

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS  
MICRÓSPOROS, PRÉ-TRATAMENTOS E 2,4-D NO  
CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE CAFEIEIRO**

**ELISÂNGELA RODRIGUES FIGUEIRA**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas

**UBERLÂNDIA- MG  
SETEMBRO- 2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS  
MICRÓSPOROS, PRÉ-TRATAMENTOS E 2,4-D NO  
CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE CAFEIEIRO**

**ELISÂNGELA RODRIGUES FIGUEIRA**

**PROF. DR. JOSÉ MAGNO QUEIROZ LUZ  
ORIENTADOR**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

**UBERLÂNDIA- MG  
SETEMBRO- 2002**


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS  
MICRÓSPOROS, PRÉ-TRATAMENTOS E 2,4-D NO  
CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE CAFEIEIRO**

**ELISÂNGELA RODRIGUES FIGUEIRA**

Aprovado pela Banca Examinadora em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Nota \_\_\_

  
\_\_\_\_\_  
**PROF. DR. JOSÉ MAGNO QUEIROZ LUZ**  
**ORIENTADOR**

  
\_\_\_\_\_  
**PROFA. MSC. ALCIONE DA SILVA ARRUDA**

  
\_\_\_\_\_  
**PROF. MSC. CÍCERO DONIZETE PEREIRA**

Uberlândia, \_\_\_ de \_\_\_ de 2002.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por iluminar meus caminhos, os já percorridos e aqueles que ainda desconheço.

A Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Ao Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz pela orientação e aos Prof<sup>as</sup>. Msc. Alcione da Silva Arruda e Cícero Donizete Pereira pelas valiosas informações.

Às amigas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Adelaide, Gláucia, Patrícia e Luciana, pelo companheirismo e compreensão na realização do trabalho.

Ao Laboratório de Citologia, especialmente ao Dálcio e Ana Alice, na preciosa colaboração para a realização de um dos experimentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Denise Garcia Santana pelo auxílio nas análises estatísticas.

À 48<sup>a</sup> turma de Ciências Biológicas pelos anos de convivência e aprendizado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O *Coffea arabica* apresenta poucos progressos quanto à aplicação da cultura de anteras. Foram avaliados o estágio ideal do explante e o efeito dos pré-tratamentos por choque frio(4°C), de calor(35°C), e à temperatura ambiente de botões florais e a influência do regulador de crescimento 2,4-D na indução de embriões em anteras de cafeeiro. Foram utilizados três cultivares de *Coffea arabica* L., Mundo Novo, Catuaí Vermelho 44 e 99. Os botões florais foram coletados e analisados citologicamente; para os pré-tratamentos, os mesmos foram desinfestados e as anteras inoculadas em meio MS suplementado com 2,4-D nas concentrações 0,005, 0,05, 0,5 e 5,0 µM. O delineamento experimental foi de blocos casualizados, com 4 repetições por tratamento, constituindo cada placa uma parcela, composta de 20 anteras por placa. A análise das cultivares estudadas demonstrou que existe uma relação entre o comprimento do botão floral com as anteras e com o estágio de desenvolvimento dos micrósporos. Em algumas, após o intumescimento, manifestou-se uma pequena calosidade, mas estas e as demais oxidaram e morreram. A cultivar Catuaí 99 apresentou os melhores resultados.

**Palavras-chave:** anteras, *Coffea arabica*, cultivo *in vitro*.

## ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- O Cafeeiro ( <i>Coffea arabica</i> L.) .....	1
1.2- Importância econômica.....	2
1.3- Cultura de tecidos.....	3
1.4- A contaminação na cultura de tecidos vegetais.....	5
1.5- Cultura de tecidos de café.....	6
1.6- Cultura de anteras e melhoramento genético no cafeeiro.....	8
2- MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1- Relação entre os estádios de desenvolvimento dos micrósporos e as características morfológicas do botão floral.....	12
2.2- Avaliação dos pré-tratamentos de botões florais e do regulador de crescimento 2,4-D na indução de embriões em anteras de cafeeiro.....	13
2.2.1- Considerações gerais.....	13
2.2.2- Pré-tratamento por choque frio.....	14
2.2.3- Pré-tratamento por choque de calor.....	14
2.2.4- Temperatura ambiente (experimento controle).....	15
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
3.1- Relação entre os estádios de desenvolvimento dos micrósporos e as características morfológicas do botão floral.....	17
3.2- Avaliação dos pré-tratamentos de botões florais e do regulador de crescimento 2,4-D na indução de embriões em anteras de cafeeiro.....	23
3.2.1- Pré-tratamento por choque frio.....	23
3.2.2- Pré-tratamento por choque de calor.....	25
3.2.3- Temperatura ambiente (experimento controle).....	29
4- CONCLUSÕES.....	33
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do meio de cultura de Murashige & Skoog (1962).....	16
Tabela 2: Média do diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) dos micrósporos nos seus diferentes estádios de desenvolvimento para a cultivar Catuai vermelho 99, UFU/Uberlândia-MG, 2002.....	17
Tabela 3: Estádio de desenvolvimento dos micrósporos, de acordo com as diferentes classes de tamanho em relação ao comprimento (mm) e média dos botões florais (mm) e comprimento (mm) das anteras para a cultivar Mundo Novo, UFU/Uberlândia-MG, 2002....	18
Tabela 4: Estádio de desenvolvimento dos micrósporos, de acordo com as diferentes classes de tamanho em relação ao comprimento (mm) e média dos botões florais (mm) e comprimento (mm) das anteras para a cultivar Catuai Vermelho 44, UFU/Uberlândia-MG, 2002.....	18
Tabela 5: Estádio de desenvolvimento dos micrósporos, de acordo com as diferentes classes de tamanho em relação ao comprimento (mm) e média dos botões florais (mm) e comprimento (mm) das anteras para a cultivar Catuai Vermelho 99, UFU/Uberlândia-MG, 2002.....	19
Tabela 6: Percentagem de oxidação e contaminação nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuai vermelho 44 (CV44) e Catuai vermelho 99 (CV99) para o pré-tratamento por choque frio. UFU/Uberlândia-MG, 2002.....	23
Tabela 7: Intumescimento de anteras de cafeeiro nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuai vermelho 44 (CV44) e Catuai vermelho 99 (CV99) para o pré-tratamento por choque frio. UFU/Uberlândia-MG, 2002.....	24
Tabela 8: Primeira avaliação da oxidação de anteras de cafeeiro em diferentes doses de 2,4-D ( $\mu\text{M}$ ) e nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuai vermelho 44 (CV44) e Catuai vermelho 99 (CV99) no pré- tratamento por choque de calor. UFU/Uberlândia, 2002.....	26
Tabela 9: Segunda e terceira avaliações da oxidação de anteras de cafeeiro nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuai vermelho 44 (CV44) e Catuai vermelho 99 (CV99) para o pré-tratamento por choque de calor. UFU/Uberlândia-MG, 2002.....	28
Tabela 10: Contaminação de anteras de cafeeiro nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuai vermelho 44 (CV44) e Catuai vermelho 99 (CV99) para o pré-tratamento por choque de calor. UFU/Uberlândia-MG, 2002.....	28
Tabela 11: Oxidação de anteras de cafeeiro nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuai vermelho 44 (CV44) e Catuai vermelho 99 (CV99) à temperatura ambiente (experimento controle). UFU/Uberlândia-MG, 2002.....	30

Tabela 12: Contaminação de anteras de cafeeiro nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí vermelho 44 (CV44) e Catuaí vermelho 99 (CV99) à temperatura ambiente (experimento controle). UFU/Uberlândia-MG, 2002.....	30
Tabela 13: Intumescimento de anteras de cafeeiro nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí vermelho 44 (CV44) e Catuaí vermelho 99 (CV99) à temperatura ambiente (experimento controle). UFU/Uberlândia, 2002.....	31

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Média geral de oxidação, contaminação e intumescimento de anteras de cafeeiro antes e após o transplante no pré-tratamento por choque de calor. UFU/Uberlândia-MG, 2002.....	25
Figura 2: Primeira avaliação da oxidação de anteras de cafeeiro em diferentes doses de 2,4-D ( $\mu\text{M}$ ) para a cultivar Mundo Novo no pré- tratamento por choque de calor. UFU/Uberlândia-MG, 2002.....	27
Figura 3: Primeira avaliação da oxidação de anteras de cafeeiro em diferentes doses de 2,4-D ( $\mu\text{M}$ ) para a cultivar Catuaí vermelho 99 no pré- tratamento por choque de calor. UFU/Uberlândia-MG, 2002.....	27
Figura 4: Média geral de oxidação, contaminação e intumescimento de anteras de cafeeiro antes e após o transplante no experimento controle (temperatura ambiente). UFU/Uberlândia-MG, 2002.....	29



## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1-O CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae, na qual o gênero *Coffea* abrange cerca de 60 espécies, apresentando grande heterogeneidade entre elas. No entanto, possuem características diferenciadas quanto à forma dos frutos e flores, e resistência à diversas moléstias e pragas (GRANER & GODOY, 1967).

*Coffea arabica* L. é considerada uma espécie nobre, com café de boa qualidade, possuindo mais de 40 mutantes e muitas variedades. É tetraplóide, autofértil, ocorrendo 10 a 12% de fecundação cruzada. Apresenta raiz pivotante profunda e raízes secundárias ramificadas. O caule único e os ramos ortotrópicos podem dar origem às folhas e aos ramos plagiotrópicos. Os ramos plagiotrópicos dão origem às folhas e aos botões florais. Quando maduros, os frutos são drupas amareladas ou avermelhadas, possuindo superfície lisa, exocarpo delgado, mesocarpo carnoso e endocarpo fibroso. O endosperma possui uma película prateada, e na sua base aloja-se o embrião (GRANER & GODOY, 1967).

As folhas do cafeeiro apresentam coloração verde escura, são elípticas a lanceoladas, aparecem nos ramos laterais num mesmo plano e em posições opostas, inserindo-se cada uma no ramo por um pecíolo plano na parte superior e convexo na inferior. Cada inflorescência compreende duas a seis flores originadas em ramificações de um eixo floral formado numa

axila foliar de um ramo plagiotrópico. Um a três destes eixos florais, correspondentes a outras inflorescências, inserem-se normalmente em cada axila, formando glomérulos (CARDOSO, 1994).

Cada flor tem um pedúnculo, na extremidade do qual se situa o ovário; em coroa sobre este inserem-se as sépalas, semelhantes a folhas minúsculas, que formam o cálice. Acima deste sai a corola, constituída por cinco pétalas soldadas na base, formando um tubo cilíndrico. Do ovário sai o estilete que percorre o interior do tubo da corola até sair acima da superfície desta. Na sua extremidade contém o estigma. Os estames são em número de cinco e têm os filetes soldados com a base das pétalas. Nas suas extremidades encontram-se as anteras, que se apresentam sob a forma de bolsas alongadas, contendo os grãos de pólen, que são libertados por uma fenda longitudinal (CARDOSO, 1994).

