

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

LEANDRO DE OLIVEIRA LINO

**REGULADORES DE CRESCIMENTO NA FORMAÇÃO DE EMBRIÕES
SOMÁTICOS DE CAFEIEIRO *Coffea arabica***

**Uberlândia – MG
Junho – 2009**

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

LEANDRO DE OLIVEIRA LINO

**REGULADORES DE CRESCIMENTO NA FORMAÇÃO DE EMBRIÕES
SOMÁTICOS DE CAFEEIRO *Coffea arabica***

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

Co-orientadora: Tatiana Michlovska Rodrigues

**Uberlândia – MG
Junho – 2009**

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

LEANDRO DE OLIVEIRA LINO

**REGULADORES DE CRESCIMENTO NA FORMAÇÃO DE EMBRIÕES
SOMÁTICOS DE CAFEEIRO *Coffea arabica***

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 05 de junho de 2009.

Prof. Dra. Tatiana Michlovska Rodrigues
Co-orientadora

Rafael Nascimento
Membro da Banca

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz
Orientador

A minha avó Joana
Maria, pelo exemplo de
perseverança e
dedicação.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer essa conquista à Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Ciências Agrárias pela oportunidade de realizar este curso e por terem ampliado meus horizontes, à FAPEMIG e ao CNPq pela bolsa de iniciação concedida durante três anos de graduação, ao meu orientador José Magno pela confiança e paciência que mesmo em tempos difíceis tem me ajudado e à minha co-orientadora Tatiana Michlovska, pela paciência e pelo grande carinho em ensinar.

Aos meus professores pela contribuição direta e indireta em minha vida, dos quais nunca esquecerei Nelza de Castro, Marli Ranal, Denise Garcia, Marcos Vinícios, Mauro Batista, João Paulo, Julho César, Benjamim, Maurício, Paulo Bernardes.

Aos meus colegas de classe, em especial Juni Vicente que muito me ajudou durante esses cinco anos de graduação, sendo muitas vezes mais que um amigo e me ajudando como meu pai, irmão, orientador, colega de trabalho, sempre com muito humor e irreverência e aos tantos outros amigos de graduação não menos importantes e que também merecem ser citados aqui, sendo eles, Luciano Ferreira, Li Ataia, Gustavo de Paula, Suelen Arantes, Suelen Martins Vitor Boaventura, Murilo Borges, Mariele Naves e José Augusto.

Aos técnicos e laboratoristas Marco Aurélio, Sara, Adílio, Manoel, Márcia, a minha querida tia Valda, que sempre me ajudou com palavras acolhedoras e tranqüilizantes em nossas conversas na biblioteca.

Aos meus pais que mesmo a distancia me acompanharam, e por acreditarem em mim, mesmo com tom desafiador que muito me ajudou a construir meu senso crítico e me ensinou a ser perseverança, obrigado pelo amor e educação. Aos meus irmãos Fernando e Helder pela paciência e pelas horas de descontração.

Aos meus amigos do ônibus Daniele, Kamilla, Mônica, Rafael, Djane, Renato, que foram companheiros diários, com os quais dividi problemas e alegrias, angústias e anseios. Aos irmãos que eu escolhi para serem o meu histórico de vida, Fábio e Evanise.

Em fim a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram nessa conquista e a Deus que tem me amparado, iluminado e inspirado em todos os dias de minha vida.

