

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

**INDUÇÃO DE CALOS EM ANTERAS DE *Coffea arabica* EM FUNÇÃO DE
DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO**

RAQUEL VIEGAS MARQUES

JOSÉ MAGNO QUEIROZ LUZ
(Orientador)

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

Uberlândia – MG
Março– 2006

**INDUÇÃO DE CALOS EM ANTERAS DE *Coffea arabica* EM FUNÇÃO DE
DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO**

APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA EM 08 / 03 / 2006

Prof. Dr. José Maqno Queiroz Luz
(Orientador)

Dr^a. 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	9
2.3. Cultura de anteras de cafeeiro	11
3- MATERIAL E MÉTODOS	16
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5- CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

RESUMO

Várias são as metodologias de cultura de tecidos que auxiliam os programas de melhoramento do cafeeiro. Uma delas é a cultura de anteras para a obtenção de plantas homozigotas que, através da duplicação do número de cromossomos, substitui as gerações de autofecundação, no processo usual, tendo grande valor nos programas de melhoramento. A composição do meio de cultura, incluindo os reguladores de crescimento, é de grande importância para o sucesso desta técnica. Neste sentido, foi conduzido no laboratório de Biotecnologia/Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Uberlândia o experimento que teve como objetivo avaliar os efeitos das combinações dos reguladores de crescimento, 2 mgL^{-1} 2,4-D + 2 mgL^{-1} BAP; 8 mgL^{-1} Cinetina + 1 mgL^{-1} AIB; 2 mgL^{-1} Cinetina + 1 mgL^{-1} 2,4-D; 2 mgL^{-1} Cinetina + 20 mgL^{-1} GA₃; 2 mgL^{-1} 2,4-D + $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ TDZ, 2 mgL^{-1} ANA e 2 mgL^{-1} 2,4D, em meio MS na indução de calos em anteras de *Coffea arabica*, cultivar Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44. O delineamento experimental foi de inteiramente casualizado, em esquema fatorial 7x2 (combinações de reguladores de crescimento e épocas de cultivo *in vitro*, respectivamente), com 4 repetições. As avaliações das variáveis contaminação, oxidação, intumescimento, calosidade e presença de pró-embrióides, foram feitas aos 30 e 60 dias após a inoculação das anteras. As combinações de reguladores de crescimento que melhor responderam à indução de calos, e com conseqüente formação de pró-embrióides, foram 2 mgL^{-1} 2,4-D + 2 mgL^{-1} BAP, 2 mgL^{-1} Cinetina + 1 mgL^{-1} 2,4-D e 2 mgL^{-1} 2,4-D + $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ TDZ, embora não diferindo estatisticamente da combinação 2 mgL^{-1} 2,4D aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

1- INTRODUÇÃO

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 novas cultivares (ANDRADE, 1998).

No Brasil, o *C. arabica* apresenta progressos com relação à aplicação da cultura de anteras, visto que, este país é o principal produtor mundial de café. Trabalhos como o de Pasqual (2002) que estabeleceu uma metodologia eficiente para regeneração de plantas dihaplóides, e de Figueira (2002) que estudou o efeito do pré-tratamento de botões florais e do regulador de crescimento 2,4-D na indução de embriões, ambos em anteras de cafeeiro;

comprovam os progressos com relação á esta cultura. Com isso objetivou-se com este trabalho avaliar, em diferentes épocas, 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*.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Aspectos gerais da cultura de tecidos

Na cultura de tecidos, a adição de hormônios no meio de cultura é de suma importância, pois reproduz o que ocorre naturalmente na planta. Combinações de dosagens dessas substâncias propiciam um melhor crescimento e desenvolvimento do explante (ANDRADE, 1998). Os reguladores de crescimento são substâncias orgânicas, que apresentam como função básica a sua ação sobre o crescimento e em alguns tipos de organogênese. Os principais grupos são as auxinas e citocininas. Dentre as auxinas tem-se o ácido indol - 3 - butírico (AIB) e o ácido 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4 - D). Com relação as citocininas, as mais usadas são a 6 - benzilaminopurina (BA, BAP) e a cinetina (KIN). O thidiazuron (TDZ) é um regulador de crescimento, derivado de uréia, sendo de composição química N-phenil-N'-1,2,3-thiadiazol-5-iluréia, com estrutura não contendo anel purínico, ao contrário do que acontece nas citocininas. Inicialmente este composto foi registrado como desfolhante de algodão e mais recentemente foi reportado como tendo ação citocinínica, e por isto, tem sido cada vez mais usado no cultivo *in vitro* (ANDRADE, 1998).

