

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

INDUÇÃO DE CALOS EM ANTERAS DE *Coffea arabica* L., CULTIVADAS *IN VITRO* NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE LUZ EM MEIO COM 2,4-D, BAP, TDZ E CINETINA.

Adelaide Siqueira Silva

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  
Dezembro-2003

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

INDUÇÃO DE CALOS EM ANTÉRAS DE *Coffea arabica* L., CULTIVADAS *IN VITRO* NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE LUZ EM MEIO COM 2,4-D, BAP, TDZ E CINETINA.

Adelaide Siqueira Silva

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz

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  
Dezembro-2003

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


INDUÇÃO DE CALOS EM ANTERAS DE *Coffea arabica* L., CULTIVADAS *IN VITRO* NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE LUZ EM MEIO COM 2,4-D, BAP, TDZ E CINETINA.

Adelaide Siqueira Silva

Aprovada pela Banca Examinadora em 05/13/03  
Nota: 93,0

  
Universidade Federal de Uberlândia  
Prof.ª Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

  
Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz  
  
MSc. Alcione da Silva Arruda  
Examinadora

  
Prof. Dr. Cicero Donizete Pereira  
Examinador

Uberlândia, 05 de Dezembro de 2003

INDUÇÃO DE CALOS EM ANTERAS DE *Coffea arabica* L., CULTIVADAS IN VITRO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE LUZ EM MEIO COM 2,4-D, BAP, TDZ E CINETINA.

ADELAIDE SIQUEIRA SILVA<sup>1</sup>

RESUMO

No Brasil, o *Coffea arabica* L. apresenta progressos com relação à aplicação da cultura de anteras, visto que este país é o principal produtor mundial de café. Este trabalho avaliou o cultivo in vitro de anteras de *C. arabica* do cv. Catuai Vermelho 44 na ausência ou presença de luz em meio de cultura com os reguladores de crescimento 2,4-D, BAP, TDZ e Cinetina na indução de calos. O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, da Universidade Federal de Uberlândia. Anteras do cv. Catuai Vermelho 44 foram cultivadas em meio básico MS suplementado com quatro concentrações de 2,4-D (9,05; 18,1; 27,1; 36,2  $\mu\text{M}$ ) e duas concentrações de BAP (0 e 8,9  $\mu\text{M}$ ), na presença ou ausência de luz. As avaliações das variáveis oxidação, intumescimento e calosidade foram realizadas aos trinta dias e o diâmetro dos calos aos quarenta e cinco dias. Nos trinta dias os calos foram separados em: friáveis, esverdeados, esbranquiçados e cinza. Os resultados mostraram que o cultivo na ausência de luz independentemente da associação ou não do 2,4-D ao BAP acarretou menor oxidação e promoveu maior intumescimento das anteras, formação e aumento do tamanho dos calos, bem como na formação e desenvolvimento de calos friáveis.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, cultura de anteras, reguladores de crescimento.

<sup>1</sup>Bióloga - Universidade Federal De Uberlândia

# INDUCTIONS OF CALUS IN ANTHERS OF *Coffea arabica* L., CULTIVATED *IN VITRO* IN PRESENCE OR ABSENCE OF LIGHT WITH 2,4-D, BAP, TDZ, AND KINETIN

## ABSTRACT

In Brazil, *Coffea arabica* L. still shows progress in relation to the application of the culture of anthers, known with this country is the principal producer world-wide of coffee. This work evaluate the cultivation anthers *in vitro* of Catuai Vermelho 44 a *C. arabica* L. cultivar in the presence and absence of light, in culture middle with the plant growth regulators 2,4-D, BAP, TDZ and KIN in the induction of calus. The experiment was carried out at the Plant Tissue Culture Laboratory of Universidade Federal de Uberlandia (UFU), in two stages. Anthers of Catuai Vermelho 44 cultivar were cultivated in MS middle with four concentrations of 2,4-D (9,05; 18,1; 27,1 and 36,2  $\mu\text{M}$ ) and two concentrations of BAP (0 and 8,9  $\mu\text{M}$ ) in conditions: presence of light. The evaluations for calus formation, oxidation and intumescence were done at thirty days after incubation, and the calus diameter it was realized after forty-five days. After thirty days the calus were classified in the following classes: friable, greenish, whitish and gray. The results showed that the cultivate in absence of light with or no association of 2,4-D and BAP give best results that oxidation, intumescence of anthers, calus formation and developing, like the formation and developing of friable calus.