No início dos estudos genéticos do gênero *Coffea* tomou-se como padrão a espécie *Coffea arabica* L., sendo primeiramente denominada de *C. arabica* var. *typica*, descrita por Linneu; atualmente denominada *Coffea arabica* var. *arabica* (CARVALHO, 1993; FAZUOLI, 1986).

Segundo ANDRADE (1998), *Coffea arabica* L. é nativo da região sudoeste da Etiópia, Sudão e Quênia. No Brasil, foi introduzido em 1727 pelo Sargento Francisco de Melo Palheta em Belém do Pará, em seguida levado para o Maranhão e Bahia, e posteriormente foi levado para o Rio de Janeiro, expandindo-se para o Vale do Paraíba, Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná, Mato Grosso e Rondônia (CARVALHO, 1993).

## 1.2- IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Em função dos enormes quantitativos atingidos pela procura mundial de café e dos seus preços favoráveis e também da plasticidade de adaptação ecológica revelada pelas suas espécies, variedades e formas cultivadas, o cafeeiro tornou-se, possivelmente, uma das plantas perenes que o homem atualmente cultiva em maior amplitude de condições ecológicas (CARDOSO, 1994).

As espécies mais comuns no mercado são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*; segundo FERRÃO *et al.* (2000), o café arábica corresponde a aproximadamente 70% do café comercializado no mundo e é produzido principalmente no continente americano.

O Brasil é o maior produtor mundial de café, sendo que a exportação deste produto representa uma significativa fonte de divisas para o país. Baseados nisso, os produtores têm

adotado novas tecnologias de condução e manejo da lavoura, a fim de aumentar a produtividade e, conseqüentemente, a margem de lucro (FARIA *et al.* 2001).

A importância da cafeicultura na economia brasileira pode ser avaliada pelo fato de abastecer o mercado interno e de contribuir com cerca de 6% do total do valor das exportações. Segundo CAIXETA (1999), a economia cafeeira movimenta no País, cerca de seis bilhões de reais por ano e gera pelo menos quatro milhões de empregos.

Minas Gerais é o maior produtor de café do Brasil, com cerca de 14 milhões de sacas na safra 1999/2000, que vendidas ao preço médio vigente, esse café proporcionará a Minas Gerais uma receita superior a dois bilhões de reais. O parque cafeeiro mineiro já superou o limite de 2,5 bilhões de pés plantados em 1 milhão de hectares, abrangendo mais de 80 mil propriedades e aproximadamente 60% dos municípios do estado, ou seja, 510 municípios (FLORIANI, 2000).

Nos países onde o café assume importância econômica, Instituições de pesquisa têm envidado esforços nos programas de melhoramento das espécies mais cultivadas. Segundo MENDES *et al.* (1998), os programas de melhoramento genético do cafeeiro têm selecionado cultivares de elevado potencial produtivo e valor agrônômico para as várias regiões produtoras do Brasil.

É o Brasil o país que soma o maior número de contribuições ao melhoramento genético do cafeeiro. Atuando desde o início da década de 1930, a Seção de Genética do IAC (Instituto Agrônômico de Campinas) vêm desenvolvendo um vasto programa de genética e de melhoramento do cafeeiro, tendo realizado quase todos os estudos de café e lançado as mais importantes cultivares plantadas nas várias regiões cafeeiras do Brasil e mesmo de outros países. Os estudos são concentrados na espécie *Coffea arabica*. A partir da década de 1970, outras instituições de Ensino e Pesquisa somaram-se ao IAC, nos vários Estados, num trabalho integrado e cooperativo. São exemplos a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e a Universidade Federal de Lavras (UFLA) (MENDES *et al.* 1998).

### 1.3 - CULTURA DE TECIDOS

O termo clonagem, hoje já incorporado ao cotidiano das pessoas, deriva etimologicamente do grego *klón*, que quer dizer “broto” e pressupõe “qualquer grupo de células ou organismos produzidos assexuadamente de um único ancestral sexuadamente

produzido". Essa tecnologia permite a obtenção de indivíduos geneticamente idênticos (ENTENDENDO..., 2001?).

Com a possibilidade da clonagem de plantas a partir de células somáticas o sonho do botânico austro-húngaro, Gottlieb Haberlandt, se tornou realidade. Em 1902, ele publicou a sua idéia sobre o princípio da "Teoria da Totipotência", que profeticamente postulou que os seres vivos têm capacidade de regenerar seus corpos inteiros a partir de células únicas. Nem ele, nem os seus discípulos da sua época não calcularam que suas tentativas abrissem novos horizontes para a humanidade, o que atualmente é aplicado na Biotecnologia vegetal. A técnica da clonagem *in vitro* de plantas é possível mediante a cultura de tecidos (ENTENDENDO..., 2001?).

Desde o início do século, a propagação de plantas *in vitro* tem atraído pesquisadores, que utilizam as técnicas de cultura de tecidos vegetais (TORRES *et al.* 1998), que são ferramentas importantes para solucionar problemas sanitários, que ocorrem com a propagação e o melhoramento genético de plantas (PARANHOS *et al.* 1996).

A Cultura de Tecidos é uma técnica que visa obter plantas a partir de explantes, os quais podem ser: meristemas, partes da folha, raízes, caules, anteras ou protoplastos. Essa técnica baseia-se na totipotencialidade celular, ou seja, na capacidade de uma célula qualquer da planta regenerar uma nova planta, visto que possui toda a informação genética necessária para isso (RIBEIRO, 1999).

Os explantes são estabelecidos em meios nutritivos conhecidos como meio de cultura, esses podem apresentar reguladores de crescimento ou fitohormônios, substâncias que regulam o comportamento *in vitro* da planta (RIBEIRO, 1999).

Na cultura de tecidos, a adição de hormônios no meio de cultura é de suma importância, pois reproduz o que ocorre naturalmente na planta. Combinações de dosagens dessas substâncias propiciam um melhor crescimento e desenvolvimento do explante (ANDRADE, 1998). A composição do meio de cultura e dos reguladores de crescimento presentes no mesmo, estão dentre os importantes fatores que determinam a regeneração de embriões haplóides (MORAES FERNANDES, 1990).

Os reguladores de crescimento são substâncias orgânicas, que apresentam como função básica a sua ação sobre o crescimento e em alguns tipos de organogênese. Os principais grupos são as auxinas e citocininas. Dentre as auxinas tem-se o Ácido indol - 3 - butírico (AIB) e o Ácido 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4 - D). Com relação as citocininas, as mais usadas são a 6 - benzilaminopurina (BA, BAP) e a Cinetina (KIN). O Thidiazuron

(TDZ) é um regulador de crescimento, derivado de uréia, sendo de composição química *N*-phenil-*N*'-1,2,3-thiadiazol-5-iluréia, com estrutura não contendo anel purínico, ao contrário do que acontece nas citocininas. Inicialmente este composto foi registrado como desfolhante de algodão e mais recentemente foi reportado como tendo ação citocinínica, e por isto, tem sido cada vez mais usado no cultivo *in vitro* (ANDRADE, 1998).

Um dos meios básicos utilizado em diversas culturas é chamado de "MS", em referência aos seus autores, MURASHIGE & SKOOG (1962). Um meio de cultura deve conter macro e microelementos, água, aminoácidos, vitaminas e reguladores de crescimento, podendo ainda ser líquido ou sólido através da adição de ágar (ANDRADE, 1998).

Sua composição é de grande importância para o sucesso da cultura de anteras, não existindo contudo, uma recomendação generalizada. Na maioria das espécies a androgênese se verifica em meio que contém sais minerais, sacarose, vitaminas, reguladores de crescimento e ágar (MORAES FERNANDES, 1990). A consistência do meio, normalmente é sólida, mas os meios líquidos estão sendo cada vez mais usados, pois tem vantagens no aumento do rendimento pela maior obtenção de embriões e calos (PIERIK, 1987). Com o contínuo aumento dos estudos com o cultivo *in vitro* de vegetais, recentemente uma das linhas que está sendo explorada é a composição e a influência de gases nos recipientes de cultivo, bem como a adição de componentes ao meio de cultura que influenciam na formação e ação destes gases, que por sua vez irão afetar diretamente a resposta do explante, principalmente no que diz respeito à embriogênese.

Com relação às condições ótimas de incubação, principalmente temperatura e iluminação, dependem da espécie e mesmo do genótipo. Geralmente as temperaturas ideais variam entre 20 e 28°C, sendo que a pré-incubação em baixas temperaturas é relatada como benéfica para muitas espécies (MARTINEZ *et al.* 1989).

#### 1.4- A CONTAMINAÇÃO NA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

O termo patógeno é comumente usado, segundo HERMAN (1996), para descrever organismos que causam doenças em plantas, também prejudiciais para o cultivo *in vitro*.

Segundo DEBERGH & ZIMMERMAN (1991), um grande problema da cultura de tecidos vegetais é o índice de contaminação que pode ser resultante das próprias matrizes ou do manuseio em laboratório. Assim, muitos pesquisadores, como HERMAN (1996), se preocupam com a detecção, identificação e caracterização de contaminantes na cultura de

tecidos vegetais, tentando controlá-los e, até mesmo, discutir a influência desses microrganismos.

A interação entre plantas e microrganismos pode estimular o crescimento vegetal, seja por competição com patógenos ou por indução de efeitos de outros microrganismos úteis ocasionando o benefício às plantas (ARRUDA, 2000). Entretanto, DE FOSSARD (1985), defende a idéia de que todos os contaminantes são potencialmente prejudiciais para cultura de tecidos, assim, faz-se necessária uma esterilização absoluta dos explantes.

As contaminações por microrganismos, em cultura de tecidos, principalmente por fungos e bactérias, podem advir do manuseio do material em laboratório ou dos próprios explantes (ARRUDA, 2000).

Nesse sentido, pesquisas contribuem para a identificação de “vitropatógenos”, visando a eliminação dos microrganismos. Vários métodos para o controle da contaminação dos explantes, tem sido apontados como a radiação a laser, o tratamento com água corrente, água quente, a dupla desinfecção, a desinfecção interna, o uso de antibióticos no meio de cultura, a termoterapia, a quimioterapia e o uso de múltiplos procedimentos (HERMAN, 1996).

Os antibióticos e fungicidas são ocasionalmente utilizados para o controle *in vitro* de patógenos. POLLOCK *et al.* (1983), demonstraram que o uso de certos antibióticos, são eficientes no controle de bactérias. Entretanto, o uso dos mesmos e de fungicidas para o controle *in vitro* de bactérias contaminantes, tem sido limitado devido a grande toxicidade para as células de plantas (ARRUDA, 2000).