Poucas culturas *in vitro* mostram respostas às giberelinas. Já são conhecidas mais de sessenta giberelinas, como por exemplo o ácido giberélico (GA_3) e uma mistura de GA_3 + GA_7 , que se encontram disponíveis comercialmente. A resposta do tecido pode depender da utilização da giberelina apropriada para cada espécie e fase do desenvolvimento (CALDAS et al, 1998). Murashige (1965) observou um estímulo do crescimento de calo de fumo com concentrações de ácido giberélico entre $3 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ e $3 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; entretanto a giberelina inibiu a organogênese tanto na formação de partes aéreas quanto de raízes. No entanto, o GA_3 aumentou a porcentagem de embriões somáticos pequenos de *Citrus sinensis* que enraizaram *in vitro* (TORRES et al, 1999).

O ácido abscísico (ABA) é um inibidor de crescimento *in vitro*, no entanto, esse hormônio tem sido bastante utilizado para o desenvolvimento normal e maturação de embriões somáticos, evitando sua germinação precoce. Já o etileno é um regulador de crescimento em forma gasosa, produzido por células vegetais, até mesmo, por células *in vitro* (CALDAS et al, 1998).

Um dos meios básicos utilizados em diversas culturas é chamado de “MS”, em referência aos seus autores, Murashige e Skoog (1962). Um meio de cultura deve conter macro e microelementos, água, aminoácidos, vitaminas e reguladores de crescimento, podendo ainda ser líquido ou sólido através da adição de ágar (ANDRADE, 1998). Sua composição é de grande importância para o sucesso da cultura de anteras, não existindo contudo, uma recomendação generalizada. Na maioria das espécies a androgênese se verifica em meio que contém sais minerais, sacarose, vitaminas, reguladores de crescimento e ágar.

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).

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

A oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo e do tipo de explante utilizado, ou seja, explantes jovens em geral oxidam menos que os velhos. Tipos adequados de explantes retirados em épocas apropriadas podem apresentar um menor teor endógeno de fenóis nos tecidos e, com isto, minimizar a oxidação. Da mesma forma, menores danos físicos e químicos no momento da excisão e desinfestação podem contribuir para minimizar o problema (TEIXEIRA, 2001). Nogueira et al. (2003) afirma que a presença do regulador de crescimento TDZ no meio de cultura pode influenciar no processo de oxidação das anteras, baseado em trabalho com indução de brotações a partir de segmentos nodais de murici-pequeno, *Byrsonima intermedia*, inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de TDZ.

A adição de substâncias antioxidantes ao meio de cultura, tais como: carvão ativado, polivinilpirrolidene (PVP), ácido ascórbico e ácido cítrico diminuem consideravelmente a oxidação fenólica dos explantes (ANDRADE, 1998). Esta tem sido controlada também, em diferentes espécies lenhosas, através da redução da intensidade luminosa (MARKS;

SIMPSON, 1990), associada com a substituição freqüente do meio de cultura (TEIXEIRA, 2001).

Aliada à oxidação, outro problema enfrentado na fase inicial de estabelecimento do explante *in vitro* diz respeito à contaminação bacteriana e fúngica (TEIXEIRA, 2001). Para a realização da cultura de anteras, é necessária primeiramente a desinfestação do material vegetal. Os principais compostos utilizados são etanol e cloro, e o modo de ação do etanol consiste na rápida desnaturação protéica e dissolução de lipídios, tendo como desvantagem o fato de ser pouco ativo contra esporos fúngicos. O cloro inativa enzimas e age como oxidante, tem efeito sobre bactérias e sua desvantagem é o odor irritante e também sua baixa atividade contra esporos (PASQUAL et al., 2002).

2.2- Melhoramento do cafeeiro

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae, na qual o gênero *Coffea* abrange cerca de 60 espécies, entretanto, as espécies mais comuns são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, sendo que o café arábica corresponde a aproximadamente 70% do café comercializado no mundo (GRANER; GODOY JÚNIOR, 1967).

Segundo Andrade (1998) *Coffea arabica* L. é nativo da região sudoeste da Etiópia, Sudão e Quênia. No Brasil, foi introduzido em 1727 pelo Sargento Francisco de Mello Palheta em Belém do Pará, em seguida levado para o Maranhão e Bahia, e posteriormente levado para o Rio de Janeiro, expandindo-se para o Vale do Paraíba, Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná, Mato Grosso e Rondônia.

Apesar da tendência de crescimento em todos os países produtores, a participação brasileira na produção mundial de café gira em torno de 40%. A colheita da safra de 2004/05 atingiu 39.028 milhões de sacas. Contrastando com tal realidade, o Brasil, país líder na produção, é o segundo maior consumidor mundial atrás apenas dos Estados Unidos. Seu consumo equivale a aproximadamente 50% do total consumido por todos os outros países produtores (USDA/FNP).

