added of BAP 6 mg.L⁻¹. After 180 days, the nodal segments were inoculated in MS medium added of BAP at 0, 6, 9, 12 and 15 mg.L⁻¹ concentrations (experiment 1). In the second experiment, the nodal segments were inoculated in MS medium added of TDZ at 0, 0.05, 0.15, 0.45 and 1.35 mg.L⁻¹ concentrations. The medium pH was adjusted for 5.8 and solidified with agar 0.7%. The explants were transferred to the growth room at 27°C±1 temperature, 16h photoperiod and 32µM.m⁻².s⁻¹ light intensity, during 120 days. There was residual effect of BAP added to the pre-culture medium. The addition of BAP (9-10 mg.L⁻¹) and TDZ (0.15-1.35 mg.L⁻¹) to the sub-culture medium increased the number of total sprouts, the number of sprouts between 0.5 and 1cm, the number of sprouts number larger than 1 cm and the sprout fresh matter weight.

Key words: *Coffea arabica*, tissue culture, nodal segments, cytokinin.

INTRODUÇÃO

O melhoramento do cafeeiro, pelos métodos tradicionais, é um longo processo que envolve várias técnicas, demanda mais de 15 anos para obtenção de um novo cultivar, é dispendioso e resulta em insuficiente produção e distribuição de sementes para satisfazer as necessidades dos produtores logo nos primeiros anos.

A multiplicação *in vitro* é considerada de grande importância para a propagação de genótipos excepcionais em larga escala. As técnicas de cultura de tecidos têm possibilitado a obtenção de grande número de plantas e a garantia da uniformidade genética do material (7, 11, 26, 30).

Na cultura de tecidos, a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura é de suma importância, pois reproduz o que ocorre naturalmente na planta. Combinações entre essas substâncias propiciam melhor crescimento e desenvolvimento do explante (1). Um meio mínimo, sem adição de reguladores de crescimento, raramente serve de veículo para suportar o crescimento de tecidos normais (19).

As citocininas são indispensáveis para quebrar a dominância apical e induzir a proliferação de gemas axilares, sendo o tipo de citocinina e a sua concentração os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro* (16). A benzilaminopurina (BAP) tem sido muito eficaz para a multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina por excelência

para multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias (15, 17, 32). Vários autores testaram o efeito desse regulador na micropropagação do cafeeiro (2, 3, 6, 7, 9, 10, 31).

O Thidiazuron (TDZ) tem sido descrito como uma substância com potente efeito citocinínico, com capacidade para induzir brotações múltiplas em plantas (5). É utilizado como regulador de crescimento em espécies lenhosas, sendo considerado uma das mais positivas inovações da cultura de tecidos nos últimos anos (18, 22, 23).

Como o processo de micropropagação exige um ou mais subcultivos, inclusive em alguns casos mudando-se o regulador de crescimento, pode haver efeito cumulativo ou residual de um subcultivo para outro. Segundo Grattapaglia e Machado (16), o efeito das citocininas não se restringe a uma subcultura, pois diversas vezes constata-se efeito residual de uma subcultura para outra, que é positivo quando se trata, por exemplo, do processo de rejuvenescimento *in vitro* de espécies lenhosas pelas seguidas exposições à citocinina. Entretanto, pode ser problemático quando afeta o alongamento e torna-se fator limitante na fase de enraizamento. Quando exerce ação negativa, o efeito residual pode ser resolvido com a introdução de uma fase intermediária de alongamento, em meio com concentrações reduzidas ou ausência de citocinina, para desintoxicar as culturas. A adição de carvão ativado ao meio de cultura também pode solucionar o problema, visto que esse coadjuvante possui a capacidade de reter concentrações excessivas de fitorreguladores.

Outros efeitos residuais atribuídos às citocininas têm sido observados nas plantas após o transplante, como menor capacidade de sobrevivência durante a aclimatização, devido à vitrificação, quebra da dominância apical, manutenção de hábito arbustivo e miniaturização e deformação dos frutos (16).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito residual do BAP, no meio de pré-cultivo e de BAP e TDZ no meio de subcultivo, sobre a proliferação de brotos axilares de *Coffea arabica*.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se segmentos nodais provenientes de plântulas de *Coffea arabica* 'Caturra Amarelo' estabelecidas *in vitro*. Parte do material foi pré-cultivado em meio MS (24) sem reguladores de crescimento e parte em meio MS acrescido de 6 mg.L⁻¹ de BAP durante 180 dias. Após esse período, foram instalados dois experimentos. No primeiro, os segmentos nodais pré-cultivados em meio MS sem regulador de crescimento ou em MS com BAP foram inoculados em meio de cultivo MS acrescido de BAP nas concentrações de 0, 6, 9, 12 e 15 mg.L⁻¹, perfazendo 10 tratamentos em fatorial 2 x 5, com quatro repetições de cinco tubos cada. No segundo

experimento, segmentos nodais foram inoculados em meio MS de cultivo acrescido de TDZ nas concentrações de 0; 0,05; 0,15; 0,45 e 1,35 mg.L⁻¹, perfazendo 10 tratamentos em fatorial 2 x 5, com quatro repetições de cinco tubos cada. O meio foi ajustado para pH 5,8, solidificado com ágar 0,7% e autoclavado a 121°C e 1,2 atm durante 20 min. Depois de inoculados no meio de cultura, os explantes foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 27°C±1, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 32µM.m⁻².s⁻¹. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, e após 120 dias, analisaram-se o número total de brotações, número de brotações maiores que 1 cm, número de brotações entre 0,5 e 1 cm e peso da matéria fresca das brotações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito de concentrações de BAP no meio de subcultivo em explantes de cafeeiro pré-cultivados em meio MS sem regulador de crescimento ou com adição de 6 mg.L⁻¹ de BAP