RESUMO

Objetivou-se determinar a influencia de diferentes concentrações de cinetina, GA₃ e BAP na formação e regeneração de embriões somáticos a partir de calos provenientes de anteras de *Coffea arabica* L.. Foram utilizados no teste os reguladores de crescimento cinetina e GA₃, nas concentrações de 1, 2, 4 e 8 mg.L⁻¹ e 0,1; 0,2 e 0,4 mg.L⁻¹ respectivamente, sendo que o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, num total de doze tratamentos, com cinco repetições. Para testar os efeitos do BAP na diferenciação de embriões somáticos, calos primários foram transferidos para meio de cultura “MS” com 8 mg.L⁻¹ de ANA, 1 mg.L⁻¹ de AIB, 2 mg.L⁻¹ de GA₃ e 2 mg.L⁻¹ de cinetina, e quatro concentrações de BAP (1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg.L⁻¹). Cada concentração de BAP representou um tratamento com dez repetições, constituídas de frascos com trinta mililitros de meio e um calo por frasco. A maior porcentagem de calos embriogênicos foi obtida com 8 mg.L⁻¹ de cinetina + 0,2 mg.L⁻¹ de GA₃, os tratamentos com 2 mg.L⁻¹ cinetina + 0,4 mg.L⁻¹ de GA₃ ou 1 mg.L⁻¹ de cinetina + 0,2 mg.L⁻¹ de GA₃, foram os que apresentaram maior porcentagem de calos friáveis. Para o diâmetro dos calos, o tratamento com 8 mg.L⁻¹ de cinetina + 0,2 mg.L⁻¹ de GA₃ foi o tratamento que apresentou maior diâmetro médio. Independente das concentrações de BAP, os tratamentos não diferiram significativamente entre si, quanto à característica diâmetro dos calos. Não houve formação de embriões somáticos nas circunstâncias citadas neste trabalho.

Palavras Chave: micropropagação, androgênese, cultura de tecidos, biotecnologia vegetal.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate the influences of the different concentrations of kinetin, GA₃ and BAP in the formation and regeneration of somatic embryos from calluses from coffee tree anthers, *Coffea arabica* L.. Were used the growth of regulators kinetin and GA₃, in the concentrations of 1, 2, 4 and 8 mg.L⁻¹ and 0,1; 0,2 and 0,4 mg.L⁻¹ respectively. The used delineation were entirely random (DIC), in a total of twelve treatments, with five repetitions. To test the effect of the BAP in the differentiation of somatic embryos, they were transferred to “MS” medium of culture supplied with, 8 mg.L⁻¹ de ANA, 1 mg.L⁻¹ of AIB, 2 mg.L⁻¹ of GA₃ and 2 mg.L⁻¹ de kinetin, and four concentrations of BAP (1,0; 1,5; 2,0 and 2,5 mg.L⁻¹). Each concentration of BAP represents a treatment with ten repetitions, consisting of bottles with thirty milliliters of medium and a callus of bottles. The biggest percentage of embryogenic calluses was gotten with 8 mg.L⁻¹ of kinetin + 0,2 mg.L⁻¹ of GA₃, the treatments with 2 mg.L⁻¹ kinetin + 0,4 mg.L⁻¹ of GA₃ or 1 mg.L⁻¹ of kinetin + 0,2 mg.L⁻¹ of GA₃, had been the ones that had presented greater percentage of friable calluses, for the diameter of the calluses the treatment with 8 mg.L⁻¹ of kinetin + 0,2 mg.L⁻¹ of GA₃ was the treatment that presented greater average diameter. Independent from the BAP concentrations, the treatments do not differ significantly between itself for to the feature diameter of the calluses. It did not have formation of somatic embryos in the circumstances cited in this work.

Key Words: micropropagation, androgenesis, culture, vegetal biotechnology.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 8 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 10 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 13 |
| 3.1 Procedimentos Gerais..... | 13 |
| 3.1.1 Influência de diferentes concentrações de cinetina e ácido giberélico (GA ₃) na indução e regeneração de embriões..... | 13 |
| 3.1.2 Concentrações de BAP, ANA, AIB, GA ₃ e cinetina, na diferenciação de embriões somáticos..... | 14 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 15 |
| 4.1 Influência de cinetina e ácido giberélico (GA ₃) na indução e regeneração de embriões..... | 15 |
| 4.2 Concentrações de BAP, ANA, AIB, GA ₃ e cinetina, na diferenciação de embriões somáticos..... | 18 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 20 |
| REFERÊNCIAS..... | 21 |

1 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 10 milhões de pessoas envolvidas direta ou indiretamente com este agronegócio. Além do aspecto econômico, a atividade apresenta ainda relevada importância social na geração de empregos e fixação 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, tem sido fornecido aos produtores variedades melhoradas, adaptadas às diferentes regiões cafeeiras e aos sistemas de cultivo, com elevada produtividade de grãos (ARAÚJO, 2004).