KEYWORDS: *Coffea arabica*, culture anthers, growth regulators

## INTRODUÇÃO

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae, na qual o gênero *Coffea* abrange cerca de 60 espécies, sendo as mais comuns no mercado *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. O *C. 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 (GRANER E GODOY, 1967)

Instituições de pesquisa têm direcionado esforços nos programas de melhoramento das espécies mais cultivadas, nos países onde o café assume importância econômica. Segundo Mendes e Guimarães (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.

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 novos cultivares, porém demandam aproximadamente 25 anos, contados desde a hibridação até a obtenção de uma nova variedade (PASQUAL, et al. 2002). Nestes programas, a cultura de anteras é considerada uma ferramenta importante, pois permite a obtenção de haplóides em gerações segregantes, o que leva a rápida produção de plantas homocigotas por meio da duplicação do número de cromossomos numa única etapa, substituindo as gerações de autofecundação. Acrescenta-se a isso o fato dos haplóides serem livres dos problemas de dominância e recessividade, por possuir apenas um alelo em cada loco gênico (ANDRADE, 1998).

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 microsporos recém liberados da tetrade meiótica até no máximo, estágio binucleado. Grandó e 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 microsporo, pois nestes dois momentos o microsporo ainda teria metabolicamente características esporofíticas, o que permite a diferenciação do grão de pólen em embrião e posterior formação de uma planta.

Segundo Mantell et al. (1994), são possíveis vários tipos de desenvolvimento do microsporo *in vitro*, sendo que tanto o núcleo generativo quanto o vegetativo podem se dividir continuamente originando um embriãoide haploide, ou ainda, a primeira mitose produziria dois núcleos semelhantes e estes se dividiriam repetidamente resultando na formação de embriões haploides. De acordo com Figueira (2002), existe um sincronismo no desenvolvimento das anteras, do botão floral e estes, estão relacionados com os estágios de desenvolvimento dos microsporos, ou seja, o diâmetro dos mesmos evolui de acordo com o crescimento das anteras e do botão floral.

A composição do meio de cultura também 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 meios que contêm sais minerais, sacarose, vitaminas, reguladores de crescimento e agar (MORAES FERNANDES, 1990). A consistência do meio, normalmente é sólida, mas os meios líquidos estão sendo cada vez mais usados, pois têm vantagens no aumento do rendimento pela maior obtenção de embriões e calos (PIERIK, 1987).

Outros fatores indispensáveis em qualquer técnica de cultura de tecidos são os reguladores de crescimento. Estas substâncias orgânicas apresentam como função básica a 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 citocinínico, derivado de uréia, sendo de composição química *N*-phenil-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-iluréia, não contendo anel purínico em sua estrutura, ao contrário do que acontece nas demais 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).

No Brasil, o *C. arabica* apresenta progressos com relação à aplicação da cultura de anteras, visto que, este país é o principal produtor mundial de café. Trabalhos como o de Pasqual (2002) que estabeleceu uma metodologia eficiente para regeneração de plantas dihaplóides, e de Figueira (2002) que estudou o efeito do pré-tratamento de botões florais e do regulador de crescimento 2,4-D na indução de embriões, ambos em anteras de cafeeiro, comprovam os progressos com relação à esta cultura. Objetivou-se com este trabalho induzir e regenerar calos em anteras de *C. arabica*, com 2,4-D, BAP, TDZ e Cinetina, bem como a determinação de condições físicas mais adequadas à incubação de anteras dessa espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1 -Análise do fotoperíodo e da interação entre os reguladores de crescimento 2,4-D e BAP na indução de calos.

Esta etapa foi constituída por dois experimentos, conduzidos no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Uberlândia em Uberlândia - Minas Gerais, no período de setembro de 2002 a janeiro de 2003.

Foram utilizados botões florais do cultivar (Catuai Vermelho LCH-2077-2-5-44) de *Coffea arabica* L., plantado na área experimental do Campus Umuarama desta Universidade.



Os botões foram coletados entre 8 e 9 horas da manhã e armazenados em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido em água destilada e colocados dentro de uma caixa de isopor para evitar a desidratação, até serem conduzidos ao laboratório. Foram selecionados para o experimento botões com tamanho entre 4,5 e 6,5 mm de comprimento para todos os tratamentos, medidos com o auxílio de um paquímetro. Pois é neste tamanho em que os micrósporos estão no estágio uninucleado central, otimizando o processo para a obtenção de plantas haplóides (FIGUEIRA, 2002).

