

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

ISRAEL VIEIRA NAVES

2,4-D E BAP NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES EM ANTERAS DE CAFEIEIRO *Coffea arabica* L.

**Uberlândia – MG
Junho – 2008**

ISRAEL VIEIRA NAVES

2,4-D E BAP NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES EM ANTERAS DE CAFEIRO *Coffea arabica* L.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: José Magno Queiroz Luz

**Uberlândia – MG
Junho – 2008**

ISRAEL VIEIRA NAVES

2,4-D E BAP NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES EM ANTERAS DE CAFEIEIRO *Coffea arabica* L.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Aprovado pela Banca Examinadora em 18 de junho de 2008

Prof. Dr. Tatiana Michlovska Rodrigues
Membro da Banca

Prof. Dr. Monalisa Alves Diniz da Silva
Membro da Banca

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz
Orientador

Dedico

Jesus Cristo

AGRADECIMENTOS

A DEUS

À minha família

Ao Dr. José Magno Queiroz Luz

Aos demais amigos que não são da Faculdade

À Tatiana, Leandro e Letícia

Ao Carvino, Fred e Oseías e suas respectivas Famílias

Aos meus amigos e da 36° Turma de Agronomia.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes concentrações de 2,4-D em combinação com BAP. O experimento foi instalado e conduzido no laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, no período de agosto de 2007 a janeiro de 2008. Foi utilizado o genótipo de cafeeiro de *Coffea arabica* L. Cultivar, Catuaí vermelho 144 advindos do Programa de Melhoramento da Universidade Federal de Lavras, plantados na Fazenda experimental do Glória da Universidade Federal de Uberlândia. As anteras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MS e diferentes concentrações de BAP (0, 1, 2, 4 mg.L⁻¹) e 2,4-D (1, 2 e 4mg.L⁻¹). As avaliações foram realizadas aos 90 dias após a instalação dos experimentos, analisando as seguintes características: Massa Fresca de Calos (mg), Percentagem Total de Calos, % de Calos Embriogênicos (CE),. Para produção de massa fresca usar 2,7 mg L⁻¹ de 2,4-D combinado com 2,0 mg L⁻¹ de BAP. Com relação à porcentagem de calos totais usar 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 2,25 mg L⁻¹ de 2,4-D. Quanto à formação de calos embriogênicos usar 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,31 mg L⁻¹ de BAP. Todas as concentrações de reguladores de crescimento citadas deverão ser usadas junto ao meio MS.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Procedimentos Gerais.....	15
3.2 Concentrações de BAP e 2,4-D na indução de calos.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5 CONCLUSÕES.....	21
REFERÊNCIAS.....	22

INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais populares do mundo e uma cultura de grande valor para a exportação, sendo o Brasil o maior exportador mundial de café com aproximadamente dez milhões de pessoas envolvidas direta ou indiretamente com este agronegócio. Além do aspecto econômico, a atividade apresenta ainda relevada importância social como atividade geradora de emprego e fixadora da mão-de-obra no campo.

O sucesso da cafeicultura deve-se, em parte, aos avanços obtidos nos trabalhos de melhoramento genético dessa cultura. Como resultado várias variedades melhoradas têm sido liberadas para os produtores, onde cada uma é adaptada às diferentes regiões cafeeiras e aos sistemas de cultivo, com elevada produtividade de grãos. Nos programas de melhoramento, as técnicas convencionais têm apresentado resultados promissores na cultura do café, no que se refere ao aumento de produtividade e obtenção de novos cultivares. Entretanto, no sistema convencional de melhoramento onde o método de cruzamentos é usado, são necessários de 7 a 8 ciclos de autofecundação para estabilizar o genótipo pela fixação de genes em homozigose. Além de ser um processo demorado e trabalhoso, a eficiência da seleção nas primeiras gerações de autofecundação é muito baixa devido, principalmente, à ocorrência de alelos dominantes em heterozigose (ANDRADE,1998).

Por se tratar de cultura perene propagada via semente, os programas de melhoramento do café demandam aproximadamente 25 anos desde a hibridação até a obtenção de uma nova variedade. Sendo assim, a cultura de anteras é considerada uma ferramenta importante, uma vez que pode auxiliar no melhoramento da cultura, pois permite a obtenção de haplóides em gerações segregantes, o que leva a rápida produção de plantas homozigóticas através da duplicação do número de cromossomos numa única etapa, substituindo as gerações de autofecundação. Além dos haplóides serem livres dos problemas de dominância e recessividade, por possuírem apenas um alelo em cada loco gênico, acelerando drasticamente o processo de obtenção de novos cultivares, (ARAÚJO, 2004).

