

CALOGÊNESE EM ANTERAS DE CAFEIEIRO
Coffea arabica L.

JOSÉ SÉRGIO DE ARAÚJO

2004

57395
MEX 049034

JOSÉ SÉRGIO DE ARAÚJO

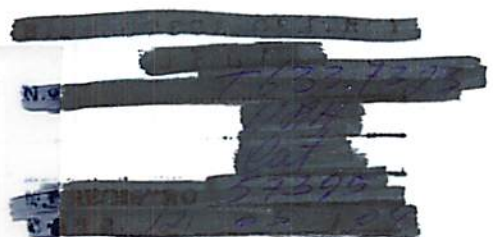
CALOGÊNESE EM ANTERAS DE CAFEIEIRO *Coffea arabica* L.

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, a para obtenção do título de Doutor.

Orientador

Prof. Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004



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

Araújo, José Sérgio de
Calogênese em anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L. / José
Sérgio de Araújo. -- Lavras : UFLA, 2004.
42 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual.
Tese (Doutorado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Androgênese. 2. Diplóide. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD-633.7323

JOSÉ SÉRGIO DE ARAÚJO

CALOGÊNESE EM ANTERAS DE CAFEEIRO *Coffea arabica* L.

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 30 de janeiro de 2004

Prof. Dr. Élberis Pereira Botrel

DAG/UFLA

Prof. Dr. João Marcos de Araújo

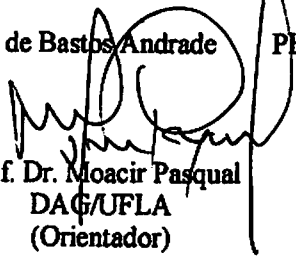
DBG/UFV

Dr. Pesquisador Leonardo Ferreira Dutra

DAG/UFLA

Dr. Pesquisador Wander Eustáquio de Bastos Andrade

PESAGRO - RIO


Prof. Dr. Moacir Pasqual
DAG/UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

OFEREÇO

A Deus, por me conceder a vida e guiar meu caminho!

Tu estás onde teus esforços te trouxeram e estarás, amanhã, lá onde eles te levarem. Realizarás a visão e os sonhos de seu coração, sejam baixos, sejam belos, ou ainda a mistura dos dois, em tuas mãos serão colocados o exato resultado dos teus esforços. Vais receber aquilo que mereces. Seja qual for o teu ambiente atual cairás, permanecerás ou te erguerás com teu pensamento, com tua visão, com teu ideal e te formarás, então, tão pequeno quanto o desejo que te controla ou te tornarás tão grande quanto à aspiração que te domina!

DEDICO

*Aos meus amados pais, Mariana e Célio (in memorian).
Aos meus queridos irmãos João Marcos, Maria Aparecida, Célia,
Laura Helena, Ângela e Paulo.
Aos meus amados sobrinhos Bernardo e Mariana.*

AGRADECIMENTOS

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

Em especial ao Prof. Dr. Moacir Pasqual, pela compreensão, orientação e apoio durante a realização deste curso.

Ao Dr. Leonardo Ferreira Dutra, pela colaboração e companheirismo.

Aos funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos, Vantuil e Claret, pela amizade, companheirismo e ajuda na execução deste trabalho.

Aos colegas de curso Alba Regina Pereira, Juliana Costa de Rezende, Alysson Lima Ferreira e Luzia Yuriko Myiada.

Aos sempre amigos Marcelo Carvalho Alves e Paula Notini Lobato.

Ao grande amigo e companheiro Fábio Pereira Dias, pela amizade inabalável e ao companheiro Afrânio Queiroz Neto.

Ao acadêmico do Centro Superior de Ensino e Pesquisa de Machado, Bruno de Carvalho Ribeiro, pela amizade e apoio durante a condução dos trabalhos.

As Professoras do Centro Superior de Ensino e Pesquisa de Machado, Giselle Prado Brigante e Hebe Perez de Carvalho, pelo apoio para a realização deste curso.