Maiores valores de número total de brotações (12,58), número de brotações entre 0,5 cm e 1 cm (3,22) e peso da matéria fresca das brotações (1,30g) foram obtidos em meio de subcultivo com 11,42; 11,04 e 9,07 mg.L⁻¹ de BAP, respectivamente, após pré-cultivo dos explantes em meio MS adicionado de BAP (Figuras 1, 3 e 4). Após atingir um valor máximo, as variáveis sofreram redução com o aumento das concentrações de BAP, provavelmente devido ao efeito tóxico deste regulador. Quando os segmentos nodais foram pré-cultivados em meio MS sem BAP e posteriormente subcultivados em meio com BAP, não houve incremento no valor de nenhuma das variáveis, sem diferença entre os tratamentos. Embora a citocinina estimule maior produção de partes aéreas, o seu excesso é tóxico e caracteriza-se, principalmente, pelo demasiado entufamento e falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação generalizada, o que pode levar a sérios problemas na fase de enraizamento (20, 21). Qi-Guang et al. (27) observaram que o excesso de BAP inibiu a brotação de gemas, reduziu drasticamente o número de partes aéreas por explante e formou calos em culturas de *Castanea mollissima*.

Com relação ao número de brotações maiores que 1 cm, houve resposta crescente até a concentração máxima de BAP no meio de subcultivo, em explantes pré-cultivados em meio MS adicionado de BAP, obtendo-se 1,36 broto maior que 1 cm (Figura 2). Não houve diferença entre os tratamentos quando os segmentos nodais foram pré-cultivados em meio MS sem BAP.

Em todas as variáveis estudadas não houve diferença entre os explantes pré-cultivados em meio MS sem regulador de crescimento ou com adição de BAP e posteriormente subcultivados para meio MS sem BAP (0 mg.L^{-1}).

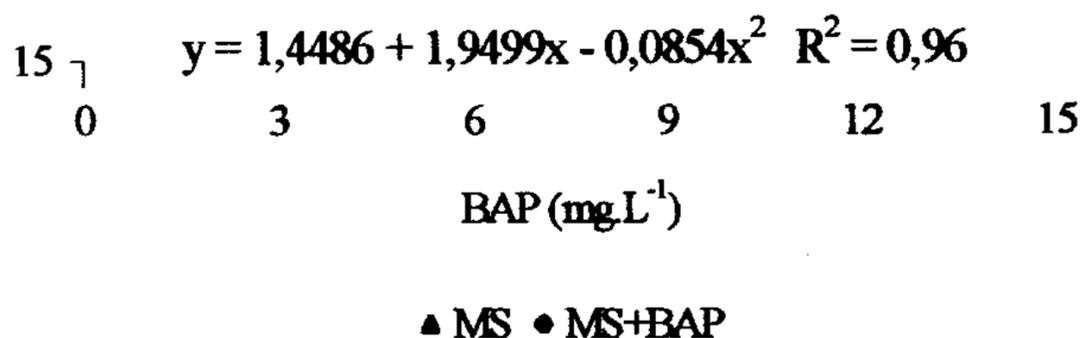


FIGURA 1 - Número total de brotações em segmentos nodais de cafeeiro pré-cultivados em meio MS ou MS+BAP e subcultivados em meio com diferentes concentrações de BAP.

