

**INDUÇÃO *IN VITRO* DE CALOGÊNESE EM  
ANTERAS E BROTAÇÕES EM SEGMENTOS  
NODAIS DE *Coffea arabica* L.**

**EDNAMAR GABRIELA PALÚ**

**2002**

53445

378704FN

**EDNAMAR GABRIELA PALÚ**


**INDUÇÃO *IN VITRO* DE CALOGÊNESE EM  
ANTERAS E BROTAÇÕES EM SEGMENTOS  
NODAIS DE *Coffea arabica* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2002



**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Palú, Ednamaar Gabriela

Indução "in vitro" de calogênese em anteras e brotações em segmentos nodais  
de *Coffea arabica* L. / Ednamaar Gabriela Palú. -- Lavras : UFLA, 2002.  
47 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual.  
Dissertação (Mestrado) – UFLA.  
Bibliografia.

1. Cultura de tecido. 2. Cultura de antera. 3. Calogênese. 4. Café. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.733

**EDNAMAR GABRIELA PALÚ**

**INDUÇÃO *IN VITRO* DE CALOGÊNESE EM ANTERAS E  
BROTAÇÕES EM SEGMENTOS NODAIS DE *Coffea arabica* L**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

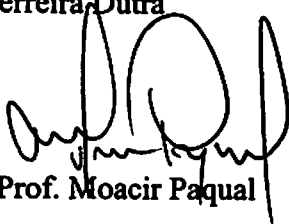
Aprovada em 25 de março de 2002

Prof. Renato Paiva, PhD

UFLA

Pequisador Dr. Leonardo Ferreira Dutra

UFLA



Prof. Moacir Paqual

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

**“O conhecimento real não é construção de alguns dias.  
É obra do tempo.”**

**A Deus,**

**pela vida;**

**Aos meus pais,**

**Celso Palú e Marisa Aparecida Palú, pelo intenso amor;**

**A meu irmão,**

**Celso Palú Júnior, pelo carinho;**

**A meu marido,**

**Jair Leonardo de Souza, pelo incentivo;**

**OFEREÇO**

**A meu filho, Arthur Palú de Souza, o melhor  
presente da vida;**

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade da realização do curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Moacir Pasqual pela orientação, amizade e dedicação.

Ao Prof. Renato Paiva PhD e aos Drs. Leonardo Ferreira Dutra e Marcelo Murad pela colaboração.

Aos bolsistas Juliana, Alba e Sandro pela indispensável ajuda na condução do trabalho.

Em especial às pessoas com quem aqui convivi mais intensamente, Juliana Sales, Fabiano, Dona Maria, Anna Lygia, Erivaldo, Cláudio e Sandra sempre presentes, mesmo nas horas mais difíceis.

Ao colega Adriano pela amizade, convívio e colaboração fundamental na confecção da dissertação.

A minha avó, Dalva, às minhas tias, Angélica, Liliana e Bete, e a meu tio, Artur, pelo incentivo e força nas horas que precisei.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho, tornando-o realizável, seja pelas ajudas prestadas ou ensinamentos, e principalmente pela atenção, companheirismo e amizade.

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE SÍMBOLOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Aspectos gerais da cultura.....	03
2.2 Cultura de Tecidos.....	03
2.3 Cultura de Anteras.....	05
2.3.1 Considerações gerais sobre a cultura de anteras.....	05
2.3.2 Fatores que influenciam a androgênese.....	06
2.3.3 Meio de cultura.....	09
2.4 Cultura de Segmentos Nodais.....	11
2.4.1 Dominância Apical.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Cultura de Anteras.....	15
3.1.1 Efeito do anti-contaminante PPM <sup>TM</sup> [5-Chloro-2-methyl-3-(2H)-isothiazolone + 2-Methyl-3-(2H)-isothiazolone] em anteras de cafeeiro.....	17
3.1.2 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, Cinetina e AIB na indução de calos em anteras de cafeeiro cultivar Acaia Cerrado.....	17
3.1.3 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e Cinetina na indução de calos em anteras de cafeeiro cultivar Rubi.....	18
3.2 Cultura de Segmentos Nodais.....	18
3.2.1 Influência do número de gemas laterais e da gema apical no número de brotações em segmentos nodais de cafeeiro.....	19

3.2.2 Influência da gema apical e da posição do explante no meio de cultura no número de brotações em segmentos nodais de cafeeiro.....	19
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Cultura de Anteras.....</b>	<b>21</b>
4.1.1 Efeito do anti-contaminante PPM™ [5-Chloro-2-methyl-3-(2H)-isothiazolone + 2-Methyl-3-(2H)-isothiazolone] em anteras de cafeeiro.....	21
4.1.2 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, Cinetina e AIB na indução de calos em anteras de cafeeiro cultivar Acaia Cerrado.....	22
4.1.3 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e Cinetina na indução de calos em anteras de cafeeiro cultivar Rubi.....	27
<b>4.2 Cultura de Segmentos Nodais.....</b>	<b>29</b>
4.2.1 Influência do número de gemas laterais e da gema apical no número de brotações em segmentos nodais de cafeeiro.....	29
4.2.2 Influência da gema apical e da posição do explante no meio de cultura no número de brotações em segmentos nodais de cafeeiro.....	33
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>45</b>



## LISTA DE SÍMBOLOS

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ANA: Ácido naftaleno acético

AIA: Ácido indol acético

CIN: 6-furfurilaminopurina (cinetina)

AIB: Ácido indolil-3-butírico

GA<sub>3</sub>: Ácido giberélico

BAP: 6-benzilaminopurina

2iP: N-isopentenilaminopurina

MS: Meio de cultura básico de Murashige e Skoog

IC: Meio de cultura para indução de calos

WPM: Meio de cultura básico (Wood Plant Medium) de Loyd e McCown

PPM<sup>TM</sup>: Plant Preservative Mixture

PMFPA: Peso da matéria fresca da parte aérea

PMSPA: Peso da matéria seca da parte aérea

PMFC: Peso da matéria fresca de calos

NTB: Número total de brotos

NB > 1cm: Número de brotos maiores que 1 centímetro

CV: Coeficiente de variação

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinação

## RESUMO

PALÚ, Ednamar Gabriela. *Indução in vitro de calogênese em anteras e brotações em segmentos nodais de Coffea arabica L.* LAVRAS: UFLA, 2002. 47p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)\*

Objetivou-se estabelecer um protocolo de indução de calos a partir de anteras e estudar a indução de brotações em segmentos nodais, observando a influência da gema apical, do número de gemas e posição de inoculação do explante em *Coffea arabica L.* Na indução de calogênese em anteras, foi efetuada a assepsia dos botões florais, em seguida as anteras foram extraídas, inoculadas em meio IC e mantidas no escuro por 8 semanas, sob temperatura de 25 °C. Devido à alta contaminação das anteras inoculadas, mesmo com a assepsia realizada nos botões florais, foi realizado um primeiro experimento testando o pré-tratamento ou não das anteras retiradas em câmara de fluxo laminar, em concentração de 25% de PPM<sup>TM</sup> (v/v) durante 2 min. e inoculação em diferentes concentrações de PPM<sup>TM</sup> (0;0,06;0,125;0,250;0,500;0,750 e 1 mL.L<sup>-1</sup>) adicionadas ao meio de cultura. Para induzir a calogênese em anteras da cv. Acaíá Cerrado foram testadas as concentrações de 2,4-D (0,1,2 e 4 mg.L<sup>-1</sup>) x cinetina (0,2,4 e 8 mg.L<sup>-1</sup>) e 2,4-D (0;0,5;1e 2mg.L<sup>-1</sup>) x AIB (0;0,5;1e 2mg.L<sup>-1</sup>) mais 2 iP (2 mg.L<sup>-1</sup>) e, para a cv. Rubi, as concentrações de 2,4-D (0,1,2 e 4 mg.L<sup>-1</sup>) x cinetina (0,2,4 e 8 mg.L<sup>-1</sup>). Na indução de brotações em segmentos nodais, os explantes foram provenientes de plantas prestabelecidas “in vitro”. Utilizou-se o meio de cultura “MS” suplementado com 3 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> + 6 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Os experimentos foram incubados em salas de crescimento com temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas , sob 35 μM.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa. Foi observada a influência da gema apical, do número de gemas e a posição dos explantes na indução de brotações das cultivares Caturra, Catuaí e Icatu. Conclui-se que o anti-contaminante PPM<sup>TM</sup> é eficiente na assepsia das anteras de cafeeiro, através do pré-tratamento destas com solução de 25% (v/v) ou adição de 0,500 mg.L<sup>-1</sup> do produto ao meio de cultura. A maior porcentagem de indução de calogênese em anteras na cv. Acaíá Cerrado ocorre com as combinações de 2,4-D(2mg. L<sup>-1</sup>) + cinetina (1,9mg.L<sup>-1</sup>) e 2,4-D (0,86mg.L<sup>-1</sup>) + AIB (1mg.L<sup>-1</sup>)+ 2iP (2mg.L<sup>-1</sup>); para cv. Rubi a combinação de 2,4-D (1,9mg.L<sup>-1</sup>) e cinetina (4mg.L<sup>-1</sup>). Para indução de brotações conclui-se que a utilização de explantes sem a gema apical, com 3 pares de gemas e inoculados na posição vertical, favorecem o maior número de brotações em segmentos nodais de *Coffea arabica L.*

---

\* Comitê Orientador: Prof. Dr. Moacir Pasqual - UFLA (Orientador).

## ABSTRACT

PALÚ, Ednamar Gabriela. *In vitro* induction of callogenesis in anthers and shoots on nodal segments of *Coffea arabica* L. Lavras: UFLA, 2002. 47p. (Dissertation-Master of Science in Agronomy/Plant Physiology)\*

This work aimed to establish a protocol to induce callus from anthers and study shoot induction on nodal segments, observing the influence of apical bud, buds number and explant position of inoculation in *Coffea arabica*. In the induction of callogenesis on anthers, the aseptic conditions of the flower buds were accomplished, followed by in anthers cut off, inoculated in IC medium and kept for eight weeks under the temperature of  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  without light. Due to the high contamination of the inoculated anthers, also in aseptic conditions performed on the flower buds, a first experiment was realized by testing the pre-treatment or not of the removed anthers in a laminar flux chamber under 25% of PPM<sup>TM</sup> (v/v) concentration for 2 minutes and inoculation at different of PPM<sup>TM</sup> (0; 0.06; 0.125; 0.250; 0.500; 0.750 and 1 mL.L<sup>-1</sup>) concentrations added to the culture medium. To induce callogenesis in anthers of the 'Acaia Cerrado' were tested 2,4-D (0, 1, 2 and 4 mg.L<sup>-1</sup>) x kinetin (0, 2, 4 and 8 mg.L<sup>-1</sup>) and 2,4-D (0; 0.5; 1 and 2 mg.L<sup>-1</sup>) x AIB (0; 0.5; 1 and 2 mg.L<sup>-1</sup>) plus 2 iP (2 mg.L<sup>-1</sup>) concentrations and for the 'Rubi' 2,4-D (0, 1, 2 and 4 mg.L<sup>-1</sup>) x kinetin (0, 2, 4 and 8 mg.L<sup>-1</sup>) concentrations. For the shoots induction on nodal segments, the conditions *in vitro* pre-established in the MS culture medium supplemented with 3 mg.L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub> + 6 mg.L<sup>-1</sup> of BAP was used. The experiments were incubated in growth room with  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  and 16 hour photoperiod under 35  $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  light intensity. The influence of the apical bud, buds number and position of explants in the shoots induction of 'Caturra', 'Catuaí' and 'Icatu' were observed. The anti-contaminant PPM<sup>TM</sup> is efficient to maintain the coffee tree anthers through the pre-treatment of them with the 25% solution (v/v) or addition of 0.500 mg.L<sup>-1</sup> of the product to the culture medium. The highest percentage of callogenesis induction on anthers of the 'Acaia Cerrado' occurs from 2,4-D (2 mg.L<sup>-1</sup>) + kinetin (1.9 mg.L<sup>-1</sup>) and 2,4-D (0.86 mg.L<sup>-1</sup>) + AIB (1 mg.L<sup>-1</sup>) + 2iP (2 mg.L<sup>-1</sup>) combinations and for 'Rubi' 2,4-D (1.9 mg.L<sup>-1</sup>) and kinetin (4 mg.L<sup>-1</sup>). For shoot induction, the use of explant without the apical bud, with three pairs of buds and inoculated in the vertical position favour the induction of a greater number of shoots on *Coffea arabica* nodal segments.