No Brasil, o *C. arabica* já apresenta alguns resultados com relação à aplicação da cultura de anteras, sendo que estes definiram a calogênese e a indução de embrióides nos estágios iniciais de desenvolvimento, no entanto, necessita-se de maior indução e principalmente regeneração de embriões somáticos. Este é normalmente o ponto de estrangulamento da técnica de cultura de anteras. Neste caso é evidente que é necessário a

continuidade dos estudos dos fatores que possam influenciar a resposta das anteras/calos cultivadas com relação à embriogênese somática.

Diante do exposto, o grau de sucesso em qualquer tecnologia que emprega cultura de células, tecidos ou órgãos é dependente de alguns fatores. Um fator significativo é a escolha dos componentes nutricionais e reguladores de crescimento que controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento "in vitro". Cujo o objetivo foi testar concentrações diferentes de 2,4-D em combinação com diferentes concentrações de BAP, na indução, no crescimento e regeneração de embriões somáticos a partir de anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A espécie *C. arabica* pertence à família Rubiaceae, originária do sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia, em uma região restrita e marginal às demais espécies. A faixa de altitude correspondente é entre 1000 e 2000 metros e algumas regiões limítrofes estão entre 8 a 12' latitude norte e 40 a 42" longitude leste de Greenwich (CHARRIER, 1978). Estudos detalhados sobre a taxonomia de *Coffea* e sua distribuição geográfica foram feitos pelo botânico Francês Auguste Chevalier. Em 1940 e 1942, esse pesquisador publicou revisões gerais das espécies de *Coffea*. Das espécies descritas, *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, representam praticamente todo o café produzido e comercializado no mundo, sendo responsáveis por 70 e 30%, respectivamente.

As principais regiões cafeeiras no Brasil abrangem catorze regiões produtoras, situadas desde o Paraná até a Bahia e Rondônia. São mais conhecidas as do Serrado Mineiro, Triângulo Mineiro e sul de Minas - a que mais produz café no Brasil. A Mogiana Paulista, no nordeste de São Paulo, quase fronteira com Minas Gerais, também se tornou importante (NATHAN, 2003). Segundo Tristão (1995), a cafeicultura é a atividade agrícola que mais gera empregos no Brasil, sendo relevante fator de distribuição de renda, em que o agronegócio café, em toda sua cadeia envolvendo a produção, transporte, armazenamento, comunicação, rede bancária, serviços financeiros, portos, embalagem, processamento, industrialização e comercialização, emprega cerca de três milhões de brasileiros. O complexo agroindustrial do café no Brasil movimentava anualmente cerca de 8,10 bilhões de reais, sendo assim distribuídos: 3,6 na indústria, 4,3 na exportação e 0,2 em solúveis (CAIXETA, 2001), envolvendo direta e indiretamente 10 milhões de pessoas e pelo menos 1.700 municípios (RESENDE et al., 2000).

O melhoramento genético do cafeeiro por meio de métodos convencionais, principalmente hibridação, seguida da seleção de populações, avaliação de progênies, retrocruzamentos e cruzamentos interespecíficos, é um processo demorado, podendo levar mais de 30 anos para se obter uma nova cultivar (ALMEIDA et al., 2000). Pelo fato do cafeeiro ser uma espécie perene, de ciclo longo e porte arbustivo, as dificuldades práticas do melhoramento genético referem-se, principalmente, ao tempo e à extensão da área experimental necessários para o desenvolvimento de variedades. Sendo assim, a embriogênese somática via técnica de cultura de anteras pode auxiliar no melhoramento da cultura, pois permite a obtenção de haplóides em gerações segregantes, o que leva a rápida

produção de plantas homozigóticas através da duplicação do número de cromossomos numa única etapa, substituindo as gerações de autofecundação.

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

A embriogênese somática *in vitro* apresenta dois padrões básicos de desenvolvimento de embriões (SHARP et al., 1980). A embriogênese somática direta, na qual os embriões somáticos originam-se diretamente de tecidos matrizes sem a formação de estádios intermediários de calos, e a embriogênese indireta, na qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação. Em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma seqüência de desenvolvimento do zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA et al., 1999).

Segundo Teixeira (2001), a capacidade regenerativa do calo embriogênico espécies lenhosas não reduziu com a idade. Entretanto em alguns experimentos observou-se uma certa correlação positiva entre o envelhecimento dos calos embriogênicos e sua capacidade de regeneração, este fato também foi constatado por Marques (2005), quando a calosidade das anteras foi favorecida apenas aos 60 dias de cultivo "*in vitro*".