No laboratório, os botões foram envoltos em gaze esteril e desinfestados em uma solução de álcool 70% por 1 segundo e por 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,2%, sob agitação. Em seguida, na câmara de fluxo laminar, foram lavados 3 vezes em água destilada e autoclavada. A partir deste momento as anteras foram retiradas dos botões com o auxílio de um microscópio estereoscópio com aumento de 40 vezes utilizando-se pinça fina e bisturi nº 10; sendo os últimos flambados a cada novo botão, tomando-se o cuidado para não ferir as anteras. Após este processo, as anteras foram imersas rapidamente em solução de ácido ascórbico na concentração de 2788  $\mu\text{M}$  para evitar a oxidação das mesmas, hipoclorito de sódio 0,2%, para a desinfestação e água destilada e autoclavada.

Após este processo as anteras foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo 20 ml do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com reguladores de crescimento, previamente esterilizado em autoclave vertical à temperatura de 121° C, sob pressão de 1 atm por 20 minutos, tendo o pH ajustado para 5,8.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados em esquema fatorial 4 x 2 x 2, onde os tratamentos foram compostos de quatro concentrações de 2,4-D (9,05; 18,1; 27,1; 36,2  $\mu\text{M}$ ), duas concentrações de BAP (0 e 8,9  $\mu\text{M}$ ), perfazendo oito tratamentos; incubados na ausência e presença de luz em sala de crescimento com  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e

16 horas de fotoperíodo. No experimento, cada tratamento teve 10 repetições, sendo um tubo, contendo 10 anteras, considerado uma repetição.

Após 30 dias de inoculação das anteras, foram avaliadas as porcentagens de oxidação, de intumescimento e de formação de calos, e aos 45 dias foi medido o diâmetro dos calos, em milímetros, sendo considerados apenas aqueles com diâmetro superior a 5 mm.

Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade e à homogeneidade, necessitando de transformação em arco seno para os dados em porcentagem e raiz de  $(x + 0,5)$  para os dados referentes ao diâmetro dos calos.

Os calos obtidos da etapa anterior nas quatro concentrações de 2,4-D e duas de BAP, foram transferidos para os meios MS suplementado com 2,4-D e BAP nas concentrações de 18,1 e 9,05  $\mu\text{M}$  incubados na presença de luz e 18,1 e 0  $\mu\text{M}$  incubados na ausência de luz, respectivamente, com o pH ajustado para 5,8, no período de fevereiro a março de 2003.

Após 30 dias neste sub-cultivo os calos foram separados em friáveis, esverdeados, esbranquiçados e cinza de acordo com o aspecto externo apresentado pelos mesmos.

## **II - Indução de calos com os reguladores de crescimento Cinetina, TDZ, BAP.**

No período de março a maio de 2003, todos os calos aproveitáveis da etapa anterior foram novamente transferidos para os meios MS 100% ou 50% de sais com 9,3  $\mu\text{M}$  Cinetina, 4,4  $\mu\text{M}$  BAP, 0,45  $\mu\text{M}$  TDZ e ausência de regulador, nos dois casos com o pH ajustado para 5,8. Nos meses de junho a agosto de 2003, os calos utilizáveis dos meios MS 100% e 50% foram transferidos em sua totalidade para um meio sem reguladores de crescimento, numa nova tentativa de regenerar os calos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### I- Análise do fotoperíodo e da interação entre os reguladores de crescimento 2,4-D e BAP na indução e regeneração de calos

De maneira geral não houve diferenças significativas quanto ao intumescimento em função da luminosidade nas concentrações de 9,05  $\mu\text{M}$ , 18,1  $\mu\text{M}$  e 36,2  $\mu\text{M}$  de 2,4-D combinado ou não com BAP (Tabela 1). Por outro lado, na concentração de 27,1  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, independentemente da presença ou não de BAP, a luminosidade atuou de forma significativa, ocorrendo portanto, um maior índice de intumescimento quando os explantes florais foram incubados no escuro.

Para a calosidade, a luminosidade e a presença ou não de BAP não interferiram de forma significativa, exceto nas concentrações 9,05 e 27,1  $\mu\text{M}$ . Já os melhores resultados ocorreram na incubação em ausência de luz e BAP.