### **1.5- CULTURA DE TECIDOS DE CAFÉ**

STARITSKY (1970) foi o primeiro a trabalhar com a cultura de café “*in vitro*”, tendo utilizado segmentos ortotrópicos de duas espécies de *Coffea*, em meio contendo sais inorgânicos, sacarose, tiamina, cisteína e auxina. O autor obteve rápida produção de calos na espécie *Coffea arabica*, e de embriões e plântulas na espécie *Coffea canephora*.

No Brasil, a primeira referência é a de SHARP *et al.* (1973), mas desde 1970, SONDHAL e colaboradores, no IAC, já estavam pesquisando na área. Os primeiros trabalhos que trouxeram uma contribuição concreta para a biotecnologia do cafeeiro foram os de SONDHAL & SHARP (1977) e SONDHAL *et al.* (1979), quando se demonstrou a embriogênese somática de alta e baixa frequência, e com os trabalhos de regeneração de embriões somáticos no começo da década de 80 (SONDHAL *et al.* 1984). A produção de

embriões somáticos a partir de calos provenientes de explantes foliares foi a base para o desenvolvimento de trabalhos de propagação *in vitro* em larga escala em meio líquido (ZAMAARRIPA *et al.* 1991; NORIEGA & SONDHAL, 1993).

Entretanto, foi somente em 1977, com a constituição do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D/Café), que novas perspectivas foram abertas à biotecnologia do cafeeiro. Já sob a influência do Programa Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (PNP&D/Café), os primeiros trabalhos brasileiros em biologia molecular foram publicados pelo grupo do BIOAGRO, na UFV (RENA & NACIF, 1999).

Hoje, várias são as metodologias de cultura de tecidos que auxiliam os programas de melhoramento do café, tais como a cultura de anteras para a obtenção de plantas homozigotas; a cultura de embriões, para a recuperação de embriões provenientes de cruzamentos interespecíficos e para a antecipação da época de plantio; embriogênese somática, através de explantes foliares para obtenção da planta inteira; cultura de meristemas, para obtenção de plantas livres de vírus; micropropagação, com o objetivo de realizar a rápida multiplicação do material melhorado, manutenção de bancos de germoplasma e a multiplicação de híbridos interespecíficos (ANDRADE, 1998).

Assim como a produção de transgênicos, com o uso das técnicas de transformação genética que podem ser de grande interesse para o melhoramento genético de plantas, pois podem gerar novas cultivares diretamente, ou genótipos para serem utilizados em um programa de melhoramento convencional (BRASILEIRO & DUSI, 1999).

A obtenção de plantas transgênicas envolve a transferência e integração do T-DNA na célula vegetal e a capacidade de diferenciação dessas células transformadas em uma planta. A totipotência permite a regeneração de plantas através de técnicas de cultura de tecidos. Assim, as ferramentas de transformação genética podem possibilitar a introdução de genes selecionados em plantas, para o desenvolvimento de novos genótipos com mínima alteração de sua base genética e, portanto das características desejadas num determinado cultivar, permitindo assim que características agronômicas importantes como resistência a doenças, pragas, herbicidas, tolerância a estresse entre outras, possam ser introduzidas em plantas cultivadas (BRASILEIRO & DUSI, 1999).

## 1.6- CULTURA DE ANTERAS E MELHORAMENTO GENÉTICO NO CAFEIRO

Nos programas de melhoramento, as técnicas convencionais têm apresentado resultados promissores na cultura do café, no que se refere ao aumento de produtividade e obtenção de novas cultivares. Após o cruzamento intervarietal são necessárias cerca de 7 a 9 gerações de autofecundação para se chegar à uniformidade genotípica. O tempo, para que se chegue a um resultado satisfatório, é muito longo, cerca de 15 a 20 anos, até se obter material superior (ANDRADE, 1998). Sendo assim, a técnica de cultura de anteras pode auxiliar no melhoramento da cultura, pois permite a obtenção de haplóides em gerações segregantes, o que leva a rápida produção de plantas homozigóticas através da duplicação do número de cromossomos numa única etapa, substituindo as gerações de autofecundação. Além dos haplóides serem livres dos problemas de dominância e recessividade, por possuir apenas um alelo em cada loco gênico.

A maior eficiência de seleção é a outra vantagem do melhoramento com uso de haplóides, especialmente quando a variação de dominância é significativa. No melhoramento convencional, linhagens de gerações iniciais, mostram diferenças fenotípicas para as quais os efeitos aditivos e de dominância contribuem. Por outro lado, linhagens dihaplóides, têm apenas variância aditiva, e conseqüentemente, alta herdabilidade no sentido restrito. Portanto, menor quantidade de indivíduos serão necessários para a seleção dos recombinantes desejados. Outra possibilidade de utilização das plantas haplóides é no estudo de herança, através de progênes homozigotas obtidas por androgênese (HENDY *et al.* 1985)

A produção de haplóides pode ser obtida por diferentes técnicas como ginogênese, androgênese, tratamento químico, choque térmico e irradiação com raios X ou luz ultravioleta, e ainda, por técnicas *in vitro* (cultura de pólen isolado, protoplastos, eliminação de cromossomos pela cultura de embriões jovens e partenogênese). No entanto, até o momento a melhor técnica *in vitro* para obtenção de haplóides é a cultura de anteras, pois nestas, os micrósporos estão em grande número, e podem desenvolver-se em haplóides por androgênese direta, dando origem a embriões, ou indireta, passando pela fase de calos (MORAES FERNANDES, 1990).

Apesar da obtenção de haplóides *in vitro* através da cultura de anteras ter sido registrada principalmente para espécies das famílias Solanaceae, Graminae e Cruciferae, recentes trabalhos mostram a possibilidade do uso desta técnica para outras famílias. Mas



mesmo com o considerável sucesso da técnica da cultura de anteras, o principal problema continua sendo a baixa frequência de haplóides obtidos na maioria das espécies trabalhadas; outro fator que pode causar problemas nessa metodologia refere-se ao fato de que plantas podem se originar de outros tecidos da antera, resultando em plantas com vários níveis de ploidia (LUZ, 1995).

Um importante fator para o sucesso da cultura de anteras é conhecer para cada cultura o estágio ideal de desenvolvimento das anteras a serem cultivadas, de maneira que este estágio contenha os micrósporos em uma fase de desenvolvimento de melhor resposta androgenética, que geralmente são os micrósporos recém liberados da tétrade meiótica até no máximo, estágio binucleado. GRANDO & MORAES FERNANDES (1993), sugerem que o potencial embriogênico do grão de pólen pode ser determinado tanto no período da meiose como no período da pré-mitose do micrósporo, pois nestes dois momentos o micrósporo ainda teria metabolicamente características esporofíticas, o que permite a diferenciação do grão de pólen em embrião e posterior formação de uma planta.

Vários trabalhos indicam que a melhor fase é aquela em que o micrósporo foi recém liberado da tétrade meiótica até, no máximo, seu estágio binucleado, pois nesta fase o micrósporo ainda possui características esporofíticas que permitem a diferenciação do grão de pólen em embrião (ANDRADE, 1998).

Estudos tem demonstrado que o RNA ribossômico e de transferência do grão de pólen inativam-se 24 horas após a primeira mitose. Após este momento, não é mais possível reverter o desenvolvimento e a célula segue o seu caminho normal para a formação do grão de pólen. As células *in vitro*, quando em condições adequadas e antes de atingirem este ponto, seriam capazes de originar embriões através do processo de embriogênese (MASCARENHAS, 1971; VASIL *et al*, 1979).

Em *Hyoscyamus nigr* foram observadas alterações estruturais no micrósporo, o qual apresentou-se com núcleo e nucléolo grandes e cromatina dispersa. Essas alterações ocorreram rapidamente após 6 horas da inoculação, e referem-se ao início da indução para a formação dos embriões (REYNOLDS, 1990).

A androgênese é um processo muito importante, pois permite a obtenção de plantas homozigotas em uma geração, em curto período de tempo, e permite acesso à novas formas recombinantes. Anteras de café possuem aproximadamente de 2.000 à 40.000 micrósporos em cada uma, os quais podem sofrer uma combinação durante a meiose (CARNEIRO, 1999).

Teoricamente, através da cultura de anteras via microsporogênese, um número considerável de plantas haplóides podem ser produzidas. Infelizmente, o progresso nessa técnica tem sido lento. Apesar de experimentos envolvendo cultura de anteras serem realizados desde 1973 (SHARP *et al.* 1973), resultados de regeneração de plantas foram conseguidos somente em 1987 (ASCANIO & ARCIA, 1987; CARNEIRO, 1987).

Segundo MANTELL *et al.* (1994), são possíveis vários tipos de desenvolvimento do grão de pólen *in vitro*, sendo que tanto o núcleo generativo quanto o vegetativo podem se dividir continuamente originando um embrióide haplóide, ou ainda, a primeira mitose produziria dois núcleos semelhantes e estes se dividiriam repetidamente resultando na formação de embrióides haplóides. Após obtidas as plantas haplóides a partir da cultura de anteras, o próximo passo é restabelecer a diploidia das mesmas, levando-as à homozigose. Há vários métodos para duplicar os cromossomos de plantas haplóides, o mais usado é o tratamento com colchicina.

A endomitose é a duplicação dos cromossomos sem que haja a divisão do núcleo celular, o que é freqüente em calos haplóides. Segundo MANTELL *et al.* (1994), os núcleos idênticos, resultantes de uma primeira divisão do micrósporo fundiriam-se produzindo um embrião diplóide homozigoto. A diploidização *in vitro* pode ser explorada na obtenção de plantas diplóides homozigotas, ela pode ser confirmada através da homogeneidade da descendência das plantas diplóides autofecundadas. No entanto, em alguns experimentos a técnica não se mostra adequada visto que vários fatores podem influenciar a resposta das anteras cultivadas. Entre estes, os mais importantes são o genótipo do material a ser cultivado, o estágio ideal do explante, as condições de cultivo e idade das plantas doadoras, meio de cultura e condições físicas da cultura pré e pós inoculação (MORAES FERNANDES, 1990).

Segundo NITSCH (1983), alguns fatores influenciam a obtenção de plantas haplóides viáveis através da cultura de anteras ou de pólen, tais como: a viabilidade do pólen, vigor que a planta apresenta no estágio homozigoto e a reação das plantas haplóides em relação aos agentes duplicadores dos cromossomos.

