

## NOTA PRÉVIA

INFLUÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NO DESENVOLVIMENTO RADICULAR DE SEMENTES DE *Coffea arabica* L. 'RUBI' IN VITRO

Guilherme Araújo Lacerda<sup>1</sup>, Antonio Chalfun-Júnior<sup>2</sup>, Luciano Vilela Paiva<sup>3</sup>, Emanuelle Ferreira Melo<sup>4</sup>, Anderson Castro Soares de Oliveira<sup>5</sup>, Juliana Costa de Rezende<sup>6</sup>

(Recebido: 25 de março de 2008; aceito: 5 de maio de 2008)

**RESUMO:** Avaliou-se o efeito de reguladores de crescimento na germinação e enraizamento *in vitro* de sementes de cafeeiro Rubi (*Coffea arabica* L. 'Rubi'). Sementes de plantas adultas de cafeeiro foram inoculadas em meio MS/2 + 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. Foram testados quatro tratamentos: T1 - controle; T2 - 6 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T3 - 6 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T4 - 5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. O melhor tratamento obtido para enraizamento de sementes de cafeeiro foi o controle (MS/2 + ágar + sacarose), tornando-se desnecessária a adição de reguladores de crescimento.

Palavras-chave: Ácido naftaleno acético, benzilaminopurina, ácido giberélico, plântula, micropropagação, *Coffea arabica*.

EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS ON ROOT DEVELOPMENT IN *Coffea arabica* L. 'RUBI' SEEDS GROWN IN VITRO

**ABSTRACT:** It was evaluated the effect of plant growth regulators in the root development in coffee seeds cv. Rubi (*Coffea arabica* L. 'Rubi') grown in vitro. Coffee seeds from adult plants were established on medium MS/2 + sucrose (20 g L<sup>-1</sup>) + agar (6 g L<sup>-1</sup>). Four treatments were tested: T1 - control; T2 - BAP (6 mg L<sup>-1</sup>) + NAA (0,1 mg L<sup>-1</sup>); T3 - BAP (6 mg L<sup>-1</sup>); T4 - GA<sub>3</sub> (5 mg L<sup>-1</sup>). The highest rooting response was observed on the control (MS/2 + agar + sucrose). This suggest that rooting can be achieved without the use of plant growth regulators.

Key words: Naftalen acetic acid, benzilaminopurin, gibberellic acid, seedling, micropropagation, *Coffea arabica*.

## 1 INTRODUÇÃO

As sementes de cafeeiro têm uma germinação lenta e variável, o que dificulta severamente a produção de mudas para a estação chuvosa seguinte. Geralmente, a emergência das plântulas demora, em média, de 50 a 60 dias, a contar da semeadura, e, por isso, qualquer técnica que proporcione uma redução no tempo de emergência, ou que possibilite a identificação dos fatores responsáveis por essa demora, é de grande interesse.

O meio de cultura "MS" (MURASHIGE & SKOOG, 1962) é o mais utilizado na propagação *in vitro* de *C. arabica*, promovendo resultados positivos

na multiplicação de segmentos nodais e desenvolvimento de embriões.

Segundo Kochba et al. (1974), a presença de ácido giberélico no meio de cultura proporciona a iniciação de uma zona meristemática radicular e/ou estimula o desenvolvimento de uma zona radicular existente. As giberelinas possuem um efeito notável no alongamento do caule primário e esse efeito em tecidos e no centro de crescimento (meristemas) é caracterizado por um aumento no tamanho das células, ou alta taxa de divisão celular, ou ambas (NICKELL, 1982). Em alguns casos, o ácido giberélico teria sido usado para a conversão de embriões somáticos em plantas (GUERRA et al., 1998).

<sup>1</sup>Biólogo, Mestre em Biotecnologia, Doutorando em Agronomia/Fisiologia Vegetal – Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – guilherme.lacerda@posgrad.ufla.br

<sup>2</sup>Engenheiro Agrônomo, PhD, Professor Adjunto do Departamento de Biologia/DBI – Setor de Fisiologia Vegetal – Universidade Federal de Lavras/UFLA – chalfunjunior@ufla.br

<sup>3</sup>Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Adjunto do Departamento de Química/DQI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – luciano@ufla.br

<sup>4</sup>Engenheira Agrônoma, Mestranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal – Setor de Fisiologia Vegetal – Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA.

<sup>5</sup>Matemático, Mestre em Estatística, Doutorando em Estatística – Departamento de Ciências Exatas/DEX – Universidade Federal de Lavras/UFLA.

<sup>6</sup>Engenheira Agrônoma, Mestre em Fitotecnia, Pesquisadora Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais/EPAMIG – julianacosta@epamig.br

Segundo Zimmerman (1993), as auxinas desempenham papel essencial no desenvolvimento de embriões. As principais auxinas utilizadas são: ácido indolacético (AIA), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2-4D), ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA) (GEORGE, 1993).