O melhoramento do cafeeiro *Coffea arabica*, é realizado através de métodos convencionais, por meio de hibridações seguidas de seleção de populações segregantes pelo método genealógico, findando com a obtenção de linhagens, o que leva aproximadamente trinta anos. Este tempo pode ser reduzido através da obtenção de haplóides em gerações segregantes.

Devido ao cafeeiro ser uma espécie perene, de ciclo longo e porte arbustivo, as práticas de melhoramento genético são dificultadas principalmente pelo tempo e pela extensão da área experimental necessários ao desenvolvimento das variedades (ALMEIDA et al., 2000).

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

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

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito das concentrações de cinetina e ácido giberélico (GA₃) acrescido de ácido naftaleno acético (ANA) para regeneração ou formação de embriões e diferentes concentrações de BAP, em meio de cultura suplementado com ANA, AIB, GA₃ e cinetina, na diferenciação de embriões somáticos de cafeeiro *Coffea arabica*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A metodologia de multiplicação de *Coffea arabica* mais promissora é a embriogênese somática (TEIXEIRA, 2001) e tem demonstrado ser o melhor método de multiplicação em grande escala, apresentando um grande potencial a ser explorado e capaz de maximizar a propagação do cafeeiro, tanto de cultivares já recomendadas para plantio como de híbridos vindos de programas de melhoramento genético (MACIEL et al., 2003).

A técnica consiste em cultivar anteras imaturas em meio de cultura apropriado e sob condições ambientais adequadas, para desviar a rota normal de desenvolvimento dos micrósporos, levando-os a formar células vegetativas ao invés de micrósporos (GEORG; SHERRINGTON, 1984). O meio de Murashige e Skoog (1962) é o mais usado na maioria das espécies. Especificamente, os reguladores de crescimento constituem no fator mais importante no sucesso desta técnica.

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

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. 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).

No que se refere aos reguladores de crescimento ou fitohormônios, as auxinas e as citocininas representam os dois principais grupos de reguladores. As auxinas são responsáveis pelo crescimento vegetal (podem também inibir o crescimento, dependendo da concentração na qual aparecem no vegetal) e ainda podem ser responsáveis pela abscisão das folhas e pela formação dos frutos. As auxinas mais utilizadas para promover a androgênese são: o 2,4-D

(ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), ANA (ácido nafetalenoacético), AIA (ácido indolil-3-acético) e o AIB (ácido indolil-3-butírico).

Outras auxinas como picloram (ácido 4-amino-3, 5,6-Tricloropicolínico), 4-CPA (ácido 4-clorofenoxiacético) e o 2,4,5-T (ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético), são usados em alguns casos na fase inicial da indução (CALDAS et al., 1999). Estas são aplicadas na fase de estabelecimento da cultura para suprir os teores endógenos dos explantes (ANDRADE, 1998).

As citocininas são reguladores vegetais que participam ativamente dos processos de divisão e diferenciação celular, sendo a 6-benzilaminopurina (BAP) umas das mais utilizadas.

As giberelinas diminuem a produção de etileno, ao contrário das citocininas que aumentam a produção, mas com menor efeito quando comparado com as auxinas (LUZ, 1995).

Com vistas á indução de calos em anteras de cafeeiro, explantes florais de *Coffea arabica* de uma população segregante F2, foram submetidos às diferentes concentrações de 2,4-D combinadas com cinetina e adicionadas ao meio de cultura para indução de calos. A porcentagem de indução de calos e peso da matéria 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 peso da matéria 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., 2002).

O balanço de auxinas e citocininas em alto e baixo favorecem o enraizamento e o balanço inverso promove a formação de parte aérea, respectivamente. Concentrações iguais promovem a produção de calos. A auxina 2,4-D é bastante usada para a indução de calos e tem o efeito de supressão da morfogênese. As auxinas 2,4-D e ANA são sintéticas e têm efeitos semelhantes às auxinas de ocorrências naturais, sendo mais estáveis à degradação. A auxina 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) e o picloran induzem a formação de calos em monocotiledôneas (AMMIRATO, 1993). As auxinas são termo-estáveis, não decompõem quando autoclavadas. O AIA é a auxina natural e a menos estável, sendo destruído em pH baixo (GUERRA; NODARI, 2006).