---

\* Guidance Committee: Moacir Pasqual – UFLA (Major Professor).

# 1 INTRODUÇÃO

O café é um dos mais importantes produtos do mercado internacional, representando importante fonte de renda para milhões de pessoas em mais de 50 países, nas regiões tropicais da América Latina, África e Ásia. Além do aspecto econômico, a cafeicultura apresenta relevante importância social como atividade geradora de empregos e fixadora de mão-de-obra no campo.

Do ponto de vista comercial, somente duas espécies do gênero *Coffea* são cultivadas extensivamente, *Coffea arabica* L. (Arabica) e *Coffea canephora* Pierre (Robusta), sendo o tipo arabica responsável por cerca de 75% dos plantios comerciais de cafeeiro do mundo (Carneiro, 1999). No Brasil, cerca de 82% da produção são provenientes de lavouras formadas com cultivares da espécie *Coffea arabica* e 18% de cultivares da espécie *Coffea canephora* (Melo et al., 1998).

Os programas de melhoramento genético do cafeeiro no Brasil têm alcançado sucesso na obtenção de cultivares produtivas, elevando em cerca de 200% a produtividade das atuais cultivares em relação à primeira variedade plantada no Brasil. Porém o tempo gasto e os recursos despendidos são fatores limitantes para o melhoramento do cafeeiro através de métodos convencionais, uma vez que, nos últimos anos surgiram novos problemas como doenças, pragas, nematóides e maior exigência em qualidade pelo mercado consumidor (Mendes, 1997). Contudo, a multiplicação vegetativa *in vitro* surge como uma alternativa viável e de curto prazo para a solução desses problemas.

Nos últimos 28 anos, ocorreram importantes avanços nas técnicas da cultura *in vitro* para o cafeeiro. Alguns sistemas de regeneração de plantas já vêm sendo usados na cultura. Técnicas de cultura de tecidos como a micropropagação de genótipos superiores, obtidos pelos programas

convencionais e a aplicação da cultura de anteras, que é uma importante ferramenta no melhoramento genético do cafeeiro e no estudo de genes livres do fenômeno da dominância, além de promover a obtenção de plantas homozigotas substituindo as inúmeras gerações de autofecundação necessárias no processo convencional, reduzem o tempo de obtenção de novas linhagens. A embriogênese somática, a cultura de meristemas apicais e gemas axilares, a indução e o desenvolvimento de gemas adventícias, a cultura de embriões zigóticos, a suspensão de células, a cultura de protoplastos e a seleção *in vitro* também são usadas para melhorar o cafeeiro via métodos biotecnológicos (Carneiro, 1999).

No presente trabalho, objetivou-se buscar um protocolo para indução *in vitro* de calogênese em anteras e observar a influência da gema apical, número de gemas e posição do explante no número de brotações em segmentos nodais de cafeeiro.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos Gerais da Cultura

A espécie *Coffea arabica* pertence à família Rubiaceae, cujo gênero *Coffea* abrange cerca de 60 espécies, possuindo características diferenciadas quanto à forma dos frutos e flores, resistência a diversas moléstias e pragas (Graner & Godoy Júnior, 1967). Esta espécie é originária do sudoeste do Sudão e norte do Quênia, em uma região restrita e marginal às demais espécies, e foi introduzida no continente Americano nas primeiras décadas do século XVIII. A faixa de altitude para cultivo do cafeeiro corresponde entre 1000 e 2000 metros e algumas regiões limítrofes estão entre 8 e 12<sup>o</sup> latitude ao norte e 40 e 42<sup>o</sup> longitude leste (Mendes, 1998).

No início dos estudos genéticos do gênero *Coffea* tomou-se como padrão à espécie *Coffea arabica*, sendo primeiramente denominada de *C.arabica* var.*typica*, descrita por Linneu; e atualmente denominada *Coffea arabica* var. *arabica* (Carvalho, 1993). *Coffea arabica* é considerada uma espécie nobre, com café de boa qualidade, possuindo mais de 40 mutantes e muitas variedades. É tetraplóide, autofértil, ocorrendo 10 a 12 % de fecundação cruzada.

### 2.2 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos é uma ciência que detém as técnicas de cultura de células, tecidos e órgãos vegetais, isolados da planta mãe e cultivados em meio de cultura artificial.

O trabalho pioneiro com a cultura de tecidos em cafeeiro utilizou segmentos ortotrópicos de duas espécies de *Coffea* em meio de cultura contendo

sais inorgânicos, sacarose, tiamina, cisteína e auxina. Os resultados obtidos foram rápida produção de calos na espécie *Coffea arabica* e embriões e plântulas em *Coffea canephora*. Posteriormente, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos envolvendo o gênero *Coffea* como a propagação *in vitro* de segmentos nodais de *Coffea arabica* (Bandel et al., 1975; Custer, Van e Buijs, 1980), indução de embriogênese somática a partir de explantes foliares de cafeeiro (Maciel, 2001) e cultura *in vitro* de embriões de *Coffea arabica* (Ribeiro, 2001).

A multiplicação *in vitro* de espécies de interesse econômico é cada vez mais promissora, sendo mais utilizada no sentido de minimizar dificuldades de multiplicação permitindo a seleção de material superior, multiplicação rápida, produção em larga escala e em pequeno espaço físico, tornando-se uma tecnologia adequada para culturas de ciclo longo como o *Coffea arabica*.

Uma das características da cultura de tecidos vegetais é a possível indução do crescimento e da morfogênese a partir de explantes *in vitro*. Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Daí a importância de se conhecerem detalhes dos componentes e propriedades dos meios de cultura, a metodologia para preparar um meio de cultura e os principais meios utilizados (Torres et al., 1998). Inicialmente foram utilizados os mais diversos tipos componentes e de meios de cultura, até que Murashige & Skoog (1962) idealizaram o meio "MS", atualmente um dos mais utilizados. Outros meios também utilizados são o White (1943), Knudson (modificado por Arditti, 1967), WPM (Wood Plant Medium) de Lloyd & McCown (1980), entre outros. Entretanto, para cada tipo de explante, espécie e cultivar, o meio de cultura mais adequado e eficiente deve ser determinado experimentalmente.

O meio de cultura deve fornecer, além dos macro e micro nutrientes, uma fonte de carboidrato (normalmente a sacarose) para substituir o carbono

atmosférico, pois as células, tecidos e plântulas produzidas *in vitro* não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO<sub>2</sub> e, às vezes, não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar fotossíntese que sustente o crescimento. E para proporcionar um melhor desenvolvimento devem ser adicionados ao meio alguns componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento (Torres et al., 1998).

## **2.3 Cultura de anteras**

### **2.3.1 Considerações gerais sobre a cultura de anteras**

A cultura de anteras foi realizada primeiramente em *Datura innoxia*, por Guha & Maheshwari (1964), sendo posteriormente empregada para obtenção de calos, embriões e plantas, em mais de 237 espécies, 88 gêneros e 34 famílias, incluindo as monocotiledôneas e as dicotiledôneas (Peters, Bobrowski, Rosinha, 1998). Alguns exemplos da produção de haplóides via cultura de anteras, são os trabalhos realizados por Ouyang (1986) em trigo, Chen (1978) em arroz, Claphan (1973) em cevada e Hirano (1975) em cebola. Sharp et al., (1973), relataram a primeira tentativa, sem sucessos, de obtenção de haplóides através da cultura de anteras, em cafeeiro.

Dentre as técnicas de cultivo *in vitro*, a cultura de anteras apresenta-se como uma ferramenta de grande utilidade em programas de melhoramento, principalmente por reduzir o tempo necessário para a obtenção de linhagens homozigóticas e permitir o estudo de mutações recessivas, visto que indivíduos haplóides e duplo haplóides, por se constituírem de apenas um complemento cromossômico, não apresentam problemas de dominância e recessividade (Bajaj, 1984; Fernandes, 1987).



As plantas haplóides podem ser obtidas de duas maneiras, por androgênese direta ou por androgênese indireta.

Na androgênese direta, o micrósporo comporta-se como um zigoto e passa por vários estádios de embriogenia, semelhante ao que ocorre *in vivo*. Os embriões, principalmente no estágio globular, são liberados, os cotilédones desenvolvem-se e as plantas emergem das anteras de 4 a 8 semanas. Na androgênese indireta, os micrósporos, em vez de passarem pela embriogênese, dividem-se algumas vezes, formando calos, os quais emergem através da parede da antera. Normalmente a regeneração de plantas via calo se dá com maior frequência (Peters et al., 1998).

A partir da formação de calo, a regeneração de plantas se dá através da embriogênese ou organogênese. Na organogênese, a formação de meristema apical e radicular se dá em função de um balanço entre auxina e citocinina, enquanto a embriogênese ocorre a partir de simples células que se desenvolvem semelhantemente aos embriões zigóticos.

Em comparação com a androgênese indireta a androgênese direta, apresenta vantagens, como redução no tempo gasto na obtenção das plantas, economia de material e espaço, além da possibilidade de menor ocorrência de variação genética (Peters et al., 1998). Bajaj (1984) cita que plântulas originadas de calos são geralmente indesejáveis porque apresentam vários níveis de ploidia.

### **2.3.2 Fatores que influenciam a androgênese**

A indução *in vitro* de haplóides pela cultura de anteras foi, inicialmente, restrita a poucas espécies, principalmente ao grupo das famílias Gramineae e Solanaceae (Bajaj, 1984). Atualmente, a androgênese está sendo aplicada a inúmeras espécies de diferentes famílias, apresentando, contudo, uma baixa

freqüência de regeneração de plantas haplóides, sendo este um dos maiores obstáculos encontrados nas pesquisas com cultura de anteras.

Peters et al., (1998) citam que é necessário o desenvolvimento de meios e protocolos de cultura que sejam aplicáveis a um largo espectro de genótipos. Desta maneira, é preciso o estudo de fatores que direta ou indiretamente estão relacionados ao sucesso da androgênese, proporcionando alta freqüência de produção de haplóides.

Segundo Nitsch (1981), as chances de se obterem plantas haplóides viáveis pela cultura de anteras ou pólen depende de:

1) Estádio ideal de desenvolvimento das anteras:

A determinação do estágio de desenvolvimento dos micrósporos é de grande importância para o sucesso da cultura de anteras, visto que devem ser utilizados micrósporos numa fase em que respondam melhor aos processos androgenéticos. Entretanto, não parece haver um estágio único, mesmo para espécies intimamente relacionadas (Sunderland, 1973). Anteras contendo grãos de pólen no estágio anterior à tetrade ou após o estágio binucleado não respondem à cultura *in vitro* (Moraes Fernandes, 1990).

