

MON  
581.81.085.  
F475i  
TES/MEM



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**INDUÇÃO DE CALOS EM ANTERAS DE *Coffea*  
*arabica* L. EM DIFERENTES MEIOS DE  
CULTURA**

**ELISÂNGELA RODRIGUES FIGUEIRA**

**SISBI/UFU**



1000220675

**2005**

ELISÂNGELA RODRIGUES FIGUEIRA

INDUÇÃO DE CALOS EM ANTERAS DE *Coffea arabica* L. EM  
DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de  
Uberlândia, como parte das exigências do Programa  
de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área  
de concentração em Fitotecnia, para obtenção do  
título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Biblioteca



SISBI/UFU  
220675

FU000034908-2

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de  
Catalogação e Classificação

F475i

Figueira, Elisângela Rodrigues, 1980-

Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* L. em diferentes  
meios de cultura / Elisângela Rodrigues Figueira. - Uberlândia, 2005.  
87f. : il.

Orientador: José Magno Queiroz Luz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-  
grama de Pós-Graduação em Agronomia.

Inclui bibliografia.

1. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura - Teses. 2. Café -  
Melhoramento genético - Teses. I. Luz, José Magno Queiroz. II. Uni-  
versidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agro-  
nomia. III. Título.

CDU: 581.81.085(043.3

ELISÂNGELA RODRIGUES FIGUEIRA

INDUÇÃO DE CALOS EM ANTERAS DE *Coffea arabica* L. EM  
DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de  
Uberlândia, como parte das exigências do Programa  
de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área  
de concentração em Fitotecnia, para obtenção do  
título de “Mestre”.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2005.

Prof. Dr. Moacir Pasqual

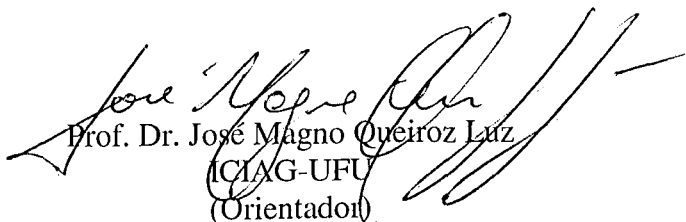
UFLA

Profa. Dra. Alcione da Silva Arruda

UEG

Prof. Dr. Benjamin de Melo

UFU



Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz  
ICIAG-UFU  
(Orientador)

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL

*DEDICO*

Aos meus amados pais Celino  
e Maria, pelo apoio, confiança  
e amor depositados em mim.

Aos meus irmãos Cristina,  
Daniel e Vanusa.

Ao meu amado noivo Delismar.

## *AGRADECIMENTOS*

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

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

Ao Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz pela orientação.

Às amigas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, especialmente à Luciana, pelo companheirismo e colaboração na realização do trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

## **BIOGRAFIA DA AUTORA**

ELISÂNGELA RODRIGUES FIGUEIRA, filha de Celino Alves Figueira e Maria Rodrigues Figueira, nasceu em Monte Alegre - MG, em 28 de fevereiro de 1980.

Residente em Canápolis - MG, mudou para Uberlândia em 1997 e em março de 1998, iniciou o curso de Ciências Biológicas (licenciatura e bacharelado) pela Universidade Federal de Uberlândia - UFU, concluindo-os em 2002. Sua monografia foi sobre a cultura de anteras de café.

Em março de 2003 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, na Universidade Federal de Uberlândia - UFU, o qual foi concluído em fevereiro de 2005; sendo que ela trabalhou com o mesmo assunto iniciado na monografia.

Na graduação, foi bolsista de iniciação científica do CNPq durante 2 anos, e no mestrado foi bolsista da CAPES durante 1 ano.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 O Cafeeiro ( <i>Coffea arabica</i> L.) .....	3
2.2 Importância econômica.....	5
2.3 Cultura de tecidos.....	7
2.4 Oxidação e contaminação na cultura de tecidos vegetais.....	11
2.5 Cultura de tecidos em cafeeiro.....	14
2.6 Cultura de anteras e melhoramento genético no cafeeiro.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Considerações gerais.....	29
3.2 Efeitos de pré-tratamentos em botões florais e do TDZ no cultivo <i>in vitro</i> de anteras de cafeeiro ( <i>Coffea arabica</i> L.).....	30
3.3 Efeito do subcultivo de calos do cultivar Catuaí Vermelho 44 em meio com 2,4-D, nitrato de prata e ácido acetilsalicílico.....	33
3.4 Influência do 2,4-D, nitrato de prata e ácido acetilsalicílico no cultivo <i>in vitro</i> de anteras de cafeeiro ( <i>Coffea arabica</i> L.).....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Efeitos de pré-tratamentos em botões florais e do TDZ no cultivo <i>in vitro</i> de anteras de cafeeiro ( <i>Coffea arabica</i> L.).....	36
4.2 Efeito do subcultivo de calos do cultivar Catuaí Vermelho 44 em meio com 2,4-D, nitrato de prata e ácido acetilsalicílico.....	50
4.3 Influência do 2,4-D, nitrato de prata e ácido acetilsalicílico no cultivo <i>in vitro</i> de anteras de cafeeiro ( <i>Coffea arabica</i> L.).....	53
5 CONCLUSÕES.....	71
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72



## RESUMO

FIGUEIRA, ELISÂNGELA RODRIGUES. **Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* L. em diferentes meios de cultura.** 2005. 87p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.<sup>1</sup>

O *Coffea arabica* apresenta poucos progressos quanto à aplicação da cultura de anteras, assim, é importante identificar os cultivares, a ação e a concentração dos reguladores de crescimento utilizados no meio de cultivo mais responsivos à androgênese. O objetivo foi aplicar a técnica da cultura de anteras em diferentes cultivares de *Coffea arabica* L. para induzir a formação de calos e regenerar plântulas dihaplóides. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de cultura de tecidos vegetais da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Experimento 1: Botões florais dos cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho 99 foram coletados, subdivididos em pré-tratamentos por choque frio (4°C), de calor (35°C) e à temperatura ambiente, desinfestados e as anteras inoculadas em meio MS suplementado com TDZ (0,001; 0,01; 0,1; e 1,0 mg.L). Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, as anteras foram subcultivadas para meio MS suplementado com 2,4-D (6 mg.L) e TDZ (0,5 mg.L). Experimento 2: Calos de Catuaí Vermelho 44 foram subcultivados em meio MS suplementado com 2 mg.L de 2,4-D, com presença ou não de 5 mg.L de AgNO<sub>3</sub> e AAS (0,0; 8,0; 16,0 e 32,0 mg.L). Experimento 3: Botões florais dos cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho 44 foram coletados, desinfestados e as anteras inoculadas em meio MS suplementado com 2 mg.L de 2,4-D, com presença ou não de 5 mg.L de AgNO<sub>3</sub> e AAS (0,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0 mg.L). Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, as anteras foram subcultivadas para meio MS suplementado com 2,4-D (0,0; 1,0 e 2,0 mg.L) e BAP (0,0; 2,0 e 4,0 mg.L). O pré-tratamento por choque frio é o mais eficiente na indução de calos no cultivo *in vitro* de anteras de *Coffea arabica* L.; os reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ nas concentrações utilizadas são eficientes na indução dos calos; porém não promovem a regeneração dos mesmos; o nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) e o ácido acetilsalicílico (AAS), assim como a associação de 2,4-D e BAP nas concentrações utilizadas, não são eficientes na regeneração dos pró-embrióides nas anteras dos cultivares estudados; Catuaí Vermelho é o cultivar mais responsivo à androgênese quando comparado ao Mundo Novo.

---

<sup>1</sup> Orientador: José Magno Queiroz Luz – UFU.

## ABSTRACT

FIGUEIRA, ELISÂNGELA RODRIGUES. **Callus induction in anthers of *Coffea arabica* L. in different culture medium.** 2005. 87p. Dissertation (Master Program in Agronomy/Crop Science) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.<sup>1</sup>

The *Coffea arabica* shows little progress in anther culture, so it is important to identify the cultivars, the action and the concentration of growth regulators used in culture medium, which is most responsive to androgenesis. The aim of this paper was to apply anther culture technique in different cultivars of *Coffea arabica* L. to induce callus formation and dihaploids plantlet regeneration. The experiments were carried out at plant tissue culture laboratory at Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Experiment 1: Flower buds of Mundo Novo and Catuaí Vermelho 99 cultivars were collected, separated in pre-treatments by cold shock (4°C), hot shock (35°C) and environmental temperature, sterilized, and the anthers were inoculated in medium MS, supplemented with TDZ (0,001; 0,01; 0,1 and 1,0 mg.L). After 30 days of *in vitro* culture, the anthers were subcultivated in medium MS supplemented with 2,4-D (6 mg.L) and TDZ (0,5 mg.L). Experiment 2: Callus of Catuaí Vermelho 44 were subcultivated in medium MS supplemented with 2 mg.L of 2,4-D, with presence or not of 5 mg.L de AgNO<sub>3</sub> and ASA (0,0; 8,0; 16,0 e 32,0 mg.L). Experiment 3: Flower buds of Mundo Novo and Catuaí Vermelho 44 cultivars were collected, sterilized and the anthers were inoculated in medium MS supplemented with 2 mg.L of 2,4-D, with presence or not of 5 mg.L de AgNO<sub>3</sub> and ASA (0,0; 8,0; 16,0; 32,0 and 64,0 mg.L). After 60 days of *in vitro* culture, the anthers were subcultivated in medium MS supplemented with 2,4-D (0,0; 1,0 e 2,0 mg.L) and BAP (0,0; 2,0 e 4,0 mg.L). The pre-treatment by cold shock is the most efficient one for the callus induction at *in vitro* culture of anthers of *Coffea arabica* L.; the growth regulators 2,4-D and TDZ at the concentrations used are efficient for the callus induction; however they don't promote the callus regeneration; the silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) and acetylsalicylic acid (AAS), such as the association of 2,4-D and BAP at the concentrations used aren't efficient in pro-embryos regeneration in anthers of the cultivars studied; Catuaí Vermelho is the most responsive cultivar at androgenesis when compared with Mundo Novo.

---

<sup>1</sup> Major Professor: José Magno Queiroz Luz – UFU.

## 1- INTRODUÇÃO

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae, na qual o gênero *Coffea* abrange cerca de 60 espécies. Entretanto, as espécies mais comuns são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, sendo que o café arábica corresponde a aproximadamente 70% do café comercializado no mundo.

O Brasil é o maior produtor mundial de café e Minas Gerais o maior produtor de café do Brasil. A colheita da safra 2003/2004 atingiu entre 27,8 a 30,08 milhões de sacas, sendo que a exportação deste produto representa significativa fonte de divisas para o país.

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. Entretanto, no sistema convencional de melhoramento onde o método de cruzamentos é usado, são necessários de 7 a 8 ciclos de autofecundação para estabilizar o genótipo pela fixação de genes em homozigose. Além de ser um processo demorado e trabalhoso, a eficiência da seleção nas primeiras gerações de autofecundação é muito baixa devido, principalmente, à ocorrência de alelos dominantes em heterozigose.

Por se tratar de cultura perene propagada via semente, os programas de melhoramento do café demandam aproximadamente 25 anos desde a hibridação até a obtenção de uma nova variedade. Sendo assim, a cultura de anteras é considerada uma ferramenta importante, uma vez que 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 possuírem apenas um alelo em cada loco gênico, acelerando drasticamente o processo de obtenção de novos cultivares.

A técnica de cultura de anteras/micrósporos, visando à produção de haplóides, vem sendo amplamente empregada na obtenção de novos cultivares em várias plantas de interesse agrônômico. Contudo, os mecanismos básicos pelos quais os micrósporos desviam de sua rota ontogenética normal, ainda são pouco compreendidos, o que dificulta a indução da androgênese em algumas espécies e limita sua aplicação nos modernos programas de melhoramento.

No Brasil, o *C. arabica* ainda apresenta poucos progressos com relação à aplicação da cultura de anteras. Assim, é de extrema importância identificar os cultivares, a ação e a concentração dos reguladores de crescimento utilizados nos meios de cultivo mais responsivos à androgênese.

O objetivo deste trabalho foi aplicar a técnica da cultura de anteras em diferentes cultivares de *Coffea arabica* L. para induzir a formação de calos e regenerar plântulas dihaplóides.

## 2- REFERENCIAL TEÓRICO

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

*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 JÚNIOR, 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).

De acordo com o mesmo autor, 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.

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 Mello 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.

O cultivo e o uso da planta iniciaram-se na Abissínia, há mais ou menos quinhentos anos, passando à Etiópia, ao Iêmen, ao restante da Arábia, e chegando à Ásia, Indonésia, às Américas e à África Tropical, e hoje é considerada bebida universal. A cafeicultura brasileira desenvolveu-se no século XIX, ganhando primazia entre as culturas de exportação no país, vindo superar o açúcar, ao ponto de inspirar políticas governamentais nas primeiras décadas do século XX. O desenvolvimento econômico brasileiro e a história nacional têm repercussões da expansão do café no território brasileiro e do desbravamento de regiões por essa cultura (LUNA-FILHO, 2001).

O *Coffea arabica* é uma espécie alotetraplóide, com  $2n = 2x = 44$  cromossomos, e apresenta comportamento cromossômico semelhante ao das espécies diplóides. A taxa de fecundação cruzada é aproximadamente de 10%, o que é considerado no melhoramento genético, como espécie autógama (RAMALHO, 1999).

O cafeeiro arábica não manifesta efeito desfavorável das autofecundações sucessivas sobre o vigor e a produtividade das plantas. Por essa razão, os materiais comerciais de *C. arabica* são geralmente linhagens ou progênies autofecundadas em gerações mais avançadas, muito uniformes quanto a expressão dos caracteres agronômicos, gerando lavouras onde o padrão de uniformidade é muito elevado (MENDES, 1999).

## 2.2- IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O café é considerado um dos mais importantes produtos agrícolas no mercado internacional e muitos países estão envolvidos na sua produção, consumo e comercialização (EIRA et al. 2001).

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).

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.

O Brasil responde, em média, por aproximadamente 38.264 mil sacas de café beneficiado e é o segundo consumidor mundial, atrás apenas dos Estados Unidos. Os estados brasileiros notoriamente produtores de café são Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Espírito Santo, Bahia e Rondônia (LUNA-FILHO,

2001). O parque cafeeiro mineiro respondeu por cerca de 12020 mil sacas de café beneficiado do tipo arabica na safra 2003/2004 (MATIELLO, 2004).

O Brasil vem liderando a produção mundial de café desde o século XIX, ou seja, a mais de 150 anos (PINTO-MAGLIO; PIEROZZI, 1999). Um dos fatores responsáveis por essa posição tem sido a utilização de cultivares altamente produtivos e adaptados às mais distintas condições edafoclimáticas das diversas regiões produtoras do país (EIRA et al., 2001).

Nos países onde o café assume importância econômica, instituições de pesquisa têm envidado esforços nos programas de melhoramento das espécies mais cultivadas. Os programas de melhoramento genético do cafeeiro têm selecionado cultivares de elevado potencial produtivo e valor agrônomo para as várias regiões produtoras do Brasil. Desde a sua introdução no Brasil, em 1727, o cafeeiro sofreu profundas modificações graças ao melhoramento genético. Do cultivar originalmente introduzido, conhecido como Típica Nacional, passando pelas várias introduções e mutações já exploradas comercialmente, como o Bourbon Vermelho, o Sumatra, o Amarelo Botucatu, o Maragogipe, o Caturra e tantas outras, até as modernas seleções Mundo Novo, Catuaí, Icatu, Rubi, Obatã e Topázio, dentre outras, aumentou em pelo menos 300% o potencial produtivo do cafeeiro (MENDES, 1999).

De acordo com o mesmo autor, apenas com a seleção e a hibridação de plantas superiores conseguiu-se quadruplicar a produtividade de nossos cultivares de cafeeiro. No início, o processo foi totalmente empírico, realizado pelos cafeicultores em suas lavouras, pela simples observação e multiplicação das plantas que se mostravam superiores para as características consideradas de importância. Somente a partir da década de 1930, com a criação da Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), o processo passou a ser estudado e melhorado geneticamente em bases científicas, ressaltando que foi justamente a partir daí que ocorreram os maiores



através do desenvolvimento de um vasto programa de genética e de melhoramento do cafeeiro, tendo realizado quase todos os estudos de café e lançado os mais importantes cultivares plantados 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). Certamente, em poucas culturas de importância econômica se conseguiu tantos ganhos através do melhoramento genético como no cafeeiro (MENDES, 1999).

O aumento do potencial de produtividade da maioria das espécies agrônomicas vem ocorrendo de forma consistente através da expansão da diversidade de procedimentos científicos utilizados no melhoramento de plantas com o desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos, de biologia molecular e celular e da citogenética.

### 2.3- 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 época calcularam que suas tentativas abririam 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 XX, a propagação de plantas *in vitro* tem atraído pesquisadores. Estes utilizam as técnicas de cultura de tecidos vegetais, (Torres et al., 1998) que são ferramentas importantes para solucionar problemas sanitários, os quais 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).

A cultura *in vitro* apresenta várias aplicações práticas para o melhoramento de plantas, cabendo ao melhorista avaliar o potencial das técnicas para o seu programa e adotar aquelas, dentro de suas limitações e recursos, que contribuem para o aumento da eficiência e da produtividade (BORÉM, 1998).