Segundo Silva (2003), anteras de *Coffea arabica* L. das cultivares Catuaí Vermelho 99 e 44 apresentaram melhores resultados quanto ao intumescimento, formação e diâmetro de

calos quando há a interação entre a auxina 2,4-D e a citocinina BAP, associando a incubação no escuro.

Já Marques (2005), estudando o efeito dos reguladores de crescimento 2,4-D, TDZ, cinetina, BAP, AIB, GA₃ 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 mg.L⁻¹ 2,4-D + 2 mg.L⁻¹ BAP, 2 mg.L⁻¹ cinetina + 1 mg.L⁻¹ 2,4-D, 2 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.L⁻¹ TDZ e 2 mg.L⁻¹ 2,4-D, quanto à resposta à indução de pró-embriões as melhores combinações foram: 2 mg.L⁻¹ 2,4-D + 2 mg.L⁻¹ BAP, 2 mg.L⁻¹ cinetina + 1 mg.L⁻¹ 2,4-D, 2 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ.

Silva e Ferreira (2003) obtiveram resultados semelhantes ao deste trabalho 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).

A contaminação também pode ser um fator limitante na cultura de anteras, (ARAÚJO, 2004) analisando a calogênese em anteras oriundas de uma população segregante F2 de *Coffea arabica* L., concluiu-se que a presença de fungicida e bactericida adicionados ao meio de cultura reduz consideravelmente a contaminação causada por microorganismos.

No Brasil, o *Coffea arabica* apresenta alguns progressos com relação à aplicação da cultura de anteras, porém sem grande sucesso com relação à regeneração de plantas e neste contexto, é evidente que são necessários estudos criteriosos dos fatores que possam influenciar a resposta das anteras das espécies em que a técnica não foi bem sucedida. Entre estes estudos, os mais importantes são o genótipo do material a ser cultivado, o estágio ideal do explante, as condições de cultivo, idade das plantas doadoras, meio de cultura e condições físicas da cultura pré e pós-inoculação (MORAES FERNANDES, 1990). Especificamente, os reguladores de crescimento constituem no fator mais importante no sucesso desta técnica.

Os progressos obtidos com relação à aplicação da cultura de anteras, porém sem grande sucesso com relação à regeneração de plantas, tornou-se evidente que a cultura de anteras, necessita de estudos criteriosos dos fatores que possam influenciar a resposta das anteras cultivadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedimentos Gerais

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, MG. Foi utilizado cultivares de cafeeiro *Coffea arabica* L.: Catuaí Vermelho 99, plantados na Fazenda experimental do Glória da Universidade Federal de Uberlândia.

Os botões florais foram coletados pela manhã e medidos com um paquímetro com tamanho de 4,5mm a 5,5mm que correspondem a anteras contendo micrósporos uninucleados e foram desinfestados em solução de álcool 70% (v/v) por trinta segundos e solução de hipoclorito de sódio 1% de cloro ativo por quinze minutos, mantido em agitação e em fluxo laminar, com posterior lavagem tripla em água destilada e autoclavada.

As anteras foram retiradas com auxílio de pinças finas e bisturi, previamente esterilizados, sob luz de um microscópio estereoscópio em aumento de quarenta vezes, e inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar, suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, por ser este o tratamento que apresentou melhores resultados em experimentos anteriores para indução de calos. Foi tomado o cuidado de não ferir as anteras e aquelas danificadas foram descartadas.

3.1.1 Influência de diferentes concentrações de cinetina e ácido giberélico (GA₃) na indução e regeneração de embriões

Os calos foram transferidos para os meios de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar e foram testados diferentes concentrações de cinetina e ácido giberélico (GA₃). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, num fatorial 4x3, sendo o primeiro fator as concentrações de cinetina (CIN) (1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹) e o segundo fator concentrações de ácido giberélico

(GA₃) (0,1; 0,2 e 0,4 mg.L⁻¹), num total de doze tratamentos, com cinco repetições, sendo cada repetição composta por três tubos, contendo um calo por tubo, num total de 180 tubos.