Aos amigos Pedro Moreira de Alcântara Neto e Maria Cristina Dias Mattos, pelos anos de convívio, carinho e amizade.

As sempre amigas Keyla de Lima Oliveira e Michele Pereira.

Enfim, a todos os parceiros desta conquista, a minha gratidão!

O que torna difícil a realização de um sonho é a inércia do sonhador.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Obtenção de plantas haplóides.....	4
2.2 Estádio ideal de desenvolvimento das anteras.....	6
2.3 Meios de cultura e reguladores de crescimento.....	8
2.4 Identificação de haplóides.....	12
2.5 Diploidização.....	12
2.6 Aclimatização de plantas obtidas “in vitro”.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Indução de calos em anteras de <i>C. arabica</i> L.....	17
3.1.1 Concentração de 2,4-D e cinetina.....	19
3.1.2 Concentrações de cinetina e ácido indol butírico.....	19
3.1.3 Concentrações de cinetina e ácido giberélico.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Concentrações de 2,4-D e cinetina na indução de calos em anteras de <i>C. arabica</i> L.....	20
4.2 Concentrações de cinetina e ácido indol butírico e acréscimo de 2,4-D na indução de calos em anteras de <i>C. arabica</i> L.....	25
4.3 Concentrações de cinetina e ácido giberélico e acréscimo de ácido naftalenoacético.....	30

5 CONCLUSÕES.....	35
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Estádio ideal do micrósporo de população F ₂ de <i>C. arabica</i> L. para calogênese em anteras.....	6
2. Massa fresca de calos em anteras de <i>C. arabica</i> L. população segregante F ₂ em diferentes concentrações de 2,4-D e cinetina. UFLA, Lavras-MG, 2004.....	22
3. Massa fresca de calos em anteras de <i>C. arabica</i> L. população segregante F ₂ em diferentes concentrações de cinetina e 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2004.....	24
4. Massa fresca de calos em anteras de <i>C. arabica</i> L. população segregante F ₂ em diferentes concentrações de cinetina e AIB. UFLA, Lavras-MG, 2004.....	27
5. Massa fresca de calos em anteras de <i>C. arabica</i> L. população segregante F ₂ em diferentes concentrações de AIB e cinetina. UFLA, Lavras-MG, 2004.....	29
6. Massa fresca de calos em anteras de <i>C. arabica</i> L. população segregante F ₂ em diferentes concentrações de GA ₃ e cinetina. UFLA, Lavras-MG, 2004.....	32
7. Massa fresca de calos em anteras de <i>C. arabica</i> L. população segregante F ₂ em diferentes concentrações de cinetina e GA ₃ . UFLA, Lavras-MG, 2004.....	34

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Componentes do meio de cultura utilizado para a indução de calos (IC) em anteras de <i>C. arabica</i> L. UFLA, Lavras, MG, 2004.....	17
2. Resumo da análise de variância para a característica massa fresca de calos (mg). UFLA, Lavras, MG, 2004.....	20
3. Resumo da análise de variância do desdobramento das concentrações de 2,4-D dentro de cada concentração de cinetina. UFLA, Lavras, MG, 2004.	21
4. Resumo da análise de variância do desdobramento das concentrações de cinetina dentro de cada concentração de 2,4-D. UFLA, Lavras, MG, 2004.....	23
5. Resumo da análise de variância para a característica massa fresca de calos (mg). UFLA, Lavras, MG, 2004.....	25
6. Resumo da análise de variância do desdobramento das concentrações de cinetina dentro de cada concentração de AIB. UFLA, Lavras, MG, 2004.....	26
7. Resumo da análise de variância do desdobramento das concentrações de AIB dentro de cada concentração de cinetina. UFLA, Lavras, MG, 2004.....	28
8. Resumo da análise de variância para a característica massa fresca de calos (mg). UFLA, Lavras, MG, 2004.....	30
9. Resumo da análise de variância do desdobramento das concentrações de cinetina dentro de cada concentração de GA ₃ . UFLA, Lavras, MG, 2004.....	31
10. Resumo da análise de variância do desdobramento das concentrações de GA ₃ dentro de cada concentração de cinetina. UFLA, Lavras, MG, 2004.....	33