A seleção de botões florais e anteras contendo grãos de pólen no estágio ótimo pode ser feita visualmente. Entretanto, os padrões utilizados podem sofrer modificações se a planta doadora e as condições de crescimento forem alteradas (Yang & Zhou, 1982).

Existem marcadores morfológicos que podem auxiliar na identificação do estágio de desenvolvimento dos grãos de pólen. Lentini et al. (1994) cita que, no arroz, as panículas apresentam uma coloração verde-amarelada.

Em cafeeiro, a maior porcentagem de micrósporos apresentando um núcleo central, ideal para a obtenção de plantas haplóides *in vitro*, encontra-se em anteras que variam de 4,5 a 5,5 mm de comprimento, presentes em botões florais que variam de 4,5 a 6 mm de comprimento (Andrade, 1998).

## 2) Genótipo da planta doadora:

A resposta das anteras colocadas em cultura é muito dependente do genótipo da planta doadora, tornando-se um fator importantíssimo, que determina o grau de sucesso na produção de haplóides. Collins (1977) relata que na maioria dos trabalhos iniciais com cultura de anteras era estudada apenas uma cultivar de determinada espécie. Constatado que a resposta das anteras estava diretamente ligada ao genótipo das plantas, verificou-se a utilização de um maior número de genótipos. Diferentes genótipos podem ter diferentes condições ótimas de crescimento, pré-tratamentos, composição de meio de cultura e condições físicas de cultura (Magalhães Jr et al., 1995).

## 3) Idade e condições da planta doadora:

A fisiologia e a idade da planta doadora são fatores que exercem grande influência no grau de eficiência da androgênese além de fatores ambientais como intensidade luminosa, fotoperíodo, temperatura e nutrição, os quais interagem entre si, influenciando o estado endógeno da planta doadora e o potencial esporofítico dos grãos de pólen (Vasil, 1987). Os níveis hormonais endógenos também estão relacionados com o sucesso da cultura de anteras (Sunderland, 1974).

Quanto à idade Anagnostakis (1974) verificou que flores de plantas relativamente jovens são mais adequadas que os botões florais de plantas que estão no fim de seu período de crescimento, mostrando que a idade e as condições fisiológicas, em geral, influenciam na eficiência da androgênese.

Em *Brassica campestris*, a resposta androgenética melhora com o aumento da intensidade luminosa, e em fumo, há um incremento da embriogênese dos micrósporos quando as plantas doadoras de anteras crescem em dias curtos (Keller et al., 1982).

Magalhães Jr. et al. (1995) evidenciaram que anteras de arroz provenientes de plantas bem supridas com nitrogênio apresentavam maior

porcentagem de formação de calos. Já em outros casos a deficiência de nitrogênio nas plantas doadoras aumenta a resposta das anteras *in vitro* (Chen et al., 1991).

### **2.3.3 Meio de cultura**

Os meios mais amplamente usados na cultura de anteras são o “MS” (Murashige & Skoog, 1962) e “W63” (White, 1943) e “N-H” (Nitsch & Nitsch, 1969) ou suas pequenas modificações com vários aditivos. Basicamente, o meio é composto por sais minerais, sacarose, vitaminas, reguladores decrescimento e ágar (Moraes Fernandes, 1990). Para estimular o desenvolvimento e regeneração são utilizados reguladores de crescimento, tais como auxinas, citocininas e giberelinas.

Os macronutrientes são indispensáveis para as plantas e, para que se possa estabelecer os sais em um meio de cultura, deve-se levar em conta suas concentrações e balanceamento. George & Sherrington (1984) verificaram que com o aumento da salinidade ocorre diminuição no crescimento de calos em anteras de feijoeiro.

Os micronutrientes possuem importância metabólica e fisiológica, pois são componentes das proteínas celulares das plantas. A embriogênese pode ser efetivamente induzida em calos de *Hevea brasiliensis* provenientes de anteras, através da duplicação da concentração dos micronutrientes no meio “MS”, enquanto, ao mesmo tempo, foi verificada redução no nível dos macronutrientes de 60 a 80% da concentração original (George & Sherrington, 1984).

A concentração da sacarose pode variar de acordo com a cultura, como tem sido observado por vários autores. Nas culturas de fumo e arroz, a concentração de 2 a 5% de sacarose no meio tem se mostrado eficiente para a

formação de calos e regeneração de plantas (Chu, 1978), enquanto, para cana-de-açúcar, o nível de sacarose pode chegar a 20% (Chen, 1978).

A utilização de substâncias como a glutamina, o inositol e extratos naturais, como o leite de coco ou água de coco desproteïnizada, extrato de levedura, extrato de batata, ácido nucléico hidrolisado, ácido ascórbico e glutatona, favorecem a androgênese (Huang, 1991).

Em muitas espécies, por razões desconhecidas, a embriogênese direta é rara e os explantes têm que ser diferenciados em calos. Para a indução de calos, geralmente é necessária uma auxina, e para a regeneração de plantas, um meio de cultura sem reguladores de crescimento é suficiente, ou o uso de citocininas associadas a baixas concentrações de auxina (Maheshwari et al., 1982). Claphan (1976) cita que, em cereais, altas concentrações de auxinas como 2,4 D são necessárias, e usualmente NAA, IAA e citocininas podem ajudar a indução de calos.

Rezende et al. (2000) utilizaram com sucesso, como meio de cultura básico para indução de calos em anteras de *Coffea arabica*, o meio de cultura citado por Berthouly e Michaux-Ferriere (1996), em um trabalho realizado com embriogênese somática em folhas de *Coffea canephora*.

Além do meio de cultura, existem outros fatores que influenciam na cultura de anteras, tais como a temperatura e a iluminação. A maioria das espécies desenvolve-se bem em temperaturas de incubação que variam de 20 a 28° C e com iluminação contínua ou não, pois essas condições variam de acordo com a espécie e até mesmo com o genótipo (Moraes Fernandes, 1990).

A contaminação causada por fungos e bactérias e a oxidação por substâncias fenólicas são fatores limitantes no estabelecimento *in vitro* de explantes de *Coffea arabica* provenientes de material coletado no campo (Maciel, 2001). Lemos (2000) indica o uso do anti-contaminante Plant Preservative

Mixture (PPM™) em microestacas de Graviola (*Annona muricata*) para uma eficiente descontaminação dos explantes introduzidos *in vitro*.

## 2.4 Cultura de segmentos nodais

A cultura de segmentos nodais é uma das aplicações mais prática da cultura de tecidos, abrange a maioria dos sistemas de micropropagação, envolvendo o isolamento de órgãos meristemáticos pré-formados (normalmente gemas axilares) e a quebra da dominância apical (George, 1993).

As gemas axilares que naturalmente se formam nas inserções das folhas são estimuladas a crescer, dando origem a novas partes aéreas, que, por sua vez repetem o mesmo processo. Se a espécie apresentar, naturalmente, uma grande capacidade de formação de folhas e um rápido alongamento do caule, como na batata, não é necessária a quebra de dominância apical, e boas taxas de multiplicação podem igualmente ser obtidas pela simples subdivisão do caule em diversos segmentos nodais. As partes aéreas produzidas são em seguida enraizadas e transplantadas (Grattapaglia & Machado, 1998).

Com a cultura de segmentos nodais, além de outras vantagens, pode-se obter um grande número de plantas sadias e geneticamente uniformes. O seu sucesso é apropriado para clonar indivíduos e produzir progênies homogêneas (Grattapaglia & Machado, 1998).

As cultivares de *Coffea arabica* são predominantemente autopolinizadas e, portanto, bastante uniformes, razão pela qual são comumente propagadas por sementes. Contudo, alguns genótipos elites híbridos têm se mostrado resistente à ferrugem, justificando sua propagação vegetativa como instrumento auxiliar em programas de melhoramento, ou mesmo como atividade comercial (Martins, 1985).

Segundo Berthouly & Echeveri (1987), a partir de uma microestaca de cafeeiro podem ser obtidos de 7 a 9 micronós a cada 80 dias, totalizando cerca de 20.000 plântulas por ano. Cálculos teóricos para *Coffea arabica*, a partir de cultura de gemas, evidenciam uma capacidade de produzir 13.000 brotos/gema após 15 meses de cultivo contínuo (Medina et al., 1983).

A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* parece estar associada não apenas ao genótipo, mas à atividade fisiológica na planta matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos (Caldas et al., 1990).

As espécies respondem diferentemente e, dentro de uma mesma espécie, as cultivares apresentam exigências diferentes, por isso, a sobrevivência do explante pode variar significativamente entre plantas (Pinto, 1998).

#### **2.4.1 Dominância apical**

Dominância apical é relacionada com o efeito da predominância da gema terminal, suprimindo o desenvolvimento das gemas laterais. A arquitetura de plantas depende das correlações de crescimento entre suas várias partes, sendo que o crescimento de ramos laterais está geralmente sob o controle do ápice vegetativo. Deste modo, tanto o grau de ramificação quanto o estímulo do crescimento lateral e o desenvolvimento do ramo principal parecem ser função da dominância apical (Valio, 1979).

Várias teorias visam explicar a dominância apical, em uma delas, acredita-se no conceito de mobilização ou translocação dirigida como controle do crescimento das gemas laterais. A auxina aplicada em caules que não contêm a gema apical aumenta fortemente a mobilização de nutrientes nesta região. A auxina e outros hormônios do ápice possivelmente causam uma translocação de nutrientes para essa região, em detrimento das gemas laterais, que ficam carentes de substrato para o crescimento (Hillman, 1985).

Uma concentração alta de auxina movimentada-se de modo basípeto no caule, impedindo a brotação das gemas laterais, mantendo-as em estado de dormência. A supressão do ápice vegetativo estimula as gemas laterais, em geral, diretamente abaixo ao corte (Poltronieri, 1986).

Ferry e Ward (1959) relatam que o efeito da remoção da gema apical é controlado pelo gradiente de auxina e sua concentração na folha, frutos e caule. O nível de auxina do caule aumenta estimulado pelo crescimento dos frutos e produção de novas folhas.

De acordo com Correia (1993), o corte da gema apical faz com que sejam retomados os processos de divisão celular e do desenvolvimento dos meristemas laterais. Correia (1993) afirma também que a aplicação de AIA no lugar da gema apical despontada mantém o controle anteriormente estabelecido pela gema apical, e que a aplicação de inibidores de transporte de auxinas próximo à gema apical exerce o mesmo papel do corte dessa. O autor deixa claro, portanto, que o controle da gema apical sobre os meristemas laterais é exercido por uma auxina que é sintetizada no ápice e transportada aos meristemas laterais.

Segundo Hillman (1985), a retirada da porção apical de um ramo é um método simples para eliminar a dominância apical. Por exemplo, plântulas sem a porção apical no terço superior resultam num crescimento vigoroso das gemas laterais. Normalmente, o maior crescimento é mostrado pela gema mais alta, e a presença desta retarda o crescimento das gemas mais baixas.

A micropropagação de brotos explora o efeito da relação auxina/citocinina na regulação do crescimento *in vitro* (Skoog & Miller, 1957). Segundo Peres & Kerbauy (2000), esses dois hormônios meristemáticos proporcionam o crescimento integrado dos caules e raízes pelo seguinte mecanismo: (a) as auxinas normalmente inibem o desenvolvimento de gemas caulinares (principalmente das gemas axilares no processo de dominância



apical) e estimulam a iniciação de raízes, sendo um fitohormônio produzido quase que exclusivamente em órgãos do sistema caulinar; (b) as citocininas são estimuladoras da iniciação das gemas caulinares e inibidoras da formação de raízes, embora sua biossíntese seja predominantemente nesse órgão. Após a biossíntese nas raízes, as citocininas entram no fluxo ascendente do xilema e são transportadas para os sítios de iniciação de gemas caulinares (Davies, 1995).