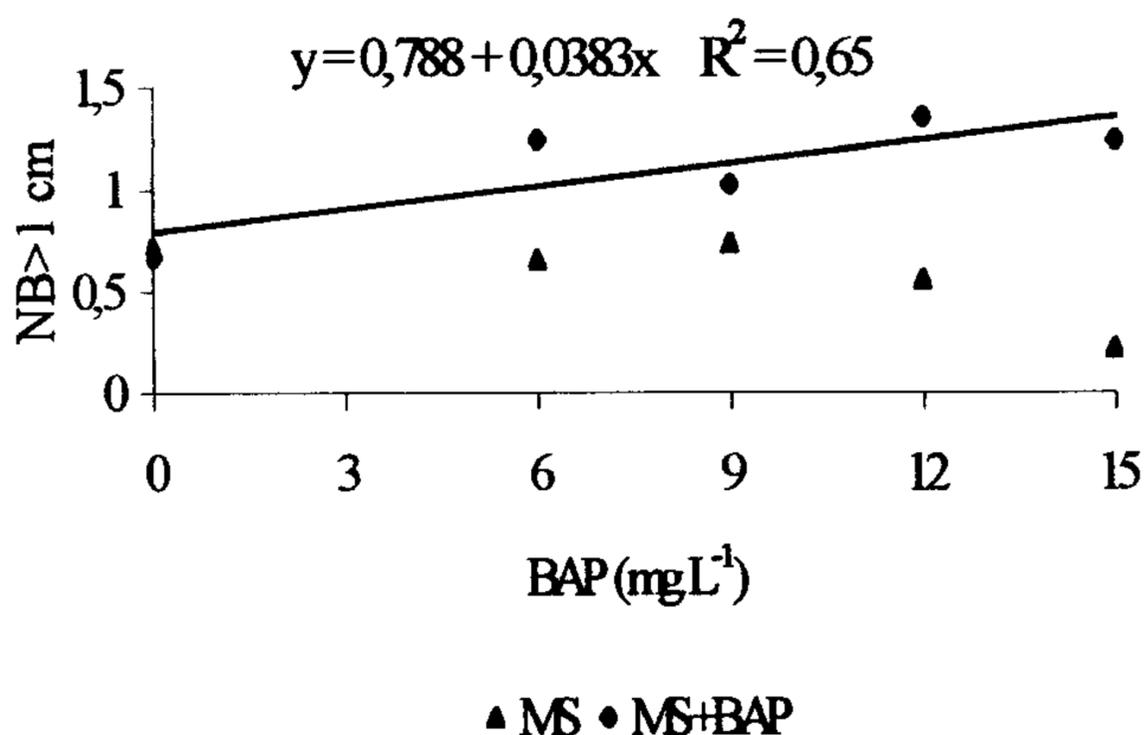
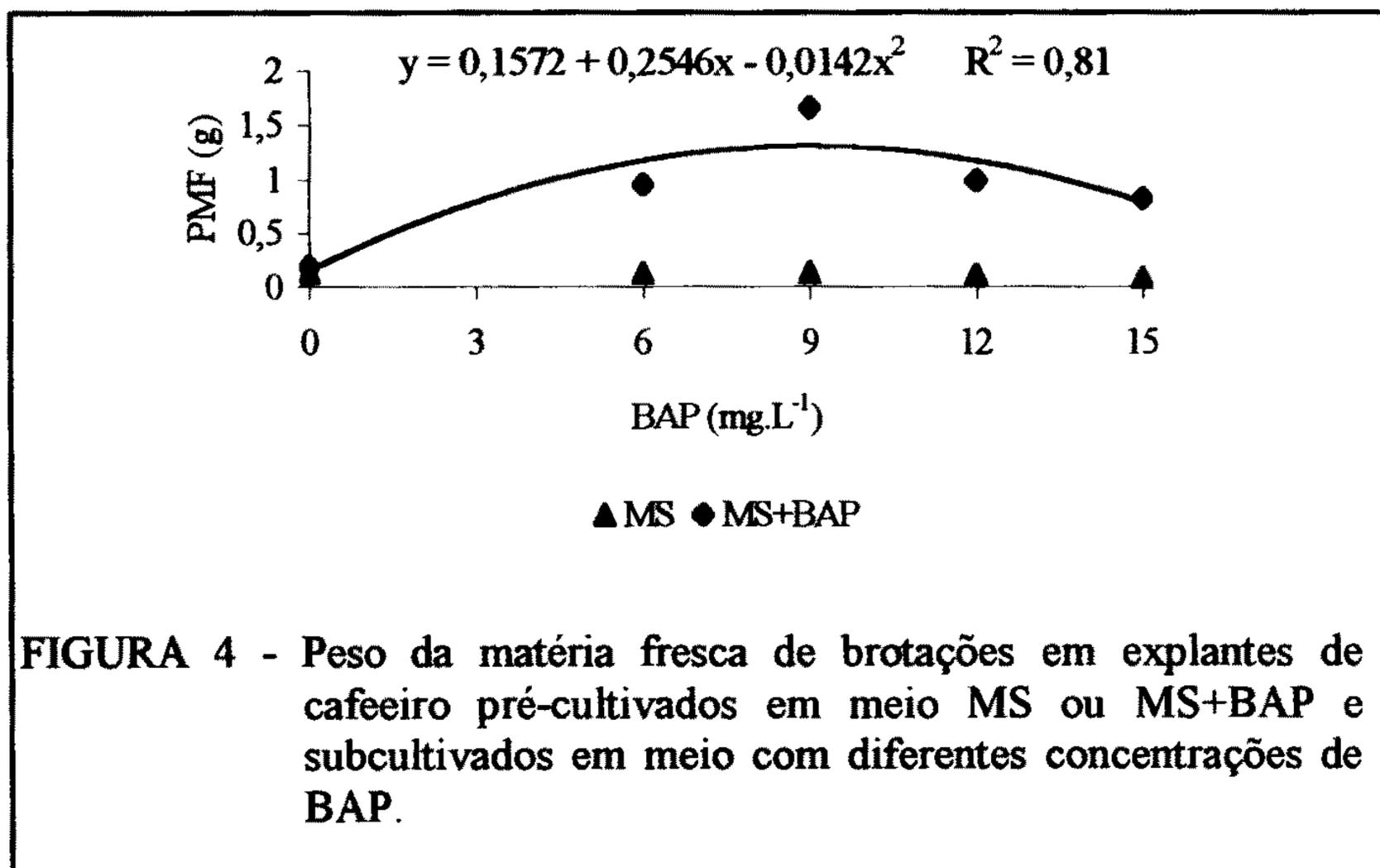