Coffea arabica é considerada uma espécie nobre, com café de boa qualidade, possuindo mais de 40 mutantes e muitas variedades. É alotetraplóide com $2n = 2x = 44$ cromossomos e apresenta comportamento cromossômico semelhante ao das espécies diplóides. A taxa de fecundação cruzada é aproximadamente de 10%, o que é considerado no melhoramento genético, como espécie autógama (RAMALHO, 1999). Apresenta raiz pivotante curta e grossa e raízes secundárias ramificadas. O caule único e os ramos ortotrópicos podem dar origem às folhas e aos ramos plagiotrópicos. Os ramos plagiotrópicos dão origem às folhas e aos botões florais. Quando maduros, os frutos são drupas amareladas ou avermelhadas, possuindo superfície lisa, exocarpo delgado, mesocarpo carnoso e endocarpo fibroso. O endosperma possui uma película prateada, e na sua base aloja-se o embrião (GRANER; GODOY JÚNIOR, 1967).

Do cultivar originalmente introduzido, conhecido como Típica ou Nacional, passando pelas várias introduções e mutações já exploradas comercialmente, como o Bourbon Vermelho, o Sumatra, o Amarelo de Botucatu, o Maragogipe, o Caturra e tantas outras, até as modernas seleções de Mundo Novo, Catuaí, Icatu, Rubi, Obatã e Topázio, dentre outras, aumentou-se em pelo menos 300% o potencial produtivo do cafeeiro (MENDES, 1999).

De acordo com o mesmo autor, apenas com a seleção e a hibridação de plantas superiores conseguiu-se quadruplicar a produtividade de grãos dos nossos cultivares de cafeeiro. A partir da década de 1930, com a criação da Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), o cafeeiro passou a ser estudado e melhorado geneticamente em bases científicas e foi justamente a partir daí que ocorreram os maiores avanços, através do desenvolvimento de um vasto programa de genética e de melhoramento do cafeeiro, tendo realizado quase todos os estudos de café e lançado os mais importantes cultivares plantados nas várias regiões cafeeiras do Brasil e mesmo de outros países. Os estudos são concentrados na espécie *Coffea arabica*.

O melhoramento do cafeeiro *Coffea arabica*, tem sido feito através de métodos convencionais, os quais são muito morosos até se obter o material genético desejado. Este tempo pode ser reduzido através da obtenção de haplóides em gerações segregantes através da cultura de anteras. Além de os haplóides serem livres dos problemas de dominância e recessividade, por possuir apenas um alelo em cada loco gênico, permitem a rápida produção de plantas homozigóticas através da duplicação do número de cromossomos numa única etapa, substituindo as gerações de autofecundação, tendo grande valor nos programas de melhoramento no processo usual para obtenção de cultivares melhoradas de cafeeiro. (ANDRADE, 1998)

2.3- Cultura de anteras de café

A produção de haplóides pode ser obtida por diferentes técnicas como ginogênese, androgênese, tratamento químico, choque térmico e irradiação com raios X ou luz ultravioleta., e ainda, por técnicas *in vitro* (cultura de pólen isolado, protoplastos, eliminação

de cromossomos pela cultura de embriões jovens e paternogênese). No entanto, até o momento a melhor técnica *in vitro* para obtenção de haplóides é a cultura de anteras, pois nestas, os grãos de pólen estão em grande número, e podem desenvolver-se em haplóides por androgênese direta, dando origem a embriões, ou indireta, passando pela fase de calos (MORAES FERNANDES, 1990).

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 agrônomico. 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).

Silva et al. (2004) trabalhando com *Coffea arabica* L. cvs. Mundo Novo, Catuaí Vermelho 44 e 99, observaram que existe um sincronismo entre o desenvolvimento das anteras e do botão floral e este, está relacionado com os estádios de desenvolvimento dos micrósporos, ou seja, o diâmetro dos micrósporos evolui de acordo com o crescimento das anteras e do botão floral. O estágio ideal dos micrósporos que devem ser utilizados na cultura de anteras *in vitro* corresponde à fase onde estes ainda estejam de forma uninucleada central, quando os botões florais variam de 4,5 a 6,0 mm de comprimento.

Estudos têm demonstrado que o RNA ribossômico e de transferência do grão de pólen inativam-se 24 horas após a primeira mitose. Após este momento, não é mais possível reverter o desenvolvimento e a célula segue o seu caminho normal para a formação do grão de pólen. As células *in vitro*, quando em condições adequadas e antes de atingirem este ponto, seriam

capazes de originar embriões através do processo de embriogênese (MASCARENHAS, 1971; VASIL et al., 1979).

Segundo Sharp et al., (1973) existem dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática que ocorrem *in vitro*. O primeiro corresponde ao modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estádios intermediários de calos. O segundo padrão corresponde ao modelo no qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação (GUERRA, 1999). O calo é utilizado na maioria dos casos como estrutura intermediária, considerando algumas limitações, como por exemplo, nem todos os tipos de calos formados irão regenerar plantas e calos mantidos por longos períodos poderão perder progressivamente a capacidade de regenerar plantas (PASQUAL, 1985).

