

EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLICO E BENZILAMINOPURINA NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DO CAFEIEIRO CV. ACAIÁ¹

GLADYSTON RODRIGUES CARVALHO², MOACIR PASQUAL, RUBENS JOSÉ GUIMARÃES, ANTÔNIO NAZARENO GUIMARÃES MENDES³, LUIS EDUARDO CORRÊA ANTUNES e ANTÔNIO TADEU DA SILVA⁴

RESUMO - Objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃) e citocinina no crescimento *in vitro* de embriões do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cv. Acaiá. O experimento foi conduzido no laboratório de cultura de tecidos da Universidade Federal de Lavras. O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, em esquema fatorial 4 x 4, com quatro tubos por parcela e um embrião por tubo. Os tratamentos constituíram-se de diferentes concentrações de GA₃ (0, 2, 4 e 8 mg/L) e benzilaminopurina (BAP) (0, 2, 4 e 8 mg/L). Utilizou-se o meio de cultura MS solidificado, com 7 g/L de ágar e pH ajustado para 6,1 antes da autoclavagem. Os resultados mostraram que o aumento da concentração de GA₃ promove redução do enraizamento, e que sobre este processo, BAP não exerce influência. A citocinina BAP é dispensável para a cultura de embriões do cafeeiro, enquanto GA₃ contribui com o desenvolvimento desses embriões.

Termos para indexação: giberilina, citocinina, cultura de embriões, café, *Coffea arabica*.

EFFECT OF THE GIBBERELIC ACID AND BENZILAMINOPURINE ON THE *IN VITRO* GROWTH OF EMBRYOS OF COFFEE PLANTS CV. ACAIÁ

ABSTRACT - The objective of this work was to evaluate the effect of different concentrations of gibberellic acid (GA₃) and cytokinin on the *in vitro* growth of embryos of the coffee (*Coffea arabica* L.) plant cv. Acaiá. The experiment was done in the tissue culture laboratory of the Universidade Federal de Lavras (Federal University of Lavras). The experimental design used was in random blocks in 4 x 4 factorial scheme with four tubes per parcel and one embryo per tube. The treatments consisted of different concentrations of GA₃ (0, 2, 4 and 8 mg/L) and benzilaminopurine (BAP) (0, 2, 4, and 8 mg/L). The culture medium used was solidified MS with 7 g/L of agar and pH adjusted to 6.1 before autoclaving. The results showed that the increase of GA₃ concentration reduces rooting and the BAP does not influence this process. The cytokinin BAP is dispensable for the culture of the coffee plant embryos, while GA₃ contributes to their development.

Index terms: gibberellin, cytokinin, embryo cultures, coffee, *Coffea arabica*.

¹ Aceito para publicação em 2 de setembro de 1997.

Financiado pela FAPEMIG.

² Eng. Agr., aluno do curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG.

³ Eng. Agr., Dr., Dep. de Agricultura, UFLA. E-mail: xvcbf@ufla.br

⁴ Eng. Agr., M.Sc., aluno do curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, UFLA.

INTRODUÇÃO

Com o uso das técnicas de cultura *in vitro* é possível fazer estudos dos fatores que influenciam tanto o crescimento dos embriões como o dos primórdios de órgãos em plântulas e os aspectos metabólicos e bioquímicos da germinação e dormência. Do ponto de vista prático, embriões cultivados *in vitro* permitem: estudar as necessidades nutricionais e físicas para o seu desenvolvimento; superar a dormência em certos tipos de sementes; testar a viabilidade das sementes; obter híbridos interespecíficos viáveis; aplicar *in vitro* técnicas de duplicação cromossômica (Pasqual & Pinto, 1988).

O embrião maduro, com raras exceções, é uma estrutura bipolar plenamente desenvolvida, que consiste de um meristema em cada extremidade; radícula ou primórdio radicular e plúmula ou primórdio foliar, e apêndices laterais, os cotilédones (Pasqual & Pinto, 1988).

Os embriões estão localizados num ambiente estéril dentro do óvulo, e portanto, antes de sua remoção basta desinfestar a superfície externa da semente que contém o óvulo, ou mesmo do fruto que contém as sementes. Por esta razão, o índice de contaminação em cultura de embriões é, geralmente, muito menor do que em outros tipos de cultura *in vitro*. Considerando que os tecidos que envolvem os embriões serão eliminados, pode-se usar uma desinfestação relativamente severa, embora não necessária.