O aumento nas concentrações de 2,4-D quando estudado em relação ao estímulo ao crescimento, apresentou de maneira geral caráter inibidor, uma vez que o melhor resultado encontrado para o diâmetro ocorreu na menor concentração de 2,4-D quando as anteras foram inoculadas na ausência de luz. Já na presença de luz sob a concentração de 27,1  $\mu\text{M}$  de 2,4-D o diâmetro mostrou-se inferior a 5 mm estando assim fora do parâmetro proposto pela metodologia adotada.

TABELA 1. Médias de intumescimento, calosidade e diâmetro dos calos (mm) das anteras do cultivar Catuai Vermelho 44, entre as diferentes concentrações de 2,4-D e ausência ou presença de BAP em duas condições de luminosidade (claro e escuro)

2,4-D ( $\mu$ M)	BAP ( $\mu$ M)	Luminosidade <sup>1</sup>					
		Intumescimento		Calosidade		Diâmetro (mm)	
		Claro	Escuro	Claro	Escuro	Claro	Escuro
9,05	0	9,07 a A	7,75 a A	7,79 bA	9,48 aA	6,09 bA	8,00 aA
	8,9	8,43 a A	8,75 a A	8,89 aA	9,46 aA	6,07 aA	4,20 bB
18,1	0	8,87 a A	8,52 a A	9,39 aA	9,90 aA	4,90 aA	4,66 aA
	8,9	9,06 a A	7,86 a A	9,17 aA	9,59 aA	4,20 aA	4,93 aA
27,1	0	6,00 b A	7,72 a A	6,94 bA	8,95 aA	0,00 bA	3,73 aA
	8,9	0,22 b B	8,27 a A	2,94 bB	8,37 aA	0,00 bA	3,76 aA
36,2	0	8,28 a A	7,37 a A	9,28 aA	9,39 aA	4,14 bA	5,95 aA
	8,9	8,66 a A	7,25 a A	9,49 aA	8,66 aA	3,29 aA	3,76 aA

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna dentro de cada concentração de 2,4-D, diferem entre si pelo teste de Tukey a significância de 5%.

Assim, o 2,4-D no presente estudo, apresentou caráter indutor para o intumescimento e calosidade conforme proposto por Torres, Caldas e Buso (1998), entretanto, não foi observada influência, positiva ou negativa, para a associação de 2,4-D e BAP conforme os estudos de Skoog e Miller (1957) onde a associação entre auxinas e citocininas nos meios de cultura regularia o desenvolvimento da cultura.

Silva (2002), cita que a utilização de auxinas e citocininas em diferentes concentrações na indução da formação e no desenvolvimento de calos em anteras de soja gerava uma discreta atuação destas substâncias na calogênese, em alguns dos tratamentos o que corrobora com os dados encontrados neste estudo.

O efeito inibidor da luminosidade foi também apresentado por Jaramillo e Summers (1991) onde a indução de calos desenvolveu-se melhor no escuro para a maioria das espécies estudadas. Contudo, para este estudo, a ausência de luminosidade apresenta efeito maior na indução da formação de calos que o suplemento hormonal conforme foi também apresentado

por Nascimento et al. (2003). Estes autores estudando a ação de fitorreguladores e da luminosidade na indução de calos de carqueja (*Baccharis trimera* (Less) D.C.), verificaram que independentemente da interação dos fitorreguladores Ácido Naftalenoacético (ANA) e Cinetina (CIN) a maior formação de calos deu-se quando a incubação das anteras ocorreu na ausência de luz.

A associação 2,4-D e BAP não influenciou de forma significativa na oxidação das anteras. Já a condição de luminosidade mostrou-se bastante significativa tendo, portanto ação estimuladora da oxidação (Tabela 2). Essa atividade segundo Dechamps e Innecco (1991) é resultado da atividade de enzimas luminosidade dependentes, que levam a biossíntese e a oxidação de compostos fenólicos promovendo assim a oxidação dos explantes florais (Tabela 3).

TABELA 2. Médias de oxidação das anteras, entre as diferentes concentrações de 2,4-D em duas condições de luminosidade (claro e escuro).

2,4-D ( $\mu$ M)	OXIDACÃO	
	Claro	Escuro
9,05	7,49 a	2,69 b
18,1	4,20 a	2,70 b
27,1	9,99 a	2,21 b
36,2	3,08 a	3,34 a

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras diferentes minúsculas na linha dentro de cada concentração de 2,4-D, diferem entre si pelo teste de Tukey a significância de 5%.