RESUMO

ARAÚJO, José Sérgio de. Calogênese em anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L. Lavras: UFLA, 2004. 39 p. (Tese – Doutorado em Agronomia/Fitotecnia)*

Objetivou-se com este trabalho, estudar a calogênese em anteras oriundas de uma população segregante F_2 de *Coffea arabica* L. Na indução de calogênese, foi efetuada a assepsia dos botões florais com álcool 70% por 1', hipoclorito de sódio 1,4% durante 15'. Em seguida, as anteras foram extraídas, inoculadas em meio "IC" (indução de calos) e mantidas em estufa tipo BOD, sob temperatura de $27 \pm 1^\circ$ C. Para controlar a contaminação causada por fungos e bactérias, foram acrescidos ao meio 10 mg L⁻¹ de benomyl e 50 mg L⁻¹ de cloranfenicol após o meio ter sido autoclavado. Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para $5,7 \pm 1$ antes de serem autoclavados. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições e 30 anteras por placa. Experimento 1: meio IC suplementado de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg L⁻¹) e cinetina (0, 2, 4 e 8 mg L⁻¹). Experimento 2: meio IC suplementado de cinetina (0, 2, 4 e 8 mg L⁻¹), ácido indol butírico (0; 0,5; 1 e 2 mg L⁻¹) e 2 mg L⁻¹ de 2,4-D. Experimento 3: meio IC suplementado de cinetina (0, 1, 2, 4 e 8 mg L⁻¹), ácido giberélico (0; 2,5; 5; 10 e 20 mg L⁻¹) e 8 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético. Concluiu-se que a presença de fungicida e bactericida adicionado ao meio de cultura reduz consideravelmente a contaminação causada por microorganismos. A combinação entre 2,4-D e cinetina favorece a indução de calos primários. A combinação de concentrações de 8 mg L⁻¹ cinetina e AIB a 1 mg L⁻¹ atua favoravelmente na indução de calos. Sugere-se que o GA₃ tenha um efeito no aumento da rapidez de crescimento dos calos provenientes de anteras de cafeeiro.

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

ABSTRACT

ARAÚJO, José Sergio de. Anthers callogenesis in *Coffea arabica* L. Lavras: UFLA, 2004. 39p. (Thesis – Doctoral in Agronomy/ Crop Science)*

This work was carried out to study the anthers callogenesis from *Coffea arabica* L. segregated population F₂ in the callogenesis induction, the floral buds had an asepsis with 70% alcohol during 1', with sodium hipochloride 1,4% during 15'. Later, the anthers were extracted, inoculated in "IC" medium – Callus Induction and kept in the growth chamber from the type BOD under 27° ± 1]C temperature. To control fungi and bacteria contamination it was added to the medium 10 mg L⁻¹ of Benomyl and 50 mg L⁻¹ of chlorophetical right after autoclaveted the medium. The culture media had their pH adjusted to 5,7 ± 1 before they had been autoclaved. There were three experiments. The experimental design used here was randomized factorial scheme 4 x 4, except for the experimental number 3, that was factorial scheme 5 x 5. All experiments had 4 competitions and 30 anthers per disk. The experiment number 1: coffee anthers were inoculated in IC medium supplied with 2,4-D (0, 1, 2 and 4 mg L⁻¹) and kinetine (0, 2, 4 and 8 mg L⁻¹). The experiment number 2: coffee anthers were inoculated in IC medium supplied with kinetine (0, 2, 4 and 8 mg L⁻¹), indol butyric acid (0; 0,5; 1 and 2 mg L⁻¹) and 2 mg L⁻¹ of 2,4-D. The experiment number 3: those coffee anthers were inoculated in IC medium supplied with kinetine (0, 1, 2, 4 and 8 mg L⁻¹), giberellic acid (0; 2,5; 5; 10 and 20 mg L⁻¹) and 8 mg L⁻¹ of naphthalenoacetic acid. It was concluded that fungicide and bactericide added into the medium decrease greatly contamination caused by microorganisms, 2,4-D and kinetine combination are very much favorable to the primary callus induction. The dosage combinations of kinetine to 8 mg L⁻¹ and AIB and also to 1 mg L⁻¹ acts in the callus induction, although there are few account in the literature about those combinations action of GA₃ with others growth regulator to callus induction in anthers, it suggests that those have an effect in the quickly increase in the callus formation.