Por outro lado, vários autores têm demonstrado que os calos embriogênicos em cafeeiro podem ser obtidos a partir do cultivo dos explantes em um único meio contendo apenas citocinina (DUBLIN, 1981; YASUDA et al., 1985) ou com a associação de uma auxina e uma citocinina (DUBLIN, 1980; PIERSON et al., 1983), sem haver modificações na composição do meio, consistindo o sistema unifásico de cultivo. A composição do meio afeta a embriogênese somática, sendo que os meios com alta concentração salina têm sido utilizados com sucesso em várias espécies de plantas. Entretanto, vários trabalhos têm mostrado que tecidos embriogênicos de café são obtidos quando a concentração dos sais é reduzida à metade (BOXTEL, 1994), ou mesmo à quarta parte (YASUDA et al., 1985).

Vários trabalhos indicam que a melhor fase de desenvolvimento da antera é aquela em que o micrósporo foi recém liberado da tétrade meiótica até, no máximo, seu estádio

binucleado, pois nesta fase o micrósporo ainda possui características esporofíticas que permitem a diferenciação do grão de pólen em embrião (ANDRADE, 1998).

Trabalhos de microsporogênese em cafeeiro mostram que o tamanho ideal do botão floral para o desenvolvimento da antera varia entre 3 a 4 mm, correspondendo à fase uninucleada central (ASCANIO; ARCIA, 1994). Andrade (1998), verificando a correlação entre o tamanho do botão floral de algumas variedades de *C. arabica* e o micrósporo no estágio uninucleado, observou que o tamanho do botão contendo micrósporos no estágio ideal variava entre 4,50 a 5,50 mm. Entretanto, Araújo et al. (2002) verificaram, em uma população segregante F2 de *C. arabica*, que o estágio uninucleado do micrósporo correspondia àquele em que os botões florais apresentavam tamanho de 5,00 a 5,50 mm.

Em um trabalho com a finalidade de induzir a formação de calos e embriões a partir de anteras de *Coffea arabica* L. var. Garnica, Ascanio e Arcia, (1994), submeteram botões florais, com micrósporo uninucleados, mitóticos e binucleados, a um choque frio e suas anteras foram removidas assepticamente e cultivadas em um meio MS suplementado com reguladores de crescimento. Após duas semanas observou-se a formação de calos brancos, friáveis, os quais continham o complemento dihaplóide do cromossomo ($2X=22$) nas anteras com micrósporo uninucleados.

Com vistas à indução de calos em anteras de cafeeiro, explantes florais do arábica cultivar 'Rubi' e de uma população segregante F2, foram submetidos às diferentes concentrações de 2,4 D combinadas com cinetina e adicionadas ao meio de cultura "IC". A porcentagem de indução de calos e massa fresca de calos da população segregante, teve um valor aproximado de 32,18%, sendo que a combinação entre 1 mg.L^{-1} de 2,4-D e 8 mg.L^{-1} de cinetina promoveu a maior indução de calos. Já para a cultivar 'Rubi', a porcentagem de indução de calos e massa fresca de calos obteve um valor aproximado de 40%. Baseado nos dados os autores concluíram que, independente do material genético é necessária uma auxina juntamente com uma citocinina, e ainda que ambos os materiais respondem de forma diferente às concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D e cinetina na indução de calos em anteras (ARAÚJO, et al., 2004).

Segundo Silva (2003), anteras de *Coffea arabica* L. das cultivares Catuaí Vermelho 99 e 44 apresentaram melhores resultados quanto ao intumescimento, formação de calos e diâmetro quando a interação entre a auxina 2,4-D e a citocinina BAP, associando a incubação no escuro.

No entanto, Figueira (2005) trabalhando com anteras da cultivar Catuaí Vermelho 44, não conseguiu regeneração dos pró-embrióides, nas anteras das cultivares estudados

utilizando para este fim o nitrato de prata (AgNO_3) na concentração de $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e o ácido acetilsalicílico (AAS) nas concentrações de 0,0; 8,0; 16,0 e $32,0 \text{ mg.L}^{-1}$; bem como determinou que a associação de 2,4-D e BAP nas concentrações utilizadas, também não foram eficientes.

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 reduziu consideravelmente a contaminação causada por microorganismos. Ainda verificou-se 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} atuou favoravelmente na indução de calos.

Já Marques (2005) estudando o efeito dos reguladores de crescimento 2,4-D, TDZ, Cinetina, BAP, AIB, GA_3 e ANA na indução de calos em anteras de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44, teve como melhor resposta na formação de calos as combinações de 2 mgL^{-1} 2,4-D + 2 mgL^{-1} BAP, 2 mgL^{-1} Cinetina + 1 mgL^{-1} 2,4-D, 2 mgL^{-1} 2,4-D + $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ TDZ e 2 mg/L 2,4-D, quanto a resposta à indução de pró-embriões as melhores combinações foram: 2 mgL^{-1} 2,4-D + 2 mgL^{-1} BAP, 2 mgL^{-1} Cinetina + 1 mgL^{-1} 2,4-D, 2 mgL^{-1} 2,4-D + $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ TDZ.

