

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

**INDUÇÃO DE CALOS E PRÓ-EMBRIÓIDES EM ANTERAS DE *Coffea arabica* L.
EM FUNÇÃO DO 2,4 – D E DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO**

ROBERTA REZENDE SECUNDINO

JOSÉ MAGNO QUEIROZ LUZ
(Orientador)

Monografia apresentada ao Curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

**Uberlândia – MG
Março – 2006**

**INDUÇÃO DE CALOS E PRÓ-EMBRIÓIDES EM ANTERAS DE *Coffea arabica* L.
EM FUNÇÃO DO 2,4 - D E DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO**

APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA EM 08 / 03 / 2006.

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz
(Orientador)

MSc. Luciana Nogueira Londe
(Membro da Banca)

Dra. Tatiana Michlovska Rodrigues
(Membro da Banca)

Uberlândia – MG

Março – 2006

ÍNDICE

| | |
|--------------------------------------------|-----------|
| 1 - INTRODUÇÃO..... | 04 |
| 2 - REVISÃO DE LITERATURA..... | 06 |
| 3 - MATERIAL E MÉTODOS..... | 12 |
| 3.1 - Análises estatísticas..... | 13 |
| 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 15 |
| 4.1 - Oxidação..... | 16 |
| 4.2 - Intumescimento..... | 18 |
| 4.3 - Calosidade..... | 20 |
| 4.4 - Pró-embrióides..... | 23 |
| 5 – CONCLUSÕES..... | 25 |
| 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 26 |

RESUMO

O café é um dos mais importantes produtos do mercado internacional. Descreve importante papel no âmbito econômico e social. Os programas de melhoramento genético do cafeeiro têm alcançado sucesso na obtenção de cultivares mais produtivas. Porém, o tempo gasto e a extensão da área experimental necessária são fatores limitantes para o melhoramento do cafeeiro por métodos convencionais. Como alternativa surge a multiplicação vegetativa *in vitro*, onde a cultura de anteras é uma ferramenta útil nos programas de melhoramento, reduzindo o tempo necessário para obtenção de linhagens homozigóticas. Assim, o conhecimento sobre reguladores de crescimento torna-se imprescindível para a evolução da genética no melhoramento de grandes culturas. Buscando acrescentar informações sobre os efeitos dos reguladores de crescimento, foi instalado e conduzido no Laboratório de Biotecnologia/Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Uberlândia um experimento com anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L. da cultivar Mundo Novo e Catuaí Vermelho 44 inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 2,0 mgL⁻¹ de 2,4-D e AAS nas concentrações de 0,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0 mgL⁻¹ em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições por tratamento. Foram realizadas avaliações aos 30, 60 e 90 dias para oxidação, intumescimento e calosidade e aos 120 dias para pró-embrióides. Para a variável calosidade não houve diferença significativa entre os cultivares e tanto para Mundo Novo quanto para Catuaí Vermelho 44 o aumento das concentrações de AAS diminuiu a formação de pró-embrióides nos calos.

1 – INTRODUÇÃO

Pertencente à família *Rubiaceae*, o café representa um dos mais importantes produtos do mercado internacional, descreve importante papel no âmbito econômico, representa fonte de renda para milhões de pessoas em mais de 50 países e, ainda, apresenta relevante importância social como atividade geradora de empregos e fixadora de mão-de-obra no campo.

No início dos estudos genéticos do gênero *Coffea* tomou-se como padrão a espécie *Coffea arabica*, que é considerada uma espécie nobre, com café de boa qualidade, apresentando mais de 40 mutantes e muitas variedades. É uma espécie tetraplóide, autofértil, possuindo de 10 a 12% de fecundação cruzada.

Os programas de melhoramento genético do cafeeiro têm alcançado sucesso na obtenção de cultivares mais produtivas, realizando-se hibridações, seguidas de seleção de populações segregantes pelo método genealógico para obtenção de linhagens. No entanto, o tempo gasto é um fator limitante para o melhoramento do cafeeiro por métodos convencionais, por se tratar de uma cultura perene propagada via semente, os programas de melhoramento demandam aproximadamente 30 anos desde a hibridação até a obtenção de uma nova variedade. Nos últimos anos surgiram novos problemas

como doenças, pragas, nematóides e maior exigência em qualidade pelo mercado consumidor havendo necessidade de se obter métodos mais eficazes e rápidos na seleção de cultivares.

Como alternativa viável surge a multiplicação vegetativa *in vitro*. Entre as técnicas de cultivo *in vitro*, a cultura de anteras é uma ferramenta útil nos programas de melhoramento, com redução do tempo necessário para a obtenção de linhagens homozigóticas, substituindo as inúmeras gerações de autofecundação necessárias no processo convencional, permitindo o estudo de mutações recessivas, devido ao fato de que indivíduos haplóides não apresentam problemas de dominância e recessividade por possuir apenas um alelo em cada loco gênico.