* Guidance committee: Prof. Dr. Moacir Pasqual – UFLA (Major Professor)

1 INTRODUÇÃO

Atualmente ainda é evidente a importância da cafeicultura, que tem sido responsável, nos últimos anos, por aproximadamente 5% do valor total das exportações brasileiras. Além do aspecto econômico, a atividade apresenta ainda relevada importância social como atividade geradora de emprego e fixadora da mão-de-obra no campo.

O sucesso da cafeicultura deve-se, em parte, aos avanços obtidos nos trabalhos de melhoramento genético dessa cultura. Como resultado, têm sido liberadas para os produtores variedades melhoradas, adaptadas às diferentes regiões cafeeiras e aos sistemas de cultivo, com elevada produtividade de grãos.

O melhoramento genético do cafeeiro por meio de métodos convencionais, principalmente hibridação, seguida da seleção de populações, avaliação de progênies, retrocruzamentos e cruzamentos interespecíficos, é um processo demorado, podendo levar mais de 30 anos para se obter uma nova cultivar (Almeida et al., 2000). Pelo fato do cafeeiro ser uma espécie perene, de ciclo longo e porte arbustivo, as dificuldades práticas do melhoramento genético referem-se, principalmente, ao tempo e à extensão da área experimental necessários para o desenvolvimento de variedades.

Apesar do tempo e dos recursos despendidos, os programas de melhoramento 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 (Carvalho, 1993). Contudo, nos últimos anos, surgiram novos problemas como doenças, pragas e nematóides, bem como maior exigência do mercado consumidor quanto à qualidade do produto obtido, entre outros fatores. Isto tem se constituído em novas informações de pesquisa, demandando o uso de técnicas de melhoramento mais avançadas.

O objetivo do melhoramento de espécies autógamas, após a hibridação entre dois ou mais genitores, é a produção de linhagens homozigóticas. Com os métodos convencionais de melhoramento genético, o procedimento para a obtenção de linhagens com alta pureza genética requer várias gerações de autofecundação. O tempo gasto no avanço de gerações, até que o nível de homozigose desejado seja atingido, pode compreender vários anos, conforme comentado anteriormente.

A produção de linhagens homozigóticas por meio de di-haplóides pode reduzir este tempo consideravelmente. Existem alguns métodos para a obtenção de di-haplóides, cuja eficiência é variável de acordo com a espécie. Uma das técnicas é a cultura de anteras, a qual tem se mostrado eficiente para diversas espécies, sendo uma alternativa para acelerar os programas de melhoramento genético na cultura do cafeeiro.

O interesse nas plantas di-haplóides de *Coffea arabica* L. deve-se à sua grande aplicabilidade nos estudos de genética básica e aplicada, já que os genes se expressam livres do fenômeno da dominância, podendo os genes recessivos serem estudados mais facilmente; além disso, linhagens homozigotas podem ser obtidas por duplicação do número de cromossomos, substituindo as inúmeras gerações de autofecundação necessárias no processo convencional. Como a segregação genética em di-haplóides é menos complexa, a população de plantas necessárias para se isolar uma determinada combinação gênica é relativamente menor. O uso desta técnica traz, como vantagem, o menor tempo necessário para a obtenção de novas linhagens quando comparada com os outros métodos de melhoramento convencionais.