De acordo com Teixeira & Marbach (2000) as auxinas estão envolvidas no alongamento celular, fototropismo, geotropismo, indução e alongamento de raiz, produção de etileno, crescimento de frutos e dominância apical, enquanto as citocininas, a função principal nas plantas é promover a divisão celular.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras – MG.

Os experimentos foram instalados em condições assépticas, utilizando câmara de fluxo laminar horizontal e tiveram o pH do meio de cultura ajustado para  $5,6 \pm 1$  antes de ser autoclavado a  $120^{\circ}\text{C}$ , 1,2 atm, durante 20 minutos.

#### 3.1 Cultura de anteras

Foram utilizados botões florais de plantas adultas de *Coffea arabica*, cultivares Rubi e Acaiá Cerrado, mantidas no campo experimental do Setor de Cafeicultura da UFLA.

Em todos os experimentos, referentes à cultura de anteras, foram coletados botões florais, com 4,5 mm a 6 mm de comprimento, entre 8 e 9 horas da manhã. A assepsia dos botões florais foi realizada na seguinte seqüência: (1°) lavados em água corrente durante 5 minutos; (2°) mantidos por 1 minuto em álcool 70%; (3°) durante 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio 1,4%; (4°) mantidos durante mais 20 minutos em solução de 25% PPM™ [5-Chloro-2-methyl-3-(2H)-isothiazolone + 2-Methyl-3-(2H)-isothiazolone]; por último, em câmara de fluxo laminar, 3 lavagens com água destilada autoclavada.

Os experimentos foram conduzidos em placas de petri, de poliestireno, de 100 mm de diâmetro, previamente desinfetadas em formol em que o meio foi adicionado, na câmara de fluxo laminar, após ser autoclavado.

As anteras, com o auxílio de Lupa estereoscópica, foram extraídas dos botões ainda fechados, por meio de uma incisão em um dos seus lados, e

reunidas em placa de petri esterilizada contendo solução de 600 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico. As anteras danificadas foram descartadas e, das restantes, inocularam-se 30 anteras por placa de petri contendo o meio "IC" (Tabela 1), considerando-se cada placa uma parcela e 4 placas por tratamento. Após a inoculação das anteras, as placas foram tampadas, vedadas com parafilme e mantidas no escuro por 8 semanas, sob temperatura de 25 °C.

*Quadas*  
TABELA 1. Componentes do meio de indução de calos (IC) em anteras de *C. arabica* L. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Componentes	IC <sup>1</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	220,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85,0
KNO <sub>3</sub>	950,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185,0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825,0
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0125
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0125
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1
KCl	0,415
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	11,15
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,125
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	13,90
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	18,65
Tiamina-HCl	10,0
Piridoxina-HCl	1,0
Ácido Nicotínico	1,0
Glicina	1,0
Mio-inositol	100,0
Caseína Hidrolisada	100,0
Extrato de Malte	400,0
Sacarose	30.000
Ácido ascórbico	600,0
Agar	6000

Fonte: <sup>1</sup>Berthouly e Michaux-Ferriere (1996)

### **3.1.1 Efeito do anti-contaminante PPM<sup>TM</sup> [5-Chloro-2-methyl-3-(2H)-isothiazolone + 2-Methyl-3-(2H)-isothiazolone] em anteras de cafeeiro.**

Mesmo com a assepsia dos botões florais, ainda se verifica uma considerável contaminação das anteras. Portanto, realizou-se um primeiro experimento testando o pré-tratamento das anteras, retiradas em câmara de fluxo laminar, mergulhando-as, ou não, durante 2 minutos em solução de 25% de PPM<sup>TM</sup> (v/v) e em seguida inoculando-as em diferentes concentrações de PPM<sup>TM</sup> (0;0,06;0,125;0,250;0,500;0,750 e 1 mL.L<sup>-1</sup>) adicionadas ao meio de cultura "IC".

A variável observada foi porcentagem de anteras contaminadas por placa de petri.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições e 30 anteras por parcela. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com aplicação do teste de F ao nível de 5% de probabilidade, e as médias analisadas por regressão polinomial.

### **3.1.2 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, Cinetina e AIB na indução de calos em anteras de cafeeiro cultivar Acaiá Cerrado.**

De botões previamente desinfestados foram retiradas anteras, as quais foram previamente tratadas por 2 minutos, com solução de 25% de PPM<sup>TM</sup> (v/v) antes de serem inoculadas ao meio de cultura "IC".

Os tratamentos constituíram-se de diferentes concentrações de 2,4-D (0, 1, 2, e 4 mg.L<sup>-1</sup>) x cinetina (0, 2, 4 e 8 mg.L<sup>-1</sup>) e de diferentes concentrações de 2,4-D (0; 0,5; 1 e 2 mg.L<sup>-1</sup>) x AIB (0; 0,5; 1 e 2 mg.L<sup>-1</sup>) mais 2iP (2 mg.L<sup>-1</sup>) acrescidos ao meio de cultura "IC".

Aos 60 dias, foram avaliados número total de brotos (NTB), número de brotos maiores que 1 centímetro (NB >1 cm), peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições, 5 tubos por parcela, cada tubo contendo um explante. Utilizou-se o teste de Skott Knott para comparação entre as médias.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Cultura de anteras

#### 4.1.1 Efeito do anti-contaminante PPM<sup>TM</sup> [5-Chloro-2-methyl-3-(2H)-isothiazolone + 2-Methyl-3-(2H)-isothiazolone] em anteras de cafeeiro.

O resumo da análise de variância para porcentagem de contaminação está apresentado na Tabela 1.A. Houve interação significativa ao nível de 5% de probabilidade entre as concentrações de PPM<sup>TM</sup> adicionadas ao meio de cultura e a realização, ou não, do pré-tratamento das anteras, em câmara de fluxo laminar, com solução de 25% de PPM<sup>TM</sup> (v/v).

A assepsia realizada nas anteras com a solução de 25% (v/v) do anti-contaminante PPM<sup>TM</sup> permite reduzir a contaminação para níveis inferiores a 2 % (Tabela 2).

TABELA 2. Médias das porcentagens de contaminação em anteras de *C. arabica*, tratadas com PPM<sup>TM</sup> e inoculadas em meio de cultura com diferentes concentrações de PPM<sup>TM</sup>. UFLA, Lavras-MG, 2001.

meio PPM <sup>TM</sup> (mL.L <sup>-1</sup> )	Contaminação(%)	
	PPM <sup>TM</sup> (ausência)	PPM <sup>TM</sup> (25%)
0,00	14,17 cB	0,83 aA
0,06	14,99 cB	0,00 aA
0,125	6,67 bB	1,67 aA
0,250	6,67 bB	1,67 aA
0,500	0,83 aB	0,00 aA
0,750	0,00 aA	0,00 aA
1,00	0,00 aA	0,00 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste Skott Knott ao nível de 5%.

[REDACTED]

Não houve diferença significativa quando se adicionou o produto ao meio de cultura, associado ao pré-tratamento das anteras com a solução de 25% de PPM<sup>TM</sup> (v/v). Quando não é feito o pré-tratamento das anteras, concentrações de PPM<sup>TM</sup> acima de 0,500 mL.L<sup>-1</sup> são eficientes no controle da contaminação.

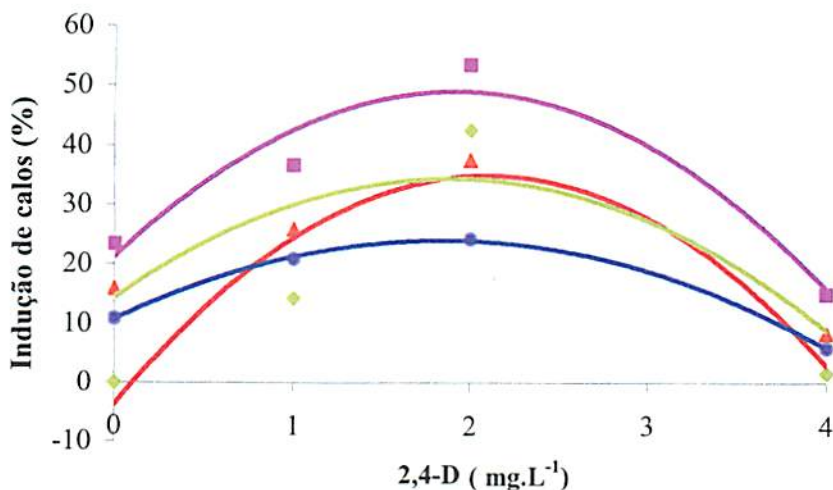
Diante dos resultados obtidos observou-se a possibilidade de utilização do anti-contaminante em anteras de cafeeiro, tanto em meio de cultura com 0,500 mL.L<sup>-1</sup> de PPM<sup>TM</sup> como através do pré-tratamento destas com solução de 25% de PPM<sup>TM</sup> (v/v). Entretanto, devido ao alto custo do produto, é importante verificar qual tratamento irá utilizar o menor volume do produto.

Esses resultados concordaram com Lemos (2000) quando relata a eficiência na assepsia de microestacas de Graviola (*Annona muricata*) tratadas com 10 mL.L<sup>-1</sup> do anti-contaminante PPM<sup>TM</sup> por 4 horas. Digonzelli et al. (2000) observaram redução expressiva na contaminação, por bactérias, na multiplicação *in vitro* de cana-de-açúcar quando utilizaram PPM<sup>TM</sup> adicionado ao meio de cultura em concentrações acima de 0,250 mL.L<sup>-1</sup>.

#### **4.1.2 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, Cinetina e AIB na indução de calos em anteras de cafeeiro cultivar Acaia Cerrado.**

Houve interação significativa para 2,4-D e cinetina na indução de calos, enquanto, para peso da matéria fresca de calos somente houve efeito significativo dos fatores isolados (Tabela 2.A).

O aumento da produção de calos ocorreu até a concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, ponto a partir do qual o regulador de crescimento passou a inibir a produção de calos, provavelmente devido a um efeito fitotóxico promovido por concentrações superiores a esta. A melhor resposta para indução de calos foi promovida pela interação entre 2,4-D (2 mg.L<sup>-1</sup>) e cinetina (1,9 mg.L<sup>-1</sup>) (Figura 1).



