

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

**INDUÇÃO DE CALOS EM ANTERAS DE CAFEIEIRO *Coffea arabica* EM FUNÇÃO  
DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO 2,4 – D E TDZ**

**SORAIA VIEGAS MARQUES**

**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 EM ANTERAS DE CAFEEIRO *Coffea arabica* EM FUNÇÃO  
DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO 2,4 – D E TDZ**

APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA EM 08/03/2006

---

Prof. Dr. José Maqno Queiroz Luz  
(Orientador)

---

Dr. <sup>a</sup> Monalisa Alves Diniz da Silva  
(Membro da Banca)

---

Mestranda Adelaide Siqueira Silva  
(Membro da Banca)

Uberlândia – MG

Março – 2006

## ÍNDICE

	Página
RESUMO -----	3
1- INTRODUÇÃO -----	4
2- REVISÃO DE LITERATURA -----	6
2.1. Aspéctos gerais da cultura de tecidos -----	6
2.2. Melhoramento genético do cafeeiro -----	12
2.3. Cultura de anteras de cafeeiro -----	13
3- MATERIAL E MÉTODOS -----	16
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	18
5- CONCLUSÕES -----	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	27

## RESUMO

O melhoramento do cafeeiro *Coffea arabica*, tem sido feito através de métodos convencionais que levam aproximadamente trinta anos para a obtenção de novas linhagens. Este tempo pode ser reduzido através da obtenção de haplóides em gerações segregantes com a técnica *in vitro* de cultura de anteras. No sentido de se obter maior conhecimento sobre a atuação dos reguladores de crescimento, teve-se como objetivo avaliar o efeito do 2,4-D em combinação com TDZ na indução de calos em anteras de cafeeiro, cultivar Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44, em diferentes épocas de incubação. O experimento foi instalado e conduzido no laboratório de Biotecnologia/Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Uberlândia. Anteras da cultivar Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44 foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com os reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ nas combinações das concentrações 2, 4, 6 e 8  $\text{mgL}^{-1}$  x 0 e 0,5  $\text{mgL}^{-1}$ , respectivamente, x época de avaliação (30, 60 e 90 dias após a inoculação das anteras). O delineamento experimental foi de blocos casualizados, em esquema fatorial de 4 x 2 x 3 com quatro repetições. Avaliou-se oxidação, intumescimento e calosidade. A combinação das concentrações de 2,0  $\text{mgL}^{-1}$  de 2,4-D e 0,0  $\text{mgL}^{-1}$  de TDZ foi a mais eficiente na indução de calos com 93,2% e a que menos respondeu à esse resultado foi de 6,0  $\text{mgL}^{-1}$  de 2,4-D e 0,0  $\text{mgL}^{-1}$  de TDZ com 65,6%. À medida que se aumentou as concentrações de 2,4-D, a formação de calos diminuiu e o aumento do período de avaliação proporcionou um maior número de anteras oxidadas. Os dados obtidos permitem concluir que, as combinações dos reguladores de crescimento, TDZ e 2,4-D nas concentrações utilizadas, responderam positivamente na indução de calos em anteras de cafeeiro.

## 1- INTRODUÇÃO

As técnicas de melhoramento convencional do cafeeiro têm apresentado resultados promissores na cultura do café, no que se refere ao aumento de produtividade e obtenção de novas cultivares.

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 possuir apenas um alelo em cada loco gênico, acelerando drasticamente o processo de obtenção de novos cultivares.

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

O presente trabalho, o qual faz parte de uma linha de pesquisa de apoio ao melhoramento do cafeeiro aplicando a técnica da cultura de anteras, teve como objetivo avaliar o efeito do 2,4-D em combinação com TDZ na indução de calos em anteras de cafeeiro *Coffea arabica*, cultivar Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44, em diferentes épocas de incubação.

## **2- REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1- Aspéctos gerais de cultura de tecidos**

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).

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

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

No Brasil, a primeira referência é a de Sharp et al. (1973), mas desde 1970, Sondhal e colaboradores, no IAC, já pesquisavam na área. Os primeiros trabalhos que trouxeram uma contribuição concreta para a biotecnologia do cafeeiro foram os de Sondhal ; Sharp (1977) e Sondhal et al. (1979), quando se demonstrou a embriogênese somática de alta e baixa frequência, posteriormente vieram os trabalhos de regeneração de embriões somáticos no começo da década de 80 (SONDHAL et al., 1984). Salienta-se que somente em 1977, com a constituição do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D/Café), que novas perspectivas foram abertas à biotecnologia do cafeeiro.

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

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

A consistência do meio, normalmente é sólida, mas os meios líquidos estão sendo cada vez mais usados, pois tem vantagens no aumento do rendimento pela maior obtenção de embriões e calos (PIERIK, 1987). Com o contínuo aumento dos estudos com o cultivo *in vitro* de vegetais, recentemente uma das linhas que está sendo explorada é a composição e a influência de gases nos recipientes de cultivo, bem como a adição de componentes ao meio de



cultura que influenciam na formação e ação destes gases, que por sua vez irão afetar diretamente a resposta do explante, principalmente no que diz respeito à embriogênese.