Visando subsidiar futuros programas de melhoramento do cafeeiro com a utilização de técnicas envolvendo a cultura de anteras, o presente trabalho teve por objetivo avaliar diferentes combinações de reguladores de crescimento na

indução de calos a partir de anteras oriundas de uma população F_2 de *C. arabica*

L.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Obtenção de plantas haplóides

A totipotência celular foi inicialmente teorizada em meados do século XIX, baseada em observações da elevada capacidade de regeneração das plantas. Em 1953, Muir, citado por Henshaw et al. (1982), conseguiu regenerar plantas a partir de células isoladas, demonstrando a teoria da totipotência.

O primeiro trabalho com sucesso utilizando plantas haplóides, numa espécie importante na alimentação mundial, foi realizado com arroz (*Oryza sativa*), por Niizeki & Oono (1968), citados por Vasil et al. (1979). Este trabalho despertou grande interesse nos pesquisadores chineses que, usando esta técnica, produziram uma série de cultivares que são cultivadas em vastas áreas.

O grande interesse despertado pela cultura de anteras está relacionado à aplicabilidade para a genética e melhoramento de plantas. Além de reduzir o tempo necessário para a obtenção de linhagens homozigóticas, esta técnica permite o estudo de mutações recessivas, visto que indivíduos haplóides, por constituírem-se de apenas um complemento cromossômico, não apresentam problemas de dominância e recessividade (Fernandes, 1987).

Atualmente já foram obtidos di-haplóides em mais de 200 espécies, incluindo as monocotiledôneas e eudicotiledôneas (Dunwell, 1986). Em gramíneas, os trabalhos de Schazffer et al. (1979) e Ouyang et al. (1983) em trigo, Chen et al. (1982) e Tian & Chen (1983) em arroz e Clapham (1973) em cevada, são apenas alguns exemplos da produção de di-haplóides via cultura de anteras. Apesar de inúmeras realizações, essa técnica deve ser muito bem estudada para descobrir métodos que rompem as barreiras existentes em algumas espécies de interesse, que impedem ou dificultam a sua utilização. Estudos criteriosos devem ser realizados no que se refere ao genótipo do material

utilizado, o estágio ideal do explante, condições de cultivo, idade da planta doadora, meios de cultura e condições físicas adequadas (Moraes- Fernandes, 1990).

Segundo Nitsch (1981), as chances de se obter plantas di-haplóides viáveis pela cultura de anteras dependem de: (1) viabilidade do pólen, (2) vigor que a planta apresenta no estágio homocigoto (as plantas alógamas são geralmente inferiores às plantas autógamas) e (3) a reação das plantas haplóides em relação aos agentes duplicadores dos cromossomos.

Existem duas rotas para a regeneração de plantas a partir da cultura de anteras: embriogênese gamética e organogênese. Na embriogênese gamética, o micrósporo, ou grão de pólen imaturo cultivado em meio nutritivo, divide-se repetidamente, formando embrióides. Com o crescimento e o desenvolvimento, os embrióides desenvolvem, em meio nutritivo com adequado balanço de reguladores de crescimento, a parte aérea e o sistema radicular, podendo ser aclimatadas e transplantadas para casa de vegetação.

Na via organogênica, os micrósporos desdiferenciam-se e, com sua divisão, formam uma massa amorfa denominada calo, que pode ser induzido à regeneração de parte aérea e, posteriormente, de sistema radicular, processo denominado de organogênese. Na embriogênese, o micrósporo comporta-se como um zigoto e sofre vários estágios 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 em 4 a 8 semanas.

Na organogênese, os micrósporos, em vez de passar pela embriogênese, dividem-se algumas vezes, formando os calos, os quais emergem através da parede da antera. As plantas derivadas de calos podem apresentar variações genéticas (Pasqual & Pinto, 1988).