Dos 405 calos resultantes da primeira fase do experimento, 350 (86,42%) eram do tipo cinza, 25 (6,17%) friáveis, 19 (4,69%) esbranquiçados e apenas 11 (2,72%) esverdeados. Quanto ao diâmetro 69 (17,08%) calos, do total de 405, apresentaram diâmetro superior a 5 mm, quando inoculados na presença de luz (Tabela 3).

TABELA 3. Sub-cultivo em meio MS com 18,1  $\mu$ M de 2,4-D e 8,9  $\mu$ M de BAP na presença de luz.

Tipos de calos	Nº de calos	Calos com diâmetro acima de 0,5 mm	Total de calos no tubo
Friáveis	25	69	405
Esverdeados	11		
Esbranquiçados	19		
Cinza	350		

Dados de contagem, não transformados.

Na ausência de luz, dos 378 calos inoculados, a maioria (203), também era de cor cinza, 94 (24,87%) esbranquiçados, 58 (15,35%) friáveis e apenas 23 (6,08%) esverdeados. Quanto ao diâmetro, 56,61% (214) dos calos apresentaram diâmetro superior a 5 mm (Tabela 4).

TABELA 4. Sub-cultivo em meio MS com 18,1  $\mu$ M de 2,4-D e 0,0  $\mu$ M de BAP na ausência de luz.

Tipos de calos	Nº de calos	Calos com diâmetro acima de 0,5 mm	Total de calos no tubo
Friáveis	58	214	378
Esverdeados	23		
Esbranquiçados	94		
Cinza	203		

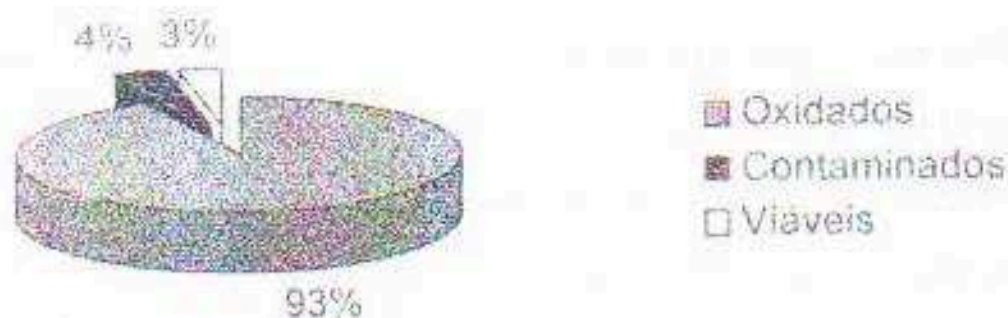
Dados de contagem, não transformados.

Dessa forma, em relação à indução a embriogênese, tem-se que os meios de cultivo MS suplementados apenas com 18,1  $\mu$ M de 2,4-D incubados na ausência de luz apresentam melhor desenvolvimento de calos friáveis. A grande quantidade de calos cinza encontrados, foi resultante da perda gradativa da coloração natural dos calos passando de verdes a marrom, aliada à diminuição do ritmo de crescimento dos mesmos, estagnação do processo de formação de embriões seguida pelo surgimento de áreas necrosadas na superfície que, segundo Silva (2002), constituem sinais característicos da decadência da cultura.

## II - Indução de calos com os reguladores de crescimento Cinetina, TDZ, BAP.

Quanto à indução de regeneração de embriões nos meios MS 100% e 50% suplementados com Cinetina, TDZ, BAP e na ausência de reguladores, não foi encontrado nenhum sinal de regeneração de calos resultando num alto índice de oxidação seguida de perda em 93% dos calos. 4% dos calos apresentaram contaminação e apenas 3% que permaneceram viáveis, foram transferidos para o meio sem reguladores de crescimento na tentativa de regenerar embriões (Figura 1). Até o presente momento estes apresentam um índice de oxidação próximo dos 100%. Este efeito difere daqueles apresentados na literatura, onde o TDZ em associação ao BAP e a Cinetina induziria a regeneração dos calos (VISSER et al., 1992; Lu, 1993).

FIGURA 1- Porcentagem de calos do Cv. Catuaí Vermelho 44 de *Coffea arabica* L. inoculados em meio de cultura com TDZ, Cinetina, BAP e ausência de reguladores de crescimento, na tentativa de induzir os calos.