Silva e Ferreira (2006) obtiveram resultados semelhantes à Marques (2005) com a utilização de BAP na indução à embriogênese somática em calos oriundos de anteras de café; os autores também não verificaram diferença significativa entre seus tratamentos quanto à variável diâmetro; mas ao contrário deste trabalho, eles tiveram embriões somáticos que posteriormente foram regenerados.

Quando as condições de cultivo são favoráveis, há regeneração de plantas completas haplóides ou duplo-haplóides. A formação de plantas duplo-haplóides requer uma duplicação do material genético celular, que pode ser espontânea e anterior às primeiras divisões celulares (HENRY, 1998) ou induzida por agentes antimitóticos, como a colchicina, ao final do processo (MORAES-FERNANDES et al., 1999). Entretanto, o estudo de mais de duzentas espécies de plantas mostrou que variações no número cromossômico, incluindo diploidia, poliploidia e aneuploidia, são comuns entre plantas androgênicas obtidas de um mesmo cultivo (HENRY, 1998).

No mundo, os trabalhos com melhores resultados quanto a regeneração foram os que trabalharam diretamente com os micrósporos e não com as anteras. Na Colômbia Herrera et al., (2002), trabalhando com micrósporos, cv Caturra, pré-tratados com colchicina, revelaram

que 95% das plantas regeneradas foram dihaplóides ($2n=2x=22$) entretanto, plantas com outros níveis de ploidia também foram obtidas sugerindo que não somente a indução androgenética, mas a duplicação cromossômica pode ser esperada como resultado da exposição à colchicina dos micrósporos. Em Portugal, Carneiro e Moura, em um trabalho sobre obtenção de plantas haplóides de *Coffea arabica* cv Catimor cultivaram micrósporos isolados de anteras, esses formaram haplóides por embriogênese direta, ou indireta via formação de calos.

Uma das linhas que está sendo explorada com o contínuo aumento dos estudos com o cultivo *in vitro* de vegetais é a composição e a influência de gases nos recipientes de cultivo, bem como a adição de componentes ao meio de cultura que influenciam na formação e ação destes gases, principalmente no que diz respeito à embriogênese (LUZ, 1995).

O etileno é um regulador de crescimento gasoso natural da planta, mais geralmente associado com maturação de fruta controlando frutos climatéricos. Seu uso na cultura de tecidos de planta não é difundido. Embora, apresenta um problema particular para a cultura *in vitro* de plantas. Algumas culturas de células da planta produzem o etileno, que, se produzido mais que o suficiente, pode inibir o crescimento e o desenvolvimento da cultura. O tipo de passagem do gás da cultura usado e os meios do fechamento afetam a troca gasosa entre a célula e a atmosfera exterior e assim os níveis do etileno apresentam-se na cultura (RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

O etileno é produzido em todas as células das plantas superiores que ocorrem nas regiões meristemáticas. Ele produz efeitos fisiológicos importantes e de grande aplicação comercial, mas no cultivo *in vitro*, a produção e ação desse gás nos recipientes de cultivo afetam diretamente a resposta do explante, sendo ela positiva ou negativa (PASQUAL et al., 2002); já que está envolvido em diversos processos fisiológicos nas plantas, tal qual as respostas a estresses ambientais bióticos e abióticos (YANG; HOFFMAN, 1984 ; WANG et al., 2002).

Por causa da ação negativa, há vários estudos sobre os inibidores do etileno, 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 glauca*, *Zea mays*, em alguns genótipos de *Brassica* e em *Daucus carota* (HATANAKA et al., 1995). O nitrato de prata a 5 mg.L⁻¹, também favoreceu a indução de embriões em anteras de *Capsicum annuum* L. (LUZ, 1995).

Muitos estudos conduzidos em laboratório e em campo sugerem que o ácido acetilsalicílico (AAS) é importante em muitas respostas biológicas de plantas, sendo que o

efeito na sua fisiologia é variável, promovendo alguns processos e inibindo outros (GUTIÉRREZ-CORONADO et al., 1998). Essa substância está envolvida ainda na resposta à estresses bióticos e abióticos (DE BLOCK; DE BROUWER, 2002). O AAS, quando adicionado ao meio de cultivo, também pode promover a embriogênese (LUZ et al., 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedimentos Gerais

O experimento foi instalado e conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, no período de agosto de 2007 a janeiro de 2008. Foi utilizado o genótipo de cafeeiro *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho 144 advindo do Programa de Melhoramento da Universidade Federal de Lavras, plantados na Fazenda experimental do Glória da Universidade Federal de Uberlândia.