2.2 Estádio ideal de desenvolvimento das anteras

Para se iniciar um estudo utilizando a técnica da cultura de anteras é necessário que se determine o estágio ideal de desenvolvimento da mesma, o qual deve conter micrósporos em fase que respondam melhor aos processos androgenéticos. Inúmeros trabalhos têm demonstrado que os micrósporos respondem melhor em uma determinada etapa do seu desenvolvimento, sendo o estágio uninucleado o mais adequado para a maioria das espécies, ou seja, a melhor fase é aquela em que o micrósporo está recém-libertado da tétrade meiótica (Moraes-Fernandes, 1990; Luz, 1995; Andrade, 1998; Araújo et al., 2002b).

Estudos mostram que os genes do RNA ribossômico e de transferência do grão de pólen desligam-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 (Mascarenhas, 1971; Vasil et al., 1979; Moraes-Fernandes & Picard, 1983).

Na cultura do arroz, foi verificado que o estágio de tétrade não responde bem ao desenvolvimento da antera, sendo os estádios de micrósporos uninucleados médio e tardio os melhores para a cultura de anteras (Chen et al., 1982; Karin et al., 1985; Mercy & Zapata, 1986). Trabalhos com aveia mostraram que o estágio ideal é aquele que contém micrósporos no estágio uninucleado médio (Islam et al., 1992). Em trigo verificou-se o estágio ideal como sendo o com micrósporo, entre o médio e o último estágio uninucleado (Sibi et al., 1979). Em aspargo e pimentão, o estágio ideal foi verificado com botões florais que continham anteras em estágio uninucleado, estando próximo à primeira divisão mitótica nuclear (Zhou & Konzak, 1992; Wolyn & Feng, 1993).

Botões florais de batata inglesa, com tamanho variando entre 4 e 6 mm, continham micrósporos uninucleados ou em estágio de tetrade, sendo ideal para o desenvolvimento das anteras (Calleberg & Johansson, 1993).

Trabalhos de microsporogênese em cafeeiro mostram que o tamanho ideal do botão floral para o desenvolvimento da antera varia entre 3 a 4 mm, correspondendo à fase uninucleada central (Ascanio & Arcia, 1994).

Andrade (1998), verificando a correlação entre o tamanho do botão floral de algumas variedades de *C. arabica* e o micrósporo no estágio uninucleado, observou que o tamanho do botão contendo micrósporos no estágio ideal variava entre 4,50 a 5,50 mm. Entretanto, Araújo et al. (2002 b) verificaram, em uma população segregante F_2 de *C. arabica*, que o estágio uninucleado do micrósporo (Figura 1) correspondia àquele em que os botões florais apresentavam tamanho de 5,00 a 5,50 mm.

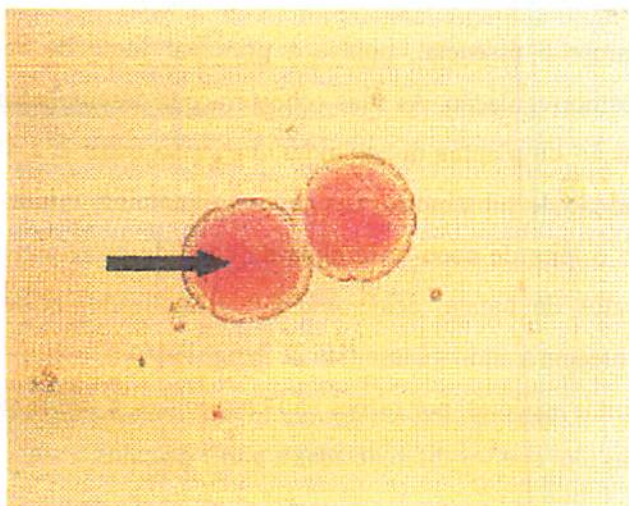


FIGURA 1. Estádio ideal do micrósporo de população F_2 de *C. arabica* L. para calogênese de anteras Araújo et al. (2002b).