Os calos permaneceram em sala de crescimento sob condições de obscuridade, com temperatura de 26°C. As avaliações foram realizadas oitenta dias após a instalação do experimento, analisando as seguintes características: porcentagem de calos embriogênicos (CE), porcentagem de calos friáveis (CF), e diâmetro de calos (cm).

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização do programa SISVAR para a comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.1.2 Concentrações de BAP, ANA, AIB, GA₃ e cinetina na diferenciação de embriões somáticos

Calos primários, obtidos de anteras em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 1 mg.L⁻¹ BAP, foram, transferidos para meio de cultura MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar, 8 mg.L⁻¹ de ANA, 1 mg.L⁻¹ de AIB, 2 mg.L⁻¹ de GA₃ e 2 mg.L⁻¹ de cinetina, e foram testados quatro concentrações de BAP (1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg.L⁻¹). Cada tratamento composto por dez repetições, constituídas de frascos com 30mL de meio e um calo por frasco, totalizando quarenta frascos que permaneceram em sala de crescimento com temperatura de 26°C, sob condições de obscuridade até o fim do experimento. Após 112 dias foram avaliados o diâmetro e a porcentagem de calo com formação de embriões somáticos. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização do programa SISVAR (FERREIRA, 2000) para a comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Influência de cinetina e ácido giberélico (GA₃) na indução e regeneração de embriões

A maior porcentagem de calos embriogênicos, aos oitenta dias, foi obtida em meio de cultura com a combinação de 8 mg.L⁻¹ de cinetina + 0,2 mg.L⁻¹ de GA₃ obtendo 73% de calos embriogênicos, seguido do tratamento com 1 mg.L⁻¹ de cinetina + 0,1 mg.L⁻¹ de GA₃ com 47% de calos embriogênicos (Tabela 1). Pereira et al, (2007) trabalhando com embriogênese somática direta em explantes foliares de café *Coffea arabica* L. cv. Acaiá Cerrado obteve o maior número de embriões somáticos, ao trabalhar com concentrações de 5,6 mg.L⁻¹ de cinetina combinada com 10 mg.L⁻¹ de GA₃, porém ao aumentar a concentração de GA₃ para 10 mg.L⁻¹ e 20 mg.L⁻¹ e reduzir a concentração de cinetina para 6 mg.L⁻¹, os autores verificaram uma redução na formação de embriões, por fim, descobriram que o número de embriões somáticos era sempre menor em tratamentos com ausência de cinetina em todas as concentrações de GA₃.

De uma forma geral a maior concentração de cinetina, 8 mg.L⁻¹, associadas com 0,1 mg.L⁻¹; 0,2 mg.L⁻¹ e 0,4 mg.L⁻¹ de GA₃ promoveram 30% de calos embriogênicos, em quanto que baixas concentrações de cinetina, 1 mg.L⁻¹, associadas com 0,1 mg.L⁻¹ e 0,2 mg.L⁻¹ de GA₃ promoveram 47% a 40% de calos embriogênicos, demonstrando a especificidade das interações desses fitoreguladores na embriogênese, não havendo um sinergismo entre doses crescentes, nem antagonismo.

É evidente a importância da cinetina tanto para a formação de embriogênese somática direta em explantes foliares quanto para formação de calos embriogênicos a partir de anteras.

Quanto à importância das giberelinas (GA₃), sabe-se que são responsáveis pela regulação do crescimento através da redução do potencial osmótico e potencial hídrico da célula do embrião, resultando na absorção de água e no aumento do potencial de pressão necessário para o alongamento celular, porém pouco se sabe sobre sua ação em cultura de calos haplóides. Poucas culturas *in vitro* mostram respostas às giberelinas (CALDAS et al., 1998).