Um princípio que governa a germinação da semente é o gradual aumento do tamanho e a proporcionalidade de crescimento de suas diferentes partes para produzir uma planta. A semente de café possui uma germinação lenta. Geralmente, a emergência das plântulas demora, em média, 50 a 60 dias, a contar da sementeira, e por isso, qualquer técnica que proporcione uma redução no tempo de emergência, ou que possibilite a identificação dos fatores responsáveis por esta demora, é de grande interesse.

Reguladores de crescimento não são normalmente requeridos na cultura de embriões, exceto na cultura de embriões muito jovens de algumas espécies, na qual são adicionados para suprimir a germinação precoce ou estimular o crescimento embriônico. Dentre os grupos de reguladores conhecidos destacam-se, para esta função, as giberelinas e citocininas (Norstog, 1972; Custers, 1982).

Existem muitas informações sobre os efeitos do ácido giberélico (GA) em embriões maduros extraídos de sementes dormentes que não germinam mesmo em condições ideais.

Sabe-se que as giberelinas têm um papel-chave na germinação de sementes, pois estão envolvidas na quebra de dormência e na síntese de enzimas hidrolíticas, como amilase e outras envolvidas no processo de mobilização de reservas do endosperma para o embrião (Alvarenga, 1990). Em sementes dormentes, sob vários tratamentos envolvendo aplicação das giberelinas externamente, as mais efetivas foram GA₃ e GA₄₊₇ (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989).

Segundo Kochba et al. (1974), a presença de ácido giberélico no meio de cultura proporciona a iniciação de uma zona meristemática radicular, ou estimula o desenvolvimento de uma zona radicular existente.

Adicionando 1mg/L de GA₃ ao meio de crescimento, Nemeth (1979), citado por George (1993), aumentou a formação de raízes em brotações *in vitro* de *Prunus salicina* Lindl. Resultados semelhantes foram observados por Anand et al. (1972), citado por George (1993), que encontraram maior taxa de enraizamento em brotações de *Coffea arabica* L. após tratamento em soluções contendo de 25 a 50 mg/L de GA₃. Entretanto, segundo George (1993), apesar de contribuir em alguns casos para a formação de raízes, a presença de GA₃ no meio de cultura freqüentemente impede ou diminui a formação de raízes. Segundo Putz (1971), citado por George (1993), a inibição no desenvolvimento do sistema radicular ocorre, principalmente se a concentração de GA₃ utilizada promover o crescimento de meristemas isolados ou extremidades de brotações.

Maestri & Vieira (1961) afirmam que as giberelinas aceleram a germinação e emergência de sementes de diversas espécies, mas não têm efeito sobre outras. Ao trabalharem com maceração de sementes de café, com e sem pergaminho, em soluções contendo ácido giberélico, observaram, em ambos os tipos de sementes, que ao aumentar a concentração do regulador ocorreu uma diminuição na porcentagem de sementes germinadas. Talvez o ácido giberélico tenha causado toxidez às sementes de café, ocasionando sua morte ou inibindo a germinação, e as sementes morreram em virtude de uma permanência demasiadamente longa na sementeira.

Resultado semelhante foi encontrado em experimento realizado por Takaki et al. (1979), em que sementes tratadas com ácido giberélico tiveram redução da porcentagem de germinação. Para estes autores, a redução ocorreu em decorrência do aumento da atividade de algumas enzimas (celulase e outras), graças ao regulador, as quais atuaram degradando material da parede celular.

Em cafeeiro, tem sido observado que a giberelina atua inibindo a retomada do crescimento do embrião, e que a citocinina atua de forma benéfica neste crescimento. Valio (1976) afirma que uma elevada taxa de germinação está relacionada com baixos teores de substâncias semelhantes ao ácido abscísico e giberélico e com altas concentrações de substâncias semelhantes às citocininas.

Segundo Alvarenga (1990), as citocininas podem funcionar como agentes quebradores de dormência, em alguns casos, e, até mesmo, substituir a necessidade de luz em espécies fotoblásticas positivas, como é o caso da alfaca. Podem, ainda, promover a germinação de sementes fotoblásticas negativas, como no caso do maxixe, e inibir o efeito de certos inibidores de germinação, como, por exemplo, o ácido abscísico, em sementes de café.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico e benzilaminopurina no crescimento *in vitro* de embriões do cafeeiro cv. Acaia.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de cultura de tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais.