2.3 Meios de cultura, reguladores e fatores de crescimento

O meio de cultura é um dos fatores mais importantes para o sucesso da cultura de anteras e sua composição varia conforme a espécie. Os meios mais amplamente usados na cultura de anteras são o “MS” (Murashige & Skoog, 1962), “W63” (White, 1963) e “N-H” (Nitsch & Nitsch, 1969) ou suas modificações com vários aditivos. Basicamente, o meio é composto por sais minerais, sacarose, vitaminas, reguladores de crescimento e ágar (Moraes-Fernandes, 1990). Para estimular o desenvolvimento e a regeneração, são utilizados reguladores de crescimento, tais como as auxinas, citocininas e giberelinas.

A embriogênese é iniciada pelos reguladores de crescimento, sendo que a presença destes, especialmente auxinas e citocininas no meio de cultura, aumenta a divisão celular. Para se obter plantas di-haplóides, via androgênese, é necessário adaptar a composição do meio de cultura ao açúcar ou aminoácidos junto com os reguladores de crescimento (Nitsch, 1981).

A sacarose é essencial, pois é a principal fonte de carbono e está envolvida na osmorregulação. As suas concentrações desempenham importante papel na obtenção de plantas di-haplóides, variando entre 2 e 4% (Clapham, 1973). A utilização de substâncias, tais como a glutamina, o inositol e extratos naturais, como o leite de coco ou a água de coco desproteïnizada, extrato de levedura, extratos de batata, ácido nucléico hidrolizado, ácido ascórbico e glutatona, favorecem a androgênese (Hu & Zeng, 1986).

Em muitas espécies, por razões não conhecidas, a embriogênese direta é rara e as plantas têm que ser diferenciadas a partir de calos. Para indução destes, geralmente é necessária uma auxina e, para a regeneração de plantas, um simples meio básico é suficiente, ou o uso de citocininas junto com baixas concentrações de auxina (Maheshwari et al., 1982). Clapham (1973) mostrou que, em cereais,

altas concentrações de auxinas como o 2,4-D são necessárias e que usualmente ANA, AIA e citocininas podem ajudar a indução de calos.

Além do meio, 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, exceto para os cereais nos quais a condição de escuro tem dado melhores resultados. Essas condições variam de acordo com a espécie e até mesmo com o genótipo (Moraes-Fernandes, 1990).

Existe relação entre o genótipo e o desenvolvimento da planta di-haplóide por meio da cultura de anteras. É importante observar as características do gênero, da espécie, bem como dos parentais. Zapata (1985) observou que, em arroz, melhores respostas foram obtidas em híbridos F₁ do que com seus pais endogâmicos e que as variedades japônicas respondem melhor que as índicas. Em aspargo, verificou-se interação entre genótipo, temperatura de incubação e data da semeadura (Wolyn & Feng, 1993). Em milho, foi verificado que a capacidade androgenética de algumas cultivares está ligada a genes nucleares e de caráter aditivo, mostrando potencial para a seleção “in vitro” de parentais, com o objetivo de aumentar a resposta à cultura de anteras (Zhou & Konzak, 1992). Moraes-Fernandes (1990) verificou que os diplóides originados de parentais com alta capacidade androgenética possuem boas respostas para a produção de plantas di-haplóides por meio da cultura de anteras, indicando que os genes podem afetar diretamente o desenvolvimento desta técnica.

O insucesso da cultura de anteras pode estar relacionado com a correlação existente entre os genótipos, visto que a maioria dos pesquisadores não utiliza várias cultivares. Na maioria das vezes, faltam dados detalhados sobre as respostas da cultura a ser utilizada, sendo necessário utilizar vários materiais para analisar quais possuem melhores respostas.

O estado fisiológico da planta doadora também influencia na resposta do potencial esporofítico dos micrósperos, assim como as diferentes estações do ano influenciam o estado endógeno da planta. Flores produzidas no início do florescimento e as que crescem em dias curtos e alta luminosidade apresentam maior capacidade embriogênica (Moraes-Fernandes, 1990).