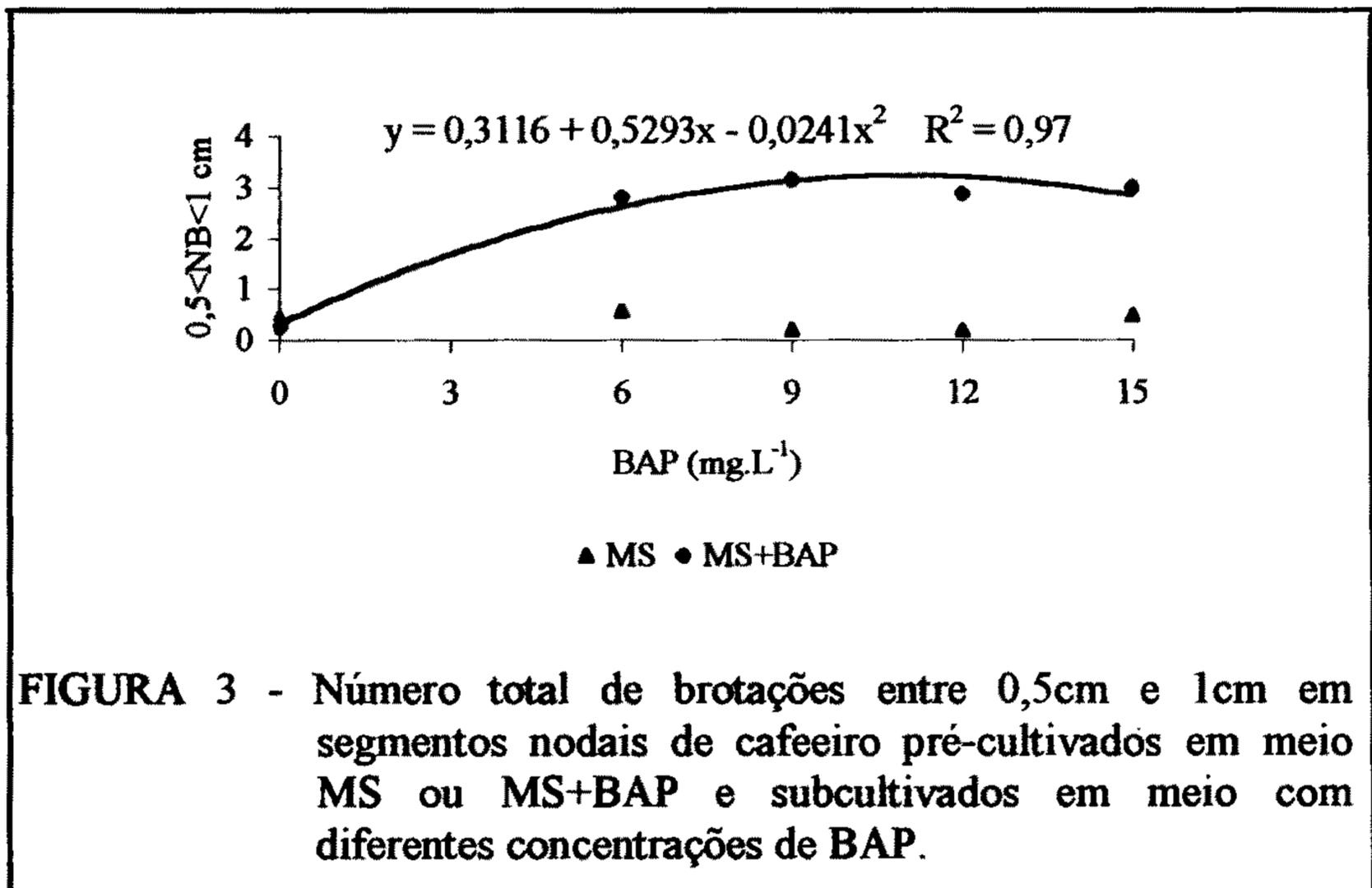