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

Segundo Andrade (1998), na cultura de tecidos, a adição de reguladores de crescimento 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. 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 utilizados em diversas culturas é chamado de "MS", em referência aos seus autores, Murashige e 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).

Com o contínuo aumento dos estudos com o cultivo *in vitro* de vegetais, 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, principalmente em relação à embriogênese (LUZ, 1995).

O etileno é um gás regulador de crescimento produzido em células das plantas superiores que ocorrem nas regiões meristemáticas. Ele produz efeitos fisiológicos importantes e de grande aplicação comercial no cultivo *in vitro*, a produção e ação desse gás nos recipientes de cultivo são diretamente a resposta do explante, sendo ela positiva ou negativa (PAGANINI et al., 2002).

Por causa da ação negativa, há vários estudos sobre os inibidores de etileno, como por exemplo o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e o ácido acetilsalicílico (AAS). O nitrato de prata, que é um potente inibidor da ação desse gás, promove a regeneração em *Triticum aestivum*, *Nicotiana plumbaginifolia* (HATANAKA et al., 1995). O nitrato de prata a 5 mg.L, também favoreceu a indução de embriões em anteras de *Capsicum annuum* L. (LUZ, 1995).

Quanto ao ácido acetilsalicílico (AAS), muitos estudos conduzidos em laboratório e em campo sugerem que ele é importante em muitas respostas biológicas de plantas, sendo que o efeito na sua fisiologia é variável, promovendo alguns processos e inibindo outros (GUTIÉRREZ-CORONADO et al., 1998). Essa substância está envolvida ainda na resposta à estresses bióticos e abióticos (DE BLOCK; DE BROUWER, 2002) e na habilidade de indução de resistência à patógenos (Senaratna et al., 2000). O AAS, quando adicionado ao meio de cultivo, também pode promover a embriogênese (LUZ et al., 1997).

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).

## 2.4- OXIDAÇÃO E CONTAMINAÇÃO NA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

As plantas perenes lenhosas são consideradas ricas em substâncias derivadas do metabolismo secundário, como os polifenóis, os quais exercem importante papel no metabolismo destas espécies, bem como na defesa contra predadores e microorganismos (TEIXEIRA, 2001). Além disso, existem substâncias presentes no meio de cultura comumente encontrados em algumas espécies lenhosas identificadas como sendo fenóis, flavonóides e taninos, responsáveis pela oxidação (PREECE; COMPTON, 1991).

A liberação de compostos fenólicos ocorre devido ao dano causado nas células durante a excisão dos explantes. Algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas (Lerch, 1981). As quinonas são responsáveis pela coloração marrom das culturas, além de causarem a inibição do crescimento e morte dos explantes em grande número de espécies (MONACO et al., 1977).

Para Pious e Ravindra (1997), o maior problema na iniciação de culturas lenhosas é a ocorrência de compostos fenólicos que estão ligados com processos de regulação de crescimento, especialmente com as auxinas, que dependendo da sua concentração endógena no tecido, resulta na indução desses compostos.

A oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo. Alguns gêneros de plantas são mais suscetíveis à oxidação fenólica que outros. A oxidação fenólica depende igualmente do tipo de explante utilizado, explantes jovens, em geral, oxidam menos que os velhos. Tipos adequados de explantes retirados em épocas apropriadas podem apresentar um menor teor endógeno de fenóis nos tecidos e, com isto, minimizar a oxidação. Da mesma forma, menores danos físicos e químicos no momento da excisão e desinfestação podem contribuir para minimizar o problema (TEIXEIRA, 2001).

Segundo Andrade (1998), o cafeeiro, como outras espécies lenhosas, libera substâncias fenólicas e, por essa razão, deve-se adicionar ao meio de cultura substâncias antioxidantes, tais como: carvão ativado, polivinilpirrolidene (PVP), ácido ascórbico e ácido cítrico. Entretanto, o ácido ascórbico deve ser esterilizado por filtração, já que é uma substância termolábil (TEIXEIRA, 2001). Tais substâncias agem pela remoção do oxigênio de outras moléculas e também atuam por mecanismos alternativos. Os ácidos cítrico e ascórbico reagem com os metais presentes no meio de cultura, evitando que os mesmos fiquem disponíveis para se oxidarem (GEORGE, 1996). Provavelmente, o ácido ascórbico seria o mais efetivo na prevenção da oxidação polifenólica dentre os diversos antioxidantes testados (GUPTA, 1986).

A oxidação fenólica tem sido controlada em diferentes espécies lenhosas pela redução da intensidade luminosa (MARKS; SIMPSON, 1990), associada com a substituição freqüente do meio de cultura e, dessa forma, as chances de se obter sucesso no estabelecimento e cultivo de explantes de espécies lenhosas são bastante elevadas (TEIXEIRA, 2001).

Aliada à oxidação, outro problema enfrentado na fase inicial de estabelecimento do explante *in vitro* diz respeito à contaminação bacteriana e fúngica, principalmente presente na superfície dos explantes. Além desta contaminação superficial, é freqüente deparar-se com contaminações presentes no interior dos tecidos e que é conhecida como contaminação endógena. Este tipo de contaminação é mais freqüente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo (TEIXEIRA, 2001).

Segundo Debergh e Zimmerman (1991), o índice de contaminação pode ser resultante das próprias matrizes ou do manuseio em laboratório. Assim, 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.

Nesse sentido, pesquisas contribuem para a identificação de “vitropatógenos”, visando a eliminação dos microrganismos. Vários métodos para o controle da contaminação dos explantes têm 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 têm sido limitado devido a grande toxicidade para as células de plantas (ARRUDA, 2000).

Para a realização da cultura de anteras, é necessária primeiramente a desinfestação do material vegetal. Os principais compostos utilizados são etanol e cloro, e o modo de ação do etanol consiste na rápida desnaturação protéica e dissolução de lipídios, tendo como desvantagem o fato de ser pouco ativo contra esporos fúngicos. O cloro inativa enzimas e age como oxidante, tem efeito sobre bactérias e sua desvantagem é o odor irritante e também sua baixa atividade contra esporos (PASQUAL et al., 2002).

## 2.5- CULTURA DE TECIDOS EM CAFEIEIRO

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, Sondahl 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 Sondahl e Sharp (1977) e Sondahl 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 (SONDAHL et al., 1985). 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; SONDAHL, 1993).

Entretanto, foi somente em 1997, 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 micropropagação, com o objetivo de realizar a rápida multiplicação do material melhorado, manutenção de bancos de germoplasma e a multiplicação de híbridos interespecíficos; cultura de embriões, para a recuperação de embriões provenientes de cruzamentos



interespecíficos e para a antecipação da época de plantio; cultura de meristemas, para obtenção de plantas livres de vírus; embriogênese somática, através de explantes foliares para obtenção da planta inteira e cultura de anteras para a obtenção de plantas homozigotas (ANDRADE, 1998). A produção de transgênicos, com o uso das técnicas de transformação genética, podem ser de grande interesse para o melhoramento genético de plantas, pois podem gerar novos cultivares diretamente, ou genótipos para serem utilizados em um programa de melhoramento convencional (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

Com a conclusão do projeto GENOMA CAFÉ, coordenado pela EMBRAPA CAFÉ, em colaboração com a FAPESP e a EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, que resultou na construção de um banco de dados com mais de 200 mil seqüências de DNA, existe a possibilidade de identificação de mais de 30 mil genes, responsáveis pelos diversos mecanismos fisiológicos de crescimento e desenvolvimento do cafeeiro. A partir dos genes identificados, será possível maior rapidez e eficiência no desenvolvimento de variedades mais produtivas, tolerantes à seca e resistentes ao ataque de pragas e doenças. Também será possível a geração de novos cultivares com qualidades superiores em aroma e sabor e com melhores características nutritivas e farmacêuticas, visando à maior satisfação dos consumidores e à conquista do mercado com produtos de maior qualidade e valor agregado (VIEIRA et al., 2004).

A micropropagação de plantas é uma técnica que visa a produção de plantas de genótipos selecionados. A multiplicação *in vitro* já é considerada de grande importância para a propagação em larga escala de genótipos excepcionais obtidos pelo melhoramento genético ou mesmo de variações induzidas *in vitro*, cuja fixação, por via sexual, seria muito longa e cara (BARRUETO, 2001). Esse autor, trabalhando com brotos de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho 81, que foram inoculados em meio de cultura líquido básico suplementado com 12 e 24  $\mu$ M de

6-benzilaminopurina (BAP), constatou, após 45 dias, que 24  $\mu\text{M}$  de BAP foi o tratamento que proporcionou maior número e altura dos brotos e, consequentemente, maior peso da matéria fresca.

Pasqual e Barros (1991), cultivando segmentos nodais do cultivar Catuaí, utilizaram tratamentos com BAP e ácido naftalenacético (ANA) nas respectivas concentrações: 0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 e 4000  $\mu\text{g.L}$  e 200  $\mu\text{g.L}$ . Eles observaram que a multiplicação de gemas ortotrópicas é estimulada por BAP, na concentração de 3000  $\mu\text{g.L}$ , em ausência de ANA, e a maior proliferação de brotos com mais de um centímetro ocorreu na concentração de 500  $\mu\text{g.L}$  de BAP, sendo que a presença de auxina é prejudicial à proliferação de brotações.

Quanto a cultura de embriões, Andrade et al. (2001) procuraram determinar as melhores concentrações dos reguladores de crescimento ANA e BAP para cultura de embriões *in vitro* de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44. Foram testadas todas as combinações possíveis entre as concentrações (mg.L) de ANA (0; 0,01; 0,1 e 1) e BAP (0; 3; 6 e 9) acrescidas ao meio MS. O ANA proporcionou os melhores resultados na concentração de 1 mg.L para as variáveis número total de brotos, número total de folhas e comprimento de brotos, e na concentração de 0,53 mg.L, para a variável massa da matéria fresca da parte aérea. Os melhores resultados com BAP foram obtidos com 9 mg.L para número total de folhas, comprimento de brotos e massa da matéria seca da parte aérea, com 7,4 mg.L para número total de brotos e com 6 mg.L para massa da matéria fresca da parte aérea.

Aliada a cultura de anteras está a embriogênese somática, que é um processo pelo qual novos indivíduos se originam a partir de células simples, que não são produto da fusão de gametas e que não apresentam conexões vasculares com os tecidos maternos. Embriões somáticos são produzidos em um grande número de espécies, mas ainda não há segurança quanto à estabilidade genética.

e uniformidade fenotípica das plantas regeneradas por esta técnica. Por exemplo, a embriogênese somática tem sido a técnica empregada como sistema regenerativo preferencial para a transformação genética (GUERRA et al., 2001).

A embriogênese somática em *Coffea* é um importante método de multiplicação de plantas-elite *in vitro*, em larga escala, apresentando um grande potencial a ser explorado, e capaz de maximizar a propagação do cafeeiro, tanto de cultivares já recomendados para plantio, como de híbridos vindos de programas de melhoramento genético (MACIEL et al., 2003).

Segundo Cordeiro (1999), a embriogênese somática indireta em *Coffea* apresenta tipos distintos de calos durante a fase de indução. Os CPN's (calos primários nodulares) referem-se às formações globulares compactas surgidas em parte ou, menos freqüentes, na totalidade dos bordos dos explantes. Os CPM's (calos primários mistos), além da reação globular, apresentam formações amorfas de células alongadas e caracterizam-se pelo crescimento visivelmente mais rápido. Os CE's (calos embriogênicos) são calos primários contendo até 20 embriões/explante, e quando esses apresentam agregados celulares granulados, facilmente destacáveis e de coloração amarelo-creme, são, então, caracterizados como CEF's (calos embriogênicos friáveis).

A freqüência de plantas regeneradas através de calos normalmente superam a freqüência obtida pela androgênese direta, porém, ocorre maior quantidade de indivíduos com diferentes níveis de ploidia, o que pode dificultar a identificação e a seleção dos haplóides (BAJAJ, 1984).

Segundo Pasqual (1985), o calo é utilizado na maioria dos casos como estrutura intermediária, considerando algumas limitações, como por exemplo, nem todos os tipos de calos formados irão regenerar plantas e calos mantidos por longos períodos poderão perder progressivamente a capacidade de regenerar plantas.

Embora se saiba que o calo possa ocorrer naturalmente nos tecidos vegetais, somente com a utilização de metodologias e técnicas adequadas para sua indução e cultivo *in vitro*, é que tem sido observado avanços na utilização prática de tal estrutura vegetal (ROCHA, 1998).

A implementação da embriogênese somática ocorre a partir de explantes de origem diversa, como: fragmentos de ramos ortotrópicos, ramos plagiotrópicos, folhas e tegumentos de óvulos (DUBLIN, 1991). A sacarose tem sido a fonte de carboidrato mais usada na embriogênese somática, sendo que sua concentração influencia nos processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos (GUERRA et al., 1999). As auxinas e citocininas têm papel fundamental na embriogênese somática de café (MACIEL et al., 2003).

Vale mencionar que esses mesmos autores, trabalhando com embriogênese somática indireta em *Coffea arabica* L. cv. Obatã, estudaram as etapas de indução de calos, diferenciação, regeneração e formação de embriões. Segmentos foliares, retirados de plantas em condições de campo, foram desinfestados e inoculados em meio de indução de calos suplementado de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg.L) e cinetina (0, 2, 4 e 8 mg.L). Posteriormente, os calos foram transferidos para o meio de diferenciação, adicionado de diferentes concentrações de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg.L) e BAP (0, 2, 4 e 8 mg.L); em seguida, durante a etapa de regeneração, os calos embriogênicos friáveis foram inoculados em meio de regeneração suplementado de BAP (0, 2, 4 e 6 mg.L) e sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g.L). Durante as etapas de indução e diferenciação de calos, os experimentos ficaram no escuro, e na etapa de regeneração, os experimentos foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas.

A combinação entre 4 mg.L de 2,4-D e 2 mg.L de cinetina favoreceu a indução de calos primários mistos. A maior frequência de calos embriogênicos friáveis ocorreu na presença de BAP (8 mg.L), associado ou não ao 2,4-D.

maior número de embriões por explante foram obtidos quando utilizou-se sacarose (30 g.L) e BAP (3 mg.L) (MACIEL et al., 2003).

A embriogênese somática indireta requer a determinação de células diferenciadas, a proliferação de calos e a indução de células embriogênicas determinadas, dependendo da ação de reguladores de crescimento, não apenas para a retomada da atividade mitótica, mas também para a determinação do estado embriogênico (SONDAHL et al., 1985; WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986).

Duas estratégias têm sido utilizadas com o objetivo de obtenção de tecido embriogênico em *Coffea*: a primeira envolve o cultivo de explante sobre um único meio de cultura, suplementado apenas com citocinina (YASUDA et al., 1995), ou a combinação de auxina e citocinina (PIERSON et al., 1983); a segunda estratégia utiliza o cultivo de explantes em um meio primário ou de indução, seguido da transferência dos explantes para o meio secundário (DUBLIN, 1984), que difere do primeiro por possuir menor razão auxina/citocinina (NORIEGA; SONDAHL, 1993; SONDAHL et al., 1985; ZAMAARRIPA et al., 1991).

## 2.6- CULTURA DE ANTERAS E MELHORAMENTO GENÉTICO NO CAFEIEIRO

A possibilidade do uso da haploidia para estudos básicos e aplicados de genética, melhoramento, evolução e biologia floral vem há muito tempo despertando o interesse na obtenção de metodologias eficientes para a produção de plantas haplóides. Nas últimas décadas, inúmeros estudos vêm sendo feitos visando à regeneração de plantas haplóides a partir da cultura *in vitro* de células gametofíticas (KALTCHUK-SANTOS; BODANESE-ZANETTINI, 2002).

Uma planta haplóide tem somente metade do patrimônio genético sendo, portanto, estéril. A duplicação de seu número cromossômico, de maneira espontânea ou induzida pela aplicação de colchicina, recupera a condição diplóide e restaura a fertilidade. Esta planta, chamada de duplohaplóide, será totalmente homozigota, uma vez que cada cromossomo terá sua cópia exata (MORAES FERNANDES, 1990).

O melhoramento de espécies diplóides, utilizando haplóides, é o melhoramento do genoma por excelência, entretanto, a possibilidade do melhoramento, via haplóide, de uma dada espécie diplóide depende, antes de tudo, da disponibilidade de métodos para produzir e isolar haplóides em quantidade suficiente (RÊGO, 2004).

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 progênies 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, 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).

Embora já se tenha conseguido desenvolver haplóides por meio destas técnicas em mais de 200 espécies, dentre elas, milho, cevada, trigo, beterraba, mamão e cacau, ainda existem muitos problemas a serem superados, visto que, a resposta *in vitro* é amplamente dependente do genótipo da planta doadora de micrósporo ou óvulo (RÊGO, 2004). A ação dos genótipos é verificada quando os haplóides são formados em diferentes frequências, não somente gênero e espécie, mas também as características parentais das sementes e do pólen devem ser consideradas na obtenção de haplóides (LUZ, 1995).

A capacidade androgenética de uma planta é influenciada pelo estado fisiológico desta durante o seu cultivo e no momento da retirada de suas anteras, onde as variações ambientais também exercem uma grande influência (Luz, 1995). Além destes, outros fatores tais como: estágio de desenvolvimento gametofítico, meio de indução, reguladores de crescimento e condições de cultivo, também são importantes e devem ser considerados (RÊGO, 2004).