As concentrações intermediárias de cinetina 2 mg.L^{-1} e 4 mg.L^{-1} associadas com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 foram as que apresentaram as menores porcentagens de calos embriogênicos, com valores abaixo de 27%, sendo o tratamento com 1 mg.L^{-1} de cinetina + $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 , com 7% de calos embriogênicos, o tratamento que apresentou a menor porcentagem. A porcentagem de formação dos calos embriogênicos para cada tratamento está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1: Porcentagem de Calos Embriogênicos (CE) formada por tratamento.

| Tratamentos | (CE) % |
|--|-------------------|
| 8 mg.L^{-1} CIN+ $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ GA_3 | 73,0 ^a |
| 1 mg.L^{-1} CIN+ $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ GA_3 | 47,0 ^b |
| 1 mg.L^{-1} CIN+ $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ GA_3 | 40,0 ^c |
| 8 mg.L^{-1} CIN+ $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ GA_3 | 33,0 ^d |
| 8 mg.L^{-1} CIN+ $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ GA_3 | 33,0 ^d |
| 2 mg.L^{-1} CIN+ $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ GA_3 | 27,0 ^e |
| 4 mg.L^{-1} CIN+ $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ GA_3 | 27,0 ^e |
| 2 mg.L^{-1} CIN+ $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ GA_3 | 20,0 ^f |
| 2 mg.L^{-1} CIN+ $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ GA_3 | 13,0 ^g |
| 4 mg.L^{-1} CIN+ $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ GA_3 | 13,0 ^g |
| 4 mg.L^{-1} CIN+ $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ GA_3 | 7,0 ^h |
| 1 mg.L^{-1} CIN+ $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ GA_3 | 7,0 ^h |

Números seguidos de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nos tratamentos em que foram submetidos a concentrações de 1 mg.L^{-1} de cinetina, combinados com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 , esperava-se uma menor porcentagem de calos embriogênicos devido a interação das citocinina com a auxina já existente ou produzida pelo calo, uma vez que foi utilizada na fase de indução 2 mg.L^{-1} de 2,4-D. Segundo Skoog e Miller (1975) a formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação de auxinas e citocininas.

Em cultura de tecidos de plantas a presença de auxina e citocinina em doses próximas levam a totipotência, ou seja as células permanecem ativamente em divisão celular com pouca diferenciação e conseqüentemente baixas taxas de formação de embriões, provavelmente este resultado possa ser explicado pela decomposição do 2,4-D, ou até mesmo a forma em que ele é difundido pelas células, provavelmente o transporte da auxina em calos haplóides é polar do ápice para a base, assim a maior concentração de auxina situa-se na base de calo, permitindo

a diferenciação das células mais periféricas formando então calos embriogênicos mesmo em baixas concentrações de a citocininas.

Contudo deve-se dar um enfoque maior e novos testes no sentido de proporcionar melhores avaliações do estado de organização interna dos calos que pode ser feito através de observações histológicas.

Para a porcentagem de calos friáveis os tratamentos que apresentaram a maior porcentagem de calos friáveis foi encontra da nos tratamentos com 2 mg.L⁻¹ cinetina + 0,4 mg.L⁻¹ de GA₃ e 1 mg.L⁻¹ de cinetina + 0,2 mg.L⁻¹ de GA₃, nos quais foram obtidos 53% de calos friáveis, seguidos do tratamento com 8 mg.L⁻¹ de cinetina + 0,2 mg.L⁻¹ de GA₃, com 40%. Valores extremos ao tratamento, com 1 mg.L⁻¹ e 8 mg.L⁻¹ de cinetina, associados com 0,1 mg.L⁻¹ e 0,4 mg.L⁻¹ de GA₃ apresentaram média de 33% e 27%, respectivamente.

Os menores valores foram obtidos para os tratamentos com 2 mg.L⁻¹ e 4 mg.L⁻¹ de cinetina associadas com 0,1 mg.L⁻¹, 0,2 mg.L⁻¹ e 0,1 mg.L⁻¹, 0,2 mg.L⁻¹ e 0,4 mg.L⁻¹ de GA₃, respectivamente, com 20% de calos friáveis, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Porcentagem de Calos Friáveis (CF) por tratamento.