- ◆ Cin (0 mg.L<sup>-1</sup>)    ■ Cil (2 mg.L<sup>-1</sup>)
- ▲ Cin (4 mg.L<sup>-1</sup>)    ● Cil (8 mg.L<sup>-1</sup>)

$$Y_{(Cin\ 0)} = 14,27 + 21,45x - 5,70x^2 \quad R^2 = 0,98$$

$$Y_{(Cin\ 2)} = 21,11 + 29,11x - 7,61x^2 \quad R^2 = 0,93$$

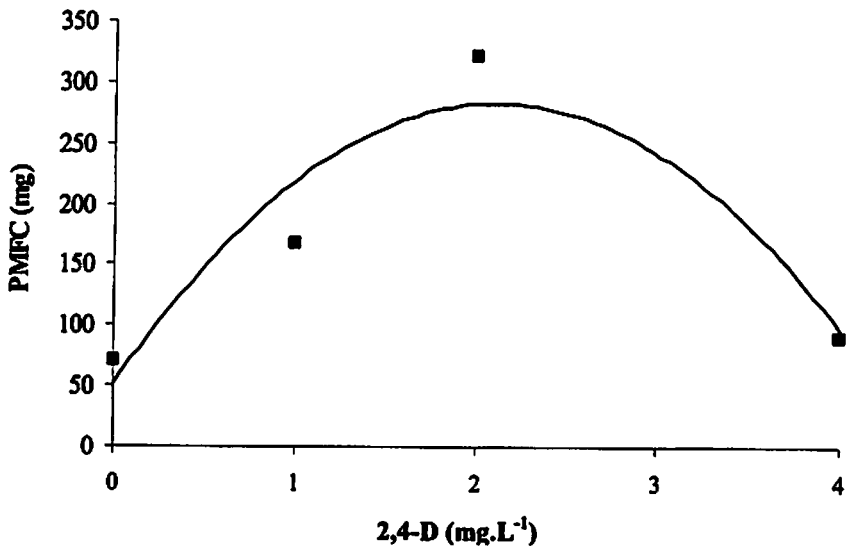
$$Y_{(Cin\ 4)} = -3,82 + 36,99x - 8,83x^2 \quad R^2 = 0,85$$

$$Y_{(Cin\ 8)} = 10,70 + 14,41x - 3,30x^2 \quad R^2 = 0,99$$

FIGURA 1. Porcentagem de indução de calos em anteras de *C.arabica* cv. Acaia Cerrado, em diferentes concentrações de cinetina e 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

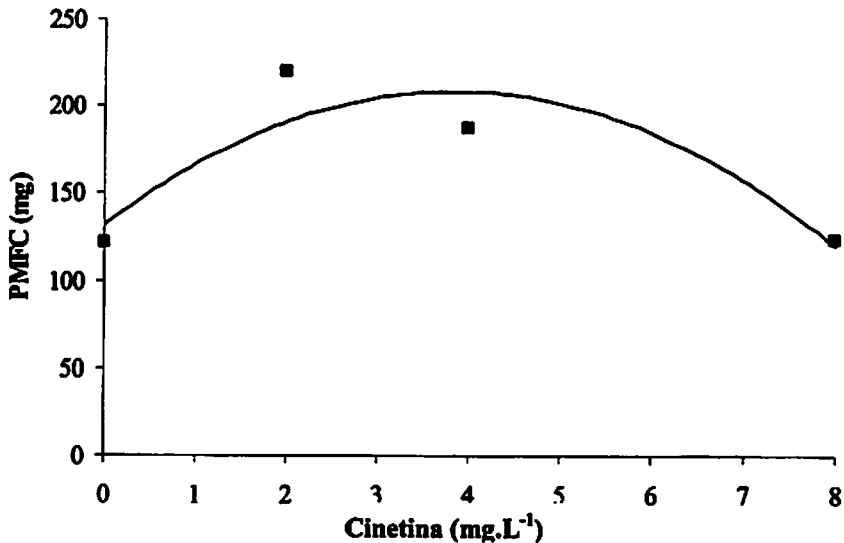
Observou-se acréscimo no peso da matéria fresca dos calos com adição de até 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, com subsequente decréscimo com o aumento das concentrações (Figura 2). O mesmo comportamento foi observado até 3,86 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina, em que também ocorreu um decréscimo no peso da matéria fresca do calo com o aumento das concentrações de cinetina adicionadas ao meio de cultura (Figura 3). Esse decréscimo no peso da matéria fresca ocorre, provavelmente, devido a um efeito fitotóxico que esses reguladores de crescimento passam a exercer acima dessas concentrações.





$$Y = 51,42 + 219,89x - 52,09x^2 \quad R^2 = 0,88$$

FIGURA 2. Peso da matéria fresca de calos oriundos de anteras de *C. arabica* cv Acaiá Cerrado, em diferentes concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.



$$Y = 131,88 + 39,88x - 5,16x^2 \quad R^2 = 0,80$$

FIGURA 3. Peso da matéria fresca de calos oriundos de anteras de *C. arabica* cv. Acaiá Cerrado, em diferentes concentrações de cinetina. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Houve interação significativa para 2,4-D e AIB para porcentagem de indução de calos e peso da matéria fresca de calos (Tabela 3.A).

Maiores porcentagens de indução de calos ocorreram com 2 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, na ausência de 2,4-D, com 0,86 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D combinado com a concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup> de AIB e com 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, na ausência de AIB (Figura 4). Assim, observou-se que a partir de determinadas concentrações, as auxinas passam a inibir a indução de calos em anteras da cultivar Acaia Cerrado, provavelmente devido a um efeito fitotóxico causado por essas.

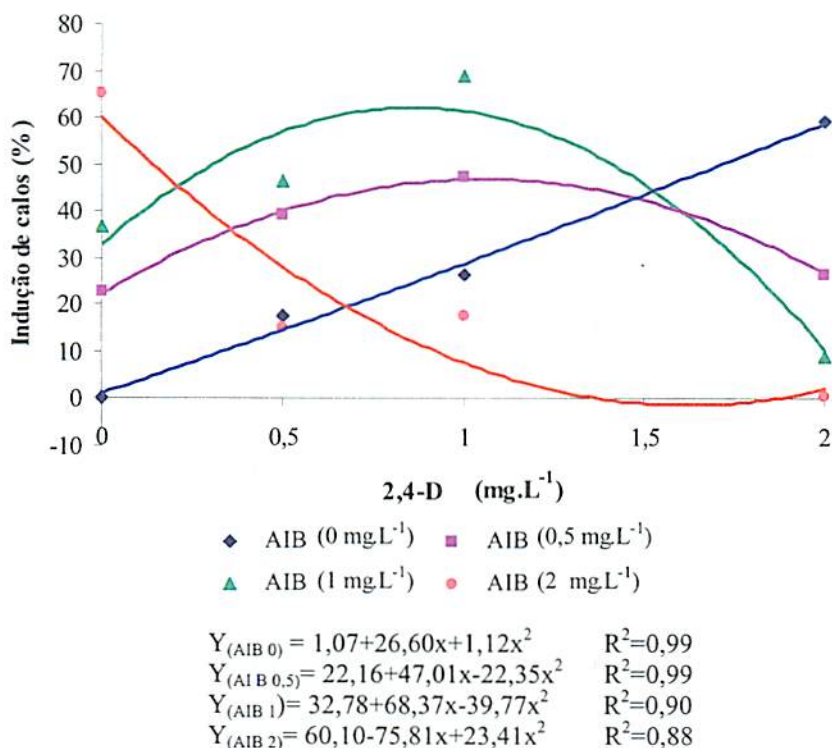


FIGURA 4. Porcentagem de indução de calos em anteras de *C. arabica* cv. Acaia Cerrado, em diferentes concentrações de AIB e 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Maior peso da matéria fresca de calos foi observado na interação entre 0,92 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, alcançando peso de aproximadamente 240 mg (Figura 5). Houve aumento no peso da matéria fresca de calos na ausência de AIB à medida que aumentaram as concentrações crescentes de 2,4-D. Entretanto, para a concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, verifica-se uma diminuição no peso da matéria fresca dos calos quando é combinada com concentrações crescentes de 2,4-D.

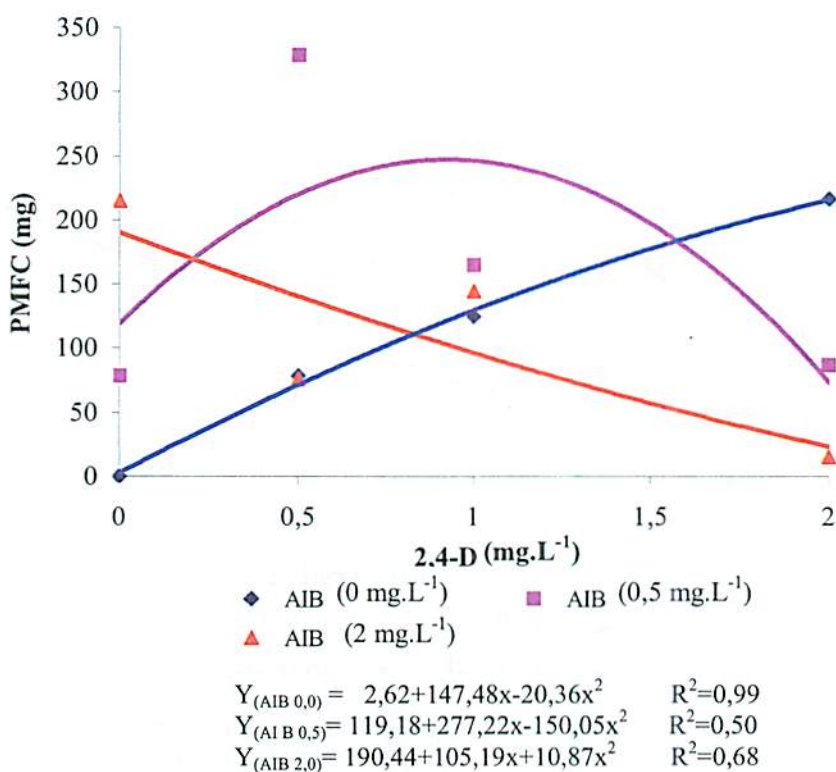


FIGURA 5. Peso da matéria fresca de calos oriundos de anteras de *C. arabica* cv. Acaiá Cerrado, em diferentes concentrações de AIB e 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

### 4.1.3 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e Cinetina na indução de calos em anteras de cafeeiro cultivar Rubi.

Observou-se a interação significativa entre as concentrações de 2,4-D e cinetina para a porcentagem de indução de calos e peso da matéria fresca de calos (Tabela 4.A). A combinação entre 1,9 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 4 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina promoveu a maior indução de calos, com valor aproximado de 40% de indução (Figura 6). Posteriormente, verificou-se que, após um máximo a concentração do regulador de crescimento passou a inibir a indução de calos.

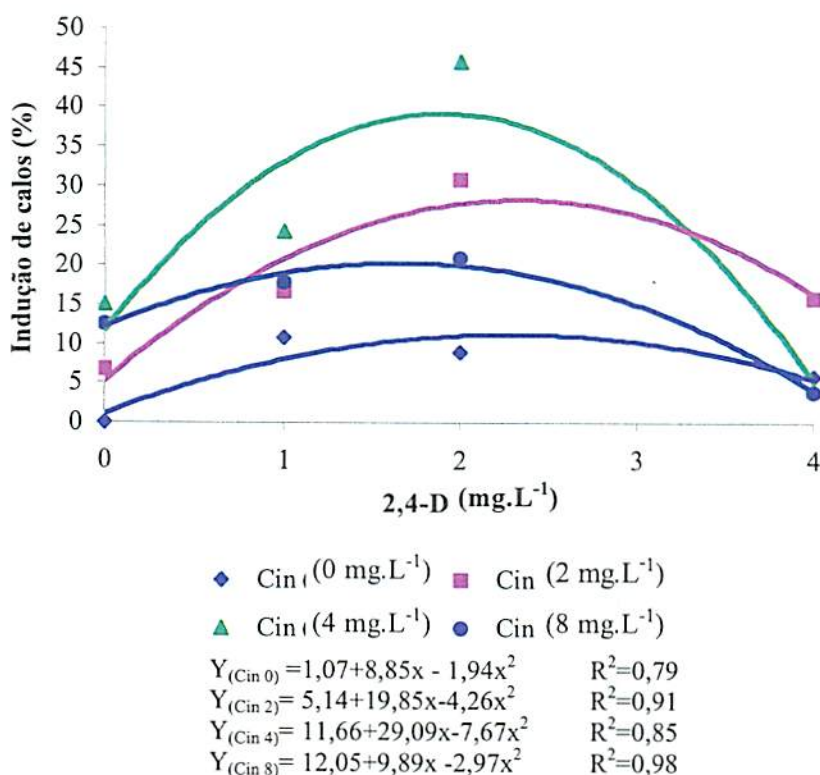


FIGURA 6. Porcentagem de indução de calos em anteras de *C. arabica* cv. Rubi em diferentes concentrações de cinetina e 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

O maior acréscimo no peso da matéria fresca de calos foi observado quando se utilizou a concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina combinada com 1,31 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D (Figura 7), após o qual houve um decréscimo.