O presente trabalho integra uma linha de pesquisa de apoio ao melhoramento do cafeeiro *Coffea arabica*, com aplicação da técnica de culturas de anteras em meio de cultura para obtenção de plantas haplóides, com o objetivo de avaliar o efeito do regulador de crescimento 2,4 – diclorofenoxiacético (2,4-D) e do Ácido Acetilsalicílico (AAS) na indução de respostas morfogênicas em anteras de cafeeiro.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Coffea* abrange aproximadamente 60 espécies. Do ponto de vista comercial, somente duas espécies são cultivadas extensivamente: *Coffea arabica* L. (Arábica) e *Coffea canephora* Pierre (Robusta), sendo o tipo arábica responsável por cerca de 75% dos plantios comerciais de cafeeiro do mundo (FIGUEIRA, 2005).

Originária da Etiópia, a espécie *Coffea arabica* L. foi introduzida no Brasil em 1727 pelo Sargento Francisco de Mello Palheta, na cidade de Belém do Pará e se dispersou pelos Estados do Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, chegando ao Vale do Paraíba, Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná, Mato Grosso e Rondônia (ANDRADE, 1998).

Movimentando algo em torno de US\$ 4,5 bilhões e gerando mais de 8,5 milhões de empregos diretos e indiretos, o agronegócio café no Brasil tem indiscutível importância econômica e social. O Brasil, por sua vez, por ser o maior produtor e exportador de café do mundo e o segundo maior mercado consumidor, tem importante peso na política e na economia cafeeira internacional, pois além de ser exemplo de produção sustentável que respeita o meio ambiente, remunera o cafeicultor com uma das mais altas taxas do mercado (<http://www.cecafe.com.br/coffeedinner/>).

Segundo Fazuoli (1986) e Carvalho (1993), no início dos estudos genéticos do gênero *Coffea*, tomou-se como padrão a espécie *Coffea arabica* L., anteriormente denominada *Coffea arabica* var. *typica*, descrita por Linneu.

É uma espécie que apresenta raiz pivotante profunda, caule único com ramos ortotrópicos, os quais podem originar as folhas e os ramos plagiotrópicos, que por sua vez dão origem às folhas e aos botões florais. Os frutos quando maduros são drupas de coloração amarelada ou avermelhada (GRANER; GODOY JÚNIOR, 1967). As folhas são de coloração verde escura, elípticas e lanceoladas e apresenta inflorescências com duas a seis flores, formando glomérulos. Cada flor apresenta um pedúnculo, que em sua extremidade abriga o ovário, e sobre o qual estão inseridos os verticilos férteis (estames e pistilos) e estéreis (cálice e a corola) (CARDOSO, 1994).

Os programas de melhoramento genético do cafeeiro, empregando os métodos convencionais de multiplicação, principalmente hibridação, seguida de seleções de populações com avaliações de progênies, retrocruzamento e cruzamentos interespecíficos podem levar mais de 30 anos para produzir uma nova cultivar. Devido ao cafeeiro ser uma espécie perene, de ciclo longo e porte arbustivo, as práticas de melhoramento genético são dificultadas principalmente pelo tempo e pela extensão da área experimental necessários ao desenvolvimento das variedades (ALMEIDA et al., 2000).

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica que visa minimizar os problemas de tempo e espaço no melhoramento do cafeeiro. 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).

Uma possibilidade para ganho de tempo no melhoramento do cafeeiro é a produção de haplóides que pode ser obtida através de diferentes técnicas como androgênese, ginogênese, tratamento químico, choques térmicos e irradiação com raios X ou luz ultravioleta, e ainda através de técnicas *in vitro* como cultura de pólen isolado, protoplastos, eliminação de cromossomos pela cultura de embriões jovens e partenogênese.

A obtenção de plantas haplóides é de grande interesse devido a sua aplicabilidade nos estudos de genética básica e aplicada, uma vez que os genes se expressam livres do fenômeno de dominância, permitindo que os genes recessivos possam ser estudados mais facilmente (ARAÚJO, 2004).

Atualmente, a técnica mais utilizada é a cultura de anteras, pois nestas, os grãos de pólen estão em grande quantidade, e podem desenvolver-se em haplóides por androgênese direta originando embriões, ou androgênese indireta, passando pela fase de calos (FERNANDES, 1990).

A técnica de culturas de anteras pode facilitar e adiantar o melhoramento genético das culturas, pois permite a obtenção de plantas haplóides em gerações segregantes, o que leva à rápida produção de plantas homozigóticas através da duplicação do número de cromossomos em uma única etapa, substituindo assim as várias gerações de autofecundação (FIGUEIRA, 2005).

No Brasil, trabalhos de cultura de anteras de *Coffea arabica* já reúnem os primeiros resultados. Inicialmente ocorreu a determinação do estágio ideal de desenvolvimento do micrósporo, em que se constatou para diferentes cultivares de *Coffea arabica* que botões com tamanho de 4,5 a 5,5 mm correspondem a anteras

contendo micrósporos uninucleados que são os que possuem maior probabilidade de regeneração em plantas haplóides (ANDRADE, 1998; SILVA et al., 2004).