| Tratamentos | (CF) %. |
|---|-------------------|
| 2 mg.L ⁻¹ CIN+0,4 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 53,0 ^a |
| 1 mg.L ⁻¹ CIN+0,2 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 53,0 ^a |
| 8 mg.L ⁻¹ CIN+0,2 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 40,0 ^b |
| 1 mg.L ⁻¹ CIN+0,4 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 33,0 ^c |
| 1 mg.L ⁻¹ CIN+0,1 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 33,0 ^c |
| 8 mg.L ⁻¹ CIN+0,1 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 27,0 ^d |
| 8 mg.L ⁻¹ CIN+0,4 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 27,0 ^d |
| 2 mg.L ⁻¹ CIN+0,1 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 20,0 ^e |
| 4 mg.L ⁻¹ CIN+0,2 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 20,0 ^e |
| 4 mg.L ⁻¹ CIN+0,4 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 20,0 ^e |
| 2 mg.L ⁻¹ CIN+0,2 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 20,0 ^e |
| 4 mg.L ⁻¹ CIN+0,1 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 0,0 ^f |

Números seguidos de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A friabilidade dos calos nas fases iniciais de indução é desejada, porém em excesso compromete a qualidade dos calos embriogênicos e conseqüentemente pode até mesmo reduzir o número de embriões somáticos, devido a ausência de uma massa celular densa e organizada.

Calos friáveis são originados de concentrações iguais ou próximas de auxinas e citocininas, porém o fator genético parece ser o mais importante do que até mesmo fatores exógenos, pois as diferenciações dos calos ocorrem concomitantemente ao processo de indução, em que anteras provenientes de diversas plantas são inoculadas nas mesmas condições de obscuridade, temperatura, atmosfera e nas mesmas composições do meio de cultura, com respostas diferentes para a friabilidade.

Para o diâmetro dos calos o tratamento com 8 mg.L⁻¹ de cinetina + 0,2 mg.L⁻¹ de GA₃, foi o tratamento que apresentou maior diâmetro seguido de 8 mg.L⁻¹ de cinetina + 0,1 mg.L⁻¹ de GA₃, sendo o tratamento com 2 mg.L⁻¹ de cinetina + 0,1 mg.L⁻¹ de GA₃ o que obteve o pior resultado, como mostrado na Tabela 3.

Os demais tratamentos diferiram pouco entre si quanto ao diâmetro médio dos calos, sendo distinguido diferenças apenas pela análise estatística, não sendo encontrado nenhuma relação entre o diâmetro e a porcentagem de calos embriogênicos (CE) e nem com a porcentagem de calos friáveis, como pode ser visto em todas as tabelas.

Tabela 3: Diâmetro Médio dos Calos (DMC) para cada tratamento.

| Tratamento | (DMC) mm |
|---|-------------------|
| 8 mg.L ⁻¹ CIN+0,2 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 5,77 ^a |
| 8 mg.L ⁻¹ CIN+0,1 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 5,33 ^b |
| 2 mg.L ⁻¹ CIN+0,4 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 5,20 ^c |
| 1 mg.L ⁻¹ CIN+0,1 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 5,17 ^d |
| 4 mg.L ⁻¹ CIN+0,2 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 4,93 ^e |
| 1 mg.L ⁻¹ CIN+0,2 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 4,80 ^f |
| 4 mg.L ⁻¹ CIN+0,4 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 4,43 ^g |
| 1 mg.L ⁻¹ CIN+0,4 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 4,20 ^h |
| 8 mg.L ⁻¹ CIN+0,4 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 4,20 ^h |
| 4 mg.L ⁻¹ CIN+0,1 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 4,15 ⁱ |
| 2 mg.L ⁻¹ CIN+0,2 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 3,85 ^j |
| 2 mg.L ⁻¹ CIN+0,1 mg.L ⁻¹ GA ₃ | 3,73 ^l |

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

4.2 Concentrações de BAP, ANA, AIB, GA₃ e cinetina, na diferenciação de embriões somáticos

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização dos programas SISVAR (FERREIRA, 2000) para a comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, após 112 dias.

Não houve formação de embriões somáticos e os tratamentos não diferem estatisticamente entre si, quanto ao diâmetro do calo.