Duas abordagens gerais têm sido adotadas na tentativa de aumentar a resposta à cultura de anteras. A primeira envolve a seleção de genótipos mais responsivos, porém esta seleção pode restringir a variabilidade genética disponível para o melhorista. A outra abordagem diz respeito a identificação dos fatores fisiológicos e ambientais que tenham influência sobre a resposta das anteras cultivadas *in vitro*. É desejável, na obtenção de haplóides, um protocolo que seja aplicável a um largo espectro de genótipos (PETERS *et al.* 1999).

No Brasil, o *C. arabica* ainda apresenta poucos progressos com relação à aplicação da cultura de anteras, tendo como trabalho inicial a determinação do estágio ideal de desenvolvimento do micrósporo (ANDRADE, 1998). Em outros países os resultados apresentam um pouco mais de sucesso. Em um trabalho envolvendo o estágio do micrósporo aliado à estudos com choque térmico, verificou-se que os melhores resultados ocorreram com tratamento frio por 48 horas (ASCANIO & ARCIA, 1994). Outras linhas de ação estão em andamento na Colômbia e Portugal. O presente trabalho faz parte de uma linha de pesquisa de apoio ao melhoramento do cafeeiro, aplicando a técnica da cultura de anteras em função dos fatores envolvidos na mesma, para obter plantas dihaplóides em diferentes genótipos de cafeeiro. Para isso, foram avaliados:

- 1- O estágio ideal do explante;
- 2- A relação dos estádios de desenvolvimento dos micrósporos com as características morfológicas do botão floral;
- 3- O genótipo do material cultivado;
- 4- A composição do meio de cultura;
- 5- O efeito do pré-tratamento de botões florais e do regulador de crescimento 2,4-D na indução de embriões em anteras de cafeeiro.

## 2-MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- RELAÇÃO ENTRE OS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS MICRÓSPOROS E AS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO BOTÃO FLORAL

Esta fase foi constituída de um experimento realizado no Laboratório de Citologia da Universidade Federal de Uberlândia, no período de Agosto à Novembro de 2001.

Foram utilizados 3 cultivares de *Coffea arabica* L.: Mundo Novo LCP-37919; Catuai vermelho LCH-2077-2-5-44 e Catuai vermelho LCH-2077-2-5-99, pertencentes à área experimental da Universidade Federal de Uberlândia.

Aproximadamente 200 botões florais foram coletados no período de 8 à 9 horas da manhã, e em seguida, fixados em álcool etílico e ácido acético na proporção de 3:1 durante 24 horas, sendo posteriormente armazenados em álcool 70% e mantidos a uma temperatura de 4°C.

Os botões florais foram separados de acordo com o seu comprimento, em cinco classes distintas, de acordo com os valores mínimos, máximos e médias, a saber: classe 1 (1,5; 1,72; 2,0 mm); classe 2 (2,5; 2,98; 3,5 mm); classe 3 (4,0; 4,48; 5,0 mm); classe 4 (4,5; 5,30; 6,0 mm); classe 5 (6,5; 7,20; 8,0 mm); as quais foram correlacionadas com o comprimento do botão floral, comprimento da antera e as fases de desenvolvimento dos micrósporos. Para a

mensuração do comprimento dos botões florais, bem como do comprimento de suas anteras foi utilizado um paquímetro. Procedeu-se a análise de 3 botões de cada classe para todas as cultivares.

O estágio de desenvolvimento dos micrósporos foi avaliado pela confecção de duas lâminas por botão, sendo duas anteras por lâmina, cujos micrósporos foram corados com carmin acético. A contagem dos micrósporos foi feita nas fases de tétrade, micrósporo recém liberado de tétrade, micrósporo com núcleo deslocado, com núcleo central e com camada de exina a partir de amostras de 100 micrósporos por lâmina. Estas foram preparadas com o auxílio de lupa e microscópio óptico sob aumento de 1.500 vezes. Já para a mensuração do diâmetro dos micrósporos foi utilizada uma câmera acoplada a um microscópio óptico e estas a um microcomputador (CELERON 300 MHZ), usando o software HLImage 97.

## **2.2-AVALIAÇÃO DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE BOTÕES FLORAIS E DO REGULADOR DE CRESCIMENTO 2,4-D NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES EM ANTERAS DE CAFEIEIRO.**

### **2.2.1- CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de cultura de tecidos vegetais da Universidade Federal de Uberlândia, no período de outubro de 2000 à janeiro de 2002. Foram utilizados os genótipos de cafeeiro plantados na área experimental do Campus Umuarama dessa Universidade. Foram coletados botões florais das cultivares Mundo Novo, Catuaí Vermelho 44 e Catuaí Vermelho 99. Estes foram armazenados em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido em água destilada, dentro de uma caixa de isopor para evitar a dessecação, até serem conduzidos ao laboratório. O comprimento dos botões florais foi aferido com o auxílio de um paquímetro; utilizou-se botões florais entre 4,5 à 6,0 mm de comprimento em todos os pré- tratamentos.

Os botões florais foram envoltos em gaze previamente autoclavada e desinfestados em uma solução de álcool 70% por 1 segundo e por 15 minutos em uma solução de hipoclorito de sódio 1% sob agitação. Em câmara de fluxo laminar foram lavados 3 vezes em água destilada e autoclavada. As anteras foram retiradas dos botões florais com o auxílio de um estereomicroscópio, pinça e bisturi; sendo os últimos flambados a cada novo botão.

Após esse processo, as anteras foram inoculadas em placas de Petri, contendo 25 ml do meio Murashige e Skoog (MURASHIGE & SKOOG, 1962) (Tabela 1), com pH ajustado para 5.9, suplementado com 2,4-D, nas concentrações 0,005; 0,05; 0,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  e previamente esterilizados em autoclave vertical à temperatura de 121°C, sob a pressão de 1 atm por 20 minutos. Após a inoculação, as anteras permaneceram em sala de crescimento com  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas de luz com intensidade luminosa de 2500 lux. O delineamento experimental foi de blocos casualizados, com 4 repetições por tratamento, para cada concentração de 2,4-D e genótipo. Cada placa constituindo uma parcela, composta de 20 anteras por placa. Na análise estatística os dados foram transformados em raiz ( $x+0,5$ ).

Aos 30 dias após a inoculação das anteras, 50% provenientes do experimento controle (temperatura ambiente) e 50% das anteras provenientes do pré- tratamento por choque de calor foram transplantadas para placas de Petri, contendo 25 ml do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com pH ajustado para 5.9 e previamente autoclavado, suplementado com 2,4-D, na concentração de 10  $\mu\text{M}$ . Os 50% das anteras restantes de ambos tratamentos citados acima, também foram transplantadas da maneira citada anteriormente, entretanto, o meio foi acrescido de 2,4-D, na concentração de 15  $\mu\text{M}$ .

Foram realizadas três avaliações parciais dos índices de oxidação, contaminação e intumescimento em intervalos de 10 dias cada, para ambos pré- tratamentos, inclusive após as anteras terem sido transplantadas.

### **2.2.2- PRÉ-TRATAMENTO POR CHOQUE FRIO**

Neste pré- tratamento, após a coleta, os botões florais foram colocados em geladeira ( $4^\circ\text{C}$ ) por 48 horas. Os processos de desinfestação, inoculação e avaliação foram os mesmos descritos anteriormente.

### **2.2.3- PRÉ-TRATAMENTO POR CHOQUE DE CALOR**

Para a realização deste pré- tratamento, os botões florais, após a coleta, permaneceram em uma estufa à  $35^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Os processos de desinfestação e avaliação utilizados foram os mesmos descritos nas considerações gerais, entretanto, durante o processo de inoculação, após as anteras terem sido retiradas dos botões florais, foram imersas rapidamente

em soluções de ácido ascórbico na concentração de 3,4 mM, hipoclorito de sódio 0,2% e água destilada e autoclavada, respectivamente.

#### **2.2.4- TEMPERATURA AMBIENTE (EXPERIMENTO CONTROLE)**

Neste experimento controle, os botões florais foram mantidos no ambiente do laboratório por 24 horas. Os processos de desinfestação, inoculação e avaliação foram os mesmos descritos para o pré- tratamento por choque de calor.

Tabela 1: Composição do meio de cultura de MURASHIGE &amp; SKOOG (1962).

CONSTITUINTES	QUANTIDADES (mgL <sup>-1</sup> )
<b>INORGÂNICOS</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00
KNO <sub>3</sub>	1900,00
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	440,00
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	370,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00
KI	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
MnSO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O	22,30
ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	4,086
NaMoO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O	25,00
CuSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O	2,50
CoCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	2,50
FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	27,80
Na <sub>2</sub> EDTA 2 H <sub>2</sub> O	37,408
<b>ORGÂNICOS</b>	
Glicina	2,00
Tiamina HCl	0,10
Sacarose	3000,00
Ágar	0,7%
Inositol	100,00
Ácido nicotínico	0,50
Piridoxina HCl	0,50



### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1- RELAÇÃO ENTRE OS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS MICRÓSPOROS E AS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO BOTÃO FLORAL.

Existe um sincronismo no desenvolvimento das anteras, do botão floral e estes, estão relacionados com os estádios de desenvolvimento dos micrósporos, ou seja, o diâmetro dos mesmos evolui de acordo com o crescimento das anteras e do botão floral (Tabela 2). Nas tabelas 3, 4, 5 estão apresentadas as contagens de micrósporos nas diferentes fases de seu desenvolvimento, conforme as classes de comprimento do botão floral das cultivares Mundo Novo, Catuaí Vermelho 44 e Catuaí Vermelho 99, respectivamente.

Tabela 2: Média do diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) dos micrósporos nos seus diferentes estádios de desenvolvimento para a cultivar Catuaí vermelho 99, UFU/Uberlândia-MG, 2002.

Estádios de desenvolvimento dos micrósporos	Tétrade	Recém liberado de tétrade	Núcleo deslocado	Núcleo central	Com exina formada
Diâmetro	0,8	1,2	1,7	1,6	2,0

Tabela 3: Estádio de desenvolvimento dos micrósporos, de acordo com as diferentes classes de tamanho em relação ao comprimento (mm) e média dos botões florais (mm) e comprimento (mm) das anteras para a cultivar Mundo Novo, UFU/Uberlândia-MG, 2002.

#### Mundo Novo

Classe	Botão Floral	Antera	Estágios dos micrósporos					Total
	Comprimento	comprimento	Tétrade	Recém liberado de tétrade	Núcleo deslocado	Núcleo central *	Com exina formada	
1	1,50;1,72;2,00	1,2-----1,6	87	12	1	0	0	100
2	2,50;2,98;3,50	2,1-----3,3	52	48	0	0	0	100
3	4,00;4,48;5,00	3,1-----4,2	18	57	25	0	0	100
4	4,50;5,30;6,00	4,5-----4,9	2	5	54	39	0	100
5	6,50;7,20;8,00	4,3-----5,0	0	2	0	7	91	100

\* Estádio ideal para a utilização da cultura de anteras

Tabela 4: Estádio de desenvolvimento dos micrósporos, de acordo com as diferentes classes de tamanho em relação ao comprimento (mm) e média dos botões florais (mm) e comprimento (mm) das anteras para a cultivar Catuai Vermelho 44, UFU/Uberlândia-MG, 2002.