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

Yeoman (1970) considerou que o crescimento de calo em diferentes espécies pode ser independente de auxina e citocinina ou dependente de apenas uma delas ou dependente de ambas. Assim, certos tecidos mostram uma dependência total da presença de reguladores exógenos no meio, enquanto outros sintetizam as quantidades que necessitam.

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), que são consideradas as substâncias responsáveis por desencadear os processos de dediferenciação e rediferenciação, alterando determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes. Com relação as citocininas, as mais usadas são a 6 - benzilaminopurina (BA, BAP), que induz a formação de grandes números de brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação, a 6-furfurilaminopurina (CIN) e a isopenteniladenina (2iP) permitem apenas o crescimento normal sem brotações múltiplas (HU ; WANG, 1983). Tem-se também o Thidiazuron (TDZ), que 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*. Luz et al. (1998) trabalhando com anteras de pimentão, verificaram que o TDZ promoveu alta frequência de embrióides, mas com baixas taxas de conversão em plantas.

Segundo Andrade (1998) o TDZ, que possui ação citocinínica, produz uma maior atividade em relação às outras citocininas, pois ele não é facilmente degradado, sendo portanto mais estável e mais ativo. 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).

Por causa da ação negativa, há vários estudos sobre os inibidores do etileno ( $C_2H_4$ ), como por exemplo o nitrato de prata ( $AgNO_3$ ) e o ácido acetilsalicílico (AAS); o nitrato de prata, que é um potente inibidor da ação desse gás tem promovido a regeneração em *Triticum aestivum*, *Nicotiana plumbaginifolia*, *Zea mays*, em alguns genótipos de *Brassica* e em *Daucus carota* (HATANAKA et al., 1995). O nitrato de prata a  $5\text{ mgL}^{-1}$ , também favoreceu a indução de embrióides em anteras de *Capsicum annuum* L. (LUZ, 1995).

O Thidiazuron, segundo Mok; Mok (1985), pode levar à produção de etileno e o fechamento dos estômatos o que é característico de ação citocinínica.

Quanto ao ácido acetilsalicílico (AAS), muitos estudos conduzidos em laboratório e em campo sugerem que ele é importante em muitas respostas biológicas de plantas, o seu efeito na fisiologia das mesmas 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). O AAS quando adicionado ao meio de cultivo também pode promover a embriogênese (LUZ et al., 1997).

Segundo Herman (1991), tanto o AS quanto o AAS em forma de aspirina, estimularam a embriogênese em suspensão de células de cenoura, numa faixa de concentração de 10 à 100 $\mu$ M, e não causaram qualquer prejuízo no crescimento e sobrevivência das células, bem como não afetaram o pH do meio. O autor cita que houve uma direta relação entre a concentração de aspirina ou AS no meio de cultura e o estímulo da embriogênese com a inibição do etileno.

Luz et al. (1999), verificaram regeneração direta de plântulas haplóides em anteras de pimentão em meio acrescido com 2,4-D, cinetina e AgNO<sub>3</sub> e exposto ao etileno.

Embriogênese somática, adventícia ou assexual são termos usualmente empregados para designar o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem à uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986).

A embriogênese somática é um método importante para propagação de plantas elite *in vitro*, em larga escala. Também é uma estratégia para os estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião (YEUNG, 1995). Atualmente, esse sistema vem sendo utilizado para produção de plantas transgênicas (PRAKASH ; VARADARAJAN, 1992; GAMA, 1993) e sementes sintéticas (SCHULTHEIS et al., 1990).

O primeiro modelo que corresponde à embriogênese somática é o direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estádios intermediários de calos. O segundo consiste do modelo indireto no qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação (GUERRA et al., 1999).

Com relação às condições ótimas de incubação, principalmente temperatura e iluminação, elas 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).

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 microrganismos (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).

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).

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).

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

## 2.2- Melhoramento genético do cafeeiro

*Coffea arabica* L. é considerada uma espécie nobre, com café de boa qualidade apresentando vários mutantes e variedades. É tetraplóide, autofértil, ocorrendo 10 a 12% de fecundação cruzada (GRANER; GODOY, 1967). Pertence à família Rubiaceae, na qual o gênero *Coffea* abrange cerca de 60 espécies, sendo as mais comuns a *Coffea arabica* (70% do café comercializado no mundo) e *Coffea canephora* segundo Ferrão et al. (2000)

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 nativa da região sudoeste da Etiópia, Sudão e Quênia. No Brasil, foi introduzida em 1727 pelo Sargento Francisco de Mello Palheta em Belém do Pará, em seguida levada para o Maranhão e Bahia, e posteriormente para o Rio de Janeiro, expandindo-se para o Vale do Paraíba, Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná, Mato Grosso e Rondônia.

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).

O Brasil é o maior produtor mundial de café, atingindo na safra de 2004/2005 33,1 milhões de sacas, sendo que a exportação deste produto representa uma significativa fonte de divisas para o país. Dentre os estados produtores de café, Minas Gerais alcança a primeira posição em produção (USDA/FNP).