Utilizando-se a cultura de anteras, o número de plantas necessário para a obtenção de um novo cultivar é sensivelmente menor, ou seja, é igual à raiz quadrada do número usado em programas convencionais de melhoramento. No caso de *Coffea arabica*  $2n = 4x = 44$ , que é uma planta tetraplóide, a cultura de anteras propiciará a obtenção de plantas dihaplóides com características similares às das plantas haplóides (PASQUAL et al., 2002).

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).

A androgênese é o fenômeno no qual um grão de pólen é capaz de alterar sua rota de desenvolvimento e originar um esporófito haplóide. A técnica de cultura de anteras, visando à produção de dihaplóides, vem sendo amplamente

empregada na obtenção de novos cultivares em várias plantas de interesse agrônômico (SALOMON et al., 2003).

A cultura de anteras já foi empregada para a regeneração de calos, embriões e plantas em aproximadamente 247 espécies, 88 gêneros e 34 famílias (PETERS et al., 1999). Na China, ainda na década de 70, foram desenvolvidas os primeiros cultivares de fumo, arroz e trigo, obtidos mediante o cultivo de anteras. É também aplicada, rotineiramente, em programas de melhoramento de várias famílias importantes, como os cereais, as crucíferas e as solanáceas (MORAES FERNANDES, 1990).

A cultura de anteras em plantas alógamas, altamente heterozigotas, como o milho e o aspargo, permite a produção de linhagens puras que podem ser utilizadas como progenitoras no desenvolvimento de cultivares híbridas (MORAES FERNANDES, 1990). O cultivar BR-43 de trigo foi produzido no Brasil seguindo a metodologia de Caetano e Moraes Fernandes (CAETANO; MORAES FERNANDES, 1992).

A técnica consiste em cultivar anteras imaturas em meio de cultura apropriado e sob condições ambientais adequadas, para desviar a rota normal de desenvolvimento dos micrósporos, levando-as a formar células vegetativas ao invés de micrósporos (GEORGE; SHRRINGTON, 1984). A reversão do sistema de desenvolvimento gametofítico é bloqueada e os genes responsáveis pelo desenvolvimento esporofítico são ativados (SUNDERLAND; DUNWEL, 1977). Portanto, a célula gametofítica masculina pode alterar o seu desenvolvimento normal, dando origem a embriões somáticos com potencial para regenerar plantas homozigotas (VASIL et al., 1979).

Contudo, a mudança na ontogenia normal de um micrósporo para uma via esporofítica requer alterações profundas na morfogênese celular (KALTCHUK-SANTOS; BODANESE-ZANETTINI, 2002). Assim, importante fator para o sucesso da cultura de anteras é conhecer para o



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. 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).

Silva et al. (2004), trabalhando com *Coffea arabica* L. cvs. Mundo novo, Catuaí Vermelho 44 e 99, observaram que existe um sincronismo no desenvolvimento das anteras e do botão floral, e estes, estão relacionados com os estádios de desenvolvimento dos micrósporos, ou seja, o diâmetro dos micrósporos evolui de acordo com o crescimento das anteras e do botão floral. O estágio ideal dos micrósporos que devem ser utilizados na cultura de anteras *in vitro* corresponde à fase onde estes ainda estejam de forma uninucleada central, e tais foram encontrados em botões florais que variam de 4,5 à 6,0 mm de comprimento.

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).

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).

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. Entretanto, este processo ontogenético alternativo ainda é pouco conhecido, apesar de sua potencialidade, tanto para estudos básicos, como àqueles aplicados para melhoramento de plantas (KALTCHUK-SANTOS; BODANESE-ZANETTINI, 2002).

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.

Teoricamente, através da cultura de anteras, via microsporogênese, um número considerável de plantas haplóides podem ser produzidas. 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.

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). Mais recentemente, Araújo et al. (2003), em um trabalho sobre indução *in vitro* de calogênese em anteras de cafeeiro, submeteram esses explantes florais de *Coffea arabica* L. cultivar 'Rubi' e de uma população segregante F2, às diferentes concentrações de ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) (0, 1, 2, e 4 mg.L) combinadas com cinetina (0, 2, 4, e 8 mg.L) e adicionadas ao meio de cultura de indução de calos. A combinação entre 2 mg.L de 2,4-D e 4 mg.L de cinetina promoveu a maior indução de calos, com valor aproximado de 40% para o cultivar 'Rubi', e a combinação entre 1 mg.L de 2,4-D e 8 mg.L de cinetina promoveu a maior indução de calos, com valor aproximado de 32,18% para a população F2.

Mustafa (2003) inoculou anteras do cultivar Catuaí Vermelho 99, em meio MS suplementado com 2,4-D (2, 4, 6 e 8 mg.L) e BAP (0 e 2 mg.L), em ausência e presença de luz, e anteras do cultivar Mundo Novo submetidas ao mesmo tratamento, entretanto, tais explantes permaneceram sob a presença de luz. Os resultados mostraram que é necessária a combinação entre auxina e citocinina para que ocorra intumescimento das anteras e indução e aumento no tamanho dos calos, com maior percentagem para os de coloração cinza nos dois cultivares estudados. Além disso, anteras submetidas à ausência de luz obtiveram menores índices de oxidação.

Araújo (2004), estudando a calogênese em anteras oriundas de uma população segregante F2 de *Coffea arabica* L., inoculou tais explantes em meio de indução de calos (IC) suplementado de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg.L) e cinetina (0, 2, 4 e 8 mg.L); meio IC suplementado de cinetina (0, 2, 4 e 8 mg.L), ácido indol

butírico (AIB) ( 0; 0,5; 1 e 2 mg.L) e 2 mg.L de 2,4-D e meio IC suplementado de cinetina ( 0, 1, 2, 4 e 8 mg.L), ácido giberélico ( $GA_3$ ) (0; 2,5, 5; 10 e 20 mg.L) e 8 mg.L de ANA. Concluiu-se que a combinação entre 2,4-D e cinetina favorece a indução de calos primários. A combinação de concentrações de 8 mg.L de cinetina e AIB a 1 mg.L atua favoravelmente na indução de calos. Sugere-se que o  $GA_3$  tenha um efeito no aumento da rapidez de crescimento dos calos provenientes de anteras de cafeeiro.

Porém, em alguns experimentos, a técnica não se mostra adequada, visto que vários fatores podem influenciar na 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).

Para Sudripta (1996), diversos fatores podem interferir no êxito da regeneração *in vitro*, porém os mais efetivos além da composição do meio, idade e tipo de explante, é o requerimento de luz e tempo de permanência no meio, especialmente quando se trata de espécies lenhosas. Outro problema é dificuldade de fazer o isolamento asséptico de material proveniente do campo.

Outros fatores podem também causar problemas nessa metodologia, plantas podem se originar de outros tecidos da antera, resultando em plantas com vários níveis de ploidia (LUZ, 1995), além disso, evidências sugerem que existem vários níveis de controle genético sob a ploidia de plantas obtidas por cultura de anteras (SILVA et al., 1997).

As chances de se isolar um haplóide numa mistura de níveis de ploidia são pequenas, já que os haplóides são superados no crescimento pelos poliplóides, pois estes são mais vigorosos; pode haver alta incidência de plantas albinas, principalmente em cereais, exemplo disto ocorre em alguns genótipos de arroz, onde a frequência destas plantas pode ser baixa, até 20%, mas pode chegar

a mais que 50%. Técnicas inadequadas para a duplicação podem também constituir-se problema, e ainda, a mutação em plantas dihaplóides derivadas da cultura de anteras é também um obstáculo ao sucesso da técnica. Por fim, a seleção que é feita *in vitro* nem sempre tem vantagem em condições de campo, devido a ausência da seleção natural (LUZ, 1995).

Em plantas regeneradas por meio de cultura de tecidos, freqüentemente, podem surgir indivíduos que se distinguem da planta original em um ou mais caracteres, e essas alterações podem ser estáveis e transmissíveis aos descendentes. Esse fenômeno é denominado de variação somaclonal (ILLG, 1990).

As causas prováveis que induzem esse fenômeno são várias e de natureza bastante distintas, como variação preexistente, mutação nuclear ou citoplásmica, ou outras aberrações cromossômicas, recombinação mitótica, perda do fuso cromático e outras anormalidades na mitose das plantas, provocando o surgimento de poliplóides. Além disso, as condições físicas do meio de cultura (sólida ou líquida) podem afetar o comportamento dos organismos desenvolvidos nessas condições. Outro fator importante que pode induzir a variação somaclonal é a composição química do meio de cultura, onde os reguladores de crescimento podem exercer grande influência nas alterações do cariótipo, provocando um crescimento desordenado das estruturas celulares, com conseqüente surgimento de células com anomalias (SANT'ANA et al., 2001).

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*, sendo desejável, na obtenção de haplóides, um

protocolo que seja aplicável a um largo espectro de genótipos (PETERS et al., 1999).

Nesse contexto, as hipóteses científicas do presente trabalho são que as anteras de *Coffea arabica* L., submetidas a diferentes meios de cultura, induzem a formação de calos e regeneram plântulas dihaplóides.

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de cultura de tecidos vegetais da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia-MG no período de setembro de 2003 à novembro de 2004. Foram utilizados 3 cultivares de *Coffea arabica* L.: Mundo Novo LCP-379-19; Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44 e Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-99, pertencentes a área experimental do Campus Umuarama dessa Universidade.

Os botões florais 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 dessecação, até serem conduzidos ao laboratório. O comprimento dos botões florais foi aferido com o auxílio de um paquímetro e utilizaram-se botões florais entre 4,5 à 6,0 mm de comprimento em todos os experimentos (FIGURA 1).

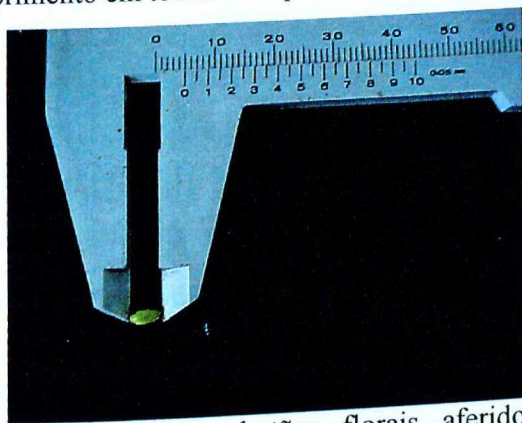


FIGURA 1: Comprimento dos botões florais aferidos com paquímetro. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

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 através de uma incisão em um dos seus lados com o auxílio de um estereomicroscópio, pinça e bisturi; sendo os últimos flambados a cada novo botão e imersas por 1 segundo, antes de serem inoculadas, em uma solução de ácido ascórbico na concentração de 600 mg.L<sup>-1</sup> hipoclorito de sódio à 0,2% e em água destilada e autoclavada, respectivamente.

Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5.9 e foram esterilizados em autoclave vertical à temperatura de 121°C, sob a pressão de 1 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação dos explantes, cada tratamento foi avaliado considerando o número de anteras oxidadas, contaminadas, intumescidas, com calosidades e pró-embrióides, sendo que no caso do número de calos formados, a contagem real do número de calos produzidos em cada explante foi feita considerando as proliferações ocorridas em pontos localizados, e nos casos onde o contorno do explante mostrava calos unificados, considerou-se como calo único.

### 3.2- EFEITOS DE PRÉ-TRATAMENTOS EM BOTÕES FLORAIS E DO TDZ NO CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)

Botões florais dos cultivares de cafeeiro Mundo Novo e Catuaí Vermelho 99 foram coletados e subdivididos em três pré-tratamentos: choque frio, choque de calor e temperatura ambiente, onde os botões permaneceram durante 24 horas em geladeira (4°C), em estufa (35°C) e à temperatura ambiente, respectivamente.



Após a desinfestação, as anteras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) (TABELA 1), suplementado com thidiazuron (TDZ), nas concentrações 0,001; 0,01; 0,1 e 1,0 mg.L. Após a inoculação, as anteras permaneceram em sala de crescimento com  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 2500 lux. O delineamento experimental foi de blocos casualizados, uma vez que as anteras foram inoculadas em dias diferentes, em esquema fatorial  $2 \times 3 \times 4$  (sendo 2 cultivares, 3 pré-tratamentos e 4 concentrações de TDZ), com 4 repetições por tratamento.

Uma parcela experimental foi composta por quatro tubos, com 5 anteras por tubo. Foram realizadas três avaliações parciais dos índices de anteras oxidadas, contaminadas, intumescidas e com calosidades em intervalos de 10 dias cada, para todos os pré-tratamentos. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização dos programas PROPHET, onde os resíduos não apresentaram distribuição normal e as variâncias não foram homogêneas, e transformados em  $\sqrt{x + 1/2}$ ; e SANEST, com aplicação do teste de F, a 1 e 5% de probabilidade, os cultivares e os pré-tratamentos foram analisados pelo teste de Tukey, a 1 e 5% de probabilidade, e as médias das concentrações de TDZ foram analisadas por regressão polinomial.

Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, todas as anteras submetidas aos pré-tratamentos e ao TDZ foram subcultivadas aleatoriamente para meio MS suplementado com 6 mg.L de 2,4-D e 0,5 mg.L de TDZ, em delineamento inteiramente casualizado, uma vez que as anteras foram subcultivadas em um mesmo dia. As avaliações dos índices de oxidação, contaminação, intumescimento e calosidade foram realizadas aos 15, 45 e 60 dias após o subcultivo, sendo que estas não foram acumulativas.

TABELA 1: Composição do meio de cultura de Murashige e Skoog (1962).

CONSTITUINTES	QUANTIDADES (mg.L)
<b>INORGÂNICOS</b>	
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
$\text{KNO}_3$	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	370
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
KI	0,83
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,20
$\text{MnSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	22,30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	27,80
$\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	37,250
<b>ORGÂNICOS</b>	
Glicina	2
Tiamina HCl	0,10
Sacarose	30000
Ágar	7000
Inositol	100
Ácido nicotínico	0,50
Piridoxina HCl	0,50

### 3.3- EFEITO DO SUBCULTIVO DE CALOS DO CULTIVAR CATUAÍ VERMELHO 44 EM MEIO COM 2,4-D, NITRATO DE PRATA E ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

Calos provenientes de anteras do cultivar Catuaí Vermelho 44, mantidos em meio MS sem reguladores de crescimento, foram subcultivados em meio MS acrescido de 2,4-D, na concentração de 2,0 mg.L, com presença ou não de 5,0 mg.L de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e ácido acetilsalicílico (AAS), nas concentrações de 0,0; 8,0; 16,0 e 32,0 mg.L. O AAS foi obtido através de solução de aspirina, contendo 325 mg de AAS em 200 ml. Inocularam-se explantes de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro em tubos de ensaio, contendo 10 ml do meio MS. Após o subcultivo, os calos permaneceram em sala de crescimento com  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 2500 lux.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, uma vez que os calos foram subcultivados em um mesmo dia, em esquema fatorial  $2 \times 4$  (sendo 2 concentrações de nitrato de prata e 4 de ácido acetilsalicílico) com 12 repetições. Uma parcela experimental foi composta por 1 tubo de ensaio, com 1 calo por tubo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização dos programas PROPHET, onde os resíduos não apresentaram distribuição normal e as variâncias não foram homogêneas; e SANEST, com todas as transformações possíveis com aplicação do teste de F, a 1 e a 5% de probabilidade. No entanto, os resultados não foram significativos.

Então, a área dos calos foi estimada com o auxílio de uma régua, considerando a sua maior extensão e largura e avaliadas a coloração e textura dos mesmos aos 30 dias após o subcultivo.

### 3.4- INFLUÊNCIA DO 2,4-D, NITRATO DE PRATA E ÁCIDO ACETILSALICÍLICO NO CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)

Botões florais dos cultivares de cafeeiro Mundo Novo e Catuaí Vermelho 44 foram coletados, desinfestados e as anteras inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio MS, acrescido de 2,4-D, na concentração de 2,0 mg.L, com presença ou não de 5,0 mg.L de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e ácido acetilsalicílico (AAS), nas concentrações de 0,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0 mg.L. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, na ausência de luz, sob temperatura controlada de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, uma vez que as anteras foram inoculadas em um mesmo dia, em esquema fatorial  $2 \times 2 \times 5$  (sendo 2 cultivares, 2 concentrações de  $\text{AgNO}_3$  e 5 concentrações de AAS) com 4 repetições. Uma parcela experimental foi composta por 3 tubos de ensaio, com 5 anteras por tubo. Os índices de anteras oxidadas, contaminadas, intumescidas e com calosidades foram avaliados aos 30 e 60 dias após a inoculação.

Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, as anteras com calosidades foram observadas ao estereomicroscópio sob aumento de 20x em busca de estruturas pró-embrióticas. Também foram avaliadas a coloração, textura e o diâmetro das calosidades.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização dos programas PROPHET, onde os resíduos não apresentaram distribuição normal e as variâncias não foram homogêneas, e transformados em  $\sqrt{x + 1/2}$  no SANEST, com aplicação do teste de F, a 1 e 5% de probabilidade. As médias das concentrações de  $\text{AgNO}_3$  e AAS foram analisadas por regressão polinomial e os cultivares pelo teste de Tukey, a 1 e 5% de probabilidade.

Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, todas as anteras intumescidas e/ou com calosidades foram subcultivadas, aleatoriamente, para meio MS, acrescido de 2,4-D, nas concentrações de (0,0; 1,0 e 2,0 mg.L), combinadas com BAP (0,0; 2,0 e 4,0 mg.L). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3. Para o cultivar Mundo Novo, foram 8 repetições por tratamento, uma parcela experimental foi composta por 1 tubo de ensaio com 3 anteras por tubo. Para o cultivar Catuaí Vermelho 44, foram 6 repetições por tratamento e uma parcela experimental foi composta por 1 tubo de ensaio com 2 anteras por tubo. Após o subcultivo, os explantes permaneceram em sala de crescimento com  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 2500 lux.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização dos programas PROPHET, onde os resíduos não apresentaram distribuição normal e as variâncias não foram homogêneas; e SANEST, com todas as transformações possíveis com aplicação do teste de F, a 1 e a 5% de probabilidade. No entanto, os resultados não foram significativos.

Então, a percentagem de anteras oxidadas, contaminadas, intumescidas, com calosidades e pró-embrióides foi avaliada aos 30 dias após o subcultivo.

#### 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1- EFEITOS DE PRÉ-TRATAMENTOS EM BOTÕES FLORAIS E TDZ NO CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)

O resumo das análises de variância do número médio de anteras oxidadas, contaminadas, intumescidas e com calosidades em relação aos pré-tratamentos e níveis de TDZ, aos 10, 20 e 30 dias de *cultivo in vitro*, estão apresentados nas TABELAS 2, 3 e 4, respectivamente. Houve interação significativa, a 5% de probabilidade, somente entre cultivar e pré-tratamento e aos 10 dias de cultivo *in vitro*.

Os dados obtidos para os níveis de TDZ não foram significativos em nenhum dos períodos de cultivo *in vitro* analisados. As concentrações de TDZ aqui utilizadas foram bastante distantes entre si, logo, intervalos pequenos entre essas concentrações poderiam proporcionar melhores resultados. Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, os dados para a variável oxidação não foram significativos.

TABELA 2: Resumo das análises de variância do número médio de anteras oxidadas (OXID.), contaminadas (CONT.), intumescidas (INT.) e com calosidades (CALOS.), em função dos pré-tratamentos e concentrações de TDZ, aos 10 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Causas da variação	Quadrados médios				
	G.L	OXID.	CONT.	INT.	CALOS.
CULTIVAR	1	2,8765*	0,0747	5,2037*	0,2197**
PRÉ-TRATAMENTO	2	2,5388*	0,9627*	3,4157*	0,2302**
TDZ	3	0,0410	0,1718	0,0241	0,0213
CUL*PRE	2	0,5179**	0,1321	0,1045	0,1396
CUL*TDZ	3	0,1063	0,0772	0,0010	0,0185
PRE*TDZ	6	0,0635	0,0589	0,0903	0,0017
CUL*PRE*TDZ	6	0,0176	0,0699	0,0317	0,0355
BLOCOS	3	1,2968	0,7787	1,2789	0,2595
RESÍDUO	69	0,1423	0,1159	0,1877	0,0609
C.V(%)		20,16	25,83	36,65	28,83

\* Significativo, a 1% de probabilidade; \*\* Significativo, a 5% de probabilidade.

TABELA 3: Resumo das análises de variância do número médio de anteras oxidadas (OXID.), contaminadas (CONT.), intumescidas (INT.) e com calosidades (CALOS.), em função dos pré-tratamentos e concentrações de TDZ, aos 20 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Causas da variação	Quadrados médios				
	G.L	OXID.	CONT.	INT.	CALOS.
CULTIVAR	1	2,5264*	0,0550	3,6680*	1,6248*
PRÉ-TRATAMENTO	2	1,3119*	1,9350*	0,8498**	0,3550*
TDZ	3	0,0377	0,1409	0,0795	0,0185
CUL*PRE	2	0,0712	0,1992	0,1765	0,0365
CUL*TDZ	3	0,0266	0,1684	0,0573	0,0179
PRE*TDZ	6	0,1188	0,0906	0,0518	0,0165
CUL*PRE*TDZ	6	0,1733	0,1710	0,1598	0,0518
BLOCOS	3	1,5647	0,8051	0,5412	0,2117
RESÍDUO	69	0,1883	0,1633	0,1952	0,0635
C.V(%)		22,11	31,84	41,29	27,06

\* Significativo, a 1% de probabilidade; \*\* Significativo, a 5% de probabilidade.

TABELA 4: Resumo das análises de variância do número médio de anteras oxidadas (OXID.), contaminadas (CONT.), intumescidas (INT.) e com calosidades (CALOS.), em função dos pré-tratamentos e concentrações de TDZ, aos 30 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Causas da variação	Quadrados médios				CALOS.
	G.L	OXID.	CONT.	INT.	
CULTIVAR	1	0,3704	0,2461	4,6239*	0,8113*
PRÉ-TRATAMENTO	2	0,2032	0,4944**	0,7893	0,5108**
TDZ	3	0,4201	0,2226	0,0826	0,1276
CUL*PRE	2	0,5688	0,3836	0,1231	0,0149
CUL*TDZ	3	0,1983	0,0336	0,0248	0,0080
PRE*TDZ	6	0,2061	0,0726	0,1803	0,0469
CUL*PRE*TDZ	6	0,1687	0,2090	0,2321	0,0715
BLOCOS	3	1,4410	0,1387	0,1288	0,0826
RESÍDUO	69	0,2207	0,1617	0,2938	0,1157
C.V(%)		22,76	37,89	43,77	35,06

\* Significativo, a 1% de probabilidade; \*\* Significativo, a 5% de probabilidade.

Quanto a oxidação, aos 10 dias de cultivo *in vitro*, o cultivar Mundo Novo foi o que apresentou os maiores índices para os pré-tratamentos por choque frio e a temperatura ambiente (TABELA 5).

Aos 20 dias de cultivo *in vitro*, Mundo novo também obteve maior oxidação quando comparado ao Catuaí Vermelho 99. Em relação aos pré-tratamentos, os de choque de calor e a temperatura ambiente obtiveram o maior número médio de anteras oxidadas (TABELA 6).



TABELA 5: Número médio de anteras oxidadas nos cultivares Mundo Novo (MN) e Catuaí Vermelho 99 (CV 99) para os pré-tratamentos por choque frio, choque de calor e temperatura ambiente, aos 10 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Cultivar	Pré-tratamentos		
	Choque Frio	Choque de Calor	Temperatura ambiente
MN	2,7521 a	3,8933 a	4,4984 a
CV99	1,1777 b	3,6732 a	2,5911 b

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1 e 5 % de probabilidade.

TABELA 6: Número médio de anteras oxidadas nos cultivares Mundo Novo (MN) e Catuaí Vermelho 99 (CV 99) para os pré-tratamentos por choque frio, choque de calor e temperatura ambiente, aos 20 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Cultivar	Pré-tratamentos			Média
	Choque Frio	Choque de calor	Temperatura ambiente	
MN	3,1263	4,2254	4,7747	4,0421
CV 99	1,9177	3,3168	3,0829	2,7725
Média	2,522	3,7711	3,9288	

O cafeeiro, como outras espécies lenhosas, libera substâncias fenólicas e, por essa razão, deve-se adicionar, ao meio de cultura, substâncias antioxidantes. No presente trabalho, apesar do uso de ácido ascórbico nas anteras, ainda houve um alto índice de oxidação.

No trabalho de Silva (2003) também foi observado um alto índice de oxidação (93%), entretanto a autora trabalhou somente com o cultivar Catuaí Vermelho 44 e com os reguladores de crescimento cinetina, TDZ e BAP.

A presença do regulador de crescimento TDZ no meio de cultura pode ter influenciado no processo de oxidação das anteras conforme proposto por Nogueira et al. (2003), em trabalho com indução de brotações a partir de segmentos nodais de murici-pequeno, inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de TDZ. Estes autores observaram que, aos 30 dias após a inoculação, não houve formação de brotações em nenhuma das concentrações de TDZ testadas, somente presença de explantes necrosados.

Quanto a contaminação, aos 10 dias de cultivo *in vitro*, os maiores índices foram observados para o pré-tratamento por choque de calor, aos 20 dias não houve diferença significativa entre o pré-tratamento por choque de calor e choque frio, a 1 e 5 % de probabilidade, e aos 30 dias de cultivo *in vitro*, houve diferença significativa entre os pré-tratamentos (TABELA 7).

TABELA 7: Número médio de anteras contaminadas para os pré-tratamentos por choque frio, choque de calor e temperatura ambiente, aos 10, 20 e 30 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Pré-tratamentos	Dias de cultivo <i>in vitro</i>		
	10	20	30
Choque frio	1,2378 ab	1,5573 a	0,7979
Choque de calor	1,7259 a	1,4229 a	0,7700
Temperatura ambiente	0,8112 b	0,4734 b	0,3420

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1 e 5 % de probabilidade.

No início do cultivo *in vitro*, as anteras apresentaram um maior índice de contaminação no pré-tratamento por choque de calor, provavelmente devido ao fato da maior temperatura ter favorecido a proliferação de microrganismos.

Quanto ao intumescimento, o cultivar Catuaí Vermelho 99 foi o que obteve os maiores índices, aos 10, 20 e 30 dias de cultivo *in vitro* (TABELA 8).

TABELA 8: Número médio de anteras intumescidas nos cultivares Mundo Novo (MN) e Catuaí Vermelho 99 (CV 99), aos 10, 20 e 30 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Cultivar	Dias de cultivo <i>in vitro</i>		
	10	20	30
MN	0,4012 b	0,2652 b	0,5379 b
CV 99	1,5021 a	1,1020 a	1,6249 a

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1 e 5 % de probabilidade.

Em relação aos pré-tratamentos, choque frio obteve os maiores índices aos 10 dias de cultivo *in vitro*, já aos 20 dias, não houve diferença significativa, a 5 % de probabilidade, entre choque frio e temperatura ambiente (TABELA 9). Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, os dados para a variável pré-tratamento não foram significativos.

TABELA 9: Número médio de anteras intumescidas para os pré-tratamentos por choque frio, choque de calor e temperatura ambiente, aos 10 e 20 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Pré-tratamentos	Dias de cultivo <i>in vitro</i>	
	10	20
Choque frio	1,8247 a	0,9494 a
Choque de calor	0,2638 c	0,2898 b
Temperatura ambiente	0,8174 b	0,7501 ab

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

Em relação a indução de calos, o cultivar Catuaí Vermelho 99 foi o que induziu maior formação dos mesmos quando comparado ao Mundo Novo, aos 20 e 30 dias de cultivo *in vitro*. Aos 10 dias de cultivo *in vitro*, não houve diferença significativa, a 1 e 5 % de probabilidade, entre os cultivares (TABELA 10).

TABELA 10: Número médio de anteras com calosidades nos cultivares Mundo Novo (MN) e Catuaí Vermelho 99 (CV 99), aos 10, 20 e 30 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Cultivar	Dias de cultivo <i>in vitro</i>		
	10	20	30
MN	0,1538 a	0,1425 b	0,2716 b
CV 99	0,3177 a	0,6273 a	0,6284 a

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1 e 5 % de probabilidade.

Quanto aos pré-tratamentos, choque frio foi o melhor para a indução de calos nas anteras, seguido pela temperatura ambiente, aos 10, 20 e 30 dias de cultivo *in vitro* (TABELA 11).

TABELA 11: Número médio de anteras com calosidades para os pré-tratamentos por choque frio, choque de calor e temperatura ambiente, aos 10, 20 e 30 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Pré-tratamentos	Dias de cultivo <i>in vitro</i>		
	10	20	30
Choque frio	0,4023 a	0,5340 a	0,6787 a
Choque de calor	0,1153 b	0,1624 b	0,1977 b
Temperatura ambiente	0,1972 ab	0,4297 ab	0,4801 ab

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

Apesar das anteras estarem oxidadas, e dos dados sobre os níveis de TDZ não terem sido significativos, a presença desse regulador de crescimento no meio de cultura pode ter influenciado no intumescimento das mesmas, conforme proposto por Shan et al. (2000), onde o thidiazuron (TDZ) seria um eficiente regulador da morfogênese *in vitro* de muitas espécies de plantas. Além disso, Huetteman; Preece (1993) citam que o TDZ é um excelente estimulante para formação de calos em concentrações iguais ou maiores que 1,0 mM.

Segundo Andrade (1998), o TDZ, que possui ação citocinínica, produz uma maior atividade em relação as outras citocininas, pois ele não é facilmente degradado, sendo portanto mais estável e mais ativo. E esse regulador tem recebido mais atenção recentemente devido a sua habilidade em promover a

regeneração *in vitro* em muitas espécies, particularmente em lenhosas (SHAN et al., 2000).

Em banana, Srangsam e Kanchanapoom (2003), trabalhando com indução de calos, observaram que calos embriogênicos foram induzidos, em meio MS, acrescido de TDZ, na concentração de 2,0 mg.L. Em maçã, Morales et al. (1999) citam que o TDZ, a 5 mM, é importante para a formação de calos regenerativos. Shan et al. (2000) investigaram o efeito do TDZ na regeneração *in vitro* de cevada (*Hordeum vulgare* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.). A regeneração de tecidos a partir de calosidades de cevada foi maior na concentração de 1 mg.L, enquanto que o nível ótimo de TDZ para a regeneração de trigo foi de 0,2 mg.L.

No presente estudo, o pré-tratamento por choque frio influenciou o intumescimento e indução de calos nas anteras, principalmente no cultivar Catuai Vermelho 99, entretanto, estas não formaram embrióides (FIGURA 2).



FIGURA 2: Anteras intumescidas com calosidades. UFU/Uberlândia.2005.

Vários autores citam a importância dos pré-tratamentos para a androgênese, e que a pré-incubação, em baixas temperaturas, é benéfica para muitas espécies, como por exemplo para o arroz, o qual é pré-incubado a 8°C, o que proporciona uma maior viabilidade do grão de pólen, ativando algumas enzimas e posterior formação de calos (MARTINEZ et al., 1989).

Nitsch (1983) observou que anteras de *Datura*, tratadas a 3°C, por 48 horas, apresentaram uma frequência de pólenes 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.

Em pepino, Kumar et al. (2003) observaram que a temperatura de pré-tratamento dos botões florais de melhor resposta na indução de calos embriogênicos foi a de 4°C por 2 dias. Luz et al. (2001), trabalhando com anteras dos cultivares Mundo Novo, Catuaí Vermelho 44 e Catuaí Vermelho 99 de *Coffea arabica* L., submetidas a um choque frio (4°C por 48 horas) e inoculadas em meio MS com diferentes concentrações de 2,4-D, verificaram o intumescimento de 27% das anteras do cultivar Catuaí Vermelho 44.

Na verdade, sabe-se pouco sobre os mecanismos de redirecionamento da ontogenia do gametófito masculino no sentido de formar uma célula embriogênica, mas os estudos têm mostrado que este redirecionamento necessita de um estímulo-sinal. Estudos indicam que a aplicação de fatores externos torna o microsporo competente para a androgênese (REYNOLDS, 1990). O estresse parece ser o sinal para iniciar o processo androgenético, uma vez que proteínas de estresse são detectadas durante a indução da embriogênese haplóide (KALTCHUK-SANTOS; BODANESE-ZANETTINI, 2002).

Uma série de fatores de estresse, aplicados *in vivo* ou *in vitro*, tem sido identificados como capazes de disparar o processo esporofítico (KYO; HARADA, 1986; BINAROVA et al., 1997; TOURAEV et al., 1997; RÍHOVA; TUPI, 1999) ou aumentar a proporção de microsporos e grãos de pólen responsivos (KIVIHARJU; PEHU, 1998; DIAS, 1999; GU et al., 2004). Entre eles podem ser listados: choque térmico (calor ou frio), irradiação, agentes anti-mitóticos (colchicina), carência de nitrogênio, carência de carboidratos, incubação em solução de manitol (KALTCHUK-SANTOS; BODANESE-ZANETTINI, 2002).

O tratamento das anteras a baixas temperaturas, antes ou no início da cultura *in vitro*, tem como conseqüências para o grão de pólen a dissolução dos microtúbulos e alterações na distribuição do citoplasma e na divisão celular. Portanto, é provável que o pré-tratamento de frio exerça seu efeito através de uma interferência precoce no estabelecimento da polaridade, resultando numa mudança na organização do fuso, com a formação de pólen binucleados simétricos (KALTCHUK-SANTOS; BODANESE-ZANETTINI, 2002).

Ascanio e Arcia (1994) citam que 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. Em trabalhos com *Coffea arabica* L. variedade Garnica, esses autores 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.

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.

Na tentativa de induzir maior formação de calosidades e regeneração de pró-embrióides, as anteras foram subcultivadas para meio MS acrescido de 2,4-D e TDZ, uma vez que Murashige (1974) cita que um único meio de cultura não é suficiente para a regeneração e multiplicação *in vitro*, havendo necessidade de diferentes meios em acordo ao estágio de desenvolvimento da cultura, como também na obtenção da resposta morfogênética desejada.



Além disso, Luz (1995), trabalhando com cultura de anteras de pimentão utilizando TDZ, observou que houve um aumento significativo na indução destas, a medida em que se aumentava a concentração de TDZ. Houve ainda uma maior percentagem de anteras com embriões, mas o TDZ foi pouco eficiente na maturação dos mesmos, ou seja, o TDZ possui um papel importante na indução de embriões em anteras de pimentão.