Os botões florais foram coletados quando mediam entre 4,5 a 5,5 mm correspondendo à anteras contendo micrósporos uninucleados e foram desinfestados em álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos e dentro do fluxo laminar, com posterior lavagem tripla em água destilada e autoclavada.

As anteras foram retiradas com auxílio de pinças finas e bisturi, previamente autoclavados, sob luz de um microscópio estereoscópio em aumento de 40 vezes, e reunidas em placa de petri esterilizada, tomando-se o cuidado de não feri-las.

3.2 Concentrações de BAP e 2,4-D na indução de calos

As anteras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com citocinina BAP em diferentes concentrações (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) em combinação com diferentes concentrações da auxina 2,4-D (1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e o pH ajustado em 5,7, antes da autoclavagem. A incubação foi realizada em sala de crescimento sob condição de obscuridade, com temperatura de 26 ± 2°C.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em fatorial 4 (BAP) x 3 (2,4-D), com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por quatro tubos de ensaio contendo um explante por tubo. A avaliação realizada aos 90 dias após a inoculação foi executada por três avaliadores observando a porcentagem total de calos, porcentagem de calos embriogênicos e massa fresca dos calos.

Os dados obtidos do experimento foram submetidos à análise estatística, com aplicação do teste F a 5% de probabilidade. Para efeito da análise estatística, os dados

referentes à massa fresca de calos foram transformados em $\log(x+100)$ e todos os dados foram analisados por regressão polinomial, pelo programa Sisvar[®] (Ferreira, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na indução de calo em anteras do cafeeiro *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho 144 diferenças significativas em relação à produção de massa fresca foram encontrados em função da interação das concentrações de BAP e 2,4-D.

Na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP, os tratamentos seguiram uma tendência quadrática, em que a concentração de 2,7 mg L⁻¹ de 2,4-D correspondeu ao ponto máximo da curva, lembrando-se que para efeito da análise estatística, dos dados foram transformados em log (x+100), atingindo o máximo de massa fresca de 0,0304 gramas, de acordo com a equação derivada. Este comportamento quadrático indicou que concentrações acima e abaixo de 2,7 mg L⁻¹ tiveram tendência de redução da massa fresca de calo (Figura 1).

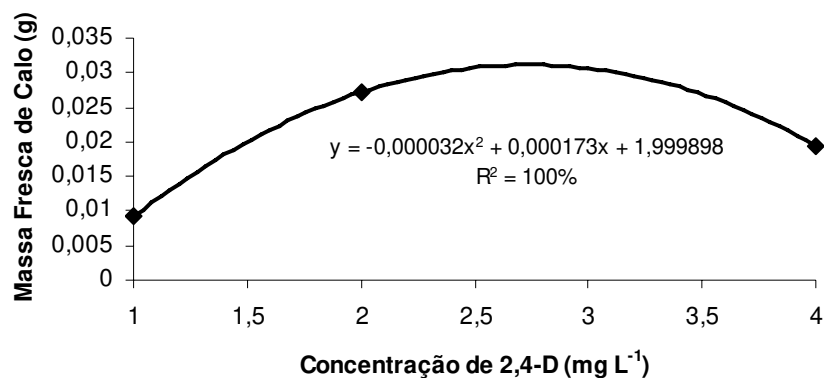


Figura 1. Massa fresca de calo de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho 144 em diferentes concentrações de 2,4-D mantidos na concentração de 2 mg L⁻¹ de BAP.

Na indução de calogênese o uso da auxina 2,4-D é freqüente. Santos (1999) verificou para anteras de soja que essa auxina é fundamental na fase de indução e que o uso associado com a citocinina BAP leva ao aumento das taxas de indução de calos. As auxinas atuam na inicialização da divisão celular e controla os processos de crescimento e alongação celular. O 2,4-D atua também no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros que decodificam proteínas para o crescimento, podendo induzir a uma desordenada proliferação celular (GEORGE, 1996).

Magalhães (2005), trabalhando com ápices caulinares de batata-doce, verificou que a maior produção de massa fresca de calo foi obtida em meio com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D. Silva (2003) utilizando *Catharanthus roseus* para obtenção de massa fresca de calo em maior

quantidade verificou também, que o uso de 2,4-D combinado com a cinetina (citocinina) proporcionou bons resultados. Isso mostra que a presença de uma citocinina tem grande influência no crescimento de tecido caloso em explantes confirmando os resultados do presente trabalho que é a combinação de 2,7 mg L⁻¹ de 2,4-D combinado com 2,0 mg L⁻¹ de BAP.