FIGURA 2 - Número de brotações maiores que 1cm em segmentos nodais de cafeeiro pré-cultivados em meio MS ou MS+BAP e subcultivados em meio com diferentes concentrações de BAP.



Os resultados encontrados no presente trabalho vêm corroborar o efeito benéfico do BAP para promover a multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias.

Custer, Wang e Buijs (9), propagando *C. arabica in vitro* por meio de segmentos nodais, obtiveram 2,2 brotos/explante em meio MS acrescido de BAP 9,9 mg.L⁻¹ e AIA 0,1 mg.L⁻¹. Os mesmos autores, testando diversas citocininas, visando ao desenvolvimento de gemas

axilares, obtiveram o melhor resultado após sete semanas de cultivo em BAP 10 mg.L^{-1} , com média de 2,8 gemas/nó. O BAP foi a citocinina mais efetiva.

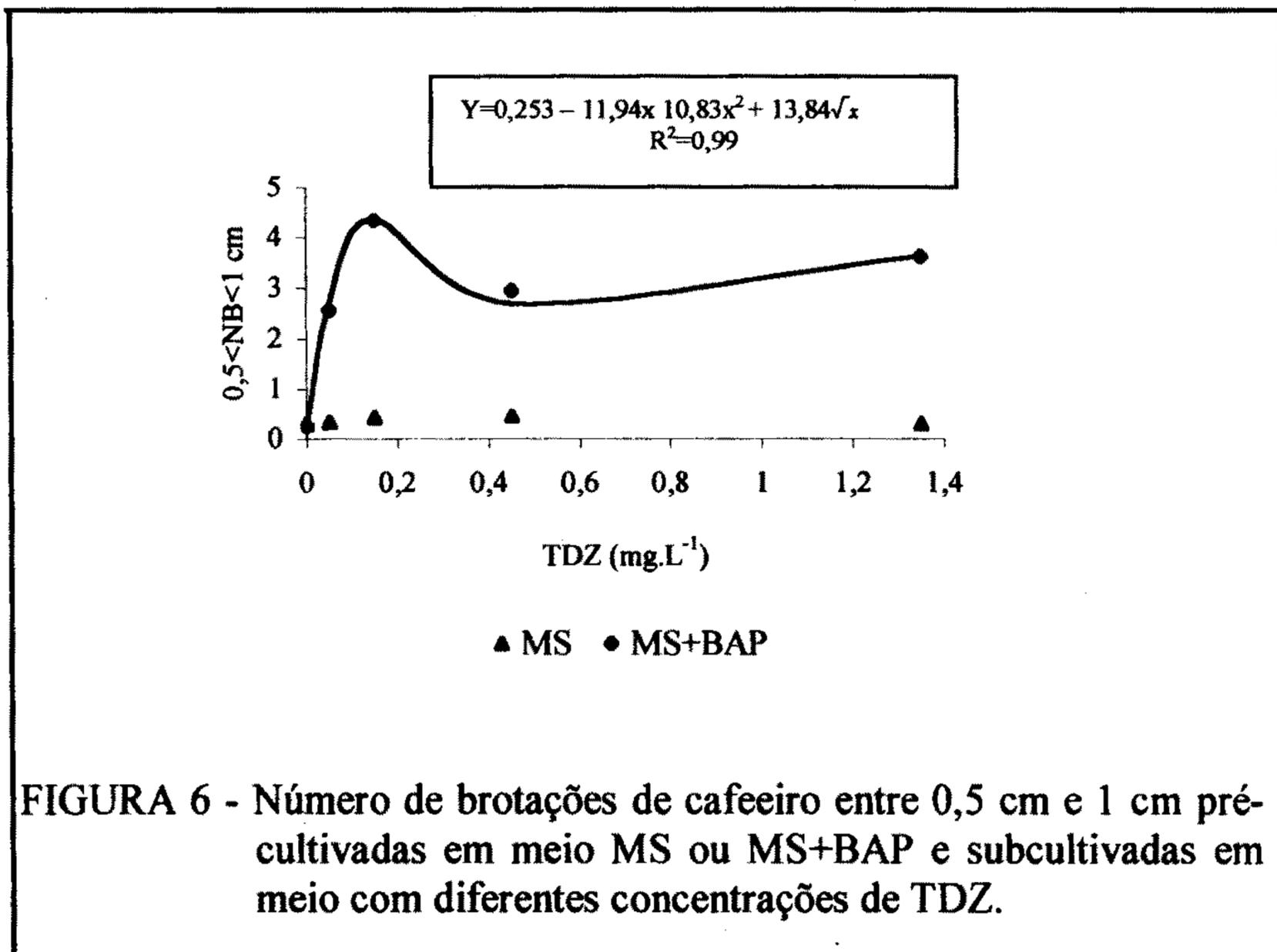
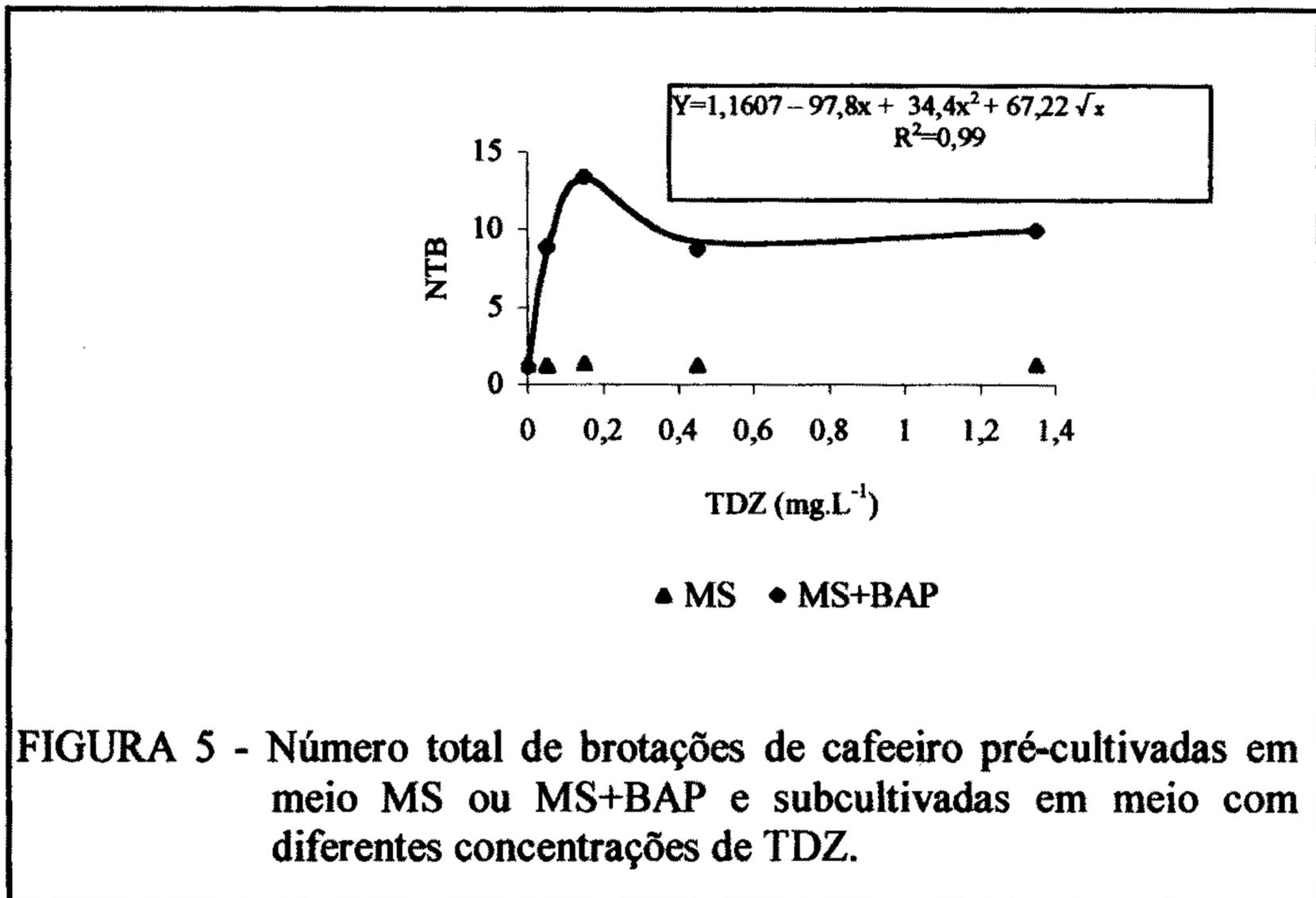
Forni e Pasqual (14) constataram aumento no número de brotos maiores que 1cm em *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho CH 207-2-5-44, com o aumento das concentrações de BAP. CARVALHO et al. (7), em trabalho com *C. arabica* cv. Catuaí, verificaram aumento linear do número de brotos maiores que 1cm e até $7,59 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP no número total de brotos.