## CONCLUSÕES

A associação de 2,4-D e BAP não influenciou de forma significativamente no intumescimento, na calosidade, no diâmetro e na oxidação das anteras do cultivar Catuai Vermelho 44 de *C. arabica* L.

A luminosidade apresentou caráter inibidor para o intumescimento, calosidade e diâmetro dos calos, principalmente na concentração de 27,1  $\mu\text{M}$  de 2,4-D associado ou não a 8,9  $\mu\text{M}$  de BAP.

A oxidação foi maior na luminosidade quando em associação ao 2,4-D.

O cultivo de calos na ausência de luz traz melhores resultados tanto para a formação de calos friáveis quanto para o crescimento destes.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que mais uma etapa da minha vida fosse vencida com muita glória. Aos meus pais João e Vera pelo amor, carinho, total apoio e incentivo em minha vida. Ao meu irmão, Luciano que muito me ajudou nessa jornada da faculdade com seu companheirismo e paciência. Ao meu namorado, Alexandre pelo amor, amizade e companhia. As minhas amigas do laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, em especial a Elisângela e a Gláucia, que muito contribuíram para a realização deste trabalho. Aos professores José Magno, Cicero e Alcione, pelo profissionalismo e dedicação à pesquisa científica que foram indispensáveis à realização desta monografia, sobretudo ao apoio e amizade que me dedicaram.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L.M.C.O. Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica*). Lavras. Dissertação (Mestrado em Cultura de Tecidos Vegetais) - Universidade Federal de Lavras, 1998. 86p.

DECHAMPS, C., INNECCO, R. **Oxidação fenólica** (Seminário de Pós-Graduação) UFPA, Lavras. 1991.

FIGUEIRA, E. R. Estádios de desenvolvimento dos micrósporos, Pré-tratamentos e 2,4-D no cultivo *in vitro* de anteras de cafeeiro. 2002. 33 p. **Dissertação (Monografia)** - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

GRANDÓ, M.F., MORAES FERNANDES, M.I.B. Proposta de um modelo para explicar a embriogênese do grão de pólen *in vitro*. In: Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal, 1993, Brasília, DF. **Anais...**, Brasília: Redbio, v.1, res.69

GRANER, E.A., GODOY JUNIOR, C. **Manual do Cafeicultor**. Ed. Universidade de São Paulo, 320p., 1967.

JARAMILO, J., SUMMER, W.L. Dark - light treatments influence induction of tomato anther culture, **Hort Science**, v.26, p. 915-916, 1991.

LU,C.Y. The use of Thidiazuron in tissue culture. **In vitro cell. Dev. Biol. sine locus**, v.29,p.92-96, Apr.1993.

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

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. 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, 1990. p.311-32.

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

NASCIMENTO, V.E., SILVA, F.G., PINTO, J.E.B.P.; SALES, J.F.; BERTOLUCCI, S.K.V. Efeito do explante, luz e fitorreguladores na indução de calos de carqueja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS 14 E CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS 1, 2003. Lavras. **Resumos...** Minas Gerais. SBPPO. 2003. p. 227.

PASQUAL, M.; MACIEL, A.L. de R.; CAMPOS, K.P. de; SANTOS, E.C.; CAMPOS, R.J.C. de. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica*) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.1, p.71-76, 2002.

PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plant. **The Netherland**, M.N. Publishers, 1987. 344p.

SILVA, H.E. **Efeito de Genótipo e de Reguladores de Crescimento na Expressão Androgenética da Soja**. Jaboticabal. Dissertação de Mestrado, Unesp, 2002. p.3-4

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated *in vitro*. In: Symposium Society of Experimental Biology. Symposium, 11, 1957. **Biological Action of Growth Substances**, v.11, 1957. p. 118-131.

TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAP - SPI, 1998, V.1, p. 207-208.

VISSER, C., QURESHI, J.A., RAVINDER, G., SAXENA, P.K. Morphoregulatory role of Thidiazuron. **Plant Physiology**, Maryland, v.99, p.1704-1707, 1992.

\* ARTIGO REDIGIDO DE ACORDO COM AS NORMAS DA REVISTA BRASILEIRA DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS (normas no Apêndice).