Com relação à porcentagem de calos totais a partir de anteras da cv. Catuaí Vermelho 144 de *Coffea arabica* L. no presente trabalho foram verificadas diferenças significativas em função da interação das concentrações de BAP e 2,4-D.

Na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP, os tratamentos seguiram uma tendência quadrática, em que a concentração de 2,25 mg L⁻¹ de 2,4-D correspondeu ao ponto máximo da curva, atingindo o máximo de calos em 98,36 %, de acordo com a equação derivada. Este comportamento quadrático indicou que concentrações acima e abaixo de 2,25 mg L⁻¹ tiveram tendência de redução do número de calos formados (Figura 2).

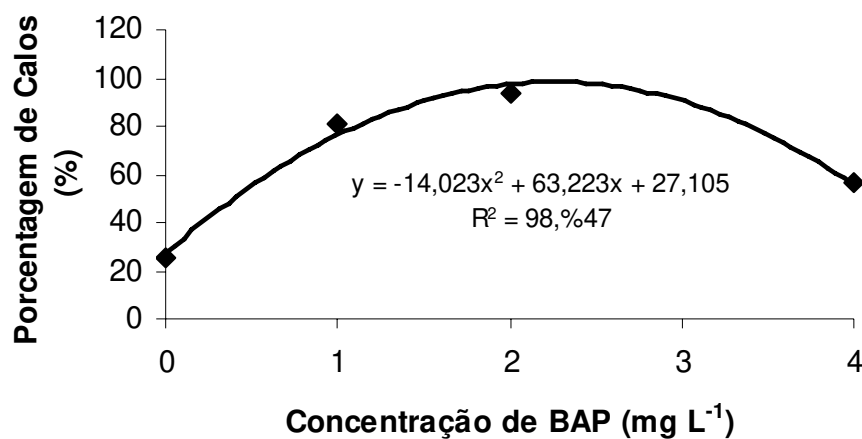


Figura 2. Porcentagem de calo de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho 144 em diferentes concentrações de BAP mantidos na concentração de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Silva (2007) testou a combinação de 2,4-D com AAS (ácido acetil salicílico) e Marques et al., (2005) testaram a combinação de 2,4-D com TDZ e ambos obtiveram o mesmo resultado. Em que ao adicionar isoladamente 2 mg L⁻¹ de 2,4-D no meio de cultivo, foi verificado a eficiência desta concentração para a formação de calos a partir de anteras de cafeeiro da cv. Catuaí Vermelho 44.

Marques (2006), trabalhando com a cv. Catuai Vermelho LCH-2077-2-5-44 da espécie *Coffea arabica* L. constatou que a combinação de auxina com citocinina (2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L⁻¹ de BAP) foi aquela que respondeu melhor na formação de calo, embora não diferindo estatisticamente das combinações de 2 mg L⁻¹ de Cinetina + 1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ TDZ, porém numericamente foi mais eficiente que as demais. Assim como também detectamos no presente trabalho a eficiência da combinação destes dois hormônios de crescimento.

Donato et al.(2000) trabalhando com Couve-comum verificou que as combinações entre 2,4-D e BAP, em que até mesmo na presença das mais reduzidas concentrações de BAP, como nos meios suplementados com 0,01 e 0,05 mg L⁻¹, os calos apresentavam melhor desenvolvimento. Os dados para a cv. Catuaí Vermelho 144 de *Coffea arabica* L. corroboram os este resultado, com ressalva para concentrações acima de 2,25 mg L⁻¹ de BAP em que ocorre um decréscimo na porcentagem de calos formados.

E para a indução de calos embriogênicos a partir do cultivo de anteras de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho 144 foi verificado diferenças significativas em relação porcentagem deste tipo de calo em função da interação das concentrações de BAP e 2,4-D.

Na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, os tratamentos seguiram uma tendência quadrática, em que a concentração de 2,31 mg L⁻¹ de BAP correspondeu ao ponto máximo da curva, atingindo o máximo de calos em 64,26 %, de acordo com a equação derivada. Este comportamento quadrático indicou que concentrações acima e abaixo de 2,31 mg L⁻¹ tiveram tendência de redução do número de calos embriogênicos formados (Figura 3).

Figura 3. Porcentagem de calo embriogênico de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho 144 em diferentes concentrações de BAP mantidos na concentração de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Magalhães (2005), trabalhando com ápices caulinares de batata-doce, verificou que a maior porcentagem de calos embriogênicos formados foram obtidos em meio com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D para as cvs. ‘92’; ‘94’; ‘188’; ‘449’; ‘594’; ‘White Star’; ‘Jewel’ favorecendo a maturação dos embriões somáticos.