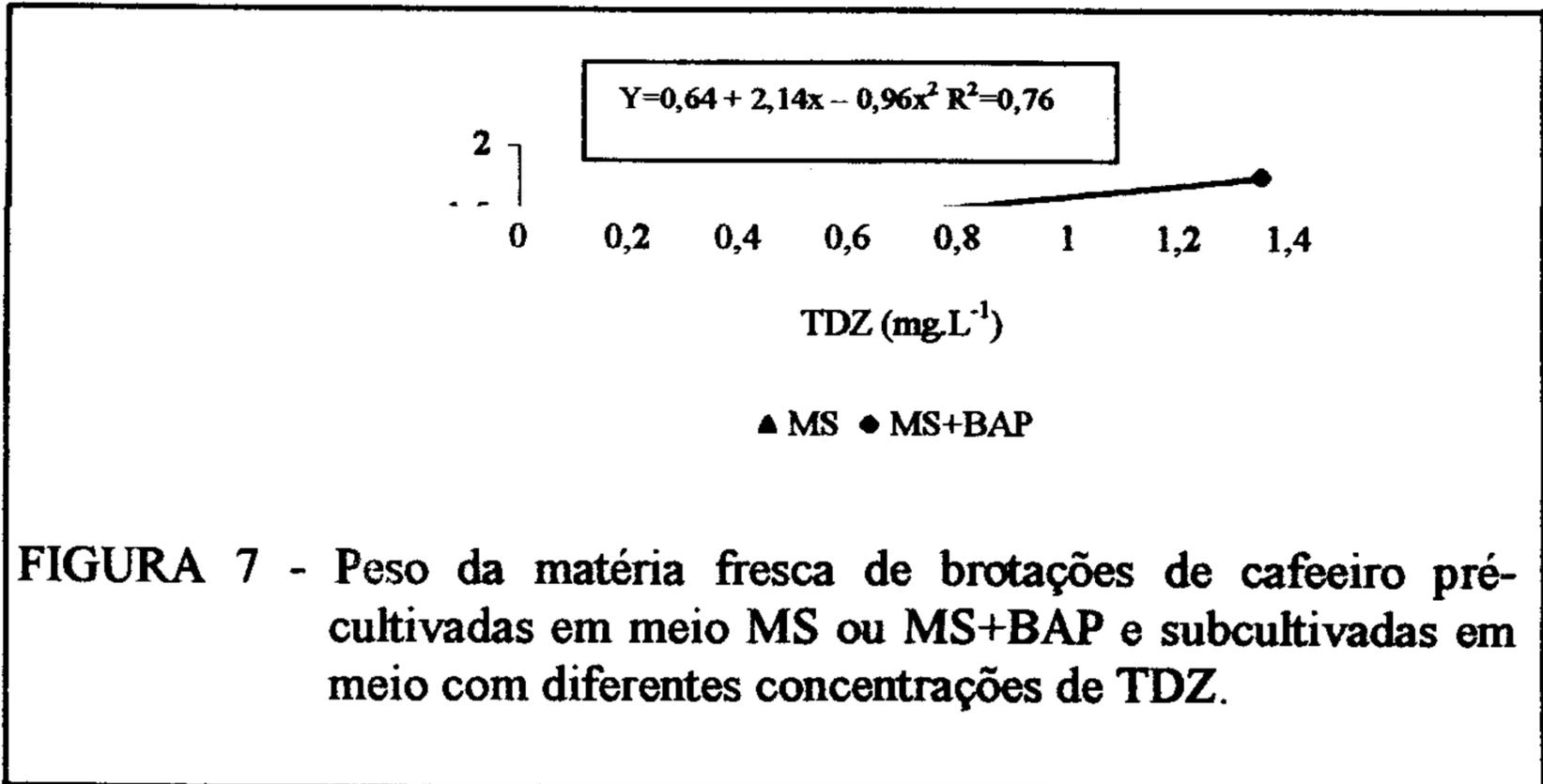
Efeito de concentrações de TDZ no meio de subcultivo em explantes de cafeeiro pré-cultivados em meio MS sem regulador de crescimento ou com adição de 6 mg.L^{-1} de BAP