Os índices de anteras oxidadas, contaminadas, intumescidas e com calosidades aos 15, 45 e 60 dias de subcultivo *in vitro* estão apresentados nas FIGURAS 3, 4 e 5.

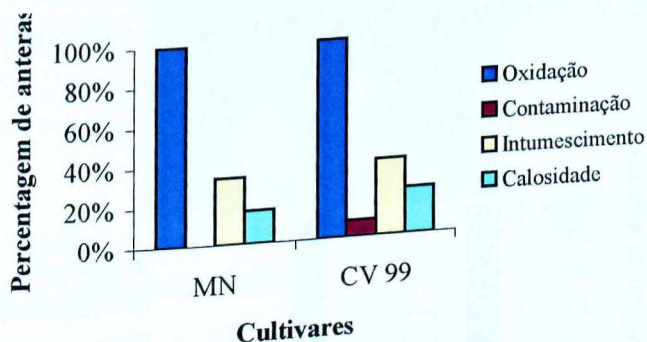


FIGURA 3: Média geral (%) de anteras oxidadas, contaminadas, intumescidas e com calosidades aos 15 dias de subcultivo *in vitro* nos cultivares Mundo Novo (MN) e Catuaí Vermelho 99 (CV 99). UFU/Uberlândia-MG, 2005.

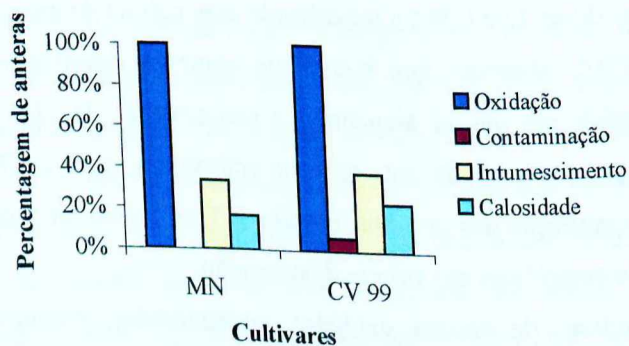


FIGURA 4: Média geral (%) de anteras oxidadas, contaminadas, intumescidas e com calosidades aos 45 dias de subcultivo *in vitro* nos cultivares Mundo Novo (MN) e Catuai Vermelho 99 (CV 99). UFU/Uberlândia-MG, 2005.

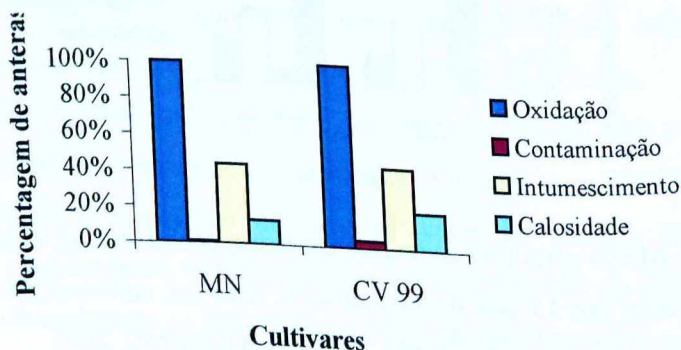


FIGURA 5: Média geral (%) de anteras oxidadas, contaminadas, intumescidas e com calosidades aos 60 dias de subcultivo *in vitro* nos cultivares Mundo Novo (MN) e Catuai Vermelho 99 (CV 99). UFU/Uberlândia-MG, 2005.

No subcultivo, em todas as avaliações foram observados altos índices de oxidação para os dois cultivares (100%). A contaminação foi maior no cultivar CV 99, quando comparado ao MN, aumentando com o passar do tempo e ficando em aproximadamente 8% aos 60 dias após o subcultivo (contaminação).

fúngica). As anteras, logo após o subcultivo, embora estivessem oxidadas, também estavam intumescidas, com os melhores resultados observados para CV 99, entretanto, esses índices não aumentaram durante o subcultivo. Quanto ao índice de calosidades, apesar da oxidação, as anteras induziram a formação de calos com os maiores valores observados para CV 99, entretanto, não houve crescimento dos mesmos (FIGURA 6), ou seja, os reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ induziram o intumescimento e calosidades nas anteras, mas estas estavam oxidadas e morreram.



FIGURA 6: Anteras oxidadas, intumescidas e com calosidades após o subcultivo. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Os índices de oxidação durante o subcultivo aumentaram, como era de se esperar, uma vez que Wang e Huang (1976) citam que o cultivo *in vitro*, por um período longo, induz a formação de compostos fenólicos no meio que podem causar necrose e posterior morte dos calos. Além disso, Utino et al. (2001) citam que para a permanência do explante por mais tempo em um mesmo meio, faz-se necessária a adição de ácido ascórbico, visando à redução da oxidação. Entretanto, Teixeira (2001) cita que o ácido ascórbico é uma substância termolábil, e, por esse motivo, tal antioxidante não deve ser colocado no meio de cultura.

Maciel (2001) e Palú (2002) citam que pelos resultados obtidos para a indução de calogênese em anteras de cafeeiro, observa-se que é necessária uma auxina juntamente com uma citocinina. Dentre as auxinas sintéticas, o 2,4-D é

sem dúvida o mais adequado a indução e manutenção do calo (GAMBORG et al., 1976).

Mustafa (2003), trabalhando com os mesmos cultivares quando comparados ao presente trabalho, observou que os melhores resultados de intumescimento foram conseguidos quando se utilizou em torno de 6 mg.L de 2,4-D. Marques et al. (2004), trabalhando com diferentes concentrações de 2,4-D e TDZ, observaram que tais reguladores induziram a formação de calos (89,09%) em anteras de cafeeiro do cultivar Catuaí vermelho 44.

Entretanto, Giri et al. (1993) afirmam que a presença de 2,4-D no meio de cultura está associado a uma maior oxidação do tecido. Figueira (2002), trabalhando com subcultivo de anteras em doses menores de 2,4-D, também obteve 100% de anteras oxidadas.

#### **4.2- EFEITO DO SUBCULTIVO DE CALOS DO CULTIVAR CATUAÍ VERMELHO 44 EM MEIO COM 2,4-D, NITRATO DE PRATA E ÁCIDO ACETILSALICÍLICO**

O resumo da análise de variância da média estimada da área dos calos do cultivar Catuaí Vermelho 44, em relação aos níveis de  $\text{AgNO}_3$  e AAS, aos 30 dias após o subcultivo, estão apresentados na TABELA 12. Os dados obtidos não foram significativos, a 1 e 5% de probabilidade.

Com o intuito de verificar se haveria crescimento e regeneração de calos induzidos previamente, foi realizado o subcultivo dos mesmos. Uma vez que os dados não foram significativos, foi realizado um cálculo da média estimada da área dos calos provenientes de anteras do cultivar Catuaí Vermelho 44, aos 30 dias após o subcultivo, que está apresentado na FIGURA 7.

TABELA 12: Resumo da análise de variância da média da área dos calos do cultivar Catuaí Vermelho 44, em função dos níveis de AgNO<sub>3</sub> e AAS, aos 30 dias após o subcultivo. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Causas da variação	Quadrado médio	
	G.L	Área (cm <sup>2</sup> )
NITRATO	1	0,0154 <sup>n.s.</sup>
AAS	3	0,0054 <sup>n.s.</sup>
NIT*AAS	3	0,0218 <sup>n.s.</sup>
RESÍDUO	88	0,0258 <sup>n.s.</sup>
C.V(%)		13,74

n.s. Não significativo, a 1 e 5 % de probabilidade.

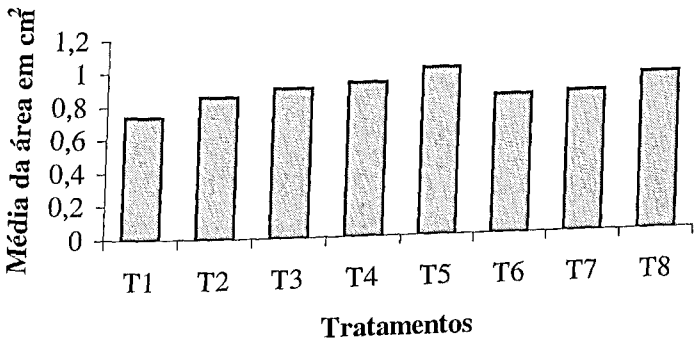


FIGURA 7: Média estimada da área em cm<sup>2</sup> dos calos provenientes de anteras do cultivar Catuaí Vermelho 44. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Foi observado o crescimento dos calos, principalmente no tratamento 5 (Meio MS + 2 mg.L de 2,4-D + 0 mg.L de AgNO<sub>3</sub> + 0 mg.L de AAS). Apesar do crescimento dos calos, os mesmos já estavam oxidados antes do subcultivo e, durante este processo, a oxidação não diminuiu e os calos não induziram a



formação de pró-embriões. Quanto a coloração, os calos encontravam-se marrons devido a necrose dos tecidos promovida pelo processo de oxidação, e com textura compacta, não embriogênica (FIGURA 8).

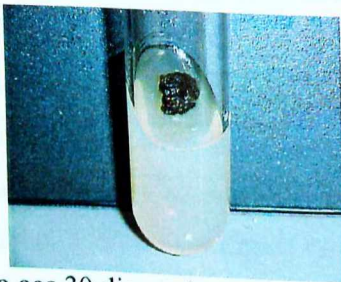


FIGURA 8: Calo oxidado aos 30 dias após o subcultivo. UFU/ Uberlândia-MG, 2005.

Em muitas espécies, por razões não conhecidas, a embriogênese direta é rara e as plantas têm que ser diferenciadas a partir de calos. Para indução destes, geralmente é necessária uma auxina (MAHESHWARI et al., 1982). Segundo Rocha (1998), para a indução e manutenção do calo, a maioria das espécies parece comportar-se diferentemente em relação aos reguladores de crescimento, podendo ocorrer independentemente de auxinas e citocininas, dependente de ambas, ou dependente de uma ou de outra.

Outras substâncias têm sido adicionadas aos meios de cultura, visando aumentar a eficiência da cultura de anteras. O  $\text{AgNO}_3$  (5 a 10 mg.L) reduz a senescência das anteras, resultando em aumento na indução de calos (PETERS et al., 1999).

Herman (1991) cita que existe uma relação direta entre a concentração de aspirina no meio de cultura e o estímulo da embriogênese, além de não causar qualquer prejuízo no crescimento e sobrevivência das células, bem como não afetar o pH do meio.

Provavelmente, a auxina 2,4-D promoveu o crescimento dos calos subcultivados, mas o  $\text{AgNO}_3$  e o AAS não estimularam a sua embriogênese.

### 4.3- INFLUÊNCIA DO 2,4-D, NITRATO DE PRATA E ÁCIDO ACETILSALICÍLICO NO CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.)

O resumo das análises de variância, para as características avaliadas, aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*, estão apresentadas nas TABELAS 13 e 14, respectivamente. Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, observa-se que, para a variável calosidades, houve interação significativa, a 5% de probabilidade, entre cultivar e nitrato de prata. Aos 60 dias, observa-se que houve interação significativa, a 1% de probabilidade, entre as doses de  $\text{AgNO}_3$  e AAS quanto ao intumescimento, calosidades e pró-embriões; e entre cultivar e  $\text{AgNO}_3$  para a variável pró-embriões. As demais interações não foram significativas.

TABELA 13: Resumo das análises de variância para o número médio de anteras contaminadas (CONT.), intumescidas (INT.) e com calosidades (CALOS.), em função das concentrações de nitrato de prata (NIT) e ácido acetilsalicílico (AAS), em um período de 30 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Causas da variação	G.L	Quadrados médios		
		CONT.	INT.	CALOS.
CULTIVAR	1	1,9517*	0,0089	0,5061**
NITRATO	1	3,9639*	0,4526	0,5080**
AAS	4	0,2958	0,6870**	0,7794**
CUL*NIT	1	0,0619	0,1944	0,4792**
CUL*AAS	4	0,0889	0,0772	0,0867
NIT*AAS	4	0,1694	0,3557	0,2607
CUL*NIT*AAS	4	0,0624	0,0164	0,0239
RESÍDUO	60	0,1383	0,1475	0,1148
			27,00	27,65
C.V(%)		34,84		

\*Significativo, a 1 % de probabilidade; \*\* Significativo, a 5 % de probabilidade.

TABELA 14: Resumo das análises de variância para o número médio de anteras contaminadas (CONT.), intumescidas (INT.), com calosidades (CALOS.) e pró-embriões (EM.), em função das concentrações de nitrato de prata (NIT) e ácido acetilsalicílico (AAS), em um período de 60 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Causas da variação	Quadrados médios				
	G.L	CONT.	INT.	CALOS.	EM.
CULTIVAR	1	1,7144*	0,0739	0,0476	0,0014
NITRATO	1	3,3188**	1,8797*	0,6281**	0,2440
AAS	4	0,2291	0,4130*	0,6805*	0,4554**
CUL*NIT	1	0,0196	0,1987	0,4174	0,4365*
CUL*AAS	4	0,0112	0,0702	0,0716	0,1796
NIT*AAS	4	0,1344	0,4952*	0,4537*	0,4043*
CUL*NIT*AAS	4	0,0471	0,0432	0,0964	0,0772
RESÍDUO	60	0,1806	0,1104	0,1142	0,0923
C.V(%)		37,73	30,41	28,11	33,05

\* Significativo, a 1% de probabilidade; \*\* Significativo, a 5% de probabilidade

Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, todas as anteras estavam oxidadas, apesar das mesmas terem permanecido no escuro, diferentemente do observado por Melo et al. (2001), onde houve o controle da oxidação pela ausência de luz. Entretanto, apesar das anteras estarem oxidadas, houve o intumescimento e formação de calosidades, e, em alguns casos, de pró-embriões. Provavelmente o ambiente escuro influenciou nesse processo, conforme observado por Muscatelli (2003), onde houve declínio da oxidação, maiores índices de intumescimento e melhor resposta na formação de calos em anteras de café, cultivadas com auxina e citocininas, no meio de cultura, e depois colocadas na ausência de luz.

Quanto à contaminação, o cultivar Catuaí Vermelho 44 foi o que apresentou os maiores índices, aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro* (TABELA 15), sugerindo que tal cultivar seja mais susceptível aos patógenos ou



cultivar Mundo Novo seja mais resistente aos mesmos. Entretanto, essa contaminação foi pequena, não interferindo no desenvolvimento das anteras.

Em relação a presença ou ausência de  $\text{AgNO}_3$  no meio de cultura, o número médio de anteras contaminadas foi menor na presença do mesmo, aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro* (TABELAS 16 e 17).

TABELA 15: Número médio de anteras contaminadas nos cultivares Mundo Novo (MN) e Catuaí Vermelho 44 (CV 44), aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Cultivar	Dias de cultivo <i>in vitro</i>	
	30	60
MN	0,3303 b	0,3522 b
CV 44	0,9972 a	0,9786 a

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1 e 5 % de probabilidade.

TABELA 16: Número médio de anteras contaminadas nos cultivares Mundo Novo (MN) e Catuaí Vermelho 44 (CV 44), em relação a ausência ou presença de  $\text{AgNO}_3$ , aos 30 de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Cultivar	Nitrato de prata (mg.L)		Média
	0	5	
MN	0,7233	0,0133	0,3683
CV 44	1,6728	0,4472	1,0600
Média	1,1980	0,2302	

TABELA 17: Número médio de anteras contaminadas nos cultivares Mundo Novo (MN) e Catuaí Vermelho 44 (CV 44), em relação a ausência ou presença de  $\text{AgNO}_3$ , aos 60 de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Cultivar	Nitrato de prata (mg.L)		Média
	0	5	
MN	0,7347	0,0405	0,3876
CV 44	1,5602	0,4932	1,0267
<b>Média</b>	1,1474	0,2669	

Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, o número médio de anteras intumescidas diminuiu, à medida em que aumentaram as doses de AAS (FIGURA 9). Já aos 60 dias, houve interação entre as doses de  $\text{AgNO}_3$  e AAS, sendo que na ausência de  $\text{AgNO}_3$ , o número médio de anteras intumescidas também decresceu, à medida em que aumentaram as doses de AAS (FIGURA 10). Os dados não foram significativos na presença de  $\text{AgNO}_3$ .