A indução e regeneração de embriões são determinadas pela composição do meio de cultura e pelos reguladores de crescimento contidos no mesmo (FERNANDES, 1990). Os reguladores de crescimento são substâncias orgânicas que atuam sobre o crescimento e sobre alguns tipos de organogênese, regulando ainda, o comportamento *in vitro* da planta (RIBEIRO, 1999), sendo indispensáveis em qualquer técnica de cultura de tecidos.

As auxinas e as citocininas representam os dois principais grupos de reguladores. As auxinas são responsáveis pelo crescimento vegetal, (podem também inibir o crescimento, dependendo da concentração na qual aparecem no vegetal) e ainda podem ser responsáveis pela abscisão das folhas e pela formação dos frutos. As citocininas são reguladores vegetais que participam ativamente dos processos de divisão e diferenciação celular, sendo a 6-benzilaminopurina (BAP) umas das mais utilizadas (<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGrad/Hormonios.html>).

Dentre as auxinas tem-se o Ácido indol – 3 – butírico (AIB) e o Ácido 2,4 – diclorofenoxiacético (2,4-D). Estas são aplicadas na fase de estabelecimento da cultura para suprir os teores endógenos dos explantes (ANDRADE, 1998).

As auxinas promovem a produção de etileno antes mesmo de seus efeitos aparecerem; baixas concentrações de etileno diminuem a ação das auxinas e altas taxas tornam a auxina sem efeito. Esta relação pode ocorrer em função do CO₂, que sendo um inibidor de etileno, reverteria a auxina e esta conseqüentemente não produziria este gás. As giberelinas diminuem a produção de etileno, ao contrário das citocininas que

umentam a produção, mas com menor efeito quando comparado com as auxinas (LUZ, 1995).

Trabalhos utilizando outras substâncias como o ácido acetilsalicílico (AAS) mostraram a sua importância na resposta biológica de plantas, sendo que o efeito na sua fisiologia é variável, podendo promover alguns processos e inibir outros (GUTIÉRREZ-CORONADO et al., 1998). Está envolvido ainda na resposta a estresses bióticos e abióticos (DE BLOCK; DE BROUWER, 2002), na habilidade de indução de resistência à patógenos (SENARATNA et al., 2000) e quando adicionado ao meio de cultivo, também pode promover a embriogênese (LUZ et al., 1997).

Araújo (2004) analisando a calogênese em anteras oriundas de uma população segregante F2 de *Coffea arabica* L., concluiu que a presença de fungicida e bactericida adicionado ao meio de cultura reduz consideravelmente a contaminação causada por microorganismos. O mesmo trabalho verificou que a combinação entre 2,4-D e cinetina favorece a indução de calos primários, onde a combinação de concentrações de 8 mg L⁻¹ cinetina e AIB a 1 mg L⁻¹ atua favoravelmente na indução de calos.

Araújo et al. (2003a) obtiveram respostas de calogênese em anteras de *Coffea arabica* cv. Acaíá Cerrado, utilizando o meio básico MS acrescido de 2,0 mgL⁻¹ de 2,4-D combinados com 2,0 mgL⁻¹ de cinetina. Resultados promissores também foram obtidos pelos mesmos autores, quando adicionaram ao meio MS 1,0 mgL⁻¹ de 2,4-D juntamente com 1,0 mgL⁻¹ AIB. Entretanto, Araújo et al. (2003b), verificando calogênese em *Coffea arabica* cv. Rubi, constataram interação significativa entre 2,4-D e cinetina para porcentagem de indução de calos e massa fresca, observando que as melhores respostas foram obtidas quando empregaram 2,0 mgL⁻¹ de 2,4-D e 4,0 mgL⁻¹ de cinetina. Pelos resultados obtidos para calogênese em anteras de cafeeiro,

independente do material genético, puderam concluir que é necessária uma auxina juntamente com uma citocinina e, comparados à cultivar Acaia Cerrado, os materiais respondem de forma diferente às concentrações dos reguladores de crescimento.

Em outro trabalho com *Coffea arabica*, porém com a cultivar Catuaí Vermelho 99, os resultados mostraram que para ocorrer intumescimento das anteras, formação e aumento do tamanho dos calos de ambas as cultivares é necessário que haja interação entre a auxina (2,4-D) e a citocinina (BAP). Além disso, a incubação no escuro promoveu uma diminuição das anteras oxidadas (SILVA et. al, 2003). Marques et al. (2004), trabalhando com diferentes concentrações de 2,4-D e TDZ, observaram que tais reguladores induziram a formação de calos em anteras de cafeeiro do cultivar Catuaí Vermelho 44, porém os dados obtidos não são estatisticamente diferentes.

Figueira (2005) observou que o 2,4-D na concentração de $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ é eficiente na indução de calos, não promovendo, porém a regeneração dos mesmos.

Estes últimos trabalhos mostram já a possibilidade da calogênese em diferentes variedades de *Coffea arabica* L., no entanto, sem ter até o momento, a indução e regeneração de embriões somáticos. Neste caso, é evidente que são necessários mais estudos dos fatores que possam influenciar a resposta das anteras cultivadas com relação a embriogênese somática.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado e conduzido no laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, no período de agosto de 2004 a fevereiro de 2005. Foram utilizadas duas cultivares da espécie *Coffea arabica* L.: Mundo Novo LCP-379-19 e Catuaí Vermelho H2077-2-5-44, plantados na área experimental do Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia.