Maior número total de brotações (13,30) e número de brotações entre 0,5cm e 1cm (4,07) foram obtidos com $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ no meio de subcultivo, após pré-cultivo dos explantes em meio MS adicionado de BAP (Figuras 5 e 6). Maior peso da matéria fresca das brotações (1,78 g) foi obtido com a concentração máxima ($1,35 \text{ mg.L}^{-1}$) de TDZ (Figura 7). A redução no valor das variáveis, após um máximo, pode ser devida a um efeito fitotóxico causado pelo TDZ, associado ao efeito residual do BAP adicionado ao meio de pré-cultivo. Quando os segmentos nodais foram pré-cultivados em meio MS sem BAP e posteriormente subcultivados para meio com TDZ, não houve incremento em nenhuma das variáveis, sem diferença entre os tratamentos. Quando os explantes foram pré-cultivados em meio MS puro ou adicionado de BAP e posteriormente subcultivados para meio MS sem BAP (0 mg.L^{-1}), também não houve diferença em nenhuma das variáveis estudadas. Os tratamentos não foram significativos para número de brotações maiores que 1 cm.

O TDZ possui capacidade para induzir brotações múltiplas em plantas (5, 29), com diversos relatos sobre seus efeitos positivos na proliferação de brotações axilares (4, 12, 13, 18, 25). Na maioria dos casos, o TDZ tem apresentado resultados superiores em relação a outras citocininas, na indução e multiplicação de brotos de várias espécies. Porém, algumas anormalidades têm sido associadas ao seu uso *in vitro* (22), como brotos menores e menos vigorosos (23).

É importante ressaltar o expressivo número de até 13 brotações/explante observadas no presente trabalho. Este resultado supera em muito os valores de 3,14; 2,45; 6,8 e 2,87 encontrados por Barros e Pasqual (2), Forni e Pasqual (14), Carvalho et al. (8) e Ribeiro (28).





Pelos resultados obtidos, pode-se verificar que houve efeito residual do BAP adicionado ao meio de pré-cultivo. Em todas as variáveis analisadas houve incremento quando os explantes foram pré-cultivados em meio com BAP e posteriormente subcultivados em meio adicionado de BAP ou TDZ. Fica evidenciado também que somente o BAP residual, proveniente do meio de pré-cultivo, não é suficiente para uma resposta satisfatória dos explantes, tomando-se necessária a adição de reguladores de crescimento ao meio de subcultivo.

Segundo Grattapaglia e Machado (16), o efeito das citocininas não se restringe a uma subcultura, pois diversas vezes constata-se um efeito residual de uma subcultura para outra. Este efeito residual é positivo quando se trata, por exemplo, do processo de rejuvenescimento *in vitro* de espécies lenhosas pelas seguidas exposições à citocinina ou, como no caso do presente trabalho, aumenta ainda mais a resposta das variáveis.

CONCLUSÕES

- 1) Há efeito residual do BAP adicionado ao meio de pré-cultivo.
- 2) A adição de BAP (9-10mg.L⁻¹) e TDZ (0,15-1,35mg.L⁻¹) no meio de subcultivo incrementa o número total de brotações, o número de brotações entre 0,5 cm e 1 cm e maior que 1cm e o peso da matéria fresca das brotações.