O que pode ser explicado pela perda da capacidade embriogênica comum em embriogênese indireta. Vários estudos têm demonstrado a importância da transferência imediata dos calos, após a sua formação para o meio de regeneração, a fim de evitar ou reduzir aberrações genéticas e maximizar a porcentagem de regeneração. (CHEN, 1986). Na cultura de anteras, vários são os fatores que afetam a eficiência do processo, determinando, muitas vezes, falta de reprodutibilidade dos resultados, desde genótipos responsivos a fatores fisiológicos e ambientais.

Segundo Uhrig (1977) e Chen (1986) a capacidade de formar calo ou embrióides é hereditária, e parece que essa resposta é controlada por um número limitado de genes nucleares.

Resultados semelhantes a este trabalho foram encontrados por Silva e Ferreira (2003) que ao trabalharem com anteras de cafeeiro em meio de cultura “MS” suplementado com ANA, cinetina, AIB, GA₃ e BAP, verificando que os tratamentos não diferiram significativamente entre si, quanto à característica diâmetro dos calos e obteve um baixo índice de respostas à formação de embriões somáticos ocorrendo em apenas dois tratamentos e em apenas cinco calos.

5 CONCLUSÕES

A cinetina e o GA₃ apresentam diferentes influências na indução e regeneração de embriões. Com a combinação de 8 mg.L⁻¹ de cinetina + 0,2 mg.L⁻¹ de GA₃, obteve-se 73% de calos embriogênicos.

A maior porcentagem de calos friáveis foi obtida com 2 mg.L⁻¹ cinetina + 0,4 mg.L⁻¹ de GA₃ e 1 mg.L⁻¹ de cinetina + 0,2 mg.L⁻¹ de GA₃, com 53% de calos friáveis.

Para o diâmetro dos calos o tratamento com 8 mg.L⁻¹ de cinetina + 0,2 mg.L⁻¹ de GA₃ foi o tratamento que apresentou maior diâmetro médio.

Independente das concentrações de BAP, os tratamentos não diferem significativamente entre si, quanto à característica diâmetro dos calos. Não houve formação de embriões somáticos nas circunstâncias citadas neste trabalho.

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.
- AMMIRATO, P. G. V. Embryogenesis, In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. G. V.; YAMADA, Y. (Ed.) **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMilam Publisher Company, v.1, p.123 - 127, 1993.
- ANDRADE, L.M.C.O. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica*)**. 1998. 86f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.
- ARAÚJO, J. S. de.; 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, 2002. p. 186.
- ARAÚJO, J.S.de. **Calogênese em anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L.** 2004. 41f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CALDAS, L.S., HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA, CNPH, 1999. V. 1, p. 87 – 132.
- CHEN, Y. The inheritance of rice pollen plant and its application in crop improvement. In: HU, H.; YANG, H. (Ed.). **Haploids of higher plants *in vitro***. Berlin: Springer-Verlag, 1986. p.118-130.
- FERREIRA, D.F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000. (SISVAR 4. 1. pacote computacional). Disponível em www.ufla.br

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.

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

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-CNPH, v. 2, 1999, p. 533-568.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **APOSTILA DE BIOTECNOLOGIA.** Florianópolis, SC. CCA/UFSC, 2006, 41 p.

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

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

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

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.

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 culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473 – 497, 1962.

PEREIRA, A R.; CARVALHO, S.P.; PASQUAL, M.; SANTOS, F.C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. acaíá cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, 332-336, 2007.

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, CNPH, 1999. v.2, p. 569 – 611.

RIBEIRO, A. O. Definição de meio de cultura para morfogênese indireta em alface variedades Verônica e Maioba. 1999. 39f. **Monografia** (Especialização em Biotecnologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 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, H.E., FERREIRA, G.B. Efeito de diferentes concentrações de BAP na Indução de embriões somáticos em calos oriundos de anteras de café. In: CONGRESSO REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA – AVANÇOS E APLICAÇÕES, 2006, Uberlândia, **Anais...** Uberlândia: UFU, 2003. p. 38.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation plant tissue culture in vitro. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-140, 1957.

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

UHRIG, H. Genetic selection and liquid medium condition improve the yield of androgenetic plants from diploid potatoes. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 71, p.263-271, 1977.