Nos países onde o café assume importância econômica, instituições de pesquisa têm envidado esforços nos programas de melhoramento das espécies mais cultivadas. Segundo Mendes e Guimarães (1998), os programas de melhoramento genético do cafeeiro têm selecionado cultivares de elevado potencial produtivo e valor agrônomo para as várias regiões produtoras do Brasil. Este é o país que soma o maior número de contribuições ao melhoramento genético do cafeeiro. Atuando desde o início da década de 1930, a Seção de Genética do IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) vêm desenvolvendo um vasto programa de genética e de melhoramento do cafeeiro, tendo realizado quase todos os estudos de café e lançado as mais importantes cultivares plantadas nas várias regiões cafeeiras do Brasil e mesmo de outros países. Os estudos são concentrados na espécie *Coffea arabica*. A partir da década de 1970, outras instituições de Ensino e Pesquisa somaram-se ao IAC, nos vários Estados, num trabalho integrado e cooperativo. São exemplos a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e a Universidade Federal de Lavras (UFLA) (MENDES; GUIMARÃES 1998).

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 (HENDY et al., 1985).

### 2.3- Cultura de anteras

Uma opção para reduzir o tempo necessário para a produção de linhagens homozigotas é a cultura de anteras ou de micrósporos, baseada na capacidade do gameta sexual masculino regenerar indivíduos haplóides. Um indivíduo haplóide regenerado desse cultivo possui metade do número de cromossomos característico da espécie e é submetido a tratamento com colchicina para duplicação do complemento de cromossomos, formando o “dihaploide”, que é 100% homozigoto (TORRES et al., 1998).

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 (FIGUEIRA, 2002).

A cultura de anteras já foi empregada para a regeneração de calos, embrióides e plantas em aproximadamente 247 espécies, 88 gêneros e 34 famílias (PETERS et al., 1999). Na China, ainda na década de 70, foram desenvolvidos os primeiros cultivares de fumo, arroz e trigo, obtidos mediante o cultivo de anteras. Esta técnica também é aplicada rotineiramente em

programas de melhoramento de várias famílias importantes como os cereais, as crucíferas e as solanáceas (MORAES FERNANDES, 1990).

Apesar da obtenção de haplóides *in vitro* através da cultura de anteras ter sido registrada principalmente para espécies das famílias Solanaceae, Graminae e Cruciferae, recentes trabalhos mostram a possibilidade do uso desta técnica para outras famílias. Mas mesmo com o considerável sucesso da técnica da cultura de anteras, o principal problema continua sendo a baixa frequência de haplóides obtidos na maioria das espécies trabalhadas; outro fator que pode causar problemas nessa metodologia refere-se ao fato de que plantas podem se originar de outros tecidos da antera, resultando em plantas com vários níveis de ploidia (LUZ, 1995). Um importante fator para o sucesso da cultura de anteras é conhecer para cada cultura o estágio ideal de desenvolvimento das anteras a serem cultivadas, de maneira que este estágio contenha os micrósporos em uma fase de desenvolvimento de melhor resposta androgenética, que geralmente são os micrósporos recém liberados da tétrade meiótica até no máximo, estágio binucleado. Grando e Moraes Fernandes (1993), sugerem que o potencial embriogênico do micrósporo pode ser determinado tanto no período da meiose como no período da pré-mitose do mesmo, pois nestes dois momentos ele ainda teria metabolicamente características esporofíticas, o que permitiria a diferenciação do micrósporo em embrião, culminando com a formação de uma planta.

Para diferentes cultivares de *C. arabica*, determinou-se que o estágio ideal de desenvolvimento do micrósporo ocorre quando os botões estão com tamanho de 4,5 a 5,5mm, que corresponde à anteras contendo micrósporos uninucleados, os quais possuem maior probabilidade de regeneração em plantas haplóides (ANDRADE, 1998; SILVA et al., 2002).



Pasqual et al. (2002) trabalhando com a cultivar de café Rubi, verificaram que a melhor assepsia para a cultura de anteras ocorreu com o uso de hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos e que o PVP (polivinilpirrolidene) diminuiu a oxidação e aumentou a formação de calos, ao contrário da adição de  $\text{AgNO}_3$  em meio com cinetina e ANA.

Trabalhando com anteras de *C. arabica*, Luz et al. (2001) e Figueira et al. (2002), verificaram para as cultivares Catuaí e Mundo Novo, que o choque de frio ou calor aliado a baixas concentrações de 2,4-D, não foram eficientes na indução de embrióides e/ou calos embriogênicos.

É evidente que a cultura de anteras das espécies onde a técnica não foi bem sucedida, como no caso do cafeeiro até o momento, são necessários estudos criteriosos dos fatores que possam influenciar a resposta das anteras cultivadas. Desta maneira, objetivou-se estudar a interação dos reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ na indução de calos em anteras de cafeeiro *Coffea arabica* em diferentes épocas de incubação.

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Biotecnologia/Cultura de Tecidos do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG) da Universidade Federal de Uberlândia, no período de agosto de 2003 a janeiro de 2004, desde a coleta dos botões até o término das análises estatísticas. Foi utilizado o genótipo de cafeeiro de *Coffea arabica* Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44 plantado na área experimental da Universidade Federal de Uberlândia.

Os botões florais foram coletados por volta de 8:00 horas quando estavam com tamanho de 4,5 a 6,0mm correspondendo à anteras contendo micrósporos uninucleados, segundo Silva et al. (2004), depois foram mantidos em placas de Petri com papel de filtro umedecido para evitar a desidratação dos mesmos. Já no laboratório, os botões foram medidos e selecionados com o auxílio de um paquímetro e enrolados em uma gaze para posterior desinfestação.