REFERÊNCIAS

1. ANDRADE, L.M. da C. Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Lavras, Universidade Federal de Lavras, 1998. 86p. (Dissertação de mestrado).
2. BARROS, I. & PASQUAL, M. Efeito da citocinina 6-BA na micropropagação de *Coffea arabica* L. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 15, Maringá, 1989. Resumos, 1989, p.56-7.
3. BERTHOULY, M. & ECHEVERRY, J.H. Multiplicación asexual de diferentes líneas de catimores: inducción *in vitro* de yemas axilares latentes. In: Congresso Latinoamericano de Tecnologia Cafeeira, 1, Campinas, 1987. Resumos, 1987, p.279-83.
4. BRAGWAT, B.; VIEIRA, L.G.E. & ERICKSON, L.R. Simulation of *in vitro* shoot proliferation from nodal explants of cassava by thidiazuron, benzyladenine and gibberellic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46: 1-7, 1996.
5. BRETAGNE, B.; CHUPEAU, M.C.; CHUPEAU, Y. & FOUILLOUX, G. Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source. *Plant Cell Reports*, 14: 120-4, 1994.
6. CARNEIRO, M.F.N. & RIBEIRO, T.M.O. *In vitro* micropropagation of *Coffea arabica* L. cv. Caturra by means of axillary buds. *Brotéria Genética*, 10: 139-52, 1989.
7. CARVALHO, G.R.; PASQUAL, M.; ANTUNES, L.E.C.; RAMOS, J.D. & MACIEL, A.L.R. Influência do benomyl e benzilaminopurina sobre a proliferação *in vitro* do café Cv. Catuaí. *Revista Ceres*, 43: 402-8, 1996.
8. CARVALHO, G.R.; PASQUAL, M.; ANTUNES, L.E.C.; SILVA, A.T. da & SCARANTE, M.J. Efeito do triadimenol e benzilaminopurina no desenvolvimento de brotos *in vitro* do cafeeiro cv. Catuaí. *Unimar*, 19: 767-75, 1997.
9. CUSTER, J.B.M.; VANG, G. & BUIJS, L.C. Clonal propagation of *Coffea arabica* by nodal culture. In: International Science Colloquium on Coffee, 9, Londres, 1980. Paris, ASIC, 1980, V. 2, p. 586-96.
10. DUBLIN, P. Multiplicación vegetative *in vitro* de L'arabusta. *Café, Cacao, Thé*, 24: 281-90, 1980.
11. DUBLIN, P. Techniques de reproduction végétative *in vitro* et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. *Café, Cacao, Thé*, 28: 231-44, 1984.
12. EAPEN, S.; SUCHITA, T. & GEORGE, L. Thidiazuron-induced shoot regeneration in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53: 217-20, 1998.
13. FELLMAN, C.D.; READ, P.E. & HOSIER, N.A. Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. *HortScience*, 22: 1197-200, 1987.
14. FORNI, R.C. & PASQUAL, M. Influência da citocinina BAP e concentrações dos componentes do meio "MS" na micropropagação do café 'Catuaí'. *Ciência e Agrotecnologia*, 20: 468-74, 1996.
15. GEORGE, E.F. *Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology.* 2nd ed. Edington, Exegetics, 1993. 574p.
16. GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.* Brasília, EMBRAPA/CNPq, 1998. p.183-260.
17. HU, C.Y. & WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V. & Yamada, Y. (eds.). *Handbook of plant cell culture: techniques of propagation and breeding.* New York, Macmillan, 1983. p.117-227.
18. HUETTEMAN, C.A. & PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33: 105-19, 1993.
19. KRIKORIAN, A.D.; KELLY, K. & SMITH, D.L. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Davies, P.J. (ed). *Plant hormones and their role in plant growth and development.* New York, Macmillan, 1987. p.593-613.

20. LANE, W.D. Regeneration of pear plants from shoot meristem-tips. *Plant Science Letters*, 16: 337-42, 1979.
21. LESHEN, B.; WERKER, E. & SHALEV, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Annals of Botany*, 62: 271-6, 1988.
22. LU, C.Y. The use of thidiazuron in tissue culture *in vitro*. *Cell Development Biology*, 29: 92-6, 1993.
23. MEYER, H.J. & Van STADEN, J. *In vitro* multiplication of *Ixia flexuosa*. *HortScience*, 6: 1070-1, 1988.
24. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-97, 1962.
25. NIEUWKERK, J.P. Van.; ZIMMERMAM, R.H. & FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. *HortScience*, 21: 516-8, 1986.
26. PASQUAL, M. & BARROS, I. de. Efeito de benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na proliferação e alongação de brotações micropropagadas em *Coffea arabica* L. *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 26: 201-4, 1991.
27. QI-GUANG, Y.; READ, P.E.; FELLMAN, C.D. & HOSIER, M.A. Effect of cytokinin, IBA and rooting regime on chinese chesnut cultured *in vitro*. *HortScience*, 21: 133-4, 1986.
28. RIBEIRO, L. de S. *Cultura in vitro* de embriões e segmentos nodais do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2001. 73p. (Dissertação de mestrado).
29. SANAGO, M.H.M.; SHATTUCK, V.I. & STROMMER, J. Rapid plant regeneration of pea using thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45: 165-8, 1996.
30. SONDAHL, M.R.; MONACO, L.C. & SHARP, W.R. *In vitro* methods applied to coffee. In: Thorpe, T.A. (ed). *Plant tissue culture: methods and applications in agriculture*. New York, Academic Press, 1981. p.325-47.
31. SONDAHL, M.R. & LOH, W.H.T. Coffee Biotechnology. In: Clarke, R.J. & Macrae, R. (eds.). *Coffee*. New York, Macmillan, 1987. V.4. p.235-64.
32. ZARR, J.B. & MAPES, M.O. Action of growth regulators. In: Bonga, J.M. & Durzan, D.J. (eds.). *Tissue culture in forestry*. 2nd ed. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.231-55.