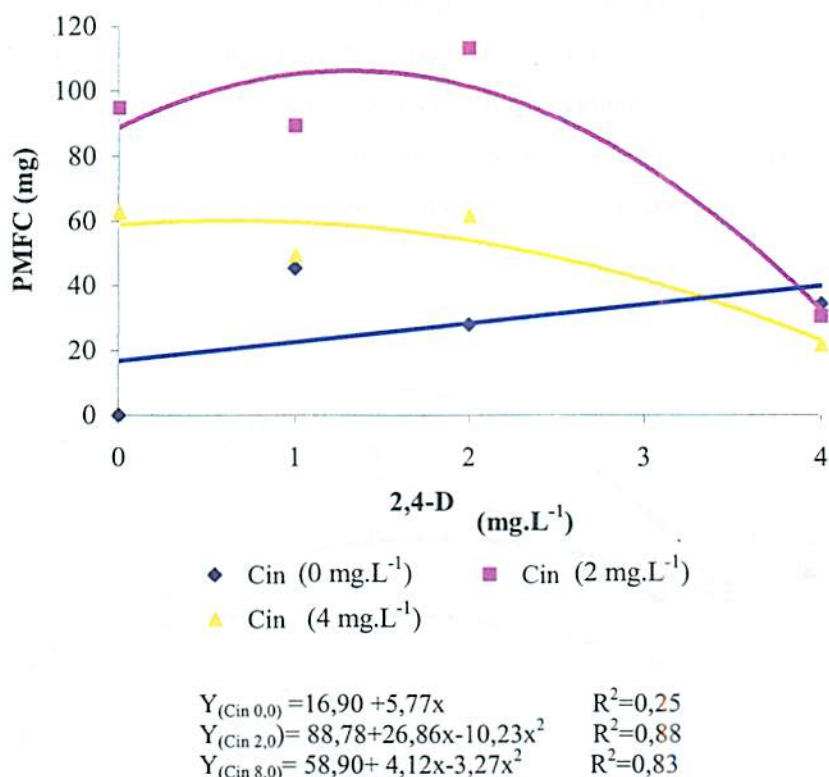


FIGURA 7. Peso da matéria fresca de calos oriundos de anteras de *C. arabica* cv. Rubi, em diferentes concentrações de Cinetina e 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Pelos resultados obtidos para indução de calos em anteras de cafeeiro, observa-se que é necessária uma auxina juntamente com citocininas, concordando com Maheshawari et al. (1982), O efeito da combinação entre auxina e citocinina para esta característica em *C. arabica* também foi observada por REZENDE et al. (2000), os quais verificaram que o regulador de crescimento

ANA combinado com cinetina não é eficiente na indução de calos em anteras dessa espécie. Observa-se, com isso, a necessidade de um estudo específico com cada regulador de crescimento, além da observação de cada um e de suas concentrações em diferentes genótipos e até mesmo dentro da mesma espécie (Silva Filho, 1989). Diferentes genótipos podem ter diferentes condições ótimas de crescimento, pré-tratamento, composição de meio de cultura e condições físicas de cultura (Magalhães Jr et al., 1995). Nakamura et al., (1997), trabalhando com anteras de sorgo, conseguiram induzir 39,4% de calos utilizando concentrações de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina + 3 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Em amoreira, Jain et al., (1996) relatam a indução de calos com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Valentim Neto et al. (2000) observaram que a maior porcentagem de indução de calos em anteras de Cajueiro Anão (*Anacardium occidentale* L.) ocorre com concentrações de 2,2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1,12 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

## **4.2 Cultura de segmentos nodais**

### **4.2.1 Influência do número de gemas laterais e da gema apical no número de brotações em segmentos nodais de cafeeiro.**

Houve interação significativa entre os pares de gemas e as cultivares para número de brotos > 1 cm e peso da matéria fresca da parte aérea, enquanto, para número total de brotos e peso da matéria seca da parte aérea, somente houve efeito significativo dos fatores isolados (Tabela 1.B).

#### **Número total de brotos**

O número total de brotos dos segmentos nodais variou significativamente em função do número de gemas e da presença da gema apical no explante, não havendo diferença significativa entre as cultivares. O melhor resultado foi observado com 3 pares de gemas (2 nós) sem a presença da gema apical, obtendo-se aproximadamente 5 brotações por explante (Figura 8), enquanto o menor número total de gemas ocorreu com 2 pares de gemas e a presença da gema apical, cerca de 1 brotação por explante.

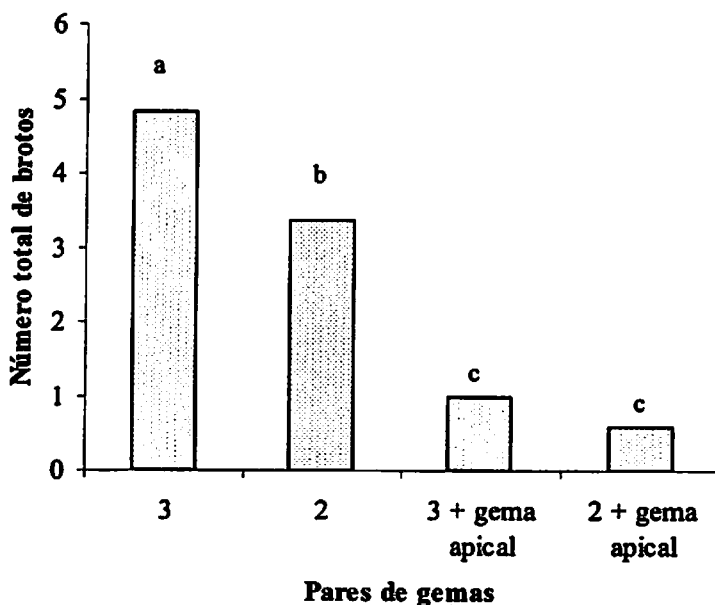


FIGURA 8. Número total de brotos formados em segmentos nodais de *C. arabica* cultivares Caturra e Catuaí, em função do número de gemas e gema apical. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Esta diferença entre o número total de brotos pode estar relacionada ao maior número de gemas existentes no explante, aumentando o número de brotos em potencial, e sem a gema apical, eliminado o efeito da dominância apical. A mesma resposta foi encontrada em estudos com cafeeiro realizados por Dublin

(1991), em que os segmentos nodais com 3 pares de gemas proporciona o maior número de brotações.

### Número de brotos maiores que 1 cm

Menor número de brotos > 1 cm na cultivar Catuai é obtido quando se usam explantes com a presença da gema apical, indicando a dominância apical, quando comparada com a cultivar Caturra, para qual o número de gemas e a gema apical não diferem. A diferença no número de brotos maiores que 1 cm entre as cultivares provavelmente está relacionada a fatores genéticos (Tabela 3). Os resultados concordam com Forni (1993), que observou maior número de brotos acima de 1 cm utilizando explantes com 3 pares de gemas em associação com  $9 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP adicionados ao meio de cultura MS.

TABELA 3. Número de brotos maiores que 1 cm de segmentos nodais de *C. arabica*, em função do número de gemas e gema apical. UFLA, Lavras-MG, 2001.

	NB > 1cm	
	Caturra	Catuai
2 pares de gemas	1,0 aA	1,2 aA
3 pares de gemas	1,2 aA	1,5 aA
2 pares de gemas + gema apical	0,7 aA	0,2 bB
3 pares de gemas + gema apical	1,1 aA	0,2 bB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5%.

### Peso da matéria fresca da parte aérea

Os tratamentos, 2 e 3 pares de gemas sem a presença da gema apical, proporcionaram maior peso da matéria fresca da parte aérea. Existe diferença



significativa entre as cultivares quando se usam 3 pares de gemas com ou sem a gema apical (Tabela 4).

TABELA 4. Peso da matéria fresca da parte aérea de segmentos nodais de *C. arabica*, em função do número de gemas e gema apical. UFLA, Lavras-MG, 2001.

	PMFPA (mg)	
	Caturra	Catuaf
2 pares de gemas	55,30 aA	58,05 bA
3 pares de gemas	70,67 aB	87,50 aA
2 pares de gemas + gema apical	15,72 cA	8,87 cA
3 pares de gemas + gema apical	34,37 bA	11,4 cB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5%.

Este comportamento dos segmentos nodais ocorreu, provavelmente, devido ao efeito da dominância apical, e para diferença entre as cultivares, devido a fatores genéticos. Os resultados estão de acordo com os obtidos por Forni (1993), que também obteve os melhores resultados de peso da matéria fresca da parte aérea, em cafeeiro, utilizando 2 e 3 pares de gemas.

### **Peso da matéria seca da parte aérea**

Pode-se observar que 2 e 3 pares de gemas sem a gema apical obtiveram os maiores pesos da matéria seca da parte aérea, quando comparados com os tratamentos em que se manteve a gema apical. Sugere-se mais uma vez o efeito da dominância apical, inibindo o desenvolvimento de brotações laterais que levam ao aumento da parte aérea (Figura 9).

Esses resultados também estão de acordo com os obtidos por Forni (1993), que obteve similaridade no peso da matéria seca da parte aérea quando

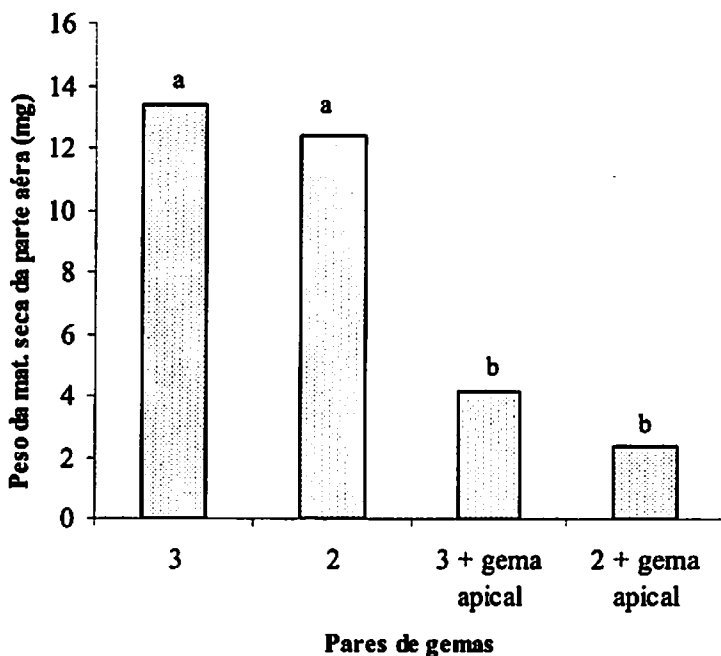


FIGURA 9. Peso da matéria seca da parte aérea de segmentos nodais de *C. arabica* cultivares Caturra e Catuaí, em função do número de gemas e gema apical. UFLA, Lavras-MG, 2001.

utilizou explantes de cafeeiro com 2 e 3 pares de gemas inoculados em meio de cultura MS suplementado com  $9 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP.

#### 4.2.2 Influência da gema apical e da posição do explante no meio de cultura no número de brotações em segmentos nodais de cafeeiro.

Houve efeito significativo para todas variáveis somente para posição do explante (Tabela 2.B).