Os botões florais foram coletados pela manhã, com tamanho de 4,5 a 5,5 mm, correspondente ao tamanho de anteras contendo micrósporos uninucleados, os quais foram colocados em placas de Petri com papéis de filtro, previamente autoclavados e umedecidos.

A desinfestação externa consistiu em envolver os botões em gaze, os quais ficaram por 1 segundo em álcool 70% e, posteriormente, sob agitação por 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio 1%. Posteriormente as anteras foram levadas à câmara de fluxo e submetidas à lavagem em água destilada autoclavada por três vezes consecutivas e posterior inoculação. As anteras foram retiradas sob estereomicroscópio com auxílio de pinça e bisturi, também autoclavados.

Para proceder a desinfestação as anteras foram banhadas em ácido ascórbico 600 mgL⁻¹, hipoclorito de sódio a 0,2% e água destilada e autoclavada. Após a desinfestação, as anteras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com pH ajustado em 5,9, suplementado com 2,0 mgL⁻¹ de 2,4-D e AAS nas concentrações de 0,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0 mgL⁻¹, respectivamente, nos tratamentos de 1 a 5. O AAS foi obtido por meio de solução de aspirina, contendo 325 mg de AAS em 200 mL de água. Foram realizadas avaliações de anteras intumescidas, oxidadas e com calosidade aos 30, 60 e 90 dias e aos 120 dias uma última avaliação de calos com presença de pró-embrióides. O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições, em parcelas constituídas de 3 tubos, com 5 explante por tubo. Os tubos de ensaio foram levados à câmara de crescimento, envolvidos por um saco plástico preto, uma vez que o experimento foi realizado no escuro.

Os tubos e os meios foram previamente esterilizados em autoclave vertical (FANEM) à temperatura de 121°C, sob a pressão de 1 atm por 20 minutos e a transferência dos explantes foi feita em câmara de fluxo laminar. Após a inoculação os explantes foram colocados em câmara de crescimento com temperatura de 25°C ± 1.

3.1 - Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização do programa SANEST, com aplicação do teste de F a 5% de probabilidade, sendo transformados em $\sqrt{x + 1/2}$, onde x = média das variáveis analisadas. As características

qualitativas foram analisadas pelo teste de Tukey a 5% e as características quantitativas por regressão polinomial.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 30, 60 e 90 dias do estabelecimento, *in vitro*, dos explantes, avaliou-se a oxidação, intumescimento e calosidade das anteras. Aos 120 dias foi avaliada a presença de pró-embriões nos calos que restaram das três primeiras avaliações.

O resumo do quadro de análise de variância das características avaliadas aos 30, 60 e 90 dias está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Resumo das análises de variância do número médio de anteras oxidadas (OXID.), intumescidas (INTUM.) e com calosidade (CALOS.), dos cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho 44, inoculadas em meio de cultura “MS” sob ação de 2,4 – diclorofenoxiacético (2,4-D) e concentrações de ácido acetilsalisílico (AAS) aos 30, 60 e 90 dias. UFU/Uberlândia-MG, 2005. AVA = Avaliações 30,60 e 90 dias.

| Causas Da Variação | GL | QUADRADOS MÉDIOS | | |
|-----------------------|-----|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | OXID. | INTUM. | CALOS. |
| AVALIAÇÃO | 2 | 1,3417* | 0,6872* | 0,3250 ^{ns} |
| CULTIVAR | 1 | 0,3944* | 1,5571* | 0,0860 ^{ns} |
| AAS | 4 | 0,0602 ^{ns} | 0,2825* | 0,8002* |
| AVA*CUL | 2 | 0,1613* | 0,2719* | 0,0301 ^{ns} |
| AVA*AAS | 8 | 0,0660 ^{ns} | 0,0236* | 0,0419 ^{ns} |
| CUL*AAS | 4 | 0,0673 ^{ns} | 0,2106 ^{ns} | 0,7338* |
| AVA*CUL*AAS | 8 | 0,0777 ^{ns} | 0,0284* | 0,0247 ^{ns} |
| RESIDUO | 90 | 0,0389 | 0,0682 | 0,1360 |
| TOTAL | 119 | 2,1835 | 2,0507 | 1,6791 |

ns = não significativo pelo teste F ($p < 0,05$);

* = significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

FV = Fonte de variação

G.L = Grau de liberdade

4.1 – Oxidação

A análise de variância dos dados obtidos para a oxidação registrou que a oxidação dos explantes foi significativamente influenciada pelo tempo de permanência no meio de cultura.

Comparando os cultivares, observou-se uma pequena diferença entre o número de anteras oxidadas, aos 90 dias de estabelecimento *in vitro*, porém, foi maior no cultivar Mundo Novo (4,95) em relação ao Catuaí Vermelho 44 (4,91). No entanto, aos 30 dias o cultivar Mundo Novo obteve menor oxidação (2,94) em relação ao Catuaí (3,91). Esses dados sugerem que o tempo de permanência no meio indutor influenciou a oxidação das anteras de café (Tabela 2).