A desinfestação externa foi feita em álcool 70% por 20 segundos e hipoclorito de sódio (2%) por 10 minutos sob agitação.

Em câmara de fluxo laminar foram lavados três 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 estereomicroscópio, pinça e bisturi; sendo os últimos flambados a cada novo botão. Posteriormente as anteras eram imersas por 1 segundo, antes de serem inoculadas, em uma solução de ácido ascórbico na concentração de  $600 \text{ mgL}^{-1}$ , em hipoclorito de sódio à 0,2% e por fim em água destilada e autoclavada, respectivamente.

As anteras foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo 20 ml do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com pH ajustado para 5.9, adicionado de 7 g/L de ágar e previamente autoclavado, suplementado com os reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ nas combinações das concentrações 2, 4, 6 e  $8 \text{ mgL}^{-1}$  x 0 e  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ , respectivamente. As inoculações das anteras ocorreram a partir das 1<sup>as</sup> semanas com florada. O material foi mantido em sala de crescimento com  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e presença de luz.

Após 30, 60 e 90 dias da inoculação dos explantes, foram avaliadas as variáveis oxidação, intumescimento e calosidade assim como a interferência dos dias nas mesmas.

Utilizou-se o delineamento experimental de blocos casualizados, em esquema fatorial  $4 \times 2 \times 3$  (concentrações de 2,4-D e TDZ, respectivamente e época de avaliação) com quatro repetições por tratamento, sendo cada três tubos uma repetição, com cinco anteras por tubo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização do programa SANEST (ZONTA et al, 1984), as médias das concentrações de TDZ foram analisados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e as mesmas nas concentrações de 2,4-D e do fator época de avaliação foram analisadas por regressão polinomial . A transformação utilizada foi de  $\sqrt{x + 1/2}$ .

#### 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 observa-se o resumo das análises de variância para o número médio de anteras oxidadas, intumescidas e com calosidades em relação às concentrações dos reguladores de crescimento, assim como as épocas de avaliação.

**Tabela 1:** Resumo das análises de variância do número médio de anteras oxidadas (OXID.), intumescidas (INT.) e com calosidades (CALOS.) em função das concentrações de 2,4-D e TDZ, em diferentes épocas de avaliação. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Causas da variação	G.L.	Q.M..		
		OXID.	INT.	CALOS.
2,4-D	3	0,5047	0,0503	0,1606*
TDZ	1	0,4837	0,1404	0,0009
Épocas de Avaliação (EA)	2	0,8517*	0,1243	0,0176
2,4-D * TDZ	3	0,0713	0,1260	0,2093*
2,4-D * EA	6	0,2893	0,0514	0,0061
TDZ * EA	2	0,0050	0,0515	0,0045
2,4-D * TDZ * EA	6	0,0629	0,0406	0,0014
Blocos	3	0,6551	0,5638	0,6307
Resíduo	69	0,2046	0,0641	0,0508
C.V.(%)		10,11	12,073	10,553

- Significativo a 5% de probabilidade

Não houve interação significativa entre as épocas de avaliação e as concentrações de 2,4-D e TDZ a respeito do número de anteras oxidadas, intumescidas e com calos.

Com relação à variável oxidação, as combinações dos reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ não diferiram estatisticamente. Porém a que apresentou o maior número de anteras oxidadas foi a concentração de 8 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D associada à 0,5 mgL<sup>-1</sup> de TDZ, (Tabela 2).

**Tabela 2.** Média (%) do número de anteras oxidadas após a inoculação das anteras da cultivar Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44 em diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ, UFU, Uberlândia-MG, 2005.

Reguladores de Crescimento		Médias Originais	Média(%)
2,4-D (mgL <sup>-1</sup> )	TDZ (mgL <sup>-1</sup> )		
2	0	4,5000	90
	0,5	4,2500	85
4	0	4,5200	90,4
	0,5	4,4333	88,6
6	0	4,6083	92,2
	0,5	4,2583	85,2
8	0	4,5250	90,5
	0,5	4,6666	93,3