Duas abordagens gerais têm sido adotadas na tentativa de aumentar a resposta à cultura de anteras. A primeira envolve a seleção de genótipos responsivos e a incorporação destes nos programas de melhoramento. A segunda abordagem tem procurado identificar fatores fisiológicos e ambientais que tenham influência sobre a resposta das anteras cultivadas *in vitro*. Dentro das abordagens descritas, diferentes fatores interagem, determinando a eficiência da androgênese, tais como a fisiologia da planta doadora, pré-tratamentos, a composição do meio de cultura, fatores físicos, as condições de cultura, o genótipo da planta doadora e o estágio de desenvolvimento dos micrósporos (PETERS et al., 1999).

Luz (1995) afirma que a capacidade androgenética de uma planta é influenciada pelo estado fisiológico desta durante o seu cultivo, e no momento da retirada de suas anteras, onde as variações ambientais também exercem uma grande influência. Além disso para indução de

calos de anteras de cafeeiro, Maciel (2001); Palú (2002) afirmam que, é necessária a adição de uma auxina juntamente com uma citocinina em meio de cultura. Dentre as auxinas sintéticas, o 2,4-D é sem dúvida a mais adequada à indução e manutenção do calo (GAMBORG et al., 1976).

De acordo com Palú et al. (2002), 2mg.L^{-1} de 2,4-D foi a concentração que melhor induziu a formação de calos em anteras de cafeeiro. Secundino et al. (2005) trabalhando com o regulador de crescimento 2,4-D combinado com diferentes concentrações de AAS (Ácido Acetil Salicílico), constatou que 2mg.L^{-1} da auxina e 0 mgL^{-1} de AAS respondeu bem à indução de calos em anteras de cafeeiro da cultivar Catuaí Vermelho 44 em ausência de luz. Este resultado confirma o proposto por Marques et al., (2005), onde a combinação de 2 mgL^{-1} de 2,4-D e 0 mgL^{-1} de TDZ proporcionou uma maior formação de calos para esta mesma cultivar porém na presença de luz.

Em outro trabalho com *C. arabica*, cultivar Catuaí Vermelho 99, os resultados mostraram que para que ocorra intumescimento das anteras, formação e aumento do tamanho dos calos é necessário que haja interação entre a auxina (2,4-D) e a citocinina (BAP). (SILVA., et al 2003)

Já Rocha (1998) afirma que a indução e manutenção do calo, para a maioria das espécies parece comportar-se diferentemente em relação aos reguladores de crescimento, podendo ocorrer independentemente de auxinas e citocininas, dependente de ambas, ou dependente de uma ou de outra.

Vários autores citam a importância dos pré-tratamentos para a androgênese e que a pré-incubação em baixas temperaturas é benéfica para muitas espécies, como por exemplo para o arroz, o qual é pré-incubado a 8°C , o que proporciona uma maior viabilidade do grão de pólen,

ativando algumas enzimas e posterior formação de calos (MARTINEZ et al., 1989). Silva et al. (2003) constatou que o pré-tratamento por choque frio é o mais eficiente na indução de calos no cultivo *in vitro* de anteras de *Coffea arabica* L.

Apesar de experimentos envolvendo cultura de anteras serem realizados desde 1973 (SHARP et al., 1973), resultados de regeneração de plantas foram conseguidos somente em 1987 (ASCANIO et al., 1987). Porém, em alguns experimentos a técnica não se mostra adequada visto que vários fatores podem influenciar na resposta das anteras cultivadas.

3- MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, no período de agosto de 2004 a novembro de 2004. O genótipo envolvido foi Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44 da espécie *Coffea arabica*, localizado na área experimental do Campus Umuarama da Universidade.

Os botões florais foram coletados entre 7:00 e 8:00 horas da manhã obedecendo ao tamanho de 4,5 a 5,5mm, pois, correspondem à anteras contendo micrósporos uninucleados. Após a coleta, os botões foram encaminhados ao laboratório em placa de petri, contendo papel de filtro umedecido com água destilada para evitar a desidratação. O comprimento ideal dos botões florais foi confirmado com o auxílio de um paquímetro.

Os explantes florais foram envolvidos por uma gaze e mantidos em uma solução de álcool 70% por 1 segundo e por 15 minutos em uma solução de hipoclorito de sódio 1% sob agitação. Foram então lavados três vezes com água destilada já na câmara de fluxo. Esta foi previamente limpa com álcool 70%, utilizando flanela esterilizada, e ,junto com todo o

material necessário para a inoculação, foi submetida à exposição de luz ultravioleta por 15 minutos.

As anteras foram retiradas com auxílio de pinças finas e bisturi, previamente autoclavados, sob luz de um microscópio estereoscópio em aumento de 40 vezes, posteriormente foram imersas em uma solução de ácido ascórbico na concentração de 600 mg.L⁻¹, hipoclorito de sódio à 0,2% e em água destilada e autoclavada, respectivamente, tomando-se o cuidado de não ferí-las. As anteras danificadas foram descartadas.