Tabela 2: Média de anteras oxidadas dos cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho 44 em função das avaliações realizadas aos 30, 60 e 90 dias. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

| AVALIAÇÕES (dias) | MÉDIAS | |
|----------------------|------------|--------------------|
| | MUNDO NOVO | CATUAÍ VERMELHO 44 |
| 30 | 2,946 c | 3,913 b |
| 60 | 4,278 b | 4,768 a |
| 90 | 4,957 a | 4,912 a |

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

Figueira (2005), trabalhando com os mesmos cultivares, observou que aos 60 dias de avaliação todas as anteras se mostraram oxidadas, mesmo tendo permanecido no escuro, confirmando a hipótese de quanto maior o tempo de permanência no meio, maior a oxidação dos explantes.

Giri et al. (1993) trabalhando com *Aconitum heterophyllum* Wall. afirmaram que a presença de 2,4 – D no meio de cultura está associado a uma maior oxidação do tecido vegetal. Experimentos de Figueira et al. (2002) mostraram que mesmo em doses menores de 2,4 – D em subcultivo de anteras ocorreu 100% de oxidação das mesmas.

Em outro trabalho com a cultivar Catuaí Vermelho 44, Silva (2003) também observou um alto índice de oxidação, o qual atingiu o valor de 93%, entretanto utilizou apenas os reguladores de crescimento cinetina, TDZ e BAP.

Londe (2005) trabalhando com cotilédones de cajuí (*Anacardium humile st. Hill*) verificou aos 30 dias que a oxidação dos explantes foi maior quando se adicionou 5,0 mgL⁻¹ de BAP em meio isento de 2,4 – D e que para as concentrações de 1,0 mgL⁻¹ de 2,4 – D e 1,0 mgL⁻¹ de BAP, a oxidação foi menor. Aos 45 dias, verificou aumento da média de oxidação, sendo que a concentração que proporcionou maior oxidação foi a de

1,0 mgL⁻¹ de 2,4 – D sem citocinina no meio de cultura. Contudo, a concentração de 1,0 mgL⁻¹ de BAP em combinação com 1,0 mgL⁻¹ de 2,4 – D proporcionou a menor taxa de oxidação de explantes.

A utilização de polivinilpirrolidona (PVP) como antioxidante para prevenção de compostos fenólicos foi testada por Pasqual et al., (2002) em anteras de *Coffea arabica* L., e verificaram que na dosagem de 200 mgL⁻¹ houve menor oxidação das anteras e em dosagens superiores o PVP causou danos aos explantes. Larson (1988) cita que considera o ácido ascórbico provavelmente mais eficiente como antioxidante que o PVP para a cultura de *A. humile*, eficiência que está relacionada por ser um antioxidante biológico e ainda por estar presente, em altas concentrações, em muitos compartimentos celulares, como o estroma dos cloroplastos.

Melo et al., (2001) concluíram que a utilização de antioxidantes no controle da oxidação de embriões de guarirobeira é essencialmente importante, uma vez que se obteve 3,37% de explantes oxidados quando se adicionou o ácido ascórbico ao meio. A adição de PVP, nesse mesmo experimento apresentou maiores índices de oxidação de embriões (22,25%).

4.2 – Intumescimento

A análise de variância (Tabela 1) dos dados obtidos para o intumescimento das anteras, registrou que o número de anteras intumescidas foi significativamente influenciado tanto pelos dias de avaliação quanto pela combinação de 2,4 – D e as diferentes doses de AAS.

O cultivar Mundo Novo foi o que apresentou os maiores índices de intumescimento de anteras, sendo que o maior valor foi obtido aos 90 dias não diferindo

estatisticamente da avaliação aos 30 dias e o menor valor de anteras intumescidas foi obtido aos 60 dias de avaliação. Já o cultivar Catuaí Vermelho 44 apresentou maior média de anteras intumescidas aos 30 dias e a menor aos 60 dias de avaliação, apesar de não diferir estatisticamente da média de anteras intumescidas aos 90 dias (Tabela 3).

Tabela 3: Média de anteras intumescidas dos cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho 44 em função das avaliações realizadas aos 30, 60 e 90 dias. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

| AVALIAÇÕES (dias) | MÉDIAS | |
|----------------------|------------|--------------------|
| | MUNDO NOVO | CATUAÍ VERMELHO 44 |
| 30 | 4,310 a | 3,736 a |
| 60 | 3,359 b | 2,864 b |
| 90 | 4,957 a | 3,178 ab |

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

Torres et al., (1998) cita que o regulador de crescimento 2,4 – D apresenta caráter indutor para o intumescimento e calosidade. No entanto, Londe (2005) verificou que em explantes de cajuí, o tratamento responsivo ao intumescimento do cotilédone foi a ausência de 2,4 – D e 10,0 mgL⁻¹ de BAP. A mesma autora cita que o intumescimento do cotilédone pode estar relacionado com a manutenção inicial dos mesmos no escuro.