#### Número total de brotos

A inoculação do explante na posição vertical e sem a gema apical promoveu aumento no número total de brotos, alcançando aproximadamente 3,5 brotos por explante (Figura 10). Esses resultados concordam com Dublin (1980 e 1984) quando relata que se podem obter rapidamente ramos vigorosos inoculando explantes verticalmente.

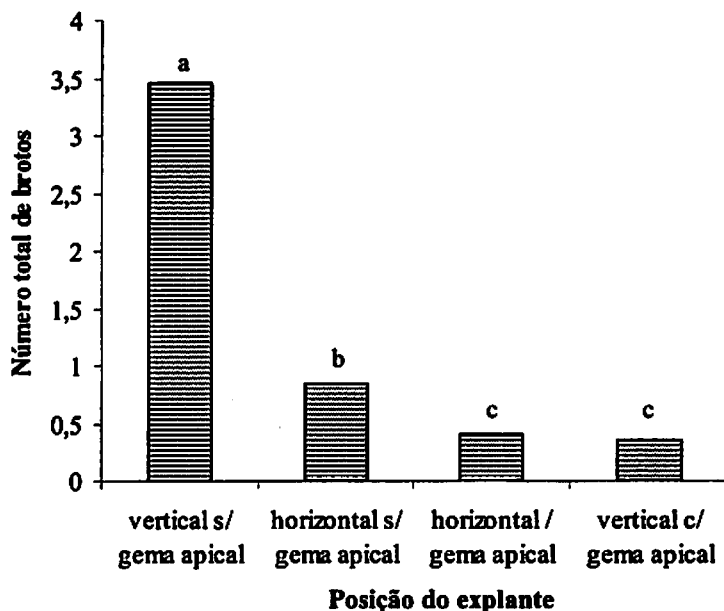


FIGURA 10. Número total de brotos de segmentos nodais de *C. arabica* cultivares Caturra e Icatu, em função da posição de inoculação do explante e da gema apical. UFLA, Lavras-MG, 200.

#### Número de brotos maiores que 1 cm

A posição vertical com a gema apical apresentou o maior número de brotos acima de 1 cm (Figura 11), sugerindo que a melhor posição de inoculação é a vertical e que, devido à dominância apical o explante passa a crescer mais e a emitir menos brotações. Segundo Hillman (1985), plantas que crescem sem

ramificações refletem uma forte influência apical, enquanto plantas ramificadas têm evidentemente, pequena influência da dominância apical.

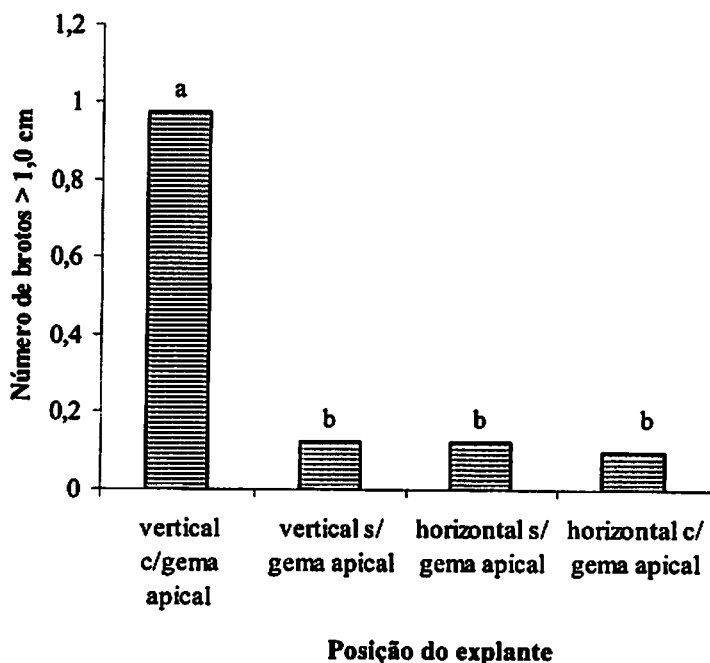


FIGURA 11. Número de brotos maiores que 1 cm de segmentos nodais de *C. arabica* cultivares Caturra e Icatu, em função da posição de inoculação do explante e da gema apical. UFLA, Lavras-MG, 2001.

### Peso da matéria fresca da parte aérea

O tratamento que proporcionou maior peso da matéria fresca da parte aérea foi a posição vertical sem a presença da gema apical, com cerca de 58 mg de matéria fresca (Figura 12). Este comportamento pode ser devido ao desenvolvimento do maior número de brotações ocorridos neste tratamento,

principalmente, devido à quebra da dominância apical proporcionada pela retirada da gema apical.

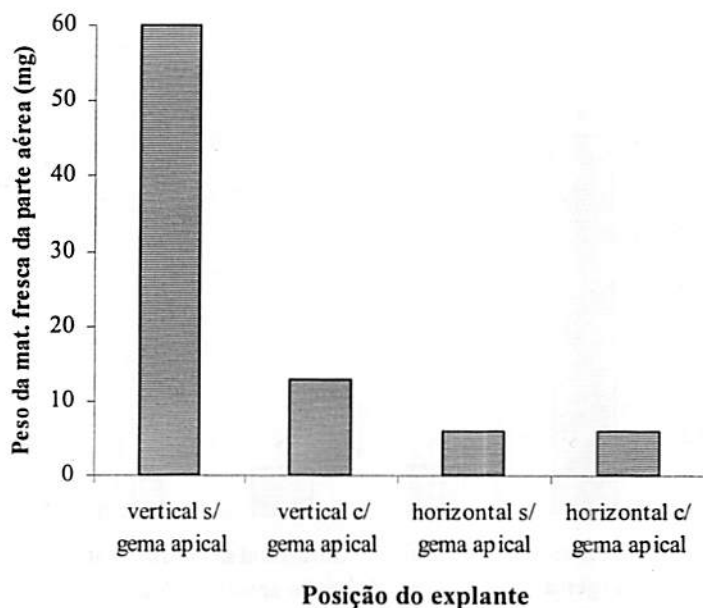


FIGURA 12. Peso da matéria fresca da parte aérea de segmentos nodais de *C. arabica* cultivares Caturra e Icatu, em função da posição de inoculação do explante e gema apical.. UFLA, Lavras-MG, 2001.

## 5 CONCLUSÕES

O anti-contaminante PPM<sup>TM</sup> na concentração de 0,500 mg.L<sup>-1</sup>, adicionado ao meio de cultura e em pré-tratamento com solução 25% (v/v) é eficiente na desinfestação de anteras de cafeeiro.

Para cultivar Acaiá Cerrado as combinações mais eficientes entre os reguladores de crescimento são 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D x 1,9 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina e 0,86 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D x 1 mg.L<sup>-1</sup> de AIB e para cultivar Rubi, 1,9 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D x 4 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Portanto, as duas cultivares de *Coffea arabica* respondem de forma diferente às concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D, AIB e cinetina na indução de calos em anteras.

A utilização de segmentos nodais de *Coffea arabica* com 3 pares de gemas sem a gema apical proporciona obtenção de maior número de brotações.

Segmentos nodais de cafeeiro inoculados na posição vertical e sem a gema apical emitem maior número de brotações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAGNOSTAKIS, S. L. Haploid plants from anthers of tobacco enhancement with charcoal. *Planta*, Berlin, v. 115, n. 3, p. 281-283, 1974.

ANDRADE, L. M. C. O. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1998. 85p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ARDITTI, J. Niacin biosynthesis in germinating *Laeliocattlya* orchid embryos and young seedling. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 54, n. 3, p. 291-298, Mar. 1967.

BAJAJ, Y. P. S. In vitro production of haploids. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. U.; YAMADA, Y. (Ed). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Mcmillan, 1984. v. 1, cap. 6, p. 229.

BANDEL, G.; CARVALHO, F. J. P. C.; CROCOMO, O. J.; SHARP, W. R.; GUTIERREZ, L. E.; CARVALHO, P. C. T. Aspectos citológicos da diferenciação de tecidos de cafeeiros cultivados "in vitro". *Anais da "Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, v. 32, p. 717-124, 1975.

BERTHOULY, M.; ECHEVERI, J. H. Multiplicación asexual de diferentes líneas de Catimor: indución *in vitro* de yemas axilares latentes. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE TECNOLOGIA CAFEEIRA, 1987, Campinas. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1987. v. 1, p. 279-283.

BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. M. High frequency somatic embryogenesis from *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 44, n. 2, p. 169-176, Feb. 1996.

① CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.37-70

CARNEIRO, M. F. Advances in coffee biotechnology. *AgBiotechNet*. v. 1, p. 12-13, 1999.

CARVALHO, A. Histórico do desenvolvimento da cultura do café no Brasil. *Boletim do Instituto Agronômico de Campinas, Campinas*, v. 9, n. 34, p. 1-7, 1993.

CLAPHAM, D. Haploid *Hordeum* plants from anthers in vitro. *Zeitschrift Fur Pflanzenzuchtung, Berlin*, v. 69, n. 2, p. 142-155, 1973.

CHEN, C. C. Effects of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice. *Crop Science, Madison*, v. 18, n. 5, p. 905-906, Sept./Oct. 1978.

CHEN, C. C.; TSAY, H. S.; HUANG, C. R. Factors affecting androgenesis in rice (*Oryza sativa* L.). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). *Biotechnonology in agriculture and forestry*. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p. 193-215.

CHU, C. C. The N<sub>6</sub> medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: SIMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, 1978, Peking. *Proceedings...* Peking: Science Press, 1978. p. 43-56.

COLLINS, G. B. Production and utilization of anther-derivd haploids in crop plants. *Crop Science, Madison*, v. 17, n. 4, p. 583-586, July/Aug. 1977.

CORREIA, D. Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido. 1993. 83p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

CUSTER, J. B. M.; VAN, E. G.; BUIJS, L. C. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. by nodal culture. In: INTERNATIONAL SCIENCE COLLOQUIUM ON COFFEE, 9., 1980, London. *Annals...* Paris: Asic, 1980. p. 586-596.

DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature occurrence, and functions. In: DAVIES, P. J. (Ed.). *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 1-12.

DIGONZELLI, P.; DÍAZ, L.; BELLONE, S. C.; LATIFE, J.; SOSA, S. Diferentes dosis de PPM para controlar la contaminacion bacteriana y sus efectos sobre el crecimiento *in vitro* de caña de azucar en la etapa de mutiplicacion. In: ENCONTO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL, 2001, Goiânia. *Resumos...* Goiânia-GO,2000. p. 90.



- DUBLIN, P. Multiplicación vegetative de café, hevea e cacao. In: ROCA, N. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tjidos en la agricultura, fundamentos e aplicaciones**. Turrialba, Costa Rica, 1991. p. 612-642.
- DUBLIN, P. Multiplication vegetative *in vitro* de L'arabusta. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v. 24, n. 4, p. 281-290, oct./dec. 1980.
- DUBLIN, P. Tequiniques de reproduction vegetative *in vitro* et amelioration genétique chez les cafeiers cultives. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v. 28, n. 4, p. 231-244, oct./dec. 1984.
- FERNANDES, M. I. B. de M. Perspectivas da biotecnologia para o melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 8, p. 881-896, ago. 1987.
- FERRY, J. F.; WARD, H. S. **Fundamentals of plant physiology**. New York: The Mac Millan, 1959. 288p.
- FORNI, R. C. Níveis de MS, BAP, número de gemas do explante e período de repicagem na produção de brotos, folhas e matéria seca, níveis de 2,4-D e cinetina para tamanho e fenótipo dos calos de *Coffea arabica* L. 1993. 81p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- GEORGE, E. F. Plant propagation and micropropagation. In: GEORGE, E. F. (Ed.) **Plant propagation by tissue culture: part 1 The technology**. 2. ed. Somerset: England: Exegetics, 1993. cap. 2, p 37-66.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Eastern Press, 1984. 709 p.
- GRANER, E. A.; GODOY JUNIOR, C. **Manual do cafeicultor**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1967. p. 320.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. **Micropropagação**, Brasília, v. 1, p. 183-260, 1998.
- GUHA, S.; MAHESHWARI, C. In vitro production embryos from anthers of *Datura*. **Nature**, London, 204, n. 4957, p. 497, Oct. 1964.
- HILLMAN, J. R. Apical Dominance. In: WILKINS, M. B. **Advanced plant physiology**. Marshfield: Ptiman, 1985. p. 127-144.