Já para a cv. Catuaí Vermelho 144 de *Coffea arabica* L. a adição somente de 2,4-D para a obtenção de calos embriogênicos foi ineficiente com 4,21% de calos embriogênicos, valor muito baixo, porém com a adição da citocinina BAP houve um acréscimo significativo até a concentração 2,31 mg L⁻¹ que corresponde a 64,26%.

Bispo et al. (2007) verificou que para *Avena sativa* L. houve a influência do genótipo na frequência de calos embriogênicos onde a cultivar “OR3” produziu a mais alta frequência

deste tipo de calo (66,7%). Flores et al., (2006) também verificou que a formação de calos em *Pfaffia tuberosa* também foi induzida em 27% dos explantes foliares quando cultivados em meio com 1 mM de 2,4-D.

Em todos os trabalhos analisados constatou-se que o 2,4-D é importante para indução calos, e a combinação com o BAP proporciona um incremento significativo na obtenção de calos embriogênicos, ficou também constado nesse trabalho.

5 CONCLUSÕES

Nas condições descritas neste trabalho:

Para produção de massa fresca em anteras do cafeeiro *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho 144, recomenda-se o uso de meio MS acrescido de $2,7 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D combinado com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.

Com relação à porcentagem de calos totais a partir de anteras da cv. Catuaí Vermelho 144 de *Coffea arabica* L, recomenda-se o uso de meio MS acrescido de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $2,25 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D

Quanto à formação de calos embriogênicos formados a partir de anteras cv. Catuaí Vermelho 144 de *Coffea arabica* L recomenda-se o uso de meio MS acrescido $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e $2,31 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP .

Mas outros trabalhos deverão ser realizadas dentro da técnica de cultura de anteras, que se obtenha novos resultados e venha contribuir para a essa linha de pesquisa para que ocorra a obtenção de plântulas haplóides.

REFERÊNCIAS

- 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 Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.
- ARAÚJO, J. S. de.; PASQUAL, M.; PEDROZO, C. A.; TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C. Determinação do tamanho do botão floral para cultura de anteras do cafeeiro em população segregante F2. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 28., 2002, Caxambu. **Resumos....** Caxambu: EMBRAPA/CAFÉ, 2002b. p. 186.
- ARAÚJO, J. S. **Calogênese em anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L.** 2004. 41f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- ASCANIO, E.C.E.; ARCIA, M.A.M.. Efecto de un shock termico sobre la androgenesis en *Coffea arabica* L. var. Garnica. **Agronomia Tropical**. Maracay, v. 44, n. 2, p. 165-177,1994.
- BISPO, N. B.; GRANDO M. F.; AUGUSTIN L.; SUZIN M. Indução de embriogênese somática em diferentes explantes de aveia (*Avena sativa* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.890-893, Junho 2007.
- BHASKARAN S.; SMITH R. H. Regeneration in cereal tissue culture: a review. **Crop Science**, Madison, v.30, p.1328-1336, 1990.
- BOXTEL, J.H.J. **Studies on genetic transformation of coffee by using electroporation and the biolistic method**. Wageningen: [s.n.], 1994. 125 f. Tese (Ph.D.).
- CAIXETA, G. Z. T. Gerenciamento da cafeicultura em época de crise. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Viçosa, MG: DFT/UFV, 2001. p. 1-24.
- CHARRIER, A. La structure génétique des caféiers spontanés de la region malgache - Mascarocoffea Leurs relation avec les caféiers d'origine africaine (Eucoffea). **Memoires Orstnm**, Paris, v.87, p.87-223, 1978.
- DE BLOCK, M.; DE BROUWER, D. A simple and robust *in vitro* assay to quantify the vigour of oissed rape lines and hybrids. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris. v. 40, p845-852, Maio 2002.
- DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G. de.; CABRAL, J. B.; ALVES, G. D. Embriogênese somática in vitro em couve-comum. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília DF, v. 35, n. 4, p. 711 – 718, 2000.

DUBLIN, P. Embryogenèse somatic directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. **Café Cacao Thé**. Paris, v.25, n.4, p. 237-242, 1981.

DUBLIN, P. Inducton de bourgeons neoformés et embryogenése somatique : deux voies de multiplication vegetative *in vitro* de caféires cultivés. **Café Cacao Thé**, Paris, v. 24, n. 2, p. 121-130, 1980.

DUBLIN, P. Techniques de reproduction vegetative *in vitro* et amelioration génétique chez lez caféirs cultivés. **Café Cacao Thé**. Paris, v.28, n.4, p.231-244, 1984.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

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

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; VASCONCELLOS, N.J.S Indução de calos e aspectos morfogenéticos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.8, n.3, p.89-95, 2006.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1: the technology**. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GRANDO, M.F.; EICHLER, L.; TANABE, C.R.; SANTOS, J.F. dos; SANTOS, C.M. dos. Indução de calos e regeneração de plantas em três genótipos de aveia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.5, n. 2, p.139-144, 1993.