Silva (2003) trabalhando com o cultivar Catuaí Vermelho 44 observou um maior índice de intumescimento, quando os explantes florais foram incubados no escuro.

Figueira (2005) verificou que o cultivar Catuaí Vermelho 99 obteve os maiores índices de anteras intumescidas, onde o número médio encontrado foi de 1,5021; 1,1020; 1,6249 respectivamente, aos 10, 20 e 30 dias em relação ao cultivar Mundo Novo, que apresentou 0,4012; 0,2652; 0,5379 como números médios de anteras intumescidas, respectivamente aos 10, 20 e 30 dias de cultivo.

De acordo com a Figura 1 observa-se que à medida que aumentaram as concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS), houve uma diminuição em média de 0,023 anteras intumescidas para o cultivar Catuaí Vermelho 44.

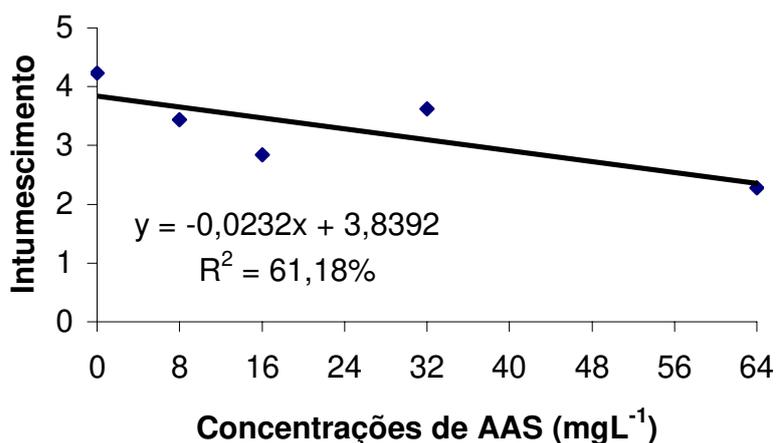


Figura 1: Número médio de anteras intumescidas do cultivar Catuaí Vermelho 44, em função das diferentes concentrações de AAS. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Resultados análogos foram obtidos por Figueira (2005) onde, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, o número médio de anteras intumescidas diminuiu à medida que aumentaram as doses de AAS e aos 60 dias houve interação entre as doses de AgNO₃ e AAS, sendo que na ausência de AgNO₃, o número médio de anteras intumescidas também decresceu com o aumento das doses de AAS.

4.3 – Calosidade

A análise de variância para formação de calos registrou que a indução de calos foi significativamente influenciada pela combinação de 2,4 – D com as diferentes concentrações de AAS.

A presença de ácido acetilsalicílico (AAS) nas concentrações utilizadas se mostrou prejudicial na formação de calosidade, uma vez que com o aumento das concentrações de AAS no meio de cultura, observou-se um decréscimo em média, de 0,04 calos formados em anteras do cultivar Catuaí Vermelho 44 (Figuras 2 e 3).

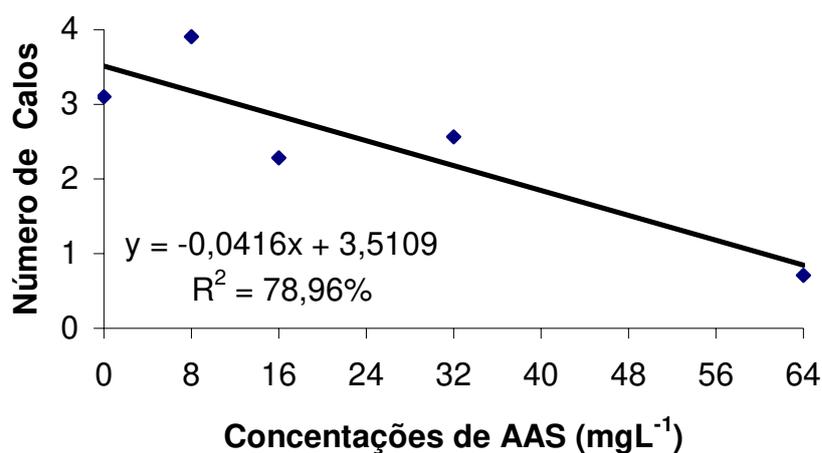


Figura 2: Número médio de anteras com calosidade do cultivar Catuaí Vermelho 44, em função das diferentes concentrações de AAS. UFU/Uberlândia-MG, 2005.



Figura 3: Calos formados na cultura de anteras de *Coffea arabica* para o cultivar Catuaí Vermelho 44 aos 90 dias de avaliação.

Para o cultivar Mundo Novo, os dados não foram significativos; as médias ajustadas pelas equações de regressão obtidas na análise de variância estão dispostas na Tabela 4. O maior número de anteras com calos foi observado quando da ausência de

AAS no meio de cultura e o menor valor foi obtido quando da presença de 64,0 mgL⁻¹ de AAS (Figura 4).