As anteras foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo 20 ml do meio MS, com pH ajustado para 5.9, adicionado de 7 g.L⁻¹ de ágar e previamente autoclavado à temperatura de 121°C, sob pressão de 1 atm por 20 minutos, suplementado com as seguintes combinações de reguladores de crescimento: 2 mg.L⁻¹ 2,4-D + 2 mg.L⁻¹ BAP; 8 mg.L⁻¹ Cinetina + 1 mg.L⁻¹ AIB; 2 mg.L⁻¹ Cinetina + 1 mg.L⁻¹ 2,4-D; 2 mg.L⁻¹ Cinetina + 20 mg.L⁻¹ GA₃; 2 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.L⁻¹ TDZ; 2 mg.L⁻¹ ANA e 2mg.L⁻¹ 2,4D, num total de sete combinações, com delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 7x2 (composição dos reguladores de crescimento e épocas de cultivo *in vitro*, respectivamente), com quatro repetições, sendo três tubos de ensaio uma repetição, com cinco anteras por tubo. O material foi mantido em sala de crescimento com 25 ± 2°C na ausência de luz.

Após 30 e 60 dias de cultivo *in vitro* foram feitas contagens de anteras contaminadas, oxidadas, intumescidas, com calos e com presença ou não de pró-embrióides.

Todos os dados obtidos nos experimentos foram analisados quanto à normalidade e homogeneidade e em seguida foram submetidos à análise de variância e, as médias, ao teste de

Tukey a 5% de probabilidade, pelo programa estatístico SANEST (ZONTA, MACHADO E SILVEIRA JÚNIOR, 1984).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos dados obtidos foi possível verificar que as combinações de reguladores de crescimento e as épocas de avaliação diferiram entre si com relação à indução de calos nas anteras inoculadas (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo das análises de variância do número médio de anteras oxidadas (OXID.), contaminadas (CONT.), intumescidas (INTUM.) e com calosidades (CALOS.) obtidas em função das concentrações de reguladores de crescimento (RC), assim como respectivas interações com a época de avaliação (EA). UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Q.M.					
C.V.	G.L	OXID.	CONT.	INTUM.	CALOS
RC	6	0,9345	0,4762	0,8690	8,6964*
EA	1	0,6429	0,8750	0,0179	13,0179*
RC*EA	6	2,1845	0,8333	0,1429	1,3512
RESÍDUO	42	0,4762	0,7202	0,9702	0,8155

* Significativo a 5% de probabilidade

As combinações não diferiram entre si com relação à variável oxidação, porém a que mais apresentou anteras oxidadas aos 60 dias de cultivo *in vitro* foi a combinação de 2 mgL^{-1} 2,4-D + $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ TDZ com 100 % (Tabela 2). No trabalho de Silva (2003) também foi observado um alto índice de oxidação (93%), para a cultivar Catuaí Vermelho 44 com o uso dos reguladores de crescimento cinetina, TDZ e BAP. A presença do regulador de crescimento TDZ no meio de cultura pode ter influenciado no processo de oxidação das anteras conforme proposto por Nogueira et al. (2003) que em trabalho com indução de brotações a partir de segmentos nodais de murici-pequeno, *Byrsonima intermedia*, 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.

Utino et al., (2001) citam que para a permanência do explante por mais tempo em um mesmo meio, faz-se necessária à adição de ácido ascórbico, visando à redução da oxidação. Entretanto, Teixeira (2001) cita que o ácido ascórbico é uma substância termolábil, e por esse motivo tal antioxidante não deve ser colocado no meio de cultura. Pasqual et al., (2002) trabalhando com cultivo de anteras da cultivar Rubi, verificaram que o uso de uma dosagem de 200 mgL^{-1} polivinilpirrolidene (PVP) também diminui a oxidação e consequentemente aumenta a formação de calos.

A contaminação, equivalente a 35,87%, foi considerada elevada comparada resultados obtidos por Palú (2002) que permitiu diminuir a contaminação para níveis inferiores à 2% com uso de solução de PPMTM a 25%(v/v). Araújo (2004) visando a calogênese em anteras oriundas de uma população segregante F2 de *Coffea arabica* L. verificou que a adição de

fungicida e bactericida ao meio de cultura reduziu consideravelmente a contaminação causada por microrganismos.

Uma certa contaminação na cultura de anteras de cafeeiro, já era esperada pois as plantas fornecedoras dos botões florais se encontravam em condições de campo.