#### Catuai Vermelho 44

Classe	Botão Floral	Antera	Estágios dos micrósporos					Total
	Comprimento	comprimento	Tétrade	Recém liberado de tétrade	Núcleo deslocado	Núcleo central *	Com exina formada	
1	1,50;1,72;2,00	1,0-----1,5	65	25	3	7	0	100
2	2,50;2,98;3,50	1,0-----2,5	52	35	13	0	0	100
3	4,00;4,48;5,00	2,9-----4,0	20	11	68	2	0	100
4	4,50;5,30;6,00	3,5-----5,5	5	31	49	15	0	100
5	6,50;7,20;8,00	5,2-----6,0	2	17	32	2	47	100

\* Estádio ideal para a utilização da cultura de anteras

Tabela 5: Estádio de desenvolvimento dos micrósporos, de acordo com as diferentes classes de tamanho em relação ao comprimento (mm) e média dos botões florais (mm) e comprimento (mm) das anteras para a cultivar Catuaí Vermelho 99, UFU/Uberlândia-MG, 2002.

**Catuaí Vermelho 99**

Classe	Botão Floral	Antera	Estágios dos micrósporos					Total
	Comprimento	comprimento	Tétrade	Recém liberado de tétrade	Núcleo deslocado	Núcleo central *	Com exina formada	
1	1,50;1,72;2,00	1,0 ----- 1,6	46	33	15	6	0	100
2	2,50;2,98;3,50	1,5 ----- 2,6	31	55	14	0	0	100
3	4,00;4,48;5,00	3,0 ----- 3,4	16	24	55	5	0	100
4	4,50;5,30;6,00							
5	6,50;7,20;8,00							

\* Estádio ideal para a utilização da cultura de anteras

Os botões florais contêm anteras que apresentam micrósporos em diferentes estádios de desenvolvimento, porém para cada classe, apenas um estágio ocorre em maior percentagem, como ilustram as tabelas 3, 4 e 5.

Os botões florais da classe 1 com comprimento de 1,50 a 2,00 mm apresentaram anteras de 1,2 à 1,6 mm de comprimento. Nestas, a maioria dos micrósporos, cerca de 87%, encontravam-se envolvidos pela calose, formando a tétrade meiótica, e os 12% restantes, encontravam-se recém liberados da tétrade para a cultivar Mundo Novo (Tabela 3). Já para a cultivar Catuaí vermelho 44, as anteras dos botões florais pertencentes à mesma classe apresentaram comprimento de 1,0 a 1,5 mm. Estas apresentaram micrósporos predominantemente na fase de tétrade meiótica, cerca de 65%, e os demais distribuídos nos outros estádios de desenvolvimento (Tabela 4). Para a cultivar Catuaí Vermelho 99, tais anteras apresentaram comprimento de 1,0 à 1,6 mm. Nestas, a maioria dos micrósporos, cerca de 46%, encontravam-se na fase de tétrade meiótica (Tabela 5).

Para a cultivar Mundo Novo, as anteras dos botões florais pertencentes a classe 1, apresentaram micrósporos nas fases de tétrade, recém liberado da mesma e núcleo deslocado, diferentemente do que ocorreu para as cultivares Catuaí vermelho 44 e 99, considerando-se a

mesma classe, onde foram encontrados micrósporos nas fase de tétrade, recém liberado de tétrade, micrósporo com núcleo deslocado ou vacuolado e micrósporo com núcleo central ou não vacuolado.

A classe 2 corresponde aos botões que variam de 2,50 à 3,50 mm de comprimento e anteras de 2,1 a 3,3 mm, sendo que estas apresentaram cerca de 52% dos micrósporos na fase de tétrade meiótica e cerca de 48% dos micrósporos recém liberados da tétrade para a cultivar Mundo Novo (Tabela 3). As anteras da mesma classe, variaram de 1,0 a 2,5 mm de comprimento para a cultivar Catuaí vermelho 44, sendo que estas apresentaram cerca de 52% dos micrósporos na fase de tétrade meiótica, e os demais distribuídos nos outros estádios de desenvolvimento (Tabela 4). Já para a cultivar Catuaí vermelho 99, tratando-se da mesma classe, as anteras encontradas mediam de 1,5 a 2,6 mm de comprimento. Houve predominância de micrósporos recém liberados de tétrade, cerca de 55% (Tabela 5).

Os micrósporos foram predominantemente encontrados na fase de tétrade meiótica, com cerca de 52% para as cultivares Mundo Novo e Catuaí vermelho 44. Estes dados apresentam divergências em relação aqueles observados por ANDRADE (1998), onde foi verificada a predominância de micrósporos na fase recém liberado de tétrade. Para a cultivar Mundo Novo, os micrósporos encontravam-se somente nas fases de tétrade meiótica e recém liberado de tétrade; já na cultivar Catuaí vermelho 44, estes foram encontrados nas duas fases citadas acima; além da fase de micrósporo com núcleo deslocado ou vacuolado. Na cultivar Catuaí vermelho 99, os micrósporos também foram encontrados nestas três fases, entretanto a predominância dos mesmos foi na fase de recém liberado de tétrade.

Para a cultivar Catuaí vermelho 44, na classe 3, as anteras variaram de 2,95 a 4,00 mm de comprimento, sendo que os micrósporos encontravam-se de forma predominante, com cerca de 68% na fase de micrósporo com núcleo deslocado ou vacuolado (Tabela 4).

Para a cultivar Catuaí vermelho 99, ainda na classe 3, o comprimento das anteras oscilou de 3,0 à 3,4 mm. Cerca de 55% dos micrósporos foram encontrados com núcleo deslocado, ou seja, na fase de micrósporo vacuolado (Tabela 5).

Para a cultivar Mundo Novo ainda na classe 3, foram encontrados micrósporos nas fases de tétrade, recém liberado de tétrade e micrósporo com núcleo deslocado. Para as cultivares Catuaí vermelho 44 e 99, foram encontrados micrósporos nas fases de tétrade, recém liberado da tétrade, micrósporo com núcleo deslocado e micrósporo com núcleo central, sendo esta última em pequena percentagem. Os botões na classe 4, variaram de 4,50 à 6,00 mm de comprimento e apresentaram anteras de 4,5 a 4,9 mm de comprimento para a

cultivar Mundo Novo (Tabela 3); 3,5 a 5,5 mm de comprimento para a cultivar Catuaí vermelho 44 (Tabela 4) e para a cultivar Catuaí vermelho 99 não foram encontrados botões florais de comprimentos pertencentes as classes 4 e 5. Na cultivar Mundo Novo, considerando-se a classe 4, os micrósporos foram predominantemente encontrados, cerca de 54%, na fase com núcleo deslocado e cerca de 39% dos micrósporos em estágio com núcleo central (Tabela 3). Para a cultivar Catuaí vermelho 44, foram encontrados cerca de 49% dos micrósporos no estágio com núcleo deslocado e 15% dos micrósporos em estágio com núcleo central (Tabela 4).

Na classe 5, os botões variaram entre 6,5 à 8,0 mm de comprimento e suas anteras de 4,3 à 5,0 mm de comprimento para a cultivar Mundo Novo (Tabela 3) e de 5,2 à 6,0 mm de comprimento para a cultivar Catuaí vermelho 44 (Tabela 4). Nesta fase os micrósporos já se encontravam maduros, com a exina completamente formada, e corresponde à uma fase inadequada para a cultura de anteras, pois já se inicia a formação do grão-de-pólen (ANDRADE, 1998; ASCANIO & ARCIA, 1994). Cerca de 91% dos micrósporos estavam no estágio onde a exina já estava formada para a cultivar Mundo Novo. Já para a cultivar Catuaí vermelho 44, cerca de 47% dos micrósporos encontravam-se nesta fase.

Segundo ANDRADE (1998), na classe 4 são encontrados os botões florais que devem ser utilizados para a cultura de anteras. Entretanto, são esperadas algumas diferenças na percentagem dos micrósporos predominantes em cada classe; uma vez que a mesma autora trabalhou com 4 cultivares, sendo apenas duas semelhantes à este trabalho, além do fato dela ter disponibilizado os dados referentes as quatro cultivares em uma única tabela.

A fase uninucleada responde positivamente ao processo embriogênico porque, nesta fase, os micrósporos apresentam uma parede celular delgada, o que a torna mais receptiva aos fatores externos. Em estádios mais avançados da microsporogênese, ocorre um engrossamento da parede celular, sendo esta uma característica do grão de pólen maduro do café, prejudicando o processo de regeneração (ASCANIO & ARCIA, 1994).

Vários trabalhos indicam que a melhor fase é aquela em que o micrósporo foi recém liberado da tétrade meiótica até, no máximo, seu estágio binucleado, pois nesta fase o micrósporo ainda possui características esporofíticas que permitem a diferenciação do grão de pólen em embrião (ANDRADE, 1998).

LUZ (1995), utilizou 3 genótipos de pimentão (*Capsicum annum* L.), onde foram observados micrósporos uninucleados próximos da primeira mitose, sendo que o ideal para a

cultura de anteras foi a utilização de botões que apresentavam pétalas e sépalas com comprimentos aproximadamente iguais.

Em trabalhos com *Coffea arabica* L. variedade Garnica, ASCANIO & ARCIA (1994) obtiveram a regeneração a partir de anteras de botões florais que mediam entre 3 a 4 mm de comprimento, contendo micrósporos uninucleados.

NEUENSCHWANDER & BAUMANN (1995), em um trabalho com *Coffea arabica* L. cultivares Catuaí e Catimor, demonstraram que o estágio crucial durante a microsporogênese, adequado para a androgênese *in vitro* comprovou ser o uninucleado, presente em botões florais medindo de 13 – 15 mm de comprimento, dois ou três dias antes da antese.

Determinar o tamanho do botão floral, bem como de suas anteras que contenham o estágio uninucleado, se faz necessário, pois otimiza o processo para a obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras (ANDRADE, 1998).