Tabela 4: Número médio de anteras com calosidade do cultivar Mundo Novo, em função das diferentes concentrações de AAS. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

| Níveis de AAS (mgL ⁻¹) | Anteras com calosidade |
|------------------------------------|------------------------|
| 0,0 | 1,749 |
| 8,0 | 1,735 |
| 16,0 | 1,720 |
| 32,0 | 1,691 |
| 64,0 | 1,632 |

Figura 4: Calos formados na cultura de anteras de *Coffea arabica* para o cultivar Mundo Novo aos 90 dias de avaliação.

Figueira (2005) analisando o efeito do subcultivo de calos em Catuaí Vermelho 44, em relação aos níveis de AgNO₃ e AAS não obteve resultados significativos. Entretanto, quando avaliou a influência do 2,4 – D, AgNO₃ e AAS na indução de calosidade em anteras de Mundo Novo e Catuaí Vermelho 44, concluiu que o número médio de anteras com calos foi maior no cultivar Mundo Novo, na ausência de AgNO₃. Em relação às doses de AAS obteve resultados semelhantes aos do presente trabalho, uma vez que houve decréscimo do número de calos formados com o aumento das doses de AAS.

Magalhães (2005) trabalhando com ápices caulinares de batata-doce, verificou que a maior produção de massa fresca de calo embriogênico foi obtida em meio com 2,0 mgL⁻¹ de 2,4 – D. A transferência dos calos embriogênicos para meio sem 2,4 – D favoreceu a maturação dos embriões somáticos.

A indução de formação de calosidade pode ter sido influenciada pela ausência de luz, fato também já proposto por Jaramillo e Summer (1991) e Nascimento et al., (2003) que trabalhando com indução de calos em carqueja obtiveram uma maior formação de calos em anteras mantidas no escuro. Ascanio e Arcia (1994) citam que as anteras devem ser mantidas no escuro para que ocorra o desenvolvimento de calosidade, e após sua formação, para o desenvolvimento do embrião, os calos devem ser mantidos no claro.

Em pesquisa com explantes foliares de pequi, para avaliação do efeito da luminosidade na indução de calogênese *in vitro*, Santos et al., (2003) verificou que o tratamento suplementado com 1,0 mgL⁻¹ de TDZ e 2,0 mgL⁻¹ de 2,4 – D, apresentou maior formação de calos, na ausência de luz.

4. 4 – Pró-embrióides

A avaliação de presença de pró-embrióides foi realizada aos 120 dias, nos tubos que restaram ao final das três avaliações (30, 60 e 90 dias) e que apresentavam calos friáveis. Dessa forma, os dados obtidos para essa variável não foram suficientes para gerar um quadro de análise de variância.

A formação de pró-embrióides foi influenciada pela combinação de 2,4 – D com as diferentes concentrações de AAS no meio de cultura, uma vez que à medida que

aumentam as concentrações de AAS, a presença de pró-embriões nos calos diminui, tanto para o cultivar Mundo Novo quanto para Catuaí Vermelho 44 (Tabela 5).

Tabela 5: Número de anteras com pró-embriões nos cultivares Catuaí Vermelho 44 e Mundo Novo, em função dos tratamentos avaliados. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

| Tratamentos | Tubos analisados | | Pró-embriões | |
|-------------|------------------|------------|--------------|------------|
| | Catuaí | Mundo Novo | Catuaí | Mundo Novo |
| T1 | 9 | 11 | 22 | 19 |
| T2 | 12 | 10 | 5 | 3 |
| T3 | 8 | 11 | 2 | 8 |
| T4 | 12 | 10 | 3 | 0 |
| T5 | 10 | 11 | 0 | 3 |

T1 = 2,0 mgL⁻¹ de 2,4 - D + 0,0 mgL⁻¹ de AAS;

T2 = 2,0 mgL⁻¹ de 2,4 - D + 8,00 mgL⁻¹ de AAS;

T3 = 2,0 mgL⁻¹ de 2,4 - D + 16,00 mgL⁻¹ de AAS;

T4 = 2,0 mgL⁻¹ de 2,4 - D + 32,00 mgL⁻¹ de AAS;

T5 = 2,0 mgL⁻¹ de 2,4 - D + 64,00 mgL⁻¹ de AAS.

Figueira (2005) trabalhando com os mesmos cultivares verificou que 19,8 % das anteras que formaram calosidade apresentavam pró-embriões, sendo 21,5 % pertencentes ao cultivar Mundo Novo e 17,6 % ao Catuaí Vermelho 44. A mesma autora observou que o número médio de anteras com pró-embriões diminui com o aumento das concentrações de AAS até o valor de 42,0 mgL⁻¹. A partir desse valor o número médio de anteras com pró-embriões tendeu a aumentar.

Luz et al., (1997) obtiveram resultados divergentes aos aqui encontrados, quando avaliaram a influência de AAS na androgênese de pimentão. As anteras foram inoculadas em meio C suplementado com AAS em concentrações idênticas ao do presente estudo e mantidas no escuro. Verificaram que a concentração de 16,0 mgL⁻¹ de AAS induziu melhor a embriogênese, e que concentrações maiores a necrose das anteras eram induzidas.