Tabela 2. Média (%) do número de anteras oxidadas da cultivar Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44, aos 60 dias de cultivo *in vitro* submetidas à diferentes combinações de reguladores de crescimento. UFU, Uberlândia-MG, 2005

REGULADORES DE CRESCIMENTO	OXIDAÇÃO	
	MÉDIAS ORIGINAIS	MÉDIAS (%)
2 mgL ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mgL ⁻¹ TDZ	5,0000	100
2 mgL ⁻¹ ANA	4,8750	97,5
8 mgL ⁻¹ Cinetina + 1 mgL ⁻¹ AIB	4,7500	95
2 mgL ⁻¹ 2,4-D	4,7500	95
2 mgL ⁻¹ Cinetina + 20 mgL ⁻¹ GA ₃	4,5000	90
2 mgL ⁻¹ Cinetina + 1 mgL ⁻¹ 2,4-D	4,3750	87,5
2 mgL ⁻¹ 2,4-D + 2 mgL ⁻¹ BAP	4,0000	80

Com relação ao intumescimento das anteras, não houve diferença significativa entre as combinações aos 60 dias de cultivo *in vitro*, no entanto, em termos de valores absolutos, a maior resposta foi obtida pela combinação de 2 mgL⁻¹ Cinetina + 1 mgL⁻¹ 2,4-D. (Tabela 3).

Se for considerado o intumescimento das anteras como um possível início de formação de calos, a diferença de manifestação entre os genótipos, é comum na técnica de cultura de anteras. Silva (2003) afirma que o Catuaí Vermelho 44 seja mais responsivo nas doses de 0,005; 0,05; 0,5 e 5 mM de 2,4-D, comparado ao Mundo Novo e Catuaí Vermelho 99, mas são necessários novos trabalhos envolvendo concentrações maiores de 2,4-D.

Tabela 3. Média (%) do número de anteras intumescidas da cultivar Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44, aos 60 dias de cultivo *in vitro* submetidas à diferentes combinações de reguladores de crescimento. UFU, Uberlândia-MG, 2005

REGULADORES DE CRESCIMENTO	INTUMESCIMENTO	
	MÉDIAS ORIGINAIS	MÉDIAS (%)
2 mgL ⁻¹ Cinetina + 1 mgL ⁻¹ 2,4-D	4,1250	82,5
2 mgL ⁻¹ 2,4-D + 2 mgL ⁻¹ BAP	4,0000	80
2 mgL ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mgL ⁻¹ TDZ	4,0000	80
8 mgL ⁻¹ Cinetina + 1 mgL ⁻¹ AIB	3,8750	77,5
2 mgL ⁻¹ ANA	3,7500	75
2 mgL ⁻¹ 2,4-D	3,7500	75
2 mgL ⁻¹ Cinetina + 20 mgL ⁻¹ GA ₃	3,1250	62,5

As combinações de reguladores de crescimento que significativamente induziram a formação de calos nas anteras inoculadas foram 2 mgL⁻¹ 2,4-D + 2 mgL⁻¹ BAP, 2 mgL⁻¹ Cinetina + 1mgL⁻¹ 2,4-D e 2 mgL⁻¹ 2,4-D + 0,5 mgL⁻¹ TDZ, embora não diferindo estatisticamente da concentração de 2 mg/L 2,4-D. Em termos numéricos, a combinação 2 mgL⁻¹ Cinetina + 20 mgL⁻¹ GA₃ foi aquela que menos respondeu à indução de calos, (Tabela 4), o que sugere que o GA₃ tenha um efeito apenas no aumento da rapidez de crescimento dos calos provenientes de anteras de cafeeiro.

Para indução de calos, geralmente é necessária uma auxina (MAHESHWARI et al., 1983). Maciel (2001); 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). Já Rocha (1998) afirma que a indução e

manutenção do calo, para a maioria das espécies parece comportar-se diferentemente em relação aos reguladores de crescimento, podendo ocorrer independentemente de auxinas e citocininas, dependente de ambas, ou dependente de uma ou de outra.

Tabela 4. Média (%) do número de anteras com calos da cultivar Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44, aos 60 dias de cultivo *in vitro* submetidas à diferentes combinações de reguladores de crescimento. UFU, Uberlândia-MG, 2005

REGULADORES DE CRESCIMENTO	CALOSIDADE	
	MÉDIAS ORIGINAIS	MÉDIAS (%)
2 mgL ⁻¹ 2,4-D + 2 mgL ⁻¹ BAP	2,6250 a	52,5
2 mgL ⁻¹ Cinetina + 1 mgL ⁻¹ 2,4-D	2,6250 a	52,5
2 mgL ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mgL ⁻¹ TDZ	2,1250 a	42,5
2 mgL ⁻¹ 2,4-D	1,2500 ab	25
8 mgL ⁻¹ Cinetina + 1 mgL ⁻¹ AIB	0,6250 b	12,5
2 mgL ⁻¹ ANA	0,3750 b	7,5
2 mgL ⁻¹ Cinetina + 20 mgL ⁻¹ GA ₃	0,2500 b	5

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

Em outro trabalho com *C. arabica*, porém com a cultivar Catuaí Vermelho 99, os resultados mostraram que para que ocorra intumescimento das anteras, formação e aumento do tamanho dos calos de ambas as cultivares é necessário que haja interação entre a auxina (2,4-D) e a citocinina (BAP). Além disso, a incubação no escuro promoveu uma diminuição das anteras oxidadas (SILVA et al., 2003). A combinação entre 2,4-D e cinetina favorece a indução de calos primários.