## APÊNDICE

### INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA BRASILEIRA DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS

Os artigos submetidos para publicação poderão ser redigidos em *português ou inglês* e deverão ser apresentados em meio magnético (disquete 3½"), utilizando-se o processador de texto Microsoft Word for Windows (versão 6.0, 7.0 ou 97), obedecendo às seguintes recomendações:

1. Juntamente com o disquete, deverão ser enviadas 4 (QUATRO) vias, sendo uma original e as demais cópias omitindo os autores e a chamada de rodapé da 1ª página (para serem enviadas aos consultores científicos), impressas em papel branco, tipo A4, em uma só face, espaço duplo, Fonte: Times New Roman, tamanho: 12, observada uma margem de 3 cm para o lado esquerdo e de 2 cm para o direito, 2,5 cm para margem superior e inferior, 2,5 cm para o cabeçalho e 2,5 cm para o rodapé. Cada trabalho deverá ter no máximo 14 páginas e junto do mesmo deverá ser encaminhado ofício dirigido ao Editor Chefe da Revista, solicitando a publicação do artigo. Nesse ofício deverão constar o endereço completo, inclusive telefone e e-mail, se houver, do autor que fará as possíveis correções e, ou sugestões dos pareceristas. Esse ofício será assinado por todos os autores.

2. Cada artigo terá: a) TÍTULO, suficientemente claro; b) NOME(S) DO(S) AUTOR(ES) EM LETRAS MAIÚSCULAS, no centro da página, um nome ao lado do outro, sendo que ao final da primeira página deverá vir a formação acadêmica e a Instituição onde trabalha (no rodapé da primeira folha); c) RESUMO (de acordo com NBR6028 da ABNT). Incluir após o Resumo TERMOS PARA INDEXAÇÃO (palavras-chave); d) TÍTULO EM INGLÊS, ABSTRACT, incluindo, em seguida INDEX TERMS; e) INTRODUÇÃO (incluindo-se a revisão de literatura); f) MATERIAL E MÉTODOS; g) RESULTADOS E DISCUSSÃO; h) CONCLUSÕES; e i) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. Nos artigos redigidos em inglês, o resumo deverá ser em português.

3. AGRADECIMENTOS: ao fim do texto e, antes das referências bibliográficas, poderão vir os agradecimentos a pessoas ou instituições. O estilo, também aqui, deve ser sóbrio e claro, indicando as razões pelas quais se fazem os agradecimentos.

4. TABELAS E QUADROS: deverão ser inseridos após citação dos mesmos dentro do próprio texto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: a lista de referências bibliográficas deve ser normalizada conforme a NBR6023 da ABNT-2002.

#### EXEMPLIFICAÇÃO (TIPOS MAIS COMUNS)

##### 5.1 - ARTIGO DE PERIÓDICO:

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Regeneração *in vitro* de brotações de pereira (*Pyrus communis* L.) cultivar carrick. Ciência Rural, Santa Maria, v. 33, n. 3, p. 391-591, mai./jun. 2003.

##### 5.2 - LIVRO:

a) Livro no todo: TORRES, A. C.; CALDAS, I. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. 509 p.

b) Parte com autor específico: TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. p. 133-143.

c) Parte sem autoria específica: MARTIM, L. C. T. Nutrição de bovino de corte em confinamento. In: \_\_\_\_\_. Confinamento de bovino de corte. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1986. cap. 3, p. 29-89.

### 5.3 - DISSERTAÇÃO E TESE

RODRIGUES, T. M. Substratos e adubação na aclimatização e desenvolvimento inicial de mudas de bromélia imperial. 2003. 62 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Nota: "A folha é composta de duas páginas: anverso e verso. Alguns trabalhos, como teses e dissertações, são impressos apenas no anverso e, neste caso, indica-se f no lugar de p". (ABNT, NBR6023, 2002, p. 18).

### 5.4 - TRABALHO APRESENTADO EM CONGRESSO E OUTROS EVENTOS

EXTERCKOTER, R. K.; PEDROTTI, E. L. Micropropagação de *Agapanthus umbellatus* var. minor. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 13, 2001, São Paulo. Resumos. São Paulo: SBFPO, 2001. p. 151.

### 5.5 - DOCUMENTOS ELETRÔNICOS

As obras consultadas online são referenciadas conforme normas específicas para cada tipo de documento (monografia no todo e em parte, trabalho apresentado em evento, artigo de periódico, artigo de jornal, etc.), acrescidas de informações sobre o endereço eletrônico apresentado entre braquetes (< >), precedido da expressão "Disponível em:" e da data de acesso ao documento, precedida da expressão "Acesso em:".