5 – CONCLUSÕES

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

- A oxidação das anteras foi influenciada pelo tempo de permanência no meio indutor, com maior média aos 90 dias para o cultivar Mundo Novo;
- O intumescimento das anteras foi influenciado tanto pelos dias de avaliação quanto pela concentração de AAS, com a maior média aos 90 dias para Mundo Novo;
- Para o cultivar Catuaí Vermelho 44 o tratamento com $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de 2,4-D e $0,0 \text{ mgL}^{-1}$ de AAS foi o que apresentou maior média de calos formados;
- Tanto para Mundo Novo quanto para Catuaí Vermelho 44 o aumento das concentrações de AAS diminuiu a formação de pró-embriões nos calos.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. A. S.; SIMIONI, K. C.; FAZUOLI, L. C.; RAMOS, L. C. S. Indução de calos de explantes foliares de genótipos de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas: EMBRAPA/CAFÉ, 2000. v. 1, p. 145-147.
- ANDRADE, L.M.C.O. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica*)**. 1998. 86f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.
- ARAÚJO, J. S. de; PALÚ, E. G.; REZENDE, J. C. de; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; LUZ, J. M. Q. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e cinetina na indução de calos em anteras de cafeeiro cultivar Rubi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 28., 2003, Caxambu. **Resumos...** Caxambu: EMBRAPA/CAFÉ, 2003a. p. 197.
- ARAÚJO, J. S. de.; RIBEIRO, B. de C.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de PASQUAL, M. Calogênese em anteras de cafeeiro ‘Rubi’ utilizando 2,4-D e cinetina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Resumos...** UFLA/FAEPE, 2003b.p. 123.
- ARAÚJO, J. S. **Calogênese em anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L.** 2004. 41p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- ASCANIO, E. C. E.; ARCIA, M. A. M. Efecto del estado de desarrollo de las anters y de un shock térmico sobre la androgénesis en *Coffea arabica* L. Var. Garnica. **Café Cacao Thé**, Paris, v. 28, n.2, p.75-79, avril./juin.1994.
- CARDOSO, A.P. S. **Café: cultura e tecnologia primária**. Brasília: Instituto de Investigação Tropical, Secretaria de Estado da Ciência e Tecnologia, Ministério do Planejamento da Administração do Território, 1994. 169 p.

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

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.

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 Fosfato, 1986. p. 87-113.

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

FIGUEIRA, E. R.; LUZ, J. M. Q. ; SILVA, A. S. ; LONDE, L. N. ; SANTANA, D. G. ; PASQUAL, M. . Efeito de pré-tratamentos em botões florais e influência do 2,4-D no cultivo *in vitro* de anteras de cafeeiro (*Coffea arabica* L). **Bioscience journal**, Uberlândia - MG, v. 19, n. 2, p. 49-55, 2003.

FIGUEIRA, E.R. **Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* L. em diferentes meio de cultura.** 2005. 87p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

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

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.

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

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.

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

LONDE, L. N. **Indução morfogênica de *Anacardium humile* St. Hill e análise da divergência genética entre populações.** 2005. 141p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Uberlândia, 2005.

- 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, 1995.
- LUZ, J.M.Q.; PINTO, J.E.B.P.; EHLERT, P.A.D.; 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.
- MAGALHÃES, J. S. Embriogênese somática de genótipos comerciais de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (Convolvulaceae). In: UNB/ EMBRAPA Hortaliças, p. 597, Brasília. **Anais...** Brasília, 2005.
- 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 ACADEMICA, 1., 2004, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: UFU-ICIAG, 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 de guaribeira [*Syagrus Oleraceae* (Mart.) Becc.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, nov./dez. 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**. v.15, p.473-479. 1962.
- NASCIMENTO, V.E.; SILVA, F.G.; PINTO, J.E.B.P.; SALES, J.F.; BERTOLUCCI, S.K.V. Efeito do explante, luz e fitorreguladores na indução de calos de carqueja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS 14 E CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS 1. 2003. Lavras. **Resumos...** Minas Gerais. SBPPO. 2003. p. 227.
- PASQUAL, M.; MACIEL, A.L. de R.; CAMPOS, K.P. de; SANTOS, E.C.; CAMPOS, R.J.C. de. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica*) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.1, p.71-76, 2002.
- RIBEIRO, A. O. **Definição de meio de cultura para morfogênese indireta em alfaca variedades Verônica e Maioba**. 1999. 39p. Monografia (Especialização em Biotecnologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 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 piquizeiro (*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.

SILVA, A. S.; LUZ, J. M. Q. ; FIGUEIRA, E.R. ; LONDE, L. N. ; SANTANA, D. G. ; MUSTAFA, P. ; PASQUAL, M. . Relação entre os estádios de desenvolvimento dos micrósporos e as características morfológicas do botão floral para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Bioscience journal**, Uberlândia - MG, v. 20, n. jan/apr, 2004.

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. **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. **Resumos...** UFLA/FAEPE, 2003. p. 114.

TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1998, V. 1, 509 p.

<<http://www.cecafe.com.br/coffeedinner/>> Acesso em: 05/12/2005

<<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGrad/Hormonios.html>> Acesso em: 14/03/2006