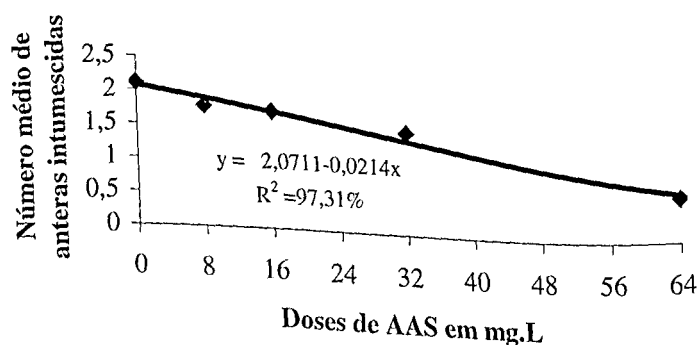


FIGURA 9: Número médio de anteras intumescidas, em diferentes concentrações de AAS, aos 30 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

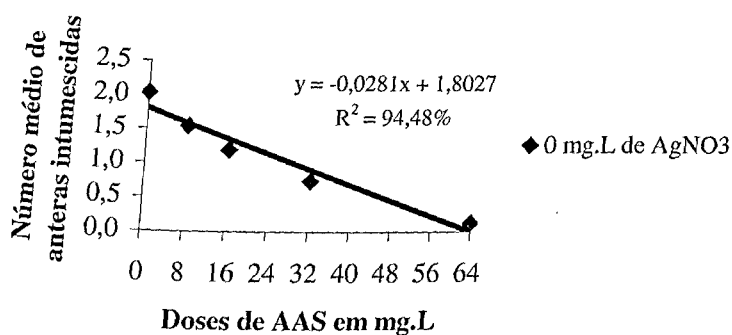


FIGURA 10: Número médio de anteras intumescidas, em ausência de nitrato de prata, em função de diferentes concentrações de AAS, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. UFU/ Uberlândia-MG, 2005.

O ambiente escuro, provavelmente, induziu o intumescimento das anteras, conforme proposto por Silva (2003), em trabalho com o cultivar Catuaí Vermelho 44, onde houve um maior índice de intumescimento quando os explantes florais foram incubados no escuro. Além disso, o regulador de crescimento 2,4-D apresenta caráter indutor para o intumescimento e calosidade conforme proposto por (TORRES et al., 1998).

Com relação ao número médio de anteras com calosidades, houve interação significativa, a 5% de probabilidade, entre cultivar e  $\text{AgNO}_3$ , aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Mundo Novo foi o cultivar que apresentou o maior número médio de anteras com calosidades na ausência de  $\text{AgNO}_3$ . À 5 mg.L de  $\text{AgNO}_3$  não houve diferença significativa entre os cultivares (TABELA 18).

TABELA 18: Número médio de anteras com calosidades nos cultivares Mundo Novo (MN) e Catuaí Vermelho 44 (CV 44), em relação a ausência e presença de  $\text{AgNO}_3$ , aos 30 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Cultivar	Nitrato de prata (mg.L)		Média
	0	5	
MN	1,6388 a	0,8185 a	1,2287
CV 44	0,8192 b	0,8087 a	0,8139
Média	1,2290	0,8136	

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

Com relação ao ácido acetilsalicílico, houve um decréscimo no número médio de anteras com calosidades, à medida em que aumentaram as doses de AAS (FIGURA 11).

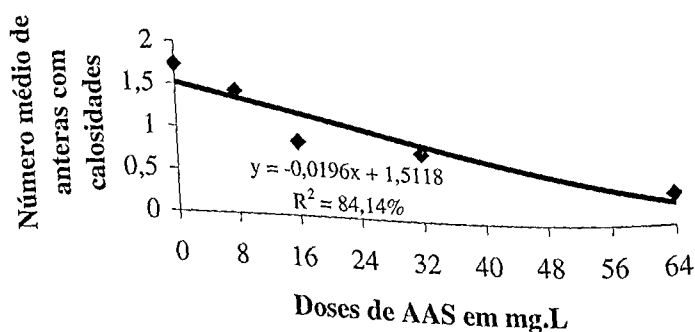


FIGURA 11: Número médio de anteras com calosidades, em diferentes concentrações de AAS, aos 30 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG 2005.

Já aos 60 dias de cultivo *in vitro*, houve interação significativa, a 1% de probabilidade, entre as doses de  $\text{AgNO}_3$  e AAS. Na ausência de  $\text{AgNO}_3$ ,

número médio de anteras com calosidades diminuiu, à medida em que as doses de AAS aumentaram (FIGURA 12). Na presença de  $\text{AgNO}_3$  os dados obtidos não foram significativos.

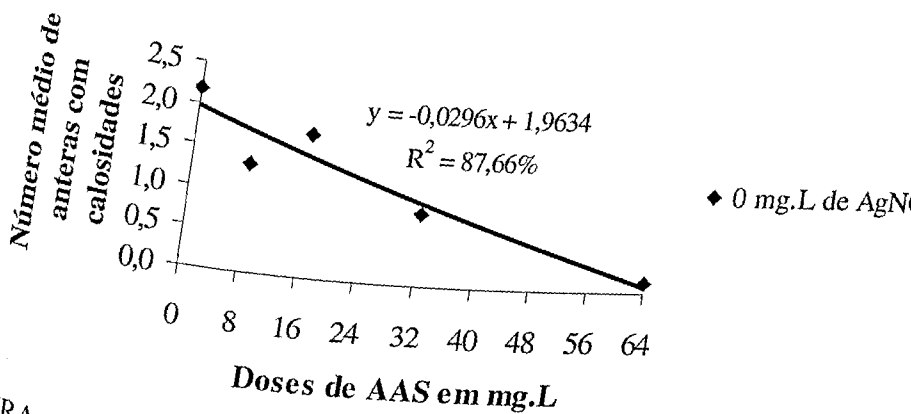


FIGURA 12: Número médio de anteras com calosidades, em ausência de  $\text{AgNO}_3$ , em função de diferentes concentrações de AAS, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. UFU/ Uberlândia-MG, 2005.

Do total de anteras inoculadas, 22% induziram a formação de calosidades, sendo 24,2% para o cultivar Mundo Novo e 20,4% para Catuaí Vermelho 44. Embora Mundo Novo tenha apresentado o maior índice de formação de calosidades, isso não significa que seja o melhor cultivar, uma vez que Catuaí vermelho 44 apresentou uma contaminação maior.

O ambiente escuro influenciou na formação de calosidades, conforme proposto por Jaramillo e Summer (1991) e Nascimento et al. (2003), em trabalho com indução de calos de carqueja, onde houve uma maior formação de calos em anteras submetidas a ausência de luz. Sharp et al. (1973) obtiveram calos através do cultivo de sementes, folhas e anteras de *C. arabica* dos cultivares Mundo Novo e Bourbon Amarelo. A indução de calos também foi mais eficiente na ausência de luz. Além disso, Ascanio e Arcia (1994) citam que, para o desenvolvimento do calo, as anteras devem ser mantidas no escuro, já para o

desenvolvimento do embrião, os calos devem ser mantidos no claro. Santos et al. (2003), trabalhando com o efeito da luz na indução de calogênese *in vitro*, em explantes foliares de pequi, inoculados em meio WPM, suplementado com 1,0 mg.L de TDZ e 2,0 mg.L de 2,4-D, observaram que a maior formação de calos também ocorria na ausência de luz.

No presente estudo, os calos formados nos explantes mostravam-se friáveis, não embriogênicos, ocupando em alguns casos todo o contorno da antera ou ocorrendo em pontos isolados. Entretanto, em alguns calos havia a presença de pró-embriões. Embora as anteras estivessem oxidadas, os calos possuíam coloração cinza na grande maioria, e, em alguns, coloração creme, justamente onde foi observada uma maior incidência de pró-embriões.

Essa coloração cinza dos calos pode ser resultante da perda gradativa da cor natural 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 constituem sinais característicos da decadência da cultura (SILVA, 2002).

Embora a ausência de luz tenha influenciado na formação e coloração dos calos, os mesmos eram pequenos, possuindo diâmetro igual ou inferior a 5 mm, diferentemente do observado por Silva (2003), onde na ausência de luz, 56,61% dos calos apresentaram diâmetro superior a 5 mm.

Além da ausência de luz, a presença de 2,0 mg.L de 2,4-D no meio de cultura, provavelmente, influenciou na formação de calosidades. Neste experimento, tal concentração foi utilizada partindo-se do pressuposto que esta é a melhor concentração do regulador de crescimento 2,4-D, conforme analisado por Maciel (2001) e Palú (2002).

Além disso, Martinotto et al. (2003), trabalhando com indução de calos friáveis em explantes foliares de dedaleira, inocularam tais explantes, em meio WPM, suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D, e observaram q

a utilização de 2,0 mg.L de 2,4-D induziu uma formação de calos de 81,65%. Rocha (1998), trabalhando com cotilédones de cajueiro anão precoce, inoculados em meio MS, com diferentes concentrações de 2,4-D, observou que os calos induzidos foram influenciados significativamente pelas doses desse regulador.

Quanto à variável pró-embrióides, 19,8% das anteras com calos possuíam tais estruturas, sendo 21,5% pertencentes ao cultivar Mundo Novo e 17,6% ao Catuaí Vermelho 44, lembrando que esses números não fazem com que Mundo Novo seja o cultivar de melhor resposta androgenética.

Mundo Novo foi o cultivar que obteve o maior número médio de anteras com pró-embrióides. Quanto ao  $\text{AgNO}_3$ , os maiores índices foram observados na ausência do mesmo (TABELA 19).

TABELA 19: Número médio de anteras com pró-embrióides nos cultivares Mundo Novo (MN) e Catuaí Vermelho 44 (CV 44), em relação a ausência e presença de  $\text{AgNO}_3$ , aos 60 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Cultivar	Nitrato de prata (mg.L)		Média
	0	5	
MN	0,6082 a	0,1312 a	0,3697
CV 44	0,3035 a	0,3717 a	0,3376
Média	0,4559	0,2515	

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

Quanto a presença do ácido acetilsalicílico no meio de cultura, à medida em que os níveis de AAS aumentam, o número médio de anteras com pró-

embrióides decresce até a concentração de 42 mg.L de AAS. A partir desse ponto, o número médio de anteras com pró-embrióides tende a aumentar (FIGURA 13).

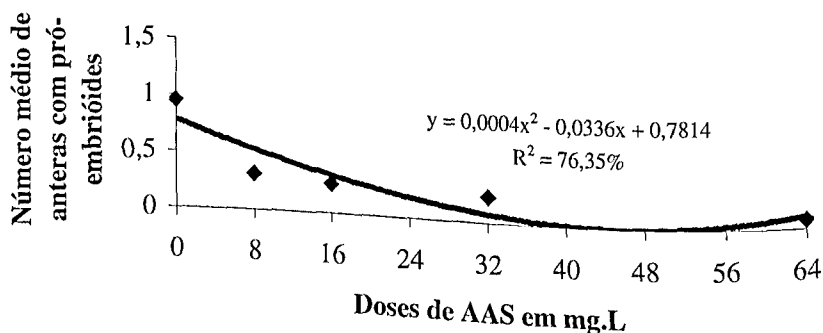


FIGURA 13: Número médio de anteras com pró-embrióides, em diferentes concentrações de AAS, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. UFU/ Uberlândia-MG, 2005.

Houve interação significativa, a 1% de probabilidade, entre as doses de  $\text{AgNO}_3$  e AAS. Na ausência do  $\text{AgNO}_3$ , o número médio de anteras com pró-embrióides decresceu, à medida em que as doses de AAS aumentaram (FIGURA 14). Os dados, na presença de  $\text{AgNO}_3$ , não foram significativos.

Ockendon e McClenaghan (1993), trabalhando com o cultivo *in vitro* de anteras de couve-de-bruxelas, afirmam que em função da alta interação do meio com o genótipo, é recomendável o uso de pelo menos dois meios, um com a presença e outro sem nitrato de prata. Em pimenta, Nervo et al., (1994) verificaram que a presença de 5 mg.L de  $\text{AgNO}_3$ , no meio de indução, teve efeito favorável na androgênese, justificando as concentrações utilizadas no presente estudo.



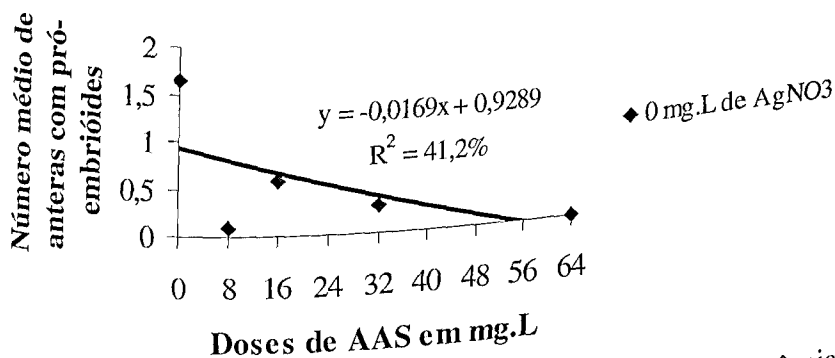


FIGURA 14: Número médio de anteras com pró-embriões, em ausência de  $\text{AgNO}_3$ , em função de diferentes concentrações de AAS, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. UFU/ Uberlândia-MG, 2005.

Uma vez que o  $\text{AgNO}_3$  e o AAS não foram eficientes na indução de calos e pró-embriões, provavelmente, o etileno exerça um efeito benéfico na indução destes em cultura de anteras de café. No entanto, Lentini et al. (1995), em trabalho com cultura de anteras de arroz, sugerem que o pouco crescimento e necrose das sementes derivados de calos estão associadas com o acúmulo de etileno no recipiente de cultivo. Porém, a rota exata dos íons de prata na organogênese e embriogênese *in vitro* não é bem conhecida e os artigos existentes são conflitantes (GÜREL et al., 2000).

O  $\text{AgNO}_3$  é benéfico em alguns casos e possui efeito contrário em outros. Resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo foram obtidos por Gürel et al. (2000) que analisaram os efeitos da adição de  $\text{AgNO}_3$  no meio de cultura na produção de plantas haplóides a partir da cultura de óvulos de beterraba. Observaram que a inclusão de 2,5 mg.L de  $\text{AgNO}_3$  diminuiu a indução de embriões e 5,0 mg.L de  $\text{AgNO}_3$  inibiu completamente a embriogênese.

Marques (1996), trabalhando com o efeito do etileno na morfogênese *in vitro* de crisântemo, através da interação entre nitrato de prata e BAP, observou que a presença de  $\text{AgNO}_3$ , utilizada isoladamente ou interagindo com BAP, resultou em baixos valores das médias obtidas para todos os parâmetros analisados.

Fuentes (1993) estudou o efeito do  $\text{AgNO}_3$  em diferentes concentrações, visando aperfeiçoar o processo de micropropagação através da embriogênese somática direta a partir de folhas de *Coffea canephora*. Ele observou que a produção de embrióides, aos 70 dias de cultivo, foi influenciada pelas diferentes doses de  $\text{AgNO}_3$ , sendo que as doses mais altas determinaram um crescente declínio na produção, indicando aproximadamente o limite de concentração.

Pasqual et al. (2002), trabalhando com anteras de *Coffea arabica* L., adicionaram, ao meio de cultura,  $\text{AgNO}_3$ , em diferentes concentrações: 0, 5, 10, 15 e 20 mg.L, e observaram que as diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  influenciaram negativamente a percentagem de calos formados a partir de anteras de cafeeiro.

Esses resultados sugerem que a ausência de etileno influenciou negativamente o desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro*. Resultados diferentes aos observados no presente trabalho foram encontrados por Auboiron et al. (1990), em trabalho com calos de seringueira; por Luz (1995) Luz et al. (1997), na indução de embrióides a partir da cultura de anteras de pimentão, isto pode ter ocorrido devido ao fato do  $\text{AgNO}_3$  bloquear a ação inibitória do etileno endógeno dos embriões, permitindo o maior desenvolvimento dos mesmos.

Oliveira (1997), trabalhando com indução de calos e a regeneração de plantas em *Brassica oleracea* L., com ênfase em repolho, *B. oleracea* var capitata, observou que a utilização de 2, 4-D, nos meios de indução de calos, é essencial para a obtenção dos mesmos, e que o  $\text{AgNO}_3$  mostrou efeito benéfico tanto na indução quanto na regeneração de plantas.

Giridhar et al. (2003), trabalhando com brotações *in vitro* de *Coffea arabica* e *C. canephora*, observaram que o  $\text{AgNO}_3$  era benéfico nas duas espécies. Finotti et al. (2001), trabalhando com anteras de *Coffea arabica* L., inoculadas em meio MS, com diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$ , observaram que a adição de 3% desta substância ao meio de cultura promovia a indução de calos.

Dias e Martins (1999) estudaram o efeito de três concentrações  $\text{AgNO}_3$  (0, 5 e 10 mg.L) na produção de embriões, a partir de cultura de anteras, em 27 morfotipos de *Brassica oleracea*. A produção de embriões foi significativamente aumentada, na maioria dos morfotipos, pela adição de  $\text{AgNO}_3$  no meio. Em geral, os melhores resultados foram obtidos com a adição de 10 mg.L de  $\text{AgNO}_3$ .

Lentini et al. (1995), estudando o efeito do  $\text{AgNO}_3$  na indução de calos, em cultura de anteras de arroz, avaliaram a adição de  $\text{AgNO}_3$  nas concentrações de 0, 2, 5, 10, 15 e 20 mg.L, ao meio líquido de indução de calos. Observaram que a formação de calos aumentou quando o  $\text{AgNO}_3$  foi adicionado ao meio de indução, principalmente na concentração de 10 mg.L. Em concentrações superiores o efeito foi inibidor, entretanto, não houve diferença quando o  $\text{AgNO}_3$  foi adicionado no meio de regeneração, indicando que para a cultura de anteras de arroz, a inibição do etileno afeta principalmente a indução de calos e embriogênese mas não a diferenciação em planta.

Em relação ao  $\text{AgNO}_3$  combinado com o AAS, efeitos inibidores semelhantes aos aqui encontrados foram observados por Conceição (1997), em estudo com o AAS em diferentes concentrações, na conservação *in vitro* de segmentos caulinares de batata, onde o AAS diminuiu o crescimento de segmentos caulinares na concentração mais elevada.