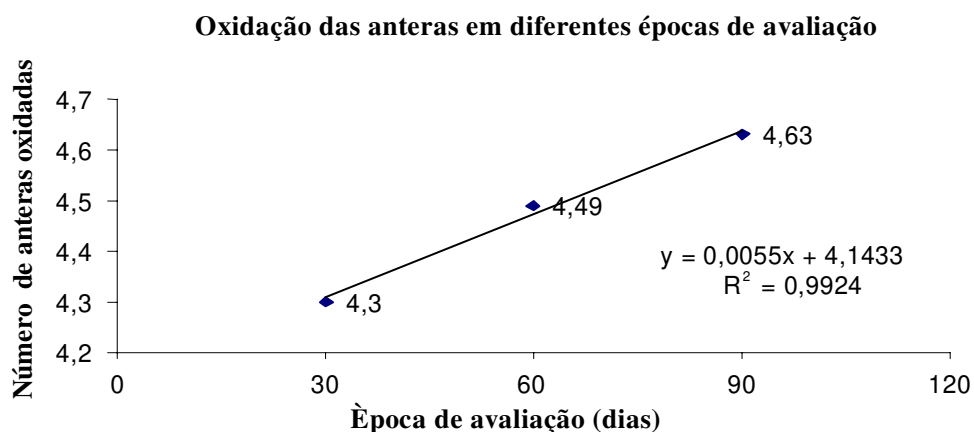
A alta concentração do regulador 2,4-D pode ter influenciado numa maior oxidação encontrada neste tratamento, o que é confirmado em outros trabalhos como Costa; Pereira (2005), que citam que nos tratamentos que utilizou-se o regulador de crescimento 2,4-D nas concentrações de 0; 2,5 e 5 mgL<sup>-1</sup> observou-se elevada oxidação dos explantes de *Piper hispidinervum* (pimenta-longa), sendo que a formação de calos foi mais pronunciada nas extremidades dos explantes. Giri et al. (1993) afirmaram que a presença de 2,4-D no meio de cultura está associada a uma maior oxidação do tecido. Figueira (2002), trabalhando com

subcultivo de anteras de cafeeiro em doses menores de 2,4-D também obteve 100% de anteras oxidadas.

A presença do regulador de crescimento TDZ no meio de cultura também pode influenciar no processo de oxidação das anteras conforme Nogueira et al. (2003) que em trabalho com indução de brotações a partir de segmentos nodais de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de TDZ, observaram que aos 35 dias após a inoculação não houve formação de brotações em nenhuma das concentrações de TDZ testadas, somente presença de explantes necrosados.

Pasqual et al. (2002) trabalhando com anteras de *Coffea arabica* L. inoculadas em meio MS acrescido de PVP (polivinilpirrolidene), observaram que a adição deste ao meio de cultura aumentou significativamente a indução de calos, atingindo um máximo de 67% na dosagem de 200 mgL<sup>-1</sup>. O uso de PVP nessa dosagem também proporcionou a menor oxidação às anteras, sendo que dosagens superiores passaram a apresentar efeito prejudicial.

Ainda quanto à oxidação, a época de avaliação interferiu significativamente, sendo que quanto maior o período de avaliação, maior foi o número de anteras oxidadas. (Figura 1)



**Figura 1:** Número de anteras oxidadas aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação das anteras da cultivar Catuaí vermelho 44, UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Mustafa (2003) ao inocular anteras das cultivares Catuaí Vermelho 99 e Mundo Novo em meio MS suplementado com 2,4-D (2, 4, 6 e 8 mgL<sup>-1</sup>) e BAP (0 e 2 mgL<sup>-1</sup>) em ausência e presença de luz, sendo que as anteras da cultivar Mundo Novo não foram submetidas à ausência de luz, verificou que as anteras que não foram expostas à luz apresentaram menores índices de oxidação. Esse resultado pode explicar a alta percentagem de anteras oxidadas encontradas neste trabalho, visto que o experimento foi conduzido na presença de luz.

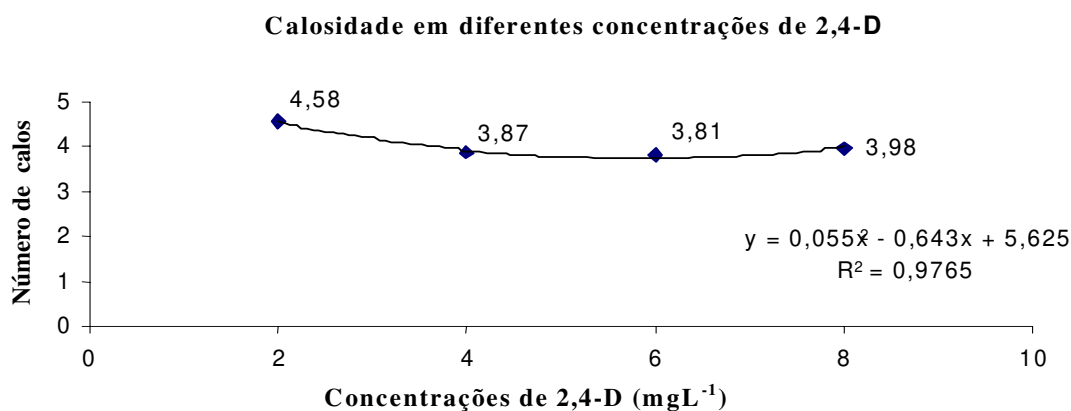
Não houve influência dos tratamentos sobre a porcentagem de anteras intumescidas. Entretanto, a combinação de reguladores de crescimento que proporcionou uma maior percentagem foi de 2,0 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,5 mgL<sup>-1</sup> de TDZ com 90%, (Tabela 3).

**Tabela 3.** Média (%) do número de anteras intumescidas após a inoculação das anteras da cultivar Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44 em diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ, UFU,Uberlândia-MG,2005.