As citocininas atuam na divisão celular, sendo necessárias na regulação da síntese de proteínas que estão diretamente relacionadas com a formação de fibras do fuso mitótico (GEORGE & SHERRINTON, 1984). As principais citocininas utilizadas são: 6-benzilaminopurina (BAP), isopentiladenina (2iP), e zeatina (ZEA) (GEORGE, 1993).

O conhecimento dos aspectos fisiológicos do sistema radicular é condição obrigatória para a obtenção de plantas transformadas de cafeeiro por *Agrobacterium rhizogenes* (Riker et al., 1930) Conn, 1942. Dessa forma, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas para entender as causas da lenta e desuniforme germinação de sementes de cafeeiro. Diante dos fatos, avaliou-se o efeito dos reguladores de crescimento na germinação e enraizamento *in vitro* de sementes de *Coffea arabica* L. cv. Rubi.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras - UFLA. Frutos de plantas adultas de *Coffea arabica* cv. Rubi foram colhidos no campo experimental de cafeicultura da UFLA, despulpados mecanicamente, fermentados e as sementes foram secas até 12% de conteúdo de água (base úmida). As sementes tiveram os pergaminhos removidos manualmente e armazenadas à temperatura de 10°C, por 3 meses, até a sua utilização.

No preparo dos meios, foram utilizadas soluções-estoque armazenadas em frascos de vidro escuro, a temperaturas em torno de 5°C. Os meios foram solidificados com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e suplementados com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, sendo o pH ajustado para 5,8 ± 0,1, utilizando-se NaOH 0,5N a 0,1N ou HCl 0,5N a 0,1N e, então, distribuídos em tubos de ensaio, cada um recebendo 15 mL.

Os tubos foram vedados com tampas plásticas translúcidas antes do processo de autoclavagem a 121°C e 1 atm, por 20 minutos.

Após o resfriamento, o meio foi levado à câmara de fluxo laminar desinfestada com álcool 70% (etanol), onde foi feita a inoculação das sementes. As sementes ficaram embebidas em água destilada por cerca de 24 horas, para facilitar a germinação dos embriões; para a desinfestação, elas foram imersas em solução de álcool 70% por um minuto e, a seguir, em hipoclorito de sódio 1% durante 20 minutos. Em seguida, foram lavadas com água destilada autoclavada por três vezes em câmara de fluxo laminar.

O experimento consistiu de quatro tratamentos: T1 – (MS/2) MS com metade da concentração de seus sais e vitaminas, suplementado com ágar 6 g L<sup>-1</sup> e sacarose 20 g L<sup>-1</sup> (controle); T2 – T1 suplementado com 6 mg L<sup>-1</sup> de BAP mais 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T3 – T1 suplementado com 6 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T4 – T1 suplementado com 5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. Após a inoculação, os tubos foram vedados com parafilme e mantidos em câmara de germinação, sob condições de obscuridade e com temperatura de 30 ± 1°C.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis repetições e um tubo por parcela, cada tubo contendo uma semente. A avaliação do experimento foi realizada 41 dias após a instalação, por meio da presença ou não do sistema radicular, da massa fresca e da massa seca da plântula. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo software R (R DEVELOPMENTO CORE TEAM, 2007), pacote agricolae, sendo os efeitos dos tratamentos comparados pelo teste LSD ao nível nominal de 5%.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve formação de um sistema radicular eficiente apenas para T1, apresentando raiz pivotante e raízes laterais (Figura 1A).

No tratamento T2, que associou BAP e ANA (Figura 1B), observou-se crescimento dos cotilédones, e não de radícula, o que não ocorreu em nenhum dos outros tratamentos. Provavelmente a relação citocininas/auxinas foi muito alta neste tratamento, pois, segundo Ben-Jaacov et al. (1991), 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.



**Figura 1** – Aspecto morfológico do crescimento radicular de sementes de *Coffea arabica* cv. Rubi germinadas *in vitro*, 41 dias após o início dos tratamentos. A) T1 – MS saís e vitaminas, suplementado com ágar 6 g L<sup>-1</sup> e sacarose 20 g L<sup>-1</sup> (controle); B) T2 – T1 suplementado com 6 mg L<sup>-1</sup> de BAP mais 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA; C) T3 – T1 suplementado com 6 mg L<sup>-1</sup> de BAP; D) T4 – T1 suplementado com 5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. Barras = 1 cm

Apesar de ter ocorrido a formação da alça hipocotiledonar com o tratamento T3, não foi observada a formação de um sistema radicular eficiente, já que essa formação não indicou um sistema radicular completamente formado (Figura 1C). Esses resultados corroboram os dados obtidos por Carvalho et al. (1998) que, trabalhando com embriões do cafeeiro cv. Acaíá, observaram que o BAP não exerce influência sobre o enraizamento.