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com GA₃ (ácido giberélico) nas dosagens de 0, 2, 4 e 8 mg/L, e BAP (Benzilaminopurina) nas dosagens de 0, 2, 4 e 8 mg/L. O meio foi solidificado com 7 g por litro de ágar, sendo seu pH aferido para 6,1 antes da autoclavagem. Após preparado, o meio foi distribuído em tubos de ensaio (10 mL/tubo) com dimensões de 25 x 150 mm. Os tubos foram fechados com tampa de plástico e esterilizados em autoclave horizontal, à temperatura de 120°C (1,3 kg/cm³), durante 20 minutos. Para a retirada dos embriões, as sementes sem pergaminho de *Coffea arabica* cv. Acaia foram previamente embebidas em água destilada, por 15 horas. Posteriormente, procedeu-se à desinfestação com álcool 70%, por 1 minuto, e com hipoclorito de sódio puro, por 30 minutos. Em seguida, as sementes foram levadas para câmara de fluxo laminar e retirados os embriões, com auxílio de lupa, pinça e bisturi. Após a inoculação dos embriões, os tubos foram fechados e levados para a sala de crescimento, à temperatura constante de 27°C ± 1°C e 3.000 lux de iluminação, com fotoperíodo de 16 horas de luz.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com os tratamentos (doses de GA₃ e BAP) em esquema fatorial 4 x 4, com quatro tubos por parcela e um embrião por tubo. As avaliações foram feitas 30 dias após a inoculação, observando-se a presença de raiz e o primeiro e segundo pares de folhas. Para análise adotaram-se as seguintes notas: 1, para as parcelas com 0 de emergência; 2, para um explante, com qualquer emergência; 3, para dois explantes, com qualquer emergência; 4, para três explantes, com qualquer emergência; e 5, para quatro explantes, com qualquer emergência. Os dados, obtidos pelo sistema de notas, foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se, pelos resultados obtidos mediante análise de variância (ANAVA), que, quanto à característica emergência de raiz, houve diferença significativa apenas no que diz respeito ao fator GA₃.

A adição de GA₃ afetou o processo da emergência das raízes, uma vez que com o aumento do nível desta substância um menor número de explantes apresentou raízes (Fig. 1). Estes resultados corroboram afirmações de George (1993), segundo o qual a presença de GA₃ no meio de cultura impede ou diminui a formação de raízes, o que contradiz as afirmações de Anand et al. (1972), citados por George (1993), Kochba et al. (1974) e Nemeth (1979), citado por George (1993), que observaram respostas favoráveis no tocante ao enraizamento, quando da presença de GA₃ no meio de cultura.

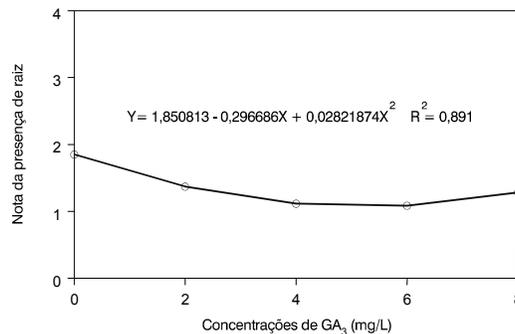


FIG. 1. Notas da presença de raiz em relação as concentrações de ácido giberélico (GA₃).

Ainda, pelos resultados da ANAVA, observou-se que quanto a esta característica não ocorreu efeito significativo de BAP, o que confirma que esta citocinina não está envolvida nos processos de rizogênese, e corrobora afirmações de Ben-Jaacov et al. (1991), de que altas concentrações de citocinina geralmente inibem ou atrasam a formação de raízes e também evitam o crescimento e os efeitos benéficos das auxinas sobre a iniciação radicular.

Analisando a Fig. 2, verifica-se, quanto à característica primeiro par de folhas, interação significativa entre os fatores GA₃ e BAP. Nota-se que um maior número de embriões apresentou o primeiro par de folhas no tratamento com 6 mg/L de GA₃ e 8 mg/L de BAP. Contudo, verifica-se também uma tendência de

superioridade no tratamento envolvendo apenas a concentração 6 mg/L de GA₃, o que indica que a citocinina BAP não influi no aparecimento das primeiras folhas, e que a BAP é dispensável na cultura de embriões no cafeeiro, quando se trata da emergência de folhas. Entretanto, em outras espécies, o efeito de BAP foi observado (Kitto & Young, 1981) em relação à presença de folhas.

O GA₃ foi de grande importância para emergência de folhas. No entanto, ao se avaliar o seu efeito nas raízes (Fig. 1) e folhas (Fig. 2), notou-se uma inversão, pois à medida que aumentou a presença de folhas, a emergência de raízes nos embriões diminuiu. Estes resultados corroboram afirmações feitas por Putz (1971) citado por George (1993), de que a inibição no crescimento do sistema radicular causado pela presença de GA₃ no meio de cultura é diretamente proporcional ao estímulo promovido pelo mesmo regulador no crescimento da parte aérea.