Santos (1999), trabalhando com anteras de soja, onde foram testados meios de indução apresentando diferentes composições de reguladores de crescimento, verificou que a presença

da auxina 2,4D é fundamental na fase indutória e que o uso associado de 2,4D com BAP leva ao aumento nas taxas de indução de calos e embriões.

Secundino et al. (2005) trabalhando com o regulador de crescimento 2,4-D combinado com diferentes concentrações de AAS (Ácido Acetil Salicílico), constatou que 2mgL^{-1} da auxina e 0mgL^{-1} de AAS respondeu bem à indução de calos em anteras de cafeeiro da cultivar Catuaí Vermelho 44 em ausência de luz. Este resultado confirma o proposto por Marques et al., (2005), onde a combinação de 2mgL^{-1} de 2,4-D e 0mgL^{-1} de TDZ proporcionou uma maior formação de calos para esta mesma cultivar porém na presença de luz.

De acordo com Palú et al. (2002), 2mg.L^{-1} de 2,4-D foi a concentração que melhor induziu a formação de calos em anteras de cafeeiro, a partir deste valor houve inibição na produção dos mesmos.

Experimento realizado, com a cultivar de café Acaiá Cerrado (Palú et al., 2002), tendo como objetivo avaliar os efeitos dos reguladores de crescimento (2,4-D, Cinetina e AIB) na indução de calos de anteras, mostrou que as combinações mais eficientes entre os reguladores de crescimento foram $2,0\text{mg.L}^{-1}$ de 2,4-D + $1,9\text{mg.L}^{-1}$ de cinetina e $0,86\text{mg.L}^{-1}$ de 2,4-D + 1mg.L^{-1} de AIB. Já para a cultivar Rubi, as combinações mais eficientes, foram, $1,9\text{mg.L}$ de 2,4-D + $4,0\text{mg.L}^{-1}$ de cinetina segundo Araújo et al. (2002).

Com base nas avaliações feitas aos 30 e 60 dias observou-se que o tempo de cultivo *in vitro* é um fator relevante para a indução de calos, visto que aos 60 dias verificou-se médias maiores que aos 30 dias, (Tabela 5). Apesar de Marques et al. (2005) afirmar que quanto maior o tempo de cultivo *in vitro* maior é a oxidação das anteras com conseqüente morte dos

calos, neste trabalho, a oxidação aos 60 dias não comprometeu o desenvolvimento dos mesmos que permaneceram vivos, friáveis e com presença de pró-embriões.

Tabela 5. Médias do número de anteras com calos da cultivar Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44, aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro* submetidas à diferentes combinações de reguladores de crescimento. UFU, Uberlândia-MG, 2005

ÉPOCA DE CULTIVO <i>in vitro</i>		
MÉDIAS ORIGINAIS		
REGULADORES DE CRESCIMENTO	30	60
2 mgL ⁻¹ 2,4-D + 2 mgL ⁻¹ BAP	2,00	3,25
2 mgL ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mgL ⁻¹ TDZ	2,00	3,25
2 mgL ⁻¹ Cinetina + 1 mgL ⁻¹ 2,4-D	1,25	3,00
2 mgL ⁻¹ 2,4-D	0,25	2,25
8 mgL ⁻¹ Cinetina + 1 mgL ⁻¹ AIB	0,75	0,75
2 mgL ⁻¹ ANA	0,25	0,50
2 mgL ⁻¹ Cinetina + 20 mgL ⁻¹ GA ₃	0,00	0,50

A presença de pró-embriões equivaleu à 84,5% dos calos. Alguns deles apresentavam-se de coloração cinza, porém a maioria possuía coloração amarelo creme nos quais se encontravam uma maior concentração de pró-embriões.

A coloração dos calos é um indicativo do estado em que se encontra a cultura. O cinza por exemplo pode ser resultante da perda gradativa da cor natural passando de verde a marrom, aliada à diminuição do ritmo de crescimento dos mesmos, estagnação do processo de formação de embriões seguida pelo surgimento de áreas necrosadas na superfície que constituem sinais característicos da decadência da cultura (SILVA, 2002).

A combinação 2 mgL^{-1} 2,4-D + 2 mgL^{-1} BAP foi aquela que respondeu melhor à esta indução embora não diferindo estatisticamente das combinações de 2 mgL^{-1} Cinetina + 1 mgL^{-1} 2,4-D e 2 mgL^{-1} 2,4-D + $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ TDZ. No entanto as combinações 2 mgL^{-1} Cinetina + 20 mgL^{-1} GA₃ e 2 mgL^{-1} ANA, não induziram a formação de pró-embrióides nos calos sendo assim considerados, numericamente, os menos eficientes. (Tabela 6).