Reguladores de Crescimento		Médias Originais	Média(%)
2,4-D (mgL <sup>-1</sup> )	TDZ (mgL <sup>-1</sup> )		
2	0	3,8798	77,6
	0,5	4,5008	90
4	0	3,6234	72,47
	0,5	4,0458	80,9
6	0	3,4254	68,5
	0,5	4,2332	84,66
8	0	4,0368	80,74
	0,5	3,4867	69,73

A presença de TDZ no meio de cultura pode ter influenciado no intumescimento das anteras, pois segundo Shan et al. (2000) este regulador de crescimento seria eficiente na morfogênese *in vitro* de muitas espécies de plantas. Além disso, Huetteman e Preece (1993) citam que o TDZ é um excelente estimulante para formação de calos em concentrações iguais ou maiores que 1,0 mM.

Houve diferença significativa entre as concentrações de 2,4-D em relação à variável calosidade (Tabela 1), de forma que a concentração de  $2\text{mgL}^{-1}$  resultou em uma maior média de calosidade. A partir desta, foi observado um decréscimo significativo de calosidade nas concentrações de 4 e  $6\text{mgL}^{-1}$ , seguido de um aumento da mesma na concentração de  $8\text{mgL}^{-1}$ , porém ainda se mantendo abaixo da primeira, (Figura 2).



**Figura 2:** Número de anteras com calos sob diferentes concentrações de 2,4D, cultivar Catuaí Vermelho 44, UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Segundo Araújo et al. (2002), as melhores respostas na indução de calos e massa fresca em *C. arabica* cv. Rubí foram obtidas quando se empregou  $2,0\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-D e  $4,0\text{mg.L}^{-1}$  de cinetina. Esses resultados confirmam os obtidos por Palú et al. (2002) onde o aumento da



produção de calos ocorreu até a concentração de  $2\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-D onde a partir desta houve uma inibição na produção de calos.

De acordo com Secundino et al. (2005), uma maior indução de calos em anteras de cafeeiro *Coffea arabica*, aos 90 dias de inoculação, foi obtida na concentração de  $2,0\text{ mgL}^{-1}$  de 2,4-D na ausência de AAS. Em embriões inoculados de *Anthurium coriaceum* (Antúrio-silvestre), segundo Fermino et al. (2005), verificou-se resultado semelhante.

Para a cultivar Catuaí Vermelho 44 a melhor concentração do regulador de crescimento 2,4-D para a indução de calos em antera de cafeeiro foi a de  $2,0\text{ mgL}^{-1}$ .

A interação entre as concentrações de 2,4D e TDZ foi significativa na indução de calos em anteras. Em termos de valores absolutos a combinação dos reguladores 2,4-D e TDZ nas concentrações de  $2,0\text{ mgL}^{-1}$  e  $0,0\text{ mgL}^{-1}$ , respectivamente, foi a que resultou no maior número de anteras com calos, apesar de não diferir das demais combinações, com exceção daquela em que se utilizou  $6,0\text{ mgL}^{-1}$  de 2,4-D e  $0,0\text{ mgL}^{-1}$  de TDZ, a qual estatisticamente proporcionou uma menor calosidade nas anteras inoculadas (Tabela 4).

**Tabela 4.** Dados médios (%) de calosidade de anteras, cultivar Catuaí vermelho 44, submetidas à diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ, UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Reguladores de Crescimento		Médias Originais	Média(%)
2,4-D ( $\text{mgL}^{-1}$ )	TDZ ( $\text{mgL}^{-1}$ )		
2	0	4,66 a	93,2
	0,5	4,51 a	90,2
4	0	4,05 a	81
	0,5	3,71 a	74,2
6	0	3,28 b	65,6
	0,5	4,37 a	87,4

8	0	4,35 a	87
	0,5	3,63 a	72,6

Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Paiva et al. (2005) consideraram a importante da combinação de uma auxina e citocinina, principalmente TDZ, na micropropagação de plântulas pré-estabelecidas de *Nidularium fulgens* (bromélia)

De acordo com Figueira et al (2005), os reguladores de crescimento 2,4-D ( $6 \text{ mgL}^{-1}$ ) e TDZ ( $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ ) foram eficientes na indução de calos; porém não promoveram a regeneração dos mesmos para a cultivar Catuaí Vermelho.

Segundo Marques et al (2005), as combinações de reguladores de crescimento que mais responderam à indução de calos em anteras de cafeeiro *Coffea arabica* foram  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$  2,4-D +  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$  BAP;  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$  Cinetina +  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  2,4-D e  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$  2,4-D +  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  TDZ. Em banana, Srangsam; Kanchanapoom (2003) trabalhando com indução de calos, observaram que calos embriogênicos foram induzidos em meio MS acrescido de TDZ na concentração de  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ . Em maçã, Morales et al. (1999) citam que o TDZ a 5 mM foi importante para a formação de calos regenerativos. Shan et al. (2000) ao investigarem o efeito do TDZ na regeneração *in vitro* de cevada (*Hordeum vulgare* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.), verificaram que a regeneração de tecidos a partir de calosidades de cevada foi maior na concentração de  $1 \text{ mg.L}$  enquanto que o nível ótimo de TDZ para a regeneração de trigo foi de  $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ .

Trabalhando com explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.), Santos et al. (2005) verificaram que o tratamento que mais proporcionou a formação de calos (90,27%) e a produção de matéria seca, foi com  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de TDZ +  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de 2,4-D.

Segundo Abbade et al. (2005), não houve formação de calos em folhas jovens de jatobá (*Hymenaea courbaril* L) na ausência ou presença do regulador de crescimento TDZ.