Em um trabalho com híbridos F<sub>1</sub> de tomate, botões florais com comprimento de 5,0 a 9,0 mm, oriundos do cruzamento IPA 5 x Rotam 4, foram utilizados com o objetivo de estabelecer a relação entre comprimento do botão floral, comprimento e estágio de desenvolvimento sobre a formação de calos no cultivo *in vitro* de anteras de tomate. Verificou-se que, apesar da formação de calos ter sido induzida em todos os estádios de desenvolvimento, a frequência de calos produzidos decresceu com o avanço destes e se apresentou de forma semelhante nos três meios testados. Tanto o comprimento da antera quanto o do botão floral apresentaram correlação significativa com o estágio de desenvolvimento. As amplitudes de classes de comprimento de anteras de 2,0 - 2,3; 2,3 - 2,9 e 2,9 - 4,1 mm, representativas para os estádios de meiose, tétrade e micrósporo mononucleado, respectivamente, foram tomadas como base para os experimentos subsequentes (BRASILEIRO *et al.* 1999).

Anteras contendo meiócitos em estágio de prófase I, predominantes em botões com aproximadamente 5,0 mm de comprimento, contendo anteras com cerca de 2,0 mm, apresentaram a maior frequência de formação de calos (27%). GULSHAN *et al.* (1981) observaram que apenas anteras contendo micrósporos mononucleados em estádios iniciais apresentaram resposta androgenética.

### 3.2- AVALIAÇÃO DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE BOTÕES FLORAIS E DO REGULADOR DE CRESCIMENTO 2,4-D NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES EM ANTERAS DE CAFEIEIRO

#### 3.2.1- PRÉ-TRATAMENTO POR CHOQUE FRIO

Aos 30 dias após a inoculação, a média geral de contaminação foi de 66 % das anteras inoculadas, prevalecendo bactérias; verificou-se também uma média de 56 % de anteras oxidadas (Tabela 6). Estes índices de contaminação e oxidação são bem superiores aos relatados por CARNEIRO (1999), em trabalho com anteras de Catuaí cultivadas em meio MS com diferentes auxinas, mas a autora não relata qual processo de desinfestação foi efetuado, bem como se usou ou não algum antioxidante.

Tabela 6: Percentagem de oxidação e contaminação nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí vermelho 44 (CV44) e Catuaí vermelho 99 (CV99) para o pré-tratamento por choque frio. UFU/Uberlândia-MG, 2002.

Cultivares	Doses de 2,4-D ( $\mu\text{M}$ )							
	0,005		0,05		0,5		5,0	
	% cont.	%oxi.	% cont.	%oxi.	% cont.	%oxi.	% cont.	%oxi.
MN	37,5	37,5	50,0	37,5	85,7	85,7	80,0	80,0
CV 44	71,4	71,4	75,0	50,0	57,0	57,0	83,4	50,0
CV 99	66,7	66,7	100,0	57,0	37,5	25,0	50,0	50,0
Média de oxidação	56,0							
Média de contaminação	66,0							

Em todas as três avaliações a cultivar mais responsiva ao intumescimento foi o Catuaí Vermelho 99 (Tabela 7).

Tabela 7: Intumescimento de anteras de cafeeiro nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí vermelho 44 (CV44) e Catuaí vermelho 99 (CV99) para o pré-tratamento por choque frio. UFU/Uberlândia-MG, 2002.

<b>Intumescimento</b>			
<b>Cultivares</b>	<b>Avaliação 1</b>	<b>Avaliação 2</b>	<b>Avaliação 3</b>
MN	0.7071 b	0.7071 b	0,0000 b
CV 44	0.7071 b	0.7071 b	0,0000 b
CV 99	1.4235 a	1.4235 a	1,5263 a

Médias seguidas por letras distintas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Aos 60 dias após a inoculação verificou-se um intumescimento das anteras restantes, sendo que, ocorreu a formação de um calo para a cultivar Mundo Novo na concentração de 0,05  $\mu\text{M}$  2,4-D. CARNEIRO (1999), em trabalho com anteras de Catuaí cultivadas em meio MS com diferentes auxinas, usou concentrações de 2,4-D de 9,1 e 13,6  $\mu\text{M}$ , bem maiores que o presente trabalho, conseguiu 95,0 e 59,2% de anteras com calos e embriogênicas, respectivamente, mas estes resultados foram conseguidos em 12 semanas de cultivo.

Em trabalhos com *Coffea arabica* L. variedade Garnica, ASCANIO & ARCIA (1994), obtiveram a regeneração a partir de anteras de botões florais que mediam entre 3 a 4 mm de comprimento, contendo micrósporos uninucleados, submetidos a uma temperatura de 5° C por um período de 48 horas. O efeito do choque térmico pode estar relacionado com o atraso do envelhecimento da parede da antera e a desorientação do fuso mitótico, levando a um aumento na viabilidade do micrósporo.

De acordo com ANDRADE (1998), as anteras utilizadas para o cultivo *in vitro* necessitam de choque térmico, sendo que o tratamento a frio das mesmas, pode aumentar a capacidade de produzir calos ou plantas regeneradas. Entretanto, o efeito desse tratamento é indireto. O aumento na androgênese é atribuído principalmente ao fato de que a baixa temperatura retém, a viabilidade do pólen por mais tempo, retarda a senescência, sincroniza as células e previne o aborto do pólen, portanto, aumenta o número de grãos de pólen viáveis, os quais são destinados a formar embriões.



A pré-incubação em baixas temperaturas é relatada como benéfica para muitas espécies, como por exemplo para o arroz, o qual em geral é pré-incubado a 8°C, o que proporciona uma maior viabilidade do grão de pólen, ativando algumas enzimas e posterior formação de calos. Com relação às condições ótimas de incubação, principalmente temperatura e iluminação, dependem da espécie e mesmo do genótipo, geralmente as temperaturas ideais variam entre 20 e 28°C (MARTINEZ *et al.* 1989).

NITSCH (1983) observou que, anteras de *Datura* tratadas a 3°C por 48 horas apresentaram uma frequência de pólen viáveis de 92%, contra 62% do material não tratado. Resultado semelhante foi obtido com *Nicotina*, sendo que o material não tratado apresentou 45% de grãos de pólen viáveis depois de 5 dias de cultura, contra 68% das anteras tratadas por 48 horas a 5°C.

### 3.2.2- PRÉ-TRATAMENTO POR CHOQUE DE CALOR

Aos 30 dias após a inoculação das anteras provenientes do pré-tratamento por choque de calor, a média geral de oxidação foi de 84,42%, a de contaminação foi de 17,89%, sendo que houve predomínio de bactérias. A média geral de intumescimento foi de 3,87% (Figura 1).

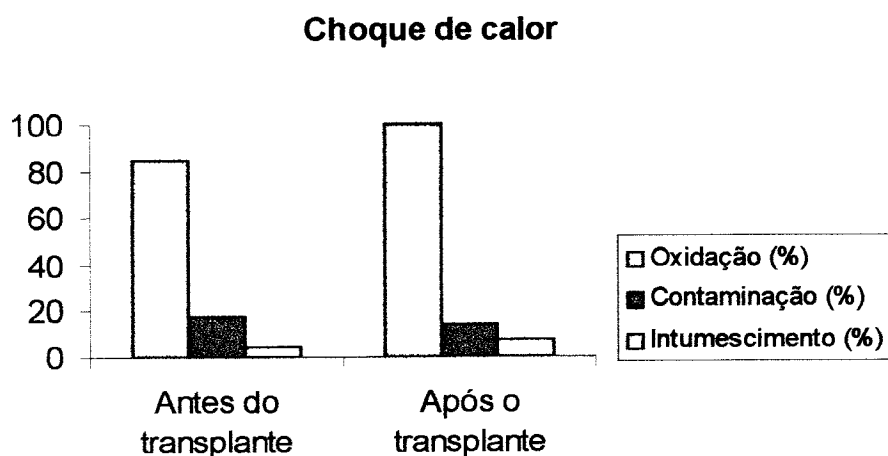


Figura 1: Média geral de oxidação, contaminação e intumescimento de anteras de cafeeiro antes e após o transplante no pré-tratamento por choque de calor. UFU/Uberlândia-MG, 2002.

Na primeira avaliação deste pré-tratamento para a oxidação, houve interação entre as doses de 2,4-D e as cultivares analisadas, sendo que a cultivar Catuaí vermelho 44 apresentou os maiores índices de oxidação nas doses de 0,005; 0,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ . Além desta, a cultivar Mundo Novo também obteve altos índices de oxidação para a dose de 5,0  $\mu\text{M}$ . No entanto, a cultivar Mundo Novo, obteve o menor índice de oxidação, nas doses de 0,005 e 0,05  $\mu\text{M}$ , e a oxidação foi menor para a cultivar Catuaí vermelho 99 na dosagem 0,5  $\mu\text{M}$  (Tabela 8).

Tabela 8: Primeira avaliação da oxidação de anteras de cafeeiro em diferentes doses de 2,4-D ( $\mu\text{M}$ ) e nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí vermelho 44 (CV44) e Catuaí vermelho 99 (CV99) no pré- tratamento por choque de calor. UFU/Uberlândia, 2002.

<b>Doses</b>	<b>Cultivares</b>	<b>Oxidação</b>
0,005	MN	2,2631 c
	CV 44	19,4904 a
	CV 99	19,2412 b
0,05	MN	6,3508 c
	CV 44	19,2277 b
	CV 99	20,0000 a
0,5	MN	12,2631 b
	CV 44	16,9593 a
	CV 99	2,2631 c
5,0	MN	20,0000 a
	CV 44	20,0000 a
	CV 99	19,2277 b

Médias seguidas por letras distintas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Analisando-se as doses de 2,4-D, para a cultivar Mundo Novo, verificou-se que à medida que se aumenta essas concentrações, há um acréscimo em média de 2,83 anteras oxidadas por parcela (Figura 2). Já para a cultivar Catuaí vermelho 99, a oxidação decresce com o aumento das dosagens até 0,5  $\mu\text{M}$ ; quando a dosagem foi 5,0  $\mu\text{M}$ , o contrário aconteceu (Figura 3). Na segunda avaliação, a cultivar Catuaí vermelho 99 obteve a maior

oxidação, entretanto, esse índice foi menor para a cultivar Mundo Novo; o mesmo ocorreu na terceira avaliação (Tabela 9).

Após 30 dias de inoculação, as anteras provenientes deste experimento foram transplantadas para meios contendo doses maiores de 2,4-D (10  $\mu$ M e 15  $\mu$ M). A média geral de oxidação foi de 100%, a de contaminação 14,79% e a de intumescimento 7,84% (Figura 1).