Tabela 6. Médias (%) do número de calos com pró-embrióides da cultivar Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44, aos 60 dias de cultivo *in vitro* submetidas à diferentes combinações de reguladores de crescimento. UFU, Uberlândia-MG, 2005

REGULADORES DE CRESCIMENTO	CALOS COM PRÓ-EMBRIÓIDES	
	MÉDIAS ORIGINAIS	MÉDIAS (%)
2 mgL^{-1} 2,4-D + 2 mgL^{-1} BAP	0,500 a	50
2 mgL^{-1} Cinetina + 1 mgL^{-1} 2,4-D	0,350 ab	35
2 mgL^{-1} 2,4-D + $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ TDZ	0,215 ab	21,66
2 mgL^{-1} 2,4-D	0,100 b	10
8 mgL^{-1} Cinetina + 1 mgL^{-1} AIB	0,015 b	1,66
2 mgL^{-1} Cinetina + 20 mgL^{-1} GA ₃	0,000 b	0
2 mgL^{-1} ANA	0,000 b	0

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

Neste sentido é permitido afirmar que a combinação 2 mgL^{-1} 2,4-D + 2 mgL^{-1} BAP, numericamente, foi mais eficiente tanto para a indução de calos quanto para a formação de pró-embrióides. Figueira et al., (2005), trabalhando com a concentração de 2 mgL^{-1} de 2,4-D em ausência ou presença de nitrato de prata observou que 19,8% das anteras com calos possuíam pró-embrióides, sendo 21,5% pertencentes ao cultivar Mundo Novo e 17,6% ao Catuaí Vermelho 44 e concluiu que a ausência de AgNO₃ foi mais eficiente para esta indução.

Quanto a presença do ácido acetilsalicílico no meio de cultura, também acrescidos de 2 mgL^{-1} de 2,4-D, esta mesma autora afirma que apartir da concentração de 42 mg.L^{-1} de AAS o número médio de calos com pró-embrióides tende a aumentar.

A utilização dos reguladores de crescimento no meio de cultura provavelmente condicionou as anteras a expressarem seu potencial embriogênico, entretanto, os pró-embrióides observados não regeneraram plântulas. Portanto a continuidade de trabalhos que visam esta linha de pesquisa devem continuar para que esta colabore efetivamente para os programas de melhoramento genético do cafeeiro.

5- CONCLUSÃO

As combinações que melhor induziram a formação de calos nas anteras inoculadas 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 e 2 mg/L 2,4-D.

A calosidade das anteras foi favorecida aos 60 dias de cultivo in vitro

As combinações 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, foram aquelas que melhor responderam à indução de pró-embrióides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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, 2002a. p. 197.

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

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

CALDAS, L.S.; HAVIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meioas Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. v.1, p. 87-132.

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.

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.

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

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.

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

MAHESHWARI, S.C.; RASHID, A.; TYAGI, A.K. Haploids from pollen grain. Retrospect and Prospect. **American Journal of Botany**. , v. 69, n.5, p. 865-879, 1983.

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, S.V.; LUZ, J.M.Q.; MARQUES, R.V.; FIGUEIRA, E.R.; SECUNDINO, R.R.; LONDE, L. Efeito dos reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ 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.

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

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

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.

MURASHIGE, T. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. v.1, p. 87-132.

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.

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.

PASQUAL, M. Obtenção de plantas por cultura de tecidos. **Informe Agropecuário**, v.11, n. 124, p. 63-68, 1985.

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 agrotecnologia.**, Lavras, v.26, n.1, p.71-76, jan./fev., 2002.

PETERS, J.A.; BOBROWSKI, V.L.; ROSINHA, G.M.S. Produção de haplóides e duplo haplóides. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH, v.2, 1999. p. 569-611.

PIOUS, T.; RAVINDRA, M.B. Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factors, season and descontamination treatments on phenolic exudation, explant

survival and axenic culture establishment. **Journal of Horticultural Science**, v.72, n.5, p.713-722, 1997.

RAMALHO, M.A.P. Genética: seleção recorrente no melhoramento do cafeeiro. **Informativo Garcafé**, 1999.

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

SANTOS, E.K. **Androgênese em cultivares brasileiras de *Glycine max* L. Merrill**. 1999. 96p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

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.

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 androgenética da soja**. 2002. p.60. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SILVA, A.S. **Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* L., cultivadas *in vitro* na presença ou ausência de luz em meio com 2,4-D, BAP, TDZ, e cinetina.** 2003. 15p. Monografia (Especialização em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

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

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

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.** 2.ed. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPQ, v.1, 1999. 509p.

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

UTINO, S.; CARNEIRO, I.F.; CHAVES, L.J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (*Musa AAB*) *in vitro*: concentrações de sais, ácidos ascórbicos e frequência de subcultivos. **Revista brasileira de fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 409-412, agosto 2001.

VASIL, I.K.; AHUJA, M.R.; VASIL, V. Plant Tissue Culture in genetics and plant breeding. **Advance Genetics**, New York, v. 20, p. 127-215, 1979.

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