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 a mais adequada a indução e manutenção do calo (GAMBORG et al., 1976).

Essas citações confirmam os resultados do presente trabalho onde a interação dos reguladores de crescimento 2,4-D, que é uma auxina, e o TDZ, que é um regulador de crescimento com ação citocinínica, mostrou-se eficiente à indução de calos. Além disso, o regulador de crescimento 2,4-D apresenta caráter indutor para o intumescimento e calosidade conforme proposto por Torres et al. (1998).

Considerando-se a contaminação, esta, se manteve baixa em todo o andamento do projeto não interferindo nos resultados obtidos. De qualquer forma é de se esperar que ocorra uma certa contaminação na cultura de anteras em cafeeiro, visto que as plantas fornecedoras dos botões florais foram provenientes do campo.

## **5- CONCLUSÕES**

Em termos de valores absolutos a combinação dos reguladores 2,4-D e TDZ nas concentrações de  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$  e  $0,0 \text{ mgL}^{-1}$ , respectivamente, foi a que resultou no maior número de anteras com calos, apesar de não diferir das demais combinações, com exceção daquela em que se utilizou  $6,0 \text{ mgL}^{-1}$  de 2,4-D e  $0,0 \text{ mgL}^{-1}$  de TDZ, a qual estatisticamente proporcionou uma menor calosidade nas anteras inoculadas.

Houve diferença significativa entre as concentrações de 2,4-D em relação à variável calosidade, de forma que  $2 \text{ mgL}^{-1}$  resultou em uma maior média de anteras com calos.

O aumento do período de avaliação proporcionou um maior número de anteras oxidadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADE, L.C.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; SOARES, F.P. Indução de calos de Jatobá (*Hymenaea courbaril*) em diferentes concentrações de TDZ. In: 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 15 CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS E 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 23, 2. 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: CBCEARÁ, 2005. p.641.

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.

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 CAFEEIRAS, 28., 2002, Caxambu. **Resumos....** Caxambu: EMBRAPA/CAFÉ, 2002. p. 197.

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

CARDOSO, A.P.S. **Café – cultura e tecnologia primária**. 1.ed. Ministério do Planejamento e da Administração do Território. Secretaria de Estado da Ciência e Tecnologia: Instituto de Investigação Científica Tropical, 1994, p.169.

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

COSTA, F.H.S.; PEREIRA, J.E.S. Seleção de auxinas para a indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* visando o estabelecimento de cultivo de células em suspensão. In: 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 15 CONGRESSO BRASILEIRO DE

FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS E 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 23, 2. 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: CBCEARÁ, 2005. p.656.

DE BLOCK, M.; DE BROUWER, D. A simple and robust *in vitro* assay to quantify the vigour of oilseed rape lines and hybrids. **Plant Physiol. Biochem.**, 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 Fósforo, 1986, p. 87-113.

FERRÃO, M.A.G., FONSECA, A. F. A. da, FERRÃO, R.G., ROCHA, A.C., ANDRADE NETO, A.P.M., FORNAZIER, M. J. 2000. Desempenho de Progenies de Café Arábica na região de Montanhas do Estado do Espírito Santo. In: Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil, 1, Poços de Caldas, 2000. **Resumos...** Brasília: Embrapa Café/Minasplan, p.426-429.

FERMINO, P.C.P.J.; SOUZA, T.V.; PEDROTTI, E.L. Indução a embriogênese somática de *Anthurium coriaceum* G.Don. In: 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 15 CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS E 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 23, 2. 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: CBCEARÁ, 2005. p.527.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético 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-CNPq, 1998. v.1. p.21-43 .

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.

FIGUEIRA, E.R.; LONDE, L.N.; SILVA, A.S.; MARQUES, R.V.; MARQUES, S.V.; LUZ, J.M.Q. Influência do 2,4-D, nitrato de prata e ácido acetilsalicílico no cultivo *in vitro* de anteras de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) In: 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 15 CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS E 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 23, 2. 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: CBCEARÁ, 2005. p.595.

GAMA, M.I.C.S. **Produção de plantas transgênicas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) por transformação de calos embriogênicos por meio de *Agrobacterium tumefaciens***. Rio de Janeiro: UFRJ, 1993. 130p. Tese Doutorado.

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

- GIRI, A.; AHUJA, P.S.; AJAYKUMAR, P.V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Aconitum heterophyllum* Wall. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v.32, p.213-218, 1993.
- GRANDO, M.F., MORAES FERNANDES, M. I. B. 1993. Proposta de um modelo para explicar a embriogênese do grão de pólen *in vitro*. In: Encontro brasileiro de biotecnologia vegetal, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: Redbio, v.1, res.69.
- GRANER, E.A., GODOY JUNIOR. C. 1967. **Manual do Cafeicultor**. Ed. Universidade São Paulo, 320p.
- 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.
- GUTIÉRREZ-CORONADO, M.A.; TREJO-LÓPEZ, C.; LARQUÉ-SAAVEDRA, A. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. **Plant Physiol. Biochem.**, Paris, v.36, n.8, p. 563-565, 1998.
- HATANAKA, T.; SAWABEB, E.; AZUMA, T.; UCHIDAB, N.; YASUDA, T. The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. **Plant Science**, Ireland, v.107, p. 199-204, 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**, 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, Inc., Shrub Oak, 1991, 94p.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip, and bud cultures. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., ed. **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1983. v.1, p.177-227.
- 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.
- LERCH, K. Cooper monooxygenases: tyrosinase and dopamine b-monooxygenases. In: SIEGEL, H (Ed.). **Metal ions in biological systems**. Marchel: Deckker, 1981. p. 143-186.
- 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.