Resultados diferentes aos aqui encontrados foram obtidos por Luz et al., (1997), em estudo sobre a influência destas substâncias na androgênese de

pimentão. As anteras foram cultivadas em meio C, suplementado com AAS, nas mesmas concentrações do presente experimento e também incubadas no escuro. Observaram que a melhor indução embriogênica foi obtida na concentração de 16 mg.L de AAS, e que concentrações maiores do AAS induziram a necrose das anteras.

Khalafalla e Hattori (2000) estudaram os efeitos dos inibidores de etileno,  $\text{AgNO}_3$  e AAS no enraizamento *in vitro* de *Vicia faba* L.. Os inibidores de etileno promoveram a formação de raízes, sendo que o  $\text{AgNO}_3$  aumentou o número de raiz por brotação, e o AAS aumentou a eficiência do enraizamento.

Gutiérrez-Coronado et al. (1998) observaram que, em soja, o ácido salicílico aumenta a formação de raízes. Além disso, Senaratna et al. (2000) estudaram a hipótese de que concentrações fisiologicamente ativas de ácido salicílico e seus derivados podem conferir tolerância a estresse em plantas. Para tanto, utilizaram feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). As sementes dessas plantas foram embebidas em soluções aquosas de AAS e mostraram aumento na tolerância ao calor, resfriamento e estresse por falta de água.

Com o intuito de verificar se haveria crescimento das calosidades e aumento do número de anteras com pró-embrióides, foi realizado o subcultivo das mesmas para meio contendo 2,4-D e BAP, sendo que o número de anteras (%) oxidadas, contaminadas, intumescidas, com calosidades e pró-embrióides, aos 30 dias de subcultivo *in vitro*, para os cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho 44 estão apresentados na FIGURA 15.

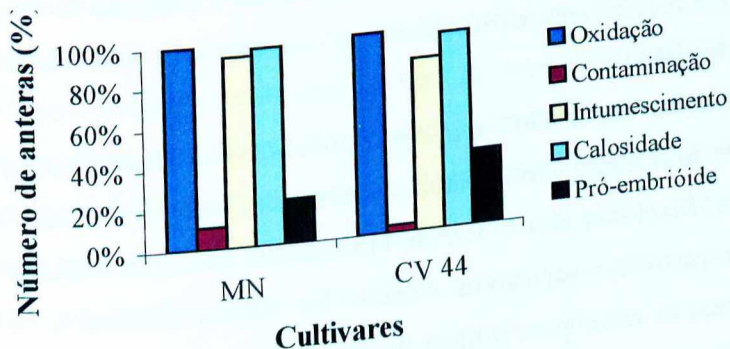


FIGURA 15: Número de anteras (%) oxidadas, contaminadas, intumescidas, com calosidades e pró-embrióides, nos cultivares Mundo Novo (MN) e Catuai Vermelho 44 (CV 44), aos 30 dias de subcultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Os índices de oxidação foram de 100% nos dois cultivares estudados. O número de anteras contaminadas, intumescidas e com calosidades foram maiores no cultivar Mundo Novo, quando comparado ao Catuai Vermelho 44, entretanto, este apresentou os maiores índices de anteras com pró-embrióides.

Quase todas as anteras estavam intumescidas e/ou com calosidades um pouco maiores, quando comparadas as anteriores, assim os reguladores de crescimento 2,4-D e BAP, provavelmente, influenciaram nesses processos. Esses dados concordam com os de Santos (1999), trabalhando com anteras de soja, onde foram testados meios de indução apresentando diferentes composições de reguladores de crescimento. Ficou evidenciado que a presença da auxina 2,4D é fundamental na fase indutória e que o uso associado de 2,4D com BAP leva ao aumento nas taxas de indução de calos e embriões.

Além disso, Silva et al. (2003), trabalhando com anteras dos cultivares MN e CV99 de *Coffea arabica* L., inoculadas em meio MS, acrescido de 2,4-D, nas concentrações de (2, 4, 6 e 8 mg.L) e BAP (0 e 2 mg.L), afirmam que para

que ocorra intumescimento das anteras, formação e aumento do tamanho dos calos de ambos cultivares, é necessário que haja interação entre a auxina (2,4-D) e a citocinina (BAP).

Apesar dos dados não serem significativos, e não existir diferença entre os tratamentos utilizados, vários autores observaram melhores resultados de tais reguladores. Maciel et al. (2003), em um trabalho com embriogênese somática indireta, a partir de segmentos foliares em *Coffea arabica* L. cv. Obatã, subcultivaram os calos para o meio de diferenciação, adicionado de diferentes concentrações de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg.L) e BAP (0, 2, 4 e 8 mg.L), e observaram que a maior frequência de calos embriogênicos friáveis ocorreu na presença de BAP (8 mg.L), associado ou não ao 2,4-D.

Mustafa (2003), trabalhando com anteras de Mundo Novo e Catuaí Vermelho 99, inoculadas em meio MS, acrescido de 2,4-D (2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg.L) e BAP (0,0; 2,0 mg.L), observou que para Mundo Novo os índices de oxidação, intumescimento e formação de calos foram influenciados significativamente pela combinação das doses de 2,4-D e BAP, sendo que a combinação de 4 mg.L de 2,4-D e 2 mg.L de BAP promoveu a maior percentagem de calos. À medida em que houve aumento nas doses de 2,4-D, houve também aumento na oxidação das anteras, no entanto, também aumentaram as anteras intumescidas chegando a um ponto máximo onde houve decréscimo. Para CV 99, a formação de calos também está associada a combinação entre auxina e citocinina, e à medida em que havia acréscimo na concentração de 2,4-D, a percentagem de calos também aumentava.

Azevedo et al. (2003), trabalhando com indução de calos de explantes foliares de copaíba, que foram inoculados em meio MS, acrescido de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP, verificaram que o uso de 1,0 mg.L de BAP em combinação com 2 mg.L de 2,4-D proporcionou a maior formação de calos.

Teixeira et al. (2003), trabalhando com brotos adventícios de crisântemo, a partir de segmentos caulinares e foliares que foram inoculados em meio MS, observaram que, independentemente do tipo de explante utilizado, todos os tratamentos promoveram a formação de calos, contudo, tratamentos com BAP combinado com 2,4-D resultaram na formação de calos verdes e pulverulentos.

Além dos reguladores de crescimento, neste experimento, o ácido ascórbico foi adicionado no meio de cultura e embora os índices de oxidação tenham sido altos, trata-se de um subcultivo, porém, tal antioxidante pode ter influenciado na indução do intumescimento e formação de calosidades e até mesmo de pró-embrióides nas anteras.

Melo et al. (2001), trabalhando com embriões de guarirobeira, verificaram que o ácido ascórbico promoveu um acréscimo na percentagem de embriões viáveis (93,30% de germinação).

O polivinilpirrolidene (PVP) também possui ação antioxidante e vem sendo utilizado para prevenir a oxidação de compostos fenólicos, entretanto, tal substância não foi testada nesses experimentos, uma vez que o ácido ascórbico provavelmente é o mais eficiente antioxidante, por ser considerado antioxidante biológico, estando presente em altas concentrações em muitos compartimentos celulares, como o estroma dos cloroplastos (LARSON, 1988). Além disso, Andrade (1998) cita que o problema de oxidação foi o fator limitante para o desenvolvimento das anteras, mesmo utilizando PVP. Melo et al. (2001) verificaram a importância dos antioxidantes no controle da oxidação no embrião da guarirobeira, com superioridade para o ácido ascórbico (somente 3,37%) de oxidação em relação ao PVP (22,25%).

Pasqual et al. (2002), trabalhando com anteras de *Coffea arabica* L., inoculadas em meio MS, acrescido de PVP, observaram que a adição deste ao meio de cultura aumentou, significativamente, a indução de calos, atingindo um máximo de 67% na dosagem de 200 mg.L. O uso de PVP nessa dosagem

também proporcionou a menor oxidação às anteras, sendo que dosagens superiores passaram a apresentar efeito prejudicial.

O insucesso da cultura de anteras pode estar relacionado com a correlação existente entre os genótipos, visto que a maioria dos pesquisadores não utiliza vários cultivares. Na maioria das vezes, faltam dados detalhados sobre as respostas da cultura a ser utilizada, sendo necessário utilizar vários materiais para analisar quais possuem melhores respostas (ARAÚJO, 2004).

A contaminação causada por fungos e bactérias e a oxidação por substâncias fenólicas são fatores limitantes no estabelecimento *in vitro* de calos em anteras de *C. arabica* provenientes de material coletado no campo. A utilização dos reguladores de crescimento, provavelmente, tenha condicionado as anteras a expressarem seu potencial embriogênico, entretanto, os pró-embrióides observados não regeneraram plântulas. Se for considerado o intumescimento das anteras e o início de formação de calos, como uma possível embriogênese, a diferença de manifestação entre os cultivares é comum na técnica de cultura de anteras.



## 5- CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho, conclui-se que:

- O pré-tratamento por choque frio é o mais eficiente na indução de calos, no cultivo *in vitro* de anteras de *Coffea arabica* L.;
- Os reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ, nas concentrações utilizadas, são eficientes na indução dos calos, porém, não promovem a regeneração dos mesmos;
- O nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e o ácido acetilsalicílico (AAS), assim como a associação de 2,4-D e BAP nas concentrações utilizadas, não são eficientes na regeneração dos pró-embrióides, nas anteras dos cultivares estudados;
- Catuaí Vermelho é o cultivar mais responsivo à androgênese, quando comparado ao Mundo Novo.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDRADE, L. M. C. O.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. R. de.; PEREIRA, A. B.; CAVALCANTE-ALVES, J. M. Cultura *in vitro* de embriões de *Coffea arabica*: influência de ANA e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1063-1070, set./out. 2001.

ARAÚJO, J. S. de; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de; PASQUAL, M. Indução *in vitro* de calogênese em anteras de cafeeiro utilizando diferentes níveis de 2,4D e citocinina. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL E WORKSHOP INTERNACIONAL DE CAFÉ & SAÚDE, 3., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Café, 2003. p. 99.

ARAÚJO, J. S. de. **Calogênese em anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L.** 2004. 41p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

ARRUDA, S. A. **Produção de propágulos de batata doce *Ipomea batatas* obtidos *in vitro* e submetidos a tratamentos prévios com fungicida bactericida**. 2000. 42p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

ASCANIO, E. C. E.; ARCIA, M. A. M. Haploids from anther culture in *Coffea arabica* L. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE CULTURE-TROPICAL SPECIES, 1987, Bogotá. **Proceedings...** Columbia [s.n.], 1987. p.68.

ASCANIO, E. C. E.; ARCIA, M. A. M. Efecto del estado de desarrollo de anteras y de un shock térmico sobre la androgénesis en *Coffea arabica* L. **Garnica. Café Cacao Thé**, Paris, v. 28, n. 2, p.75-79, avril./juin. 1994.

AUBOIRON, E.; CARRON, M. P.; MICHAUX-FERRIERE, N. Influence of atmospheric gases, particularly ethylene, on somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 21, p. 3-10, 1990.

AZEVEDO, K. de S.; PAIVA, R.; MOURA, C. A. S.; ALBERT, L. H. B.; SANTOS, B. R.; SOARES, G. de A. Indução e análises bioquímicas de calos de explantes foliares de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 126.

BAJAJ, Y. P. S. *In vitro* production of haploids. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding.** New York: Macmillan, 1984. v.1, p. 228-287.

BARRUETO, L. P. C.; RAMOS, A. R. C. Indução de multibrotação em *C. arabica* cv. Catuaí vermelho 81, usando diferentes concentrações de BAP em biorreator de imersão permanente (BIPER). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001. Vitória. **Anais...** Brasília: EMBRAPA CAFÉ, 2001. p. 382-385.

BINAROVA, P.; HAUSE, G.; CENKLOVÁ, V.; CORDEWENER, J. H. G.; CAMPAGNE, M. M. V. L. A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 10, n. 4, p. 200-208, Aug. 1997.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas.** 2. ed. Viçosa: UFV, 1998. 547p.

BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPB, 1999. v. 2, p. 679-736.

CAETANO, V. R.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. Interdisciplinaridade no CNPT/EMBRAPA: estudos que culminaram com o lançamento, por meio de métodos biotecnológicos, do trigo BR-43. In: ENCONTRO DE GENETICISTAS DO RIO GRANDE DO SUL, 8., 1992, São Leopoldo. **Anais...** São Leopoldo: SBG, 1992. p. 15-19.

CAIXETA, G. Z. C. Economia cafeeira, mercado de café, tendência e perspectivas. In: ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ DE QUALIDADE, 1999, Viçosa. **Livro de Palestras...** Viçosa: UFV, 1999. p. 3-21.

CARDOSO, A. P. S. **Café : cultura e tecnologia primária**. Brasília: Instituto de Investigação Científica Tropical, Secretaria de Estado da Ciência e Tecnologia, Ministério do Planejamento e da Administração do Território, 1994. 169 p.

CARNEIRO, M. F. *In vitro* induction of embryogenesis on pollen grains of *C. arabica* cv Catuai. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE CULTURE-TROPICAL SPECIES, 1987, Bogotá. **Proceedings...** Columbia: [s.n.], 1987.

CARNEIRO, M. F. Advances on coffee androgenesis. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR, 1999. p. 55-60.

CARVALHO, A. **Histórico do desenvolvimento da cultura do café no Brasil**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 1993. v. 9, 7p. (Documento IAC, 34).

CONCEIÇÃO, A. M. da. **Conservação *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivares: Baronesa e Santo Amor**. 1997. 50p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1997.

CORDEIRO, A. T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplastos em *Coffea***. 1999. 111p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. London: Kluwer Academic Publishers, 1991. 48p.

DE BLOCK, M.; DE BROUWER, D. A simple and robust *in vitro* assay to quantify the vigour of oilseed rape lines and hybrids. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.40, p. 845-852, May 2002.

DE- FOSSARD, R. A. Establishment of laboratory regenerates undefiled conditions. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON BIOTECNOLOGY IN AGRICULTURE: ENVOLVIM A RESEARCH AGENDA FOR THE ICGB. 1985, New Delhi. **Proceedings...** New Delhi: [s.n.], 1985. p. 193-201.

DIAS, J. C. S. Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis. **Euphytica**, Wageningen, v. 108, n. 1, p. 65-69, Jan. 1999.

DIAS, J. S.; MARTINS, M. G. Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different *Brassica oleracea* morphotypes. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 82, p. 299-307, 1999.

DUBLIN, P. Techniques de reproduction végétative *in vitro* at amelioration génétique chez les caféiers cultivés. **Café Cacao Thé**, Paris, v. 28, n. 4, p. 231-244, 1984.

DUBLIN, P. Multiplicación vegetativa de café, hevea e cacao. In: ROCA, N. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos e aplicaciones**. Turrialba: [s.n.], 1991. p. 612-642.

EIRA, M. T. S.; REIS, R. B. dos.; FAZUOLI, L. C. Conservação de sementes de *Coffea arabica* L. em bancos de germoplasma. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Brasília: EMBRAPA CAFÉ, 2001. p. 1319-1324.

EIRA, M. T. S.; FAZUOLI, L. C.; FILHO, O. G.; SILVAROLA, M. B.; DANTAS, M. S. F.; REIS, R. B. Aumento da variabilidade genética de café no Brasil. Brasília: EMBRAPA Café, 2001. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/-ocafezal>>. Acesso em: 15 out. 2003.

ENTENDENDO a biotecnologia. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Fundação Biominas, [2001?]. 1 CD-ROM.

FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A. B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (Ed.). **Cultura do cafeeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa de Potássio e do Fósforo, 1986. p. 87-113.

FIGUEIRA, E. R. **Estádios de desenvolvimento dos micrósporos, pré-tratamentos e 2,4-D no cultivo *in vitro* de anteras de cafeeiro**. 2002. 39p. Monografia (Especialização em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2002.

FINOTTI, D. R.; MACIEL, A. L. R.; PASQUAL, M.; PALU, E. G.; CAVALCANTE-ALVES, J. M.; PEREIRA, A. R. Callus induction from *in vitro* culture of coffee (*Coffea arabica* L.) anthers. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: REDBIO, 2001. p. 66.

FUENTES, S. R. L. Efeito de um inibidor do etileno (nitrato de prata) e diferentes fontes de carbono sobre a embriogênese somática do cafeeiro (*Coffea canephora*). 1993. 77p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1993.

GAMBORG, O. L.; MURASHIGE, T.; THORPE, T. A.; VASIL, I. K. Plant tissue culture media. *In Vitro*, New York, v. 12, n. 7, p. 473-478, 1976.

GEORGE, E. F.; SHRRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Eastern Press, 1984. 709p.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**: part. 2: in practice. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361p.

GIRI, A.; AHUJA, P. S.; AJAYKUMAR, P. V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Aconitum heterophyllum* Wall. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 32, p. 213-218, 1993.

GIRIDHAR, P.; INDU, E. P.; RAMU, D. V.; RAVISHANKAR, G. A. Effect of silver nitrate on *in vitro* shoot growth of coffee. **Tropical Science**, London, v. 43, n. 3, p. 144-146, 2003.

GRANER, E. A.; GODOY JUNIOR, C. **Manual do cafeicultor**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1967. 320p.