HIRANO, E. **Cultura de antera de cebola (*Allium cepa* L.) in vitro para a diferenciação de tecido haplóide.** 1975. 29p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

HUANG, H. S. Studies on medium component in anther of *Oryza sativa* by mathematical methods. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, 1981, London. **Proceedings...** London: Pitman, 1991. p. 244-246.

JAIN, A. K.; SARKAR, A.; DATTA, R. K. Induction of haploid callus and embryogenesis in "in vitro"cultured anthers of mulberry (*Morus indica*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. Dordrecht, v. 44, n. 2, p. 143-147, Feb.1996.

KELLER, H.; ARMSTRONG, K. C.; DE LA ROCHE, A. I. The production and utilization of microspore-derived haploids. In: GITES, KB.; SEM, S. K. (Ed.) **Plant cell culture in crop improvement.** New York, 1982. p. 169-183.

LEMONS, E. E. P. Organogênese e micropropagação em Anonáceas. IN: III WORKSHOP SOBRE AVANÇOS NA PROPAGAÇÃO DE PLANTAS LENHOSAS, 2000, Lavras. **Palestras...** Lavras: UFLA, 2000. p. 4-25.

LENTINI, Z.; REYS, P.; MARTÍNES, C. P.; NUÑEZ, V. M.; ROCA, W. M. **Mejoramiento del arroz con cultivo de anteras: aplicaciones en el desarrollo de germoplasma adaptado a ecosistemas latinoamericanos y el Caribe.** Cali: CIAT, 1994. 79 p.

LLOYD, G; MCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, n. 30, p. 421-427, 1980.

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

MAGALHÃES JR., A. M.; AVOZANI, O. A.; PETERS, J. A.; VIÉGAS, J.; TERRES, A. L.; ABIBI, F. R. Colchicine effect on chromosome duplication of irrigated rice haploids obtained from anther culture. In: ENCUESTRO LATINO AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., 1995, Puerto Iguazu, Argentina. **Resumos...** Puerto Iguazu: REDBIO, 1995. p. 76.

MAHESHWARI, C.; GUHA, S.; PATEL, K. R.; LOH, W. H. T. Embryogenesis and plant regeneration in anther culture. *Euphytica*, Wageningen, v. 103, n. 1, p. 1-7, 1982.

MARTINS, A. B. G. **Uso de reguladores de crescimento no enraizamento de estacas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.).** 1985. 23p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MEDINA, H. P. F.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C.; COSTA, W. M. Coffee breeding and related aspects. In: JANICK, J. (Ed.). **Plant breeding reviews.** Westport: Connecticut, 1983. p. 157-194.

MELO, B.; BATHOLO, G. F.; MENDES, A. N. G. Café: variedades e cultivares. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 193, p. 92-96, 1998.

MENDES, A. N. G. Economia cafeeira: o agrobusiness. In: MENDES, A. N. G.; RUBENS, J. G. (Ed.) **Cafeicultura empresarial - produtividade e qualidade.** Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. v. 1, p. 1-59.

MENDES, A. N. G. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: MENDES, A. N. G.; RUBENS, J. G. (Ed.) **Cafeicultura empresarial - produtividade e qualidade.** Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. v. 1, p. 1-98.

MORAES FERNANDES, M. I. B. Obtenção de plantas haplóides por meio de cultura de anteras. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 311-332.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 473-479, June 1962.

NAKAMURA, S.; NGUYEN, D. C.; YOSHIDA, T. Study on callus induction from anther and inflorescence culture of Sorghum, *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*, Fukuoka, v. 42, n. 1, p. 1-9, 1997.

NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. *Science*, Lancaster, v. 163, n. 3862, p. 85-87, Jan. 1969.

- OUYANG, J. Induction of pollen plants in *Triticum aestivum*. In: HU, H.; YANG, H. (Ed.). **Haploids of higher plants *in vitro***. Berlin: Springer-Verlang, 1986. p. 26-41, 1986.
- PETERS, J. A.; BOBROWSKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSCO, J. A. **Produção de haplóides e duplo haplóides**, v. 2, p. 569-612, 1998.
- PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. Controle hormonal do desenvolvimento das raízes. **Universa**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 181-196, 2000.
- PINTO, J. E. B. P. **Fatores que afetam o crescimento e a morfogênese**, Lavras: UFLA. 1998. 6p. (Apostila).
- POLTRONIERI, M. C. **Efeito da poda na dominância apical e frutificação de abobrinha (*Curcubita moschata* Duchesne)**. 1986. 51p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- REZENDE, D. F.; MACIEL, A. L. R.; PASQUAL, M.; PALÚ, E. G.; ALVES, J. M. C.; PEREIRA, A. R. Callus induction from *in vitro* culture of coffee(*Coffea arabica* L.) anthers. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2001, Goiânia. **Resumos...** Goiânia-GO, 2000. p. 66.
- RIBEIRO, L. S. **Cultura "in vitro" de embriões e segmentos nodais de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2001. 73 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SHARP, W. R.; CALDAS, L. S.; CROCOMO, O. J.; MONACO, L. C.; CARVALHO, A. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. **Phyton**, Harn, v. 31, n. 2, p. 67-74, 1973.
- SILVA FILHO, M. C. **Efeito de cultivares e meios de cultura na indução de calos de anteras de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1989. 79p. Disertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth organ formation in plant tissue cultured "in vitro" (Biological action of growth substances). **Symposia of the Society Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 116-131, 1957.

SUNDERLAND, N. Anther culture as a means of haploid induction. In: KASHA, K. J. (Ed.). **Haploids in higher plants: advances potentials**. Guelph: University of Guelph, 1974. p. 91- 122.

SUNDERLAND, N. Pollen and anther culture. In: STREET, H. E. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. Oxford: Blackwell, 1973. p. 205-239.

TEIXEIRA, J. B.; MARBACH, P. A. S. Fitormônios. **Universa**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 101-132, 2000.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. 864 p.

VALENTIM NETO, P. A.; BUENO, D. M.; CORREIA, D.; FIALHO, J. S. Meios de cultura para o crescimento *in vitro* de anteras de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.). In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2001, Goiânia. **Resumos...** Goiânia-GO, 2000. p. 73.

VALIO, I. F. M. Auxinas. In: FERRI, M. G. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. São Paulo: EDUE-EDUSP da Universidade de São Paulo, 1979. p. 39-70.

VAN, S.; BUIJS, P. Multiplication vegetative *in vitro* par cultura d'apex chez *Coffea arabica* L. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v. 14, n. 4, p. 275-302, oct./dec. 1980.

VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems for improvement of cereal and grass crops. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 128, n. 3, p. 193-218, May 1987.

WHITE, P. R. **A handbook of plant tissue culture**. Lancaster: Pennsylvania, Costel e Company, 1943. 273p.

YANG, H.; ZHOU, C. *In vitro* culture of unfertilized ovules in *Helianthus annuus*. In: HU, H.; YANG, H. (Ed.). **Haploid of higher plants in vitro**. Berlin, 1982. p. 182-191.

## ANEXOS

<b>ANEXO A</b>		<b>Página</b>
TABELA 1.A	Resumo da ANAVA para contaminação (%).....	47
TABELA 2.A	Resumo da ANAVA para IC e PMFC.....	47
TABELA 3.A	Resumo da ANAVA para IC e PMFC.....	47
TABELA 4.A	Resumo da ANAVA para IC e PMFC.....	48
<b>ANEXO B</b>		
TABELA 1.B	Resumo da ANAVA para NTB, NB > 1cm, PMFPA e PMSPA.....	48
TABELA 2.B	Resumo da ANAVA para NTB, NB > 1cm e PMFPA.	48

## ANEXOS

**TABELA 1.A** Resumo da ANAVA para contaminação (%). UFLA, Lavras-MG, 2001.

Causas de variação	Quadrado Médio	
	GL	Contaminação (%)
PPM <sup>TM</sup>	1	438,267*
Concentrações	6	89,081*
PPM <sup>TM</sup> xConcen.	6	78,103*
Erro	42	10,912
C.V (%)		(97,37)

\*significativo ao nível de 5 % de probabilidade.

**TABELA 2.A.** Resumo da ANAVA para IC e PMFC. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Causas de variação	Quadrado Médio		
	GL	IC(%)	PMFC (g)
2,4-D	3	3189,054*	0,021*
cinetina	3	1045,070*	0,038*
2,4-Dxcinetina	9	136,281*	0,001 <sup>ns</sup>
Erro	48	12,441	0,0007
C.V (%)		16,81	16,78

\*significativo ao nível de 5 % de probabilidade.

ns: não significativo.

**TABELA 3.A** Resumo da ANAVA para IC e PMFC. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Causas de variação	Quadrado Médio		
	GL	IC(%)	PMFC (g)
2,4-D	3	733,011*	0,016*
AIB	3	886,627*	0,014*
2,4-DxAIB	9	2624,677*	0,037*
Erro	48	28,30	0,009
C.V (%)		17,06	(73,35)

\*significativo ao nível de 5 % de probabilidade.

TABELA 4.A Resumo da ANAVA para IC e PMFC. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Causas de variação	Quadrado Médio		
	GL	IC (%)	PMFC (g)
2,4-D	3	89,501*	0,003*
cinetina	3	398,150*	0,008 <sup>ns</sup>
2,4-Dxcinetina	9	1252,553*	0,001*
Erro	48	16,068	0,0001
C.V (%)		26,75	23,79

\*significativo ao nível de 5 % de probabilidade.

ns: não significativo.

TABELA 1B. Resumo da ANAVA para NTB, NB > 1 cm, PMFPA e PMSPA. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Causas de variação	Quadrado Médio				
	GL	NTB	NB>1cm	PMFPA (mg)	PMSPA (mg)
Cultivares	1	0,661 <sup>ns</sup>	0,405 <sup>ns</sup>	0,052 <sup>ns</sup>	0,002 <sup>ns</sup>
Pares de gemas	3	32,374*	1,263*	7,560*	0,256*
Cult. X Pares de gemas	3	0,384 <sup>ns</sup>	0,668*	0,558*	0,002 <sup>ns</sup>
Erro	24	0,157	0,077	0,116	0,040
C.V (%)		16,34	31,82	25,21	78,29

\*significativo ao nível de 5 % de probabilidade.

ns: não significativo.

TABELA 2.B Resumo da ANAVA para NTB, NB > 1 cm, PMFPA. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Causas de variação	Quadrado Médio			
	GL	NTB	NB>1cm	PMFPA (mg)
Cultivares	1	0,180 <sup>ns</sup>	0,061 <sup>ns</sup>	0,004 <sup>ns</sup>
Posição do explante	3	17,418*	1,474*	4,749*
Cult. X Posição	3	0,273 <sup>ns</sup>	0,104 <sup>ns</sup>	0,051 <sup>ns</sup>
Erro	24	0,232	0,042	0,047
C.V (%)		38,19	61,93	33,25

\*significativo ao nível de 5 % de probabilidade.

ns: não significativo.