Nota: "Não se recomenda referenciar material eletrônico de curta duração nas redes" (ABNT, NBR6023, 2002, p. 4). Segundo padrões internacionais, a divisão de endereço eletrônico, no fim da linha, deve ocorrer sempre após barra (/).

#### 5.5.1 - Monografia (acesso online):

a) livro no todo

TAKAHASHI, T. (Coord.). Brasília: Socinfo/MCT, 2000. 90 p. Disponível em: <<http://www.socinfo.org.br>>. Acesso em: 22 ago. 2000.

b) parte de livro

TAKAHASHI, T. Mercado, trabalho e oportunidades. In: \_\_\_\_\_. (Coord.). Sociedade da informação no Brasil: livro verde. Brasília: Socinfo/MCT, 2000. cap. 2, p. 13-24. Disponível em: <<http://www.socinfo.gov.br>>. Acesso em: 22 ago. 2000.

c) Parte de congresso, seminário, etc.

GIESBRECHT, H. O. Avaliação de desempenho de institutos de pesquisa tecnológica: a experiência de projeto excelência na pesquisa tecnológica. In: CONGRESSO ABIPTL 2000, Fortaleza. Gestão de institutos de pesquisa tecnológica. Fortaleza: Nutec, 2000. Disponível em: <<http://www.abiptl.org.br>>. Acesso em: 01 dez. 2000.

d) Tese

SILVA, E. M. Arbitrariedade do signo: a língua brasileira de sinais (LIBRAS). 1997. 144 p. Dissertação (Mestrado em Linguística Aplicada e Estudo de Língua) - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo. São Paulo. Disponível em: <<http://www.terra.com.br/virtualbooks/freebook/port/did/teses.htm>>. Acesso em: 28 nov. 2000.

5.5.2 - Artigo de periódico (acesso online)

RESENDE, A. M. G. Hipertexto: tramas e trilhas de um conceito contemporâneo. *Informação e Sociedade*, Recife, v. 10, n. 1, 2000. Seção Educação. Disponível em: <<http://www.informacoesociedade.ufpb.br/>>. Acesso em: 30 nov. 2000.

5.6 - CITAÇÃO PELO SISTEMA ALFABÉTICO (AUTOR-DATA)

Dois autores - Erig e Schuck (2003) ou (ERIG e SCHUCK, 1960). Três ou mais autores - Santos et al. (2003) ou (SANTOS et al. 2003).

Deve-se observar caracteres maiúsculo/minúsculo, dentro e fora dos parênteses.

6. FOTOGRAFIAS, GRÁFICOS, FIGURAS, SIMBOLOS, FORMULAS. ESSES DEVERÃO OBEDECER ÀS SEGUINTE NORMAS:

6.1. FOTOGRAFIAS: deverão ser apresentadas em preto e branco, nítidas e com contraste, escaneadas, inseridas no texto após a citação das mesmas e também em um arquivo à parte (no mesmo disquete do artigo).

6.2. GRÁFICOS E/OU FIGURAS: deverão ser feitos no próprio editor gráfico do Word. Caso seja utilizado outro editor (inclusive os da Microsoft), esses deverão vir, também, em um arquivo à parte (no mesmo disquete do artigo).

6.3. FIGURAS que não têm condições de serem feitas no computador, deverão ser desenhadas nitidamente, para que possam ser reproduzidas com perfeição, escaneadas, inseridas no texto após a citação das mesmas e também em um arquivo à parte (no mesmo disquete do artigo).

6.4. SÍMBOLOS E FORMULAS QUÍMICAS: deverão ser feitas em processador que possibilite a formatação para o Word, sem perda de suas formas originais (ex. Isis, Chemical, etc).

7. O Editor Chefe notificará o autor do recebimento do original e, posteriormente, o informará sobre sua publicação. Os artigos que necessitarem de modificações serão devolvidos ao autor para a devida revisão.

8. O(s) autor(es) conservam os direitos autorais para futuras publicações; à revista, no entanto, é permitida a reprodução dos seus artigos.

9. O não-cumprimento destas normas implicará na devolução do artigo ao autor.

10. Os casos omissos serão resolvidos pela Comissão Editorial

11. O artigo deverá ser enviado para:

Renato Paiva

Editor Chefe

Revista Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas

ABCIP

Departamento de Biologia - Universidade Federal de Lavras

37.200-000 - Lavras - MG