GUERRA, M.S. O uso de giemsa na citogenética vegetal: comparar entre coloração simples e bandeamento. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.37, n.2, p.190-193, 1983.

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, v. 2, 1999, 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 Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 36, n. 8, p. 563-565, 1998.

HATANAKA, T.; SAWABE, E.; AZUMA, T.; UCHIDA, N.; YASUDA, T. The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. **Plant Science**, Limerick, v. 107, n. 2, p. 199-204, June 1995.

HENDY, H.; POCHARD, E.; DALMASSO, A. Transmission héréditaire de la résistance aux nématodes *Meloidogyne chitwood* (Tylenchida) portée par 2 lignées de *Capsicum annuum* L.:

étude de descendances homozygotes issues d'androgenèse. **Agronomie**, Paris, v. 5, n. 2, p. 93-100, 1985.

HENRY, Y. Origin of microspore-derived dihaploid *in vitro* plants. **Plant Tissue Culture Biotechnology**. Paris, v.4, n.3-4, p.127-135. 1998.

HERRERA, J.C., MORENO, L.G., ACUÑA, M.P. de, OSORIO, D. 2002. Colchicine-induced microspore embryogenesis in coffee. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Dordrecht, v.71, p.89-92, 2002.

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

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

MARQUES, S.V. **Indução de calos em anteras de cafeeiro *coffea arabica* em função dos reguladores de crescimento 2,4 – D e TDZ**. 2006. 34f. Monografia (Graduação Agronomia)- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. de; STIVAL, A.L.; BRAMMER, S.P.; GRANDO, M.F. Haplodiploidização: genética e melhoramento. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1999. v.2, p.613-650.

NOGUEIRA R. C.; RENATO PAIVA R.; OLIVEIRA L. M. de; SOARES G. A.; SOARES F. P.; CASTRO A. H. F.; PAIVA P. D. O.; Indução de calos em explantes foliares de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**. , Lavras, v. 31, n. 2, p. 366 - 370, 2007.

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

PIERSON, E. S; VAN LAMMENRN, A.; SCHEL, J. H.; STARITSKY, G. *In vitro* development of embryoids from punched leaf disc of *Coffea canephora*. **Protoplasma**, Viena, v. 115, n. 2/3, p. 208-216, 1983.

RAMAGE, C.M., WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 38, p. 116-124, 2002.

RESENDE, M.; MACIEL, M. F.G.; PONCIANO, N.J.; RESENDE, A. A. M. **Novos desafios na metodologia de classificação e padronização da bebida café**. Viçosa, PNP/UFV, 2000. p 85.

SANTOS, E. K. DOS. **Androgênese em cultivares brasileiras de *Glycine max* (L.) Merr.** 1999. 96 f. Tese (Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

SHARP, W.R.; SONDAHL, M.; CALDAS, L.S.; MARAFFA, S.B. The physiology on in vitro assexual embryogenesis. **Horticultural Review**, New York, v.2, p.268-310, 1980.

SILVA, A. L. S.; MORAES-FERNANDES, M. I.; FERREIRA, A. G. Ontogenetic events in androgenesis of Brazilian barley genotypes. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 60, n. 2, p. 315-319, 2000.

SILVA R. L.; SOUSA C. M.; SANTOS R. P.; MIRANDA R. M.; Regeneração in vitro de explantes de segmentos nodais de *Catharanthus roseus* sob diferentes combinações de auxina e citocinina, **Agronomia**, Rio de Janeiro v.37, n.1, p. 50 – 54, 2003.

SILVA, A. S, **Indução de calos e embriogênese em anteras de *Coffea arabica* L.** 2007. 62f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

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. 15f. Monografia (Especialização em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia. **Palestra...** Goiânia: REDBIO, 2001. p. 110-113

TRISTÃO, J. Perspectivas do mercado interno brasileiro de café. In: CETCAF (Ed.). SIMPÓSIO ESTADUAL DO CAFÉ II. 1995, Vitória, ES, **Anais....** p. 36-42.

WANG, K. L., LI H, ECKER, J, R., Ethylene biosynthesis and signaling networks. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto v. 14, p. 131-151, 2002.

WANG, S. E., HOFFMAN, B. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto v. 35, p. 115-189, 1984.

YASUDA, T., FUJII, Y., YAMAGUCHI, T. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. **Plant Cell Physiology**., Kobe / Japan, v. 26, p. 595-597, 1985.