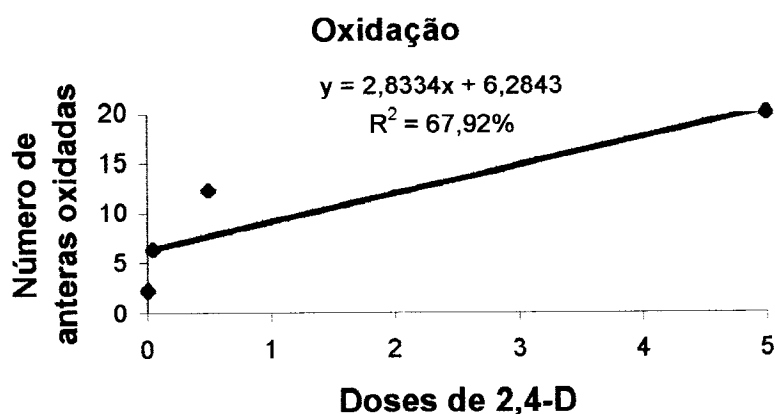


Figura 2: Primeira avaliação da oxidação de anteras de cafeeiro em diferentes doses de 2,4-D ( $\mu$ M) para a cultivar Mundo Novo no pré-tratamento por choque de calor. UFU/Uberlândia-MG, 2002.

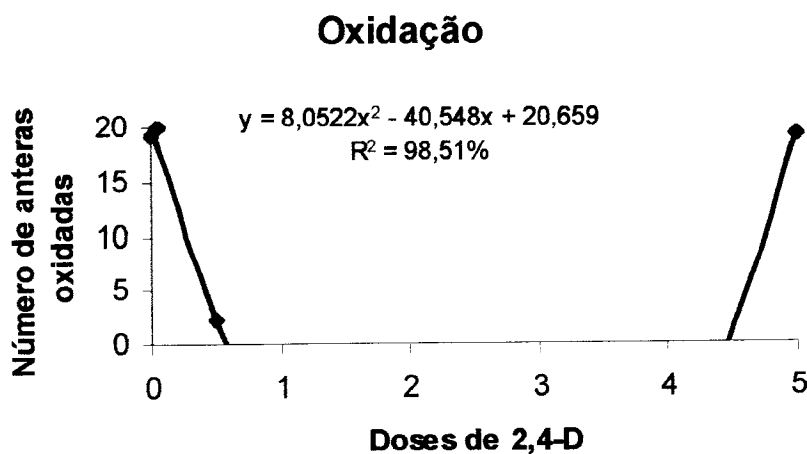


Figura 3: Primeira avaliação da oxidação de anteras de cafeeiro em diferentes doses de 2,4-D ( $\mu$ M) para a cultivar Catuaí vermelho 99 no pré-tratamento por choque de calor. UFU/Uberlândia-MG, 2002.

Tabela 9: Segunda e terceira avaliações da oxidação de anteras de cafeeiro nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuai vermelho 44 (CV44) e Catuai vermelho 99 (CV99) para o pré-tratamento por choque de calor. UFU/Uberlândia-MG, 2002.

<b>Oxidação</b>		
<b>Cultivares</b>	<b>Avaliação 2</b>	<b>Avaliação 3</b>
MN	4,0788 c	5,1578 c
CV 44	17,4630 b	17,4630 b
CV 99	19,8055 a	17,8947 a

Médias seguidas por letras distintas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Considerando-se a contaminação, na cv. Mundo Novo foi observado os menores valores em todas as avaliações; para a cv. Catuai vermelho 44, esses valores foram maiores na primeira e segunda avaliações; já para a cv. Catuai vermelho 99, a terceira avaliação obteve a maior contaminação (Tabela 10).

Tabela 10: Contaminação de anteras de cafeeiro nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuai vermelho 44 (CV44) e Catuai vermelho 99 (CV99) para o pré-tratamento por choque de calor. UFU/Uberlândia-MG, 2002.

<b>Contaminação</b>			
<b>Cultivares</b>	<b>Avaliação 1</b>	<b>Avaliação 2</b>	<b>Avaliação 3</b>
MN	1,0718 c	0,7664 c	0,7664 c
CV 44	4,3052 a	3,7697 a	3,7697 b
CV 99	1,5435 b	2,4087 b	4,4707 a

Médias seguidas por letras distintas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

### 3.2.3 - TEMPERATURA AMBIENTE (EXPERIMENTO CONTROLE)

Aos 30 dias após a inoculação das anteras provenientes deste experimento controle, a média geral de oxidação foi de 76,23 %, a de contaminação foi de 11,23%, prevalecendo bactérias; verificou-se também uma média de 18,10% de anteras intumescidas (Figura 4).

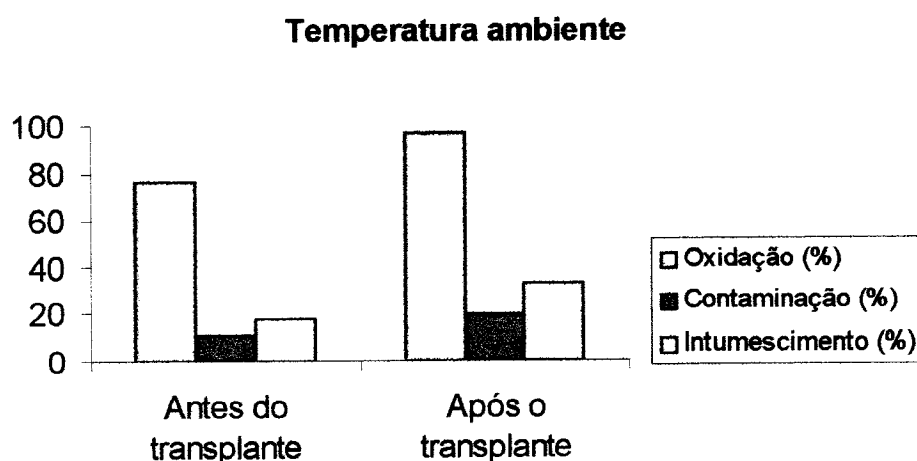


Figura 4: Média geral de oxidação, contaminação e intumescimento de anteras de cafeeiro antes e após o transplante no experimento controle (temperatura ambiente). UFU/Uberlândia-MG, 2002.

Decorridos 10 dias da inoculação deste experimento, após o intumescimento, manifestou-se uma pequena calosidade para a cultivar Catuaí vermelho 99 na dose de 0,5  $\mu$ M de 2,4-D, entretanto não houve formação de calo propriamente dito.

Os valores de oxidação, foram maiores para a cv. Catuaí vermelho 44 na primeira e segunda avaliações (Tabela 11).

Para a contaminação, os menores valores foram observados na primeira e segunda avaliações para a cv. Mundo novo (Tabela 12). De qualquer forma é de se esperar que ocorra uma contaminação maior na cultura de anteras em cafeeiro, já que as plantas fornecedoras dos botões florais se encontram em condições de campo. Deve-se então, em trabalhos posteriores, tentar aumentar a eficiência da desinfestação, e testar outros antioxidantes neste processo ou mesmo no meio de cultura.

Tabela 11: Oxidação de anteras de cafeeiro nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí vermelho 44 (CV44) e Catuaí vermelho 99 (CV99) à temperatura ambiente (experimento controle). UFU/Uberlândia-MG, 2002.

<b>Oxidação</b>			
<b>Cultivares</b>	<b>Avaliação 1</b>	<b>Avaliação 2</b>	<b>Avaliação 3</b>
MN	4,9835 c	3,7123 c	6.3508 a
CV 44	12,9095 a	15,9035 a	12.2132 a
CV 99	7,3935 b	12,7838 b	14.5865 a

Médias seguidas por letras distintas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 12: Contaminação de anteras de cafeeiro nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí vermelho 44 (CV44) e Catuaí vermelho 99 (CV99) à temperatura ambiente (experimento controle). UFU/Uberlândia-MG, 2002.

<b>Contaminação</b>			
<b>Cultivares</b>	<b>Avaliação 1</b>	<b>Avaliação 2</b>	<b>Avaliação 3</b>
MN	0,7743 c	0,1596 c	0,6045 a
CV 44	4,8589 a	2,4590 a	2,8035 a
CV 99	0,9766 b	0,8726 b	1,0843 a

Médias seguidas por letras distintas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

No presente trabalho em algumas anteras, após o intumescimento, manifestou-se uma pequena calosidade, mas em seguida estas e as demais oxidaram e morreram. As anteras logo após o transplante, embora estivessem oxidadas, voltaram a intumescer, entretanto não houve formação de indício de calosidade. A cultivar Catuaí vermelho 99 apresentou os melhores resultados (Tabela 13), se for considerado o intumescimento das anteras como um possível

início de formação de calos, a diferença de manifestação entre os genótipos é comum na técnica de cultura de anteras, prevendo-se então que o Catuaí vermelho 99 seja mais responsivo.

Tabela 13: Intumescimento de anteras de cafeeiro nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí vermelho 44 (CV44) e Catuaí vermelho 99 (CV99) à temperatura ambiente (experimento controle). UFU/Uberlândia, 2002.

<b>Intumescimento</b>			
<b>Cultivares</b>	<b>Avaliação 1</b>	<b>Avaliação 2</b>	<b>Avaliação 3</b>
MN	0,3777 b	0,0468 b	0,0468 b
CV 44	0,1328 b	0,0000 b	0,1761 b
CV 99	9,4680 a	6,5074 a	3,7279 a

Médias seguidas por letras distintas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Após 30 dias de inoculação, as anteras provenientes deste experimento controle foram transplantadas para meios contendo doses maiores de 2,4-D (10  $\mu$ M e 15  $\mu$ M). A média geral de oxidação foi de 96,86%, a de contaminação foi de 19,82% e a de intumescimento foi de 32,66% (Figura 4).

No pré-tratamento por choque de calor e no tratamento controle (temperatura ambiente), as anteras apresentaram intumescimento a partir da 1ª avaliação, entretanto, a partir da 2ª, estas também estavam oxidadas. Após o transplante, a partir da 1ª avaliação, todas as anteras que estavam intumescidas também encontravam-se oxidadas.

A partir dos resultados obtidos, notou-se que os maiores valores de oxidação e os menores de intumescimento ocorreram para o pré-tratamento por choque de calor quando comparados ao tratamento controle (temperatura ambiente), provavelmente, isso está ligado ao fato da maior temperatura (35°C) ao qual as anteras foram submetidas. Provavelmente, o tratamento controle (temperatura ambiente) foi mais eficaz quando comparado ao pré-tratamento por choque de calor.

No pré- tratamento por choque frio, foram evidenciados altos índices de contaminação quando comparado aos demais experimentos; na tentativa de resolver tal problema, a

metodologia durante o processo de inoculação foi alterada para a realização dos experimentos controle e do pré- tratamento por choque de calor; onde as anteras, após serem retiradas dos botões florais, eram imersas antes de serem inoculadas em uma solução de hipoclorito de sódio à 0,2% e em uma solução de ácido ascórbico à 3,4 mM, na tentativa de diminuir a oxidação.