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 cafeeiro (*Coffea arabica* L.) In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: REDBIO, 2001. p. 69.

LUZ, J.M.Q.; PINTO, J.E.B.P.; EHLERT, P.A.D.; CERQUEIRA, E.S.; BEDIN, I. Ação do etileno em combinação com thidiazuron, nitrato de prata e ácido acetilsalicílico na cultura de anteras de pimentão. **Horticultura Brasileira**, v.17, n.3, 45-49, nov. 1999.

LUZ, J.M.Q.; PINTO, J.E.B.P.; EHLERT, P.A.D.; CERQUEIRA, E.S. Indução “in vitro” de embriões em anteras de pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Horticultura Brasileira**, v.16, n.1, p.35-42, maio 1998.

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.

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

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. **Journal of Horticultural Science**, v.65, n.2, p.103-111, 1990.

MARQUES, R.V.; LUZ, J.M.Q.; MARQUES, S.V.; FIGUEIRA, E.R.; SECUNDINO, R.R.; LONDE, L. Efeito dos reguladores de crescimento 2,4-D, TDZ, Cinetina, BAP, AIB, GA<sub>3</sub>, e ANA na indução e regeneração de calos em anteras de cafeeiro *Coffea arabica*. In: 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 15 CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS E 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 23, 2. 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: CBCEARÁ, 2005. p.595.

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.

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

MOK, M.C.; MOK, D.W.S. The metabolism of [<sup>14</sup>C]-thidiazuron in callus tissues of *Phaseolus lunatus*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.65, p.427-432, 1985.



MONACO, L. C.; SÖNDAHL, M. R.; CARVALHO, A. *et al.*. 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, 1977. p. 109- 126.

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

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/CNPH, 1990. p.311-332.

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.

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.

NORIEGA, C.; SONDAHL, M.R. 1993. 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.

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 E CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 14, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 324.

PAIVA, P.D.O.; NAVES, V.C.; DUTRA, L.F.; PAIVA, R.; PASQUAL, M. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Nidularium fulgens* lam. In: 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 15 CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS E 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 23, 2. 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: CBCEARÁ, 2005. p.551-552.

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.

PARANHOS, T.J.; PERRANDO, E.; FRANCO, H.E.T.; AITA, A. Regeneração *in vitro* das cultivares de tomate Empine e Monte Carlo. **Revista Horticultura Brasileira**. v.14, n.2, p.203-207, 1996.

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*. **Ciênc. agrotec.**, 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-CNPH, v.2, 1999. p. 596-611.

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

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

PRAKASH, C.S.;VARADARAJAN, U. Genetic transformation of sweetpotato. In HILL,; BONSI, C.K.; LORETAN, P.A., ed. **Sweetpotato technology for the 21th century**. Tuskegee University, 1992. p.27-37.

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.

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.

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; ALVES, J.D.; DEUNER, S. Indução de calos *in vitro* em explantes foliares de pequi. In: 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 15 CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS E 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 23, 2. 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: CBCEARÁ, 2005. p.629.

SCHULTHEIS, J.R.;CHÉE, R.O.; CANTLIFFE, D.J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., ed. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Imprensa Nacional, 1990. 433p.

SECUNDINO, R.R.; LUZ, J.M.Q.; MARQUES, S.V.; MARQUES, R.V. Efeito dos reguladores de crescimento 2,4-D e do ácido acetilsalicílico na indução de calos em anteras de cafeeiro *Coffea arabica*. In: 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 15 CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS E 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 23, 2. 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: CBCEARÁ, 2005. p.595-596.

SHAN, X.; LI, D.; QU, R. Thidiazuron promotes *in vitro* regeneration of wheat and barley. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, 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**, v.31, p.67-74, 1973.

SILVA, H.E. **Efeito do genótipo e de reguladores de crescimento na expressão androgênica da soja**. 2002. p.60. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SONDHAL, M.R.; NAKAMURA, T.; MEDINA FILHO, H.P.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C.; COSTA, W.M. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of Plant Cell Culture**. New York: Macmillan Pub. Co., v.3, 1984. p.564-590.

SONDHAL, 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. **Z. Pflanzenphysiol**, Zurich, v.94, n.4, p.185-188, 1979.

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

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

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

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.

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

USDA/FNP. **Agrianual 2005 Mercado e Perspectiva**, 2005. p. 241-242

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.

YEOMAN, M.M. Early development in callus culture. **International Review of Cytology**, v.29, p.383-409, 1970.

YEUNG, E.C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORP, T.A., ed. **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.205-247.

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.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. ; SILVEIRA JUNIOR, P. **Sistema de análise estatística para microcomputadores**: manual de utilização. 2.ed. Pelotas, 1987. 177p.