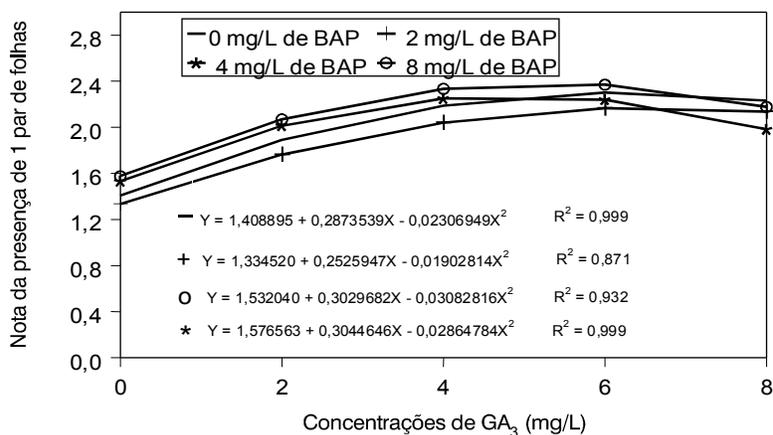


FIG. 2. Efeito das concentrações de ácido giberélico (GA₃) sobre a presença de 1 par de folhas em relação às concentrações de benzilaminopurina (BAP).

O efeito do GA₃ sobre o crescimento da parte aérea pode ser também observado na Fig. 3. Sua presença no meio de cultura apresentou resposta positiva sobre a característica presença do segundo par de folhas. Estes resultados confirmam afirmações de Norstog (1972) e Custers (1982), que apontaram as giberelinas como um dos grupos de reguladores de crescimento capaz de atuar no embrião, estimulando seu crescimento.

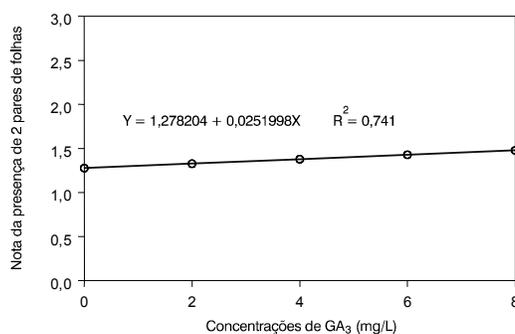


FIG. 3. Notas da presença do segundo par de folhas em relação às concentrações de ácido giberélico (GA₃).

CONCLUSÕES

1. O aumento da concentração de ácido giberélico promove redução do enraizamento; sobre este processo, a benzilaminopurina não exerce influência.
2. A adição de ácido giberélico no meio de cultura contribui para o desenvolvimento de embriões de cafeeiro.

3. É pequeno o ganho provocado pela benzilaminopurina no desenvolvimento dos em-briões de cafeeiro.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, A.A. de. **Substâncias de crescimento e regulação do desenvolvimento vegetal**. Lavras: ESAL, 1990. 56p.
- BEN-JAACOV, J.; ACKERMAN, A.; TAL, E.; JACOBS, G. Vegetative propagation of *Alberta magna* by tissue culture and grafting. **HortScience**, v.26, n.2, p.74-75, 1991.
- CUSTERS, J.B.M. *In vitro* culture of embryos of *Cucumis zeyheri* Sond. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, v.5, p.54-56, 1982.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. The technology. 2.ed. Edington: Exegetics, 1993. Part 1. 574p.
- KITTO, S.L.; YOUNG, M.J. *In vitro* propagation of "Carrizo Citrange". **Hortscience**, v.16, n.3, p.305-306, 1981.
- KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C.H.; KOCHABA, M. Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberellic acid and adenini sulphate. **Annals of Botany**, New York, v.38, p.795-802, 1974.
- MAESTRI, M.; VIEIRA, C. Nota sobre a redução da percentagem de germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L. var. Bourbon), por efeito do ácido giberélico. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v.11, p.247-249, 1961.
- MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. Germination stimulators and inhibitors: Their effects and their possible regulatory role. In: MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The Germination of seeds**. 4.ed. Toronto: Pergamon Press, 1989. Cap.6, p.174-178.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NORSTOG, K.J. Factors relating to precocious germination in cultured barley embryos. **Phytomorphology**, v.22, p.134-139, 1972.
- PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P. **Cultura de embriões**. Piracicaba: ESALQ, 1988. 13p.
- TAKAKI, M.; DIETRICH, S.M.C.; FURTADO, J.S. Anatomical changes in the hard endosperm of gibberellic acid treated coffee seeds during germination. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.2, p.103-106, 1979.
- VALIO, I.F.M. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo). **Journal of Experimental Botany**, London, v.27, n.100, p.983-991, Oct. 1976.