O tratamento T4 não apresentou formação de sistema radicular (Figura 1D). Esses resultados estão de acordo com a afirmação de George (1993), segundo o qual a presença de GA<sub>3</sub> no meio de cultura impede ou diminui a formação de raízes, e de Carvalho et al. (1998), que observaram que a adição de GA<sub>3</sub> reduziu o processo da emergência das raízes.

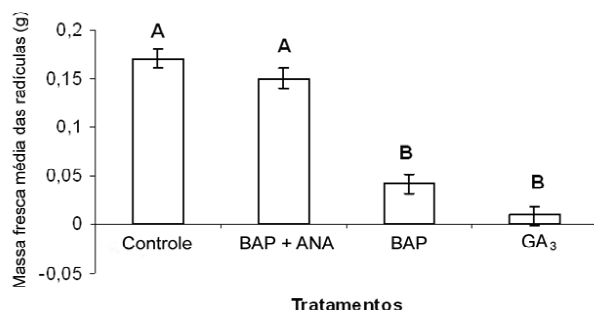
Entretanto, Silva (2002) observou que a formação da radícula depende da síntese de giberelinas endógenas, sendo essas necessárias para promover o seu enlorgamento. Segundo Kochba et al. (1974), a presença de ácido giberélico no meio de cultura proporciona a iniciação de uma zona meristemática radicular ou estimula o desenvolvimento de uma zona radicular existente.

Na Figura 2 observa-se a diferença entre a matéria fresca média das raízes de *Coffea arabica* cv. Rubi.

Por meio dessa análise, verifica-se que os tratamentos T1 e T2 são estatisticamente diferentes dos tratamentos T3 e T4, inferindo-se, indiretamente, que a atuação isolada de uma citocinina sintética, como o BAP (6-benzilaminopurina), na concentração de 6 mg L<sup>-1</sup>, tem efeito inibitório sobre a formação radicular, assim como o ácido giberélico, GA<sub>3</sub> (T4). Porém, observamos que a mesma concentração de BAP, associada a 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético), possui atividade semelhante ao tratamento-controle, porém, sem a formação de um sistema radicular eficiente (Figuras 1A e 1B).

Adicionando 1 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> ao meio de crescimento, Nemeth (1979), citado por George (1993), obteve aumento na formação de raízes em brotações *in vitro* de *Prunus salicina* Lindl. Resultados semelhantes foram observados por Anand et al. (1972), citados por George (1993), que encontraram maior taxa de enraizamento em brotações de *Coffea arabica* após tratamento em soluções contendo de 25 a 50 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>.

Entretanto, segundo George (1993), apesar de contribuir em alguns casos para a formação de raízes, a presença de GA<sub>3</sub> 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,



**Figura 2** – Efeito de reguladores de crescimento sobre a formação de raízes em sementes de *Coffea arabica* cv. Rubi germinadas *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste LSD, para matéria fresca. A barra indica o desvio-padrão entre as repetições de cada tratamento.

principalmente, se a concentração de GA<sub>3</sub> utilizada promover o crescimento de meristemas isolados ou extremidades de brotações.

De acordo com Valio (1976), em cafeeiro, tem sido observado que a giberelina atua inibindo a retomada do crescimento do embrião, e que a citocinina atua de forma benéfica nesse crescimento. Esse mesmo autor 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.

#### 4 CONCLUSÃO

O melhor tratamento obtido para germinação e enraizamento de sementes de cafeeiro cv. Rubi foi no meio MS/2, suplementado com ágar e sacarose. Nenhum dos tratamentos que utilizaram reguladores de crescimento contribuiu para melhorar o crescimento radicular.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEN-JAACOV, J.; ACKERMAN, A.; TAL, E.; JACOBS, G. Vegetative propagation of *Albertya magna* by tissue culture and grafting. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 2, p. 74-75, 1991.

CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; ANTUNES, L. E. C.; SILVA, A. T. Efeito

do ácido giberélico e Benzilaminopurina no crescimento *in vitro* de embriões do cafeeiro cv. Acaia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 847-851, 1998.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**: part. 1, the technology. 2. ed. Edington: Exegetis, 1993. 574 p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. v. 2, p. 533-568.

KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C. H.; KOCHABA, M. Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberelic acid and adenine sulphate. **Annals of Botany**, London, v. 38, p. 795-802, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NICKELL, L. G. Plant growth substances. **Encyclopedia of Chemical Technology**, v. 18, p. 1-23, 1982.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R, a language and environment for statistical computing**, R Foundation for Statistical Computing. Vienna, 2007.

SILVA, E. A. A. da. **Coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation**. 2002. 105 f. Thesis (PhD) - Wageningen University, Wageningen, 2002.

VALIO, I. F. M. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L.) cv. Mundo Novo. **Journal Experimental of Botany**, Orford, v. 27, n. 100, p. 983-999, Oct./Nov. 1976.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1411-1423, Oct. 1993.