GU, H. H.; HAGBERG, P.; ZHOU, W. J. Cold treatment enhances embryogenesis in oilseed rape. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 42, n. 2, p. 137-143, 2004.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1999. v. 2, p. 533-568.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Cultura de tecidos vegetais e micropropagação de plantas. 2001. Disponível em <http://www.fit/cca/ufsc.htm>. Acesso em: 15 maio 2004.

GUPTA, P. P. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 6, p. 33-39, 1986.

- GÜREL, S.; GÜREL, E.; KAYA, Z. Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, p. 1155-1159, 2000.
- GUTIÉRREZ-CORONADO, M. A.; TREJO-LÓPEZ, C.; LARQUÉ-SAAVEDRA, A. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 36, n. 8, p. 563-565, 1998.
- HATANAKA, T.; SAWABE, E.; AZUMA, T.; UCHIDA, N.; YASUDA, T. The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. **Plant Science**, Limerick, v. 107, n. 2, p. 199-204, June 1995.
- HENDY, H.; POCHARD, E.; DALMASSO, A. Transmission héréditaire de la résistance aux nématodes *Meloidogyne chitwood* (Tylenchida) portée par 2 lignées de *Capsicum annuum* L.: étude de descendances homozygotes issues d'androgénèse. **Agronomie**, Paris, v. 5, n. 2, p. 93-100, 1985.
- HERMAN, B. E. **Recent advances in plant tissue culture: regeneration, micropropagation and media**. New York: Agritech Consultants, Shrub Oak, 1991. 94p.
- HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 33, n. 2, p. 105-119, 1993.
- ILLG, R. D. Variação somaclonal. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA; Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas, 1990. p. 287-295.
- JARAMILO, J.; SUMMER, W. L. Dark - light treatments influence induction of tomato anther culture. **Hort Science**, Alexandria, v. 26, p. 915-916, 1991.
- KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 165-173, 2002.
- KHALAFALLA, M. M.; HATTORI, K. Ethylene inhibitors enhance *in vitro* root formation on faba bean shoots regenerated on medium containing thidiazuron. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 32, p. 59-63, 2000.

KIVIHARJU, E.; PEHU, E. The effect of cold and heat pretreatments on anther culture response of *Avena sativa* and *A. sterilis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 54, p. 97-104, 1998.

KYO, M.; HARADA, H. Studies on conditions for cell division and embryogenesis in isolated pollen culture of *Nicotiana rustica*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 79, p. 90-94, 1986.

KUMAR, H. G. A.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 98, n. 3, p. 213-222, 2003.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 27, n. 4, p. 969-978, 1988.

LENTINI, Z.; REYES, P.; MARTINEZ, C. P.; ROCA, W. M. Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. **Plant Science**, Limerick, v. 110, p. 127-138, 1995.

LERCH, K. Cooper monooxygenases: tyrosinase and dopamine b-monooxygenases. In: SIEGEL, H. (Ed.). **Metal ions in biological systems**. Marchel: Deckker, 1981. p. 143-186.

LU, C.Y. The use of Thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cellular and Development Biology Plant**, Columbia, v. 29, p. 92-96, 1993.

LUNA-FILHO, E. P. Cafés do Brasil e indicações geográficas. 2001. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/-ocafezal>>. Acesso em: 15 out. 2003.

LUZ, J. M. Q. **Embriogênese somática in vitro em anteras de pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1995. 115p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

LUZ, J. M. Q.; PINTO, J. E. B. P.; DIAS EHLERT, P. A.; CERQUEIRA, E. S. Influência do nitrato de prata, do carvão ativado e do ácido acetilsalicílico na embriogênese de anteras de pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 21, n. 4, p. 447-456, 1997.

LUZ, J. M. Q.; FIGUEIRA, E. R.; SILVA, A. S. Pré-tratamento por choque frio de botões florais e influência do 2,4-D na indução de embriões em anteras de caféiro (*Coffea arabica* L.) In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE



BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: REDBIO, 2001. p. 69.

MACIEL, A. L. de R. **Embriogênese somática indireta em *Coffea arabica* L.** 2001. 60p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

MACIEL, A. L. R. de; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de; SILVA, A. B. da; DUTRA, L. F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 107-116, jan./fev. 2003.

MAHESHWARI, S.C.; RASHID, A.; TYAGI, A.K. Haploids from pollen grain. Retrospect and Prospect. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 69, n. 5, p. 865-879, 1982.

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

MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **The Journal of Horticultural Science**, London, v. 65, n. 2, p. 103-111, 1990.

MARQUES, D. A. de. **Influência de fitoreguladores e fontes de nitrogênio na morfogênese *in vitro* de *Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Tzvelev cv. amarelo.** 1996. 90p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Campinas, 1996.

MARQUES, S. V.; MARQUES, R. V.; FIGUEIRA, E. R.; JACINTO, A. C. B.; SECUNDINO, R. R.; LONDE, L. N.; LUZ, J. M. Q. Efeito dos reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ na indução de calos em anteras de cafeeiro *Coffea arabica*. In: SEMANA ACADÊMICA, 1., 2004, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: UFU-ICIAG, 2004.

MARTINEZ, C. P.; PULVER, E.; NUNEZ, V. M. Uso del cultivo de tejidos en el mejoramiento del arroz. In: EVALUACION COOPERATIVA DEL GERMOPLASMA DE ARROZ EN AMÉRICA LATINA, 1989, Cali. **Proceedings...** Cali: CIAT, 1989. p.105-125.

MARTINOTTO, C.; PAIVA, R.; SANTOS, B. R.; LIMA, E. C.; NICIOLI, P. M.; PAIVA, L. V. Indução de calos friáveis em explantes foliares de dedaleira (*Lafoensia pacari* St. Hil.) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS 14., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. *Anais...* Lavras: UFLA, 2003. p. 219.

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

MATIELLO, J. B. Conab já definiu áreas para mapeamento. 2004. Disponível em: <<http://www.coffeefreak.com.br/-ocafezal>>. Acesso em: 15 out. 2004.

MELO, B. de; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira [*Syagrus Oleracea* (Mart.) Becc.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, nov./dez. 2001.

MENDES, A. N. G. Métodos de melhoramento empregados na cultura do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 1999, Lavras. *Anais...* Lavras: UFLA, 1999. p.18-35.

MONACO, L. C.; SÖNDAHL, M. R.; CARVALHO, A. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: [s.n.], 1977. p. 109- 126.

MORAES FERNANDES, M. I. B. de. Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA/CNPq, 1990. p.311-332.

MORALES, C. F. G.; LOMBARDI, S. R. B.; SOARES, P. F.; FORTES, G. R. de L. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5 n. 3, p. 174-177, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, p. 135-166, 1974.

MUSTAFA, P. C. V. **Indução de calos em anteras de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2003. 46p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

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., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 227.

NERVO, G.; CARANNANTE, G.; AZZIMONTI, M. T.; ROTINO, G. L. Use of anther culture method in pepper breeding: factors affecting plantlet production. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 1994, Firenze. **Anais...** Firenze: IAPTC, 1994. v.8, p.92.

NITSCH, C. Progress in anther and pollen culture techniques. In: CELL AND TISSUE CULTURE TECHNIQUES FOR CEREAL CROP IMPROVEMENT, 1983, Manila. **Proceedings...** Manila: Institute of Genetics, Academia Sinica and the International Rice Research Institute, 1983. p.1-10.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; SANTOS, B. R.; SILVA, D. P. C. da.; SOARES, F. P.; ALBERT, L. H. de B.; PAIVA, P. D. de O. Efeito de thidiazuron (TDZ) na indução de brotações a partir de segmentos nodais de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 324.

NORIEGA, C.; SONDAHL, M. R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 15., 1993, Montpellier. **Proceedings...** Montpellier: Paris- ASIC, 1993. p. 73-81.

- OCKENDON, D. J.; McCLENAGHAN, R. Effect of silver nitrate and 2,4-D on anther culture of brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. gemnifera). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v. 32, p. 41-46, 1993.
- OLIVEIRA, M. M. D. de. **Otimização de condições para indução de calos e regeneração de plantas em *Brassica oleracea* L.** 1997. 90p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 1997.
- PALÚ, E. G. **Indução *in vitro* de calogênese em anteras e brotações em segmentos nodais de *Coffea arabica* L.** 2002. 47 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.
- PARANHOS, T. J.; PERRANDO, E.; FRANCO, H. E. T.; AITA, A. Regeneração *in vitro* das cultivares de tomate Empine e Monte Carlo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 203-207, 1996.
- PASQUAL, M. Obtenção de plantas por cultura de tecidos. **Informe Agropecuário**, Brasília, v. 11, n. 124, p. 63-68, 1985.
- PASQUAL, M.; BARROS, I. de. Efeito de benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na proliferação e alongação de brotações micropropagadas em *Coffea arabica* L. *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 201-204, fev. 1991.
- PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. R. de.; CAMPOS, K. P. de.; SANTOS, E. C.; CAMPOS, R. J. C. de. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica* L.) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 71-76, jan./fev. 2002.
- PETERS, J. A.; BOBROWSKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. Produção de haplóides e duplo haplóides. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, 1999, v. 2, p. 596-611.
- PIERSON, E. S.; VAN LAMMENRN, A.; SCHEL, J. H.; STARITSKY, G. *In vitro* development of embryoids from punched leaf disc of *Coffea canephora*. **Protoplasma**, Viena, v. 115, n. 2/3, p. 208-216, 1983.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F.; PIEROZZI, N. I. Citogenética de *Coffea*. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 1999, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1999. p.1-10.

PIOUS, T.; RAVINDRA, M. B. Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factors, season and descontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. **The Journal of Horticultural Science**, London, v. 72, n. 5, p. 713-722, 1997.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D. G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Reporter**, Florida, v. 2, p. 36-39, Dec., 1983.

PREECE, F. E.; COMPTON, M. E. I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: 17 - High-Tech and micropropagation I**. Berlin: Springer Verlag, 1991. p.168-189.

RAMALHO, M. A. P. **Genética: seleção recorrente no melhoramento do cafeeiro**. 1999. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/-ocafezal>>. Acesso em: 10 nov. 2004.

RÊGO, M. M. Indução *in vitro* de haplóides de maracujazeiro (*Passiflora edulis* F. flavicarpa) a partir de óvulos não-fertilizados. 2004. Disponível em: <<http://www.ufv.htm>>. Acesso em 15 maio. 2004.

RENA, A. B., NACIF, A. de P. Programa Brasileiro de Biotecnologia aplicada ao Cafeeiro. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/IRD, 1999. p. 43-46.

REYNOLDS, T. L. Ultrastructure of pollen embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: haploids in crop improvement**. Berlin: Spring-Verlag, 1990. v. 12, p. 67-82.

RIBEIRO, A. O. **Definição de meio de cultura para morfogênese indireta em alface variedades Verônica e Maioba**. 1999. 39p. Monografia (Especialização em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1999.

RÍHOVÁ, L.; TUPÝ, J. Manipulation of division symmetry and developmental fate in cultures of potato microspore. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 59, p. 135-145, 1999.

ROCHA, A. M. M. R. **Capacidade de regeneração *in vitro* de cotilédones de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) o clone CP 76**. 1998. 54 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

- SALOMON, M. V.; CAMARGO, C. E. O. de.; FERREIRA FILHO, A. W. P.; PETTINELLI JÚNIOR, A.; CASTRO, J. L. de. Desempenho de linhagens diaplóides de trigo obtidas via cultura de anteras quanto à tolerância ao alumínio, produção de grãos e altura de planta. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 189-198, 2003.
- SANT'ANA, E. P.; FREIRE, A. B. de.; DIAS, M. D. Variação somaclonal em algumas características do grão e do ciclo da planta de arroz (*Oryza sativa* L.) **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 336-345, mar./abr. 2001.
- SANTOS, E. K. **Androgênese em cultivares brasileiras de *Glycine max* L. Merrill**. 1999. 96p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 1999.
- SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M. de.; MARTINOTTO, C.; GOMES, G. A. C.; NOGUEIRA, R. C. Efeito da ausência e presença de luz na indução de calogênese *in vitro* em explantes foliares de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 304.
- SENARATNA, T.; TOUCHELL, D.; BUNN, E.; DIXON, K. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 30, p. 157-161, 2000.
- SHAN, X.; LI, D.; QU, R. Thidiazuron promotes *in vitro* regeneration of wheat and barley. **In Vitro Cellular and Development Biology Plant**, Columbia, v. 36, p. 207-210, May/June 2000.
- SHARP, W. R.; CALDAS, L. S.; CRÓCOMO, O. J.; MÔNACO, L. C.; CARVALHO, A. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. **Phyton**, Buenos Aires, v. 31, p. 67-74, 1973.
- SILVA, A. L. S. da.; MORAES FERNANDES, M. I. B. de.; ARIAS, G.; FERREIRA, A. G.; HAAS, J. C. Production of androgenetic barley doubled haploid lines. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 11. p. 1159-1166, Nov. 1997.
- SILVA, H. E. **Efeito do genótipo e de reguladores de crescimento na expressão androgenética da soja**. 2002. 60p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

SILVA, A. S. 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. 2003. 15p. Monografia (Especialização em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

SILVA, A. S.; SOUZA, G. F. M. V.; LUZ, J. M. Q.; SANTANA, D. G.; MUSTAFA, P. C. V.; FIGUEIRA, E. R.; LONDE, L. N. Estudo do comportamento de *Coffea arabica* L. em cultura de anteras *in vitro* na indução e regeneração de calos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. *Anais...* Lavras: UFLA, 2003. p. 215.

SILVA, A. S.; LUZ, J. M. Q.; FIGUEIRA, E. R.; LONDE, L. N.; SANTANA, D. G.; MUSTAFÁ, P. C. V.; PASQUAL, M. Relação entre os estádios de desenvolvimento dos micrósporos e as características morfológicas do botão floral para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Revista Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 20, n. 1, p. 41-46, jan./abr., 2004.

SONDAHL, M. R.; SHARP, W. R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, Zurich, v. 81, n. 4, p. 395-408, 1977.

SONDAHL, M. R.; SALYSBURY, J. L.; SHARP, W. R. Sem characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, Zurich, v. 94, n. 4, p. 185-188, 1979.

SONDAHL, M. R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W. R. Propagation of coffee. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. P.; HOLLAENDER, A. (Ed.). *Tissue culture in forestry and agriculture*. New York: Plenum, 1985. p. 215-232.

SRANGSAM, A.; KANCHANAPOOM, K. Thidiazuron induced plant regeneration in callus culture of triploid banana (*Musa* sp.) 'Gros Michel', AAA group. *Songklanakarin Journal of Science Technology*, Thailand, v.25, n. 6, p. 689-696, nov./dec. 2003.

STARITSKY, G. Embryoid formation in callus cultures of coffee. *Acta Botanica*, Netherlands, v. 19, n. 4, p. 509-514, 1970.

- SUDRIPTA, D. A. S. In vitro propagation of cashewnut. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.15, p.615-619, 1996.
- SUNDERLAND, N.; DUNWELL, J. M. Anther and pollen culture. In: STREET, (Ed.). **Plant Tissue and Cell Culture**. Berkeley: University of California Press, 1977. p. 223-265.
- TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia. **Palestra...** Goiânia: REDBIO, 2001. p. 110-113.
- TEIXEIRA, P. T.; SANTARÉM, E. R. Efeito de reguladores de crescimento na indução de brotos adventícios de crisântemo (*Chrysanthemum coronarium*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 354.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, 1998, v.1, 509 p.
- TOURAEV, A.; VICENTE, O.; HEBERLE-BORS, E. Initiation of microspore embryogenesis by stress. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 8, p. 297-302, 1997.
- UTINO, S.; CARNEIRO, I. F.; CHAVES, L. J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (*Musa AAB*) *in vitro*: concentrações de sais, ácidos ascórbicos e frequência de subcultivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 409-412, ago. 2001.
- VASIL, I. K.; AHUJA, M. R.; VASIL, V. Plant Tissue Culture in genetics and plant breeding. **Advance Genetics**, New York, v. 20, p. 127-215, 1979.
- VIEIRA, L. G. E.; COLOMBO, C.; ANDRADE, A. C. Projeto genoma café. 2004. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br>>. Acesso em: 10 Nov. 2004.
- VISSER, C.; QURESHI, J. A.; RAVINDER, G.; SAXENA, P. K. Morphoregulatory role of Thidiazuron. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 99, p. 1704-1707, 1992.



WANG, P. J.; HUANG, L. C. Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ cultures. **In Vitro**, New York, v. 12, p. 260-262, 1976.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, London, v. 57, p. 443-462, 1986.

YASUDA, T.; TAHARA, M.; HATANAKA, T.; NISHIBATA, T.; YAMAGUCHI, T. Clonal propagation through somatic embryogenesis of *Coffea* species. In: COLLOQUE DE L'ASSOCIATION SCIENTIFIQUE INTERNATIONALE DU CAFÉ, 16., 1995, Kyoto. **Proceedings...** Kyoto: ASIC, 1995. v. 2, p. 537-541.

ZAMAARRIPA, A.; DUCOS, J. P.; BOLLON, H.; DUFOUR, M.; PETIARD, V. Production d'embryons somatiques de cafeier em milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. **Café Cacao Thé**, Paris, v. 35, n. 4, p. 233-244, 1991.

FU00034908-2