#### 4- CONCLUSÕES

- O estágio uninucleado central dos micrósporos foi encontrado em botões florais de 4,5 à 6,0 mm de comprimento;
- o processo de desinfestação utilizado no cultivo *in vitro* não foi eficiente;
- ocorreu um alto índice de oxidação;
- os pré- tratamentos e o 2,4-D nas concentrações utilizadas não foram eficientes na indução de embriões nas anteras das cultivares estudadas.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, L.M.C.O. 1998. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica*)**. Lavras-MG-UFLA. Dissertação de Mestrado, 86p.
- ARRUDA, S. A. 2000. **Produção de propágulos de batata doce [*Ipomea batatas* L. (Lam.)] obtidos *in vitro* e submetidos a tratamentos prévios com fungicida e bactericida**. Jaboticabal – SP – UNESP. Dissertação de mestrado, 42p.
- ASCANIO, E.C.E., ARCIA, M.M.A. 1987. **Haploids from anther culture in *Coffea arabica* L.** In: Abstracts of the International Congress of Plant Tissue-Culture-Tropical Species, Bogotá, Colômbia, 68p.
- ASCANIO, E.C.E., ARCIA, M.A.M. 1994. Efecto del estado de desarrollo de las anteras y de un shock térmico sobre la androgénesis en *Coffea arabica* L.. var. *Garnica*. **Café Cacao Thé**, v.28, n.2, p.75-79.
- BRASILEIRO, A. C. M., DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, C.A., CALDAS, S. C., BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq,1999. p. 676-736.

- BRASILEIRO, A. C. R., WILLADINO, L., GUERRA, M., COLAÇO, W., MEUNIER, I., CAMARA, T. R. 1999. Efeitos do estágio de desenvolvimento da antera e da radiação gama na formação de calos derivados de anteras de tomate. **Scientia Agricola**. v.56, n.4.
- CAIXETA, G.Z.C. 1999. Economia cafeeira, mercado de café, tendência e perspectivas. In: Encontro sobre produção de café de qualidade. **Livro de Palestras...** Viçosa: UFV, p.3-21.
- CARDOSO, A.P.S. 1994. **Café – cultura e tecnologia primária**. Ed. Ministério do planejamento e da administração do território. Secretaria de estado da ciência e tecnologia. Instituto de investigação científica tropical. 169 p.
- CARNEIRO, M. F. 1987. ***In vitro* induction of embryogenesis on pollen grains of *C. arabica* cv Catuai**. In: Proceedings of the International Congress of Plant Tissue Culture-Tropical Species, Bogotá, Colômbia (In Press).
- CARNEIRO, M.F. 1999. **Advances on coffee androgenesis**. In: *Seminário Internacional sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira*. Londrina. *Anais...* Londrina: IAPAR, 3. p. 55-60.
- CARVALHO, A. 1993. Histórico do desenvolvimento da cultura do café no Brasil. **Instituto Agrônomo de Campinas**. Campinas. v.9, n.34, 7p. (documento IAC).
- DEBERGH, P.C, ZIMMERMAN, R.H. 1991. **Micropropagation. Technology and Application**. 1 ed. London: Kluwer Academic Publishers. 48p.
- DE- FOSSARD, R.A. 1985. **Establishment of laboratory regenerantes underfield conditions**. In: International Workshop on biotechnology in agriculture: Envolvim a research agenda for the ICGEB. New Delhi. p. 193-201.
- ENTENDENDO a biotecnologia. 2001?. [S. l.]: Universidade Federal de Viçosa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Fundação Biominas. 1 CD-ROM.

- FARIA, M. A. de, VILELLA, W. M. da C., SILVA, M. de L. O., GUIMARÃES, P.T.G.; SILVA, E. L. da, OLIVEIRA, L. A. M., SILVA, A. L. da. 2001. Influência das lâminas de irrigação e da fertirrigação na produtividade do cafeeiro (*Coffea arabica L.*)- 2ª colheita. In: Simpósio Brasileiro de Pesquisa em Cafeicultura Irrigada, 4., Araguari, 2001. **Anais...** Uberlândia: UFU. p.11-14.
- FAZUOLI, L.C. 1986. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A.B. ed. **Cultura do cafeeiro – fatores que afetam a produtividade.** Piracicaba, Associação Brasileira de Pesquisa Potassa e Fosfato.
- FERRÃO, M.A.G., FONSECA, A. F. A. da, FERRÃO, R.G., ROCHA, A.C., ANDRADE NETO, A.P.M., FORNAZIER, M. J. 2000. Desempenho de Progenies de Café Arábica na região de Montanhas do Estado do Espírito Santo. In: Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil, 1, Poços de Caldas, 2000. **Resumos...** Brasília: Embrapa Café/Minasplan, p.426-429.
- FLORIANI, C.G. 2000. Café a certificação é o caminho. **Caderno Técnico-Agrotec**, Belo Horizonte, n.1, p.1-20.
- GRANDO, M.F., MORAES FERNANDES, M. I. B. 1993. Proposta de um modelo para explicar a embriogênese do grão de pólen *in vitro*. In: Encontro brasileiro de biotecnologia vegetal, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: Redbio, v.1, res.69.
- GRANER, E.A., GODOY JUNIOR. C. 1967. **Manual do Cafeicultor.** Ed. Universidade de São Paulo, 320p.
- GULSHAN, VARGHESE, T. M., SHARMA, D.R.1981. Studies on anther cultures of tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. **Biologia Plantarum**, v.23, p.414-420.
- HENDY, H., POCHARD, E., DALMASSO, A. 1985. Transmission héréditaire de la résistance aux nématodes *Meloidogyne* Chitwood (*Tylenchida*) portée par 2 lignées de *Capsicum annuum* L.: étude de descendances homozygotes issues d'androgenése. **Agronomie**, Versalhes, v.5, n.2, p.93-100.

HERMAN, B.E. 1996. **Agriceel report. A plant tissue culture Newsletter.** v.27, n.4.

LUZ, J.M.Q. 1995. Embriogênese somática “*in vitro*” em anteras de pimentão (*Capsicum annuum* L.). Tese de Doutorado. Lavras-MG-UFLA. 115p.

MANTELL, S. H., MATTHEWS, J. A., McKEE, R. A. 1994. **Princípios de biotecnologia em plantas: Uma introdução à engenharia genética em plantas.** Ribeirão Preto, SBG, 333p.

MARTINEZ, C. P., PULVER, E., NUNEZ, V.M. 1989. **Uso del cultivo de tejidos en el mejoramiento del arroz.** In: Evaluacion cooperativa del germoplasma de arroz en América Latina. Cali: CIAT, p.105-125.

MASCARENHAS, J.P. 1971. **RNA and protein synthesis during pollen development and tube growth.** In: Heslop-HARRISSON, J., ed. Pollen development and physiology. London, Butterworth, p. 201-222.

MENDES, A.N.G., GUIMARÃES, R. J. 1998. **Cafeicultura Empresarial: Produtividade e Qualidade- Melhoramento Genético do Cafeeiro.** Lavras: Universidade Federal de Lavras, p.1-3.

MORAES FERNANDES, M.I.B. de. 1990. Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP/EMBRAPA/CNPH, p.311-32.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum.** v.15, p.473-479.

NEUENSCHWANDER, B., BAUMANN,-T.W. 1995. Increased frequency of dividing microspores and improved maintenance of multicellular microspores of *Coffea arabica* in medium with coconut milk. **Plant-cell,-tissue-organ-cult.** Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers. v. 40 (1).p. 49-54.

- NITSCH, C. 1983. **Progress in anther and pollen culture techniques**. In: Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Proc. Institute of Genetics, Academia Sinica and the International Rice Research Institute, Manila, Philippines. p.1-10.
- NORIEGA, C., SONDAHL, M. 1993. **Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors**. ASIC, v.15, p. 73-81.
- PARANHOS, T.J., PERRANDO, E., FRANCO, H.E.T., AITA, A. 1996. Regeneração *in vitro* das cultivares de tomate Empine e Monte Carlo. **Revista Horticultura Brasileira**. **14(2)** : 203-207. Brasília.
- PETERS, J.A., BOBROWSKI, V.L., ROSINHA, G.M.S. 1999. Produção de haplóides e duplo haplóides. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.; BUSO, J.A. (eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. v.2, p. 596-611.
- PIERIK, R.L.M. 1987. **In vitro culture of higher plant**. The Netherland M.N. Publishers, 344p.
- POLLOCK, K., BARFIELD, D. G., SHIELDS, R. 1983. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Reporter**, Florida, v. 2, p. 36-9.
- RENA, A.B., NACIF, A. de P. 1999. Programa Brasileiro de Biotecnologia aplicada ao Cafeeiro. In: Seminário Internacional sobre biotecnologia na agroindústria cafeeira, 3, Londrina. **Anais...Londrina: IAPAR/IRD**, p.43-46.
- REYNOLDS, T. L. 1990. **Ultrastructure of Pollen Embryogenesis**. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Haploids in Crop Improvement I**. Berlin: spring-Verlag. v.12, p.67-82.
- RIBEIRO, A.O. 1999. **Definição de meio de cultura para morfogênese indireta em alface variedades Verônica e Maioba**. Uberlândia - MG- UFU. Monografia do Curso de graduação de Ciências Biológicas, 39p.

- SHARP, W.R., CALDAS, L.S., CRÓCOMO, O.J., MÔNACO, L.C., CARVALHO, A. 1973. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. *Phyton*, v.31, p.67-74.
- SONDHAL, M.R., SHARP, W.R. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol*, v.81, p.395-408.
- SONDAHL, M.R., SALYSBURY, J.L., SHARP, W.R. 1979. Sem characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. *Z. Pflanzenphysiol*, v.94, p.185-188.
- SONDAHL, M.R., NAKAMURA, T., MEDINA FILHO, H.P., CARVALHO, A., FAZUOLI, L.C., COSTA, W.M. 1984. In: AMMIRATO, P.V., EVANS, D.A., SHARP, W.R.; YAMADA, Y. (eds). **Handbook of Plant Cell Culture**. Macmillan Pub. Co., New York, v.3, p.564-590.
- STARITSKY, G. 1970. Embryoid formation in callus cultures of coffee. *Acta.Bot. Neerdl*, v.19, p.509-514.
- TORRES, C.A., CALDAS, S.C., BUSO, J.A. 1998. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa: Brasília. vol1. 509p.
- VASIL, I.K., AHUJA, M. R., VASIL, V. 1979. Plant Tissue Culture in genetics and plant breeding. *Advance Genetics*. v. 20, p. 127-215.
- ZAMAARRIPA, A., DUCOS, J.P.; BOLLON, H.; DUFOUR, M.; PETIARD, V. 1991. Production d'embryons somatiques de cafeier em milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. *Café Cacao Thé*, v.35, p.233-244