Alguns trabalhos mostraram grande potencial na formação de calos ou embriões por meio da cultura de anteras, tais como anteras de milho inoculadas e mantidas por uma semana a 14°C e depois passadas para luz contínua a 28°C (Moro, 1987); trigo inoculado em meio líquido contendo 2,4-D e 20 g de sacarose, mantidos em condições de escuro, com temperaturas variando entre 26 e 28°C (Zhou et al., 1992); aspargo em meio "MS" contendo caseína hidrolisada, glutamina, ANA, BAP, 5% de sacarose e a 35°C e batata com as anteras inoculadas em meio gelatinizado contendo amido de batata a 3% com os seguintes reguladores de crescimento: BAP a 0,013 mM e AIA a 0,02 mM (Calleberg & Johansson, 1993).

Em trabalhos com cafeeiro, os meios mais utilizados são básicos, indutores de calos, embriogênese e meio para desenvolvimento do embrião. O meio básico é o "MS", contendo basicamente 100 mg.L⁻¹ de inositol, 0,4 mg.L⁻¹ de tiamina, 30 mg.L⁻¹ de cisteína e 30 g de sacarose e de consistência sólida. Para o meio indutor de calos, utiliza-se o meio básico acrescido de 2mg.L⁻¹ de AIB e 8mg.L⁻¹ de BAP. Para o meio embriogênico, basta adicionar 5% de água de coco, 0,5 mg.L⁻¹ de AIA e 1 mg.L⁻¹ de 2-isopentil adenina (2ip). Para completar o desenvolvimento do embrião propriamente dito, adicionam-se ao meio "MS" a metade da concentração de inositol, tiamina, sacarose, 5% de água de coco e 3 mg.L⁻¹ de BAP.

Araújo et al. (2003a) obtiveram respostas de calogênese em anteras de *C. arabica* cv. Acaia Cerrado, utilizando o meio básico "MS" acrescido de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D combinados com 2mg L⁻¹ de cinetina. Resultados promissores

também foram obtidos pelos mesmos autores, quando adicionaram ao meio "MS" 1 mg L⁻¹ de 2,4-D juntamente com 1 mg L⁻¹ AIB.

Entretanto, Araújo et al. (2003d), verificando calogênese em *C. arabica* cv. Rubi, constataram interação significativa entre 2,4-D e cinetina para porcentagem de indução de calos e massa fresca, observando que as melhores respostas foram obtidas quando empregaram 2 mg L⁻¹ de 2,4-D e 4 mg L⁻¹ de cinetina. Pelos resultados obtidos para calogênese em anteras de cafeeiro, independente do material genético, puderam concluir que é necessária uma auxina juntamente com uma citocinina e, comparados à cultivar Acaiá Cerrado, os materiais respondem de forma diferente às concentrações dos reguladores de crescimento.

Além dos reguladores de crescimento, compostos orgânicos são adicionados ao meio de cultura, para suprirem as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células. De todos os aditivos, a água de coco é o que tem sido mais utilizado para um grande número de espécies "in vitro", não somente para estimular o crescimento do calo, mas também para aumentar a formação de embriões. Verificando a calogênese em anteras de uma população F₂ de *C. arabica*, Araújo et al. (2003 b, c) empregaram diferentes concentrações de 2,4-D combinadas com água de coco, acrescidas ao meio de cultura "IC" (indução de calos) (Tabela 1). Os autores observaram que o melhor resultado para porcentagem de indução de calos foi obtido quando se utilizou 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D combinado com 50 ml L⁻¹ de água de coco.

Para o desenvolvimento do calo, as anteras devem ser mantidas no escuro com temperatura variando de 25 a 26°C e umidade relativa entre 60 a 70%. Para o desenvolvimento do embrião, os calos devem ser mantidos no claro, com fotoperíodo de 12 horas (Ascanio & Arcia, 1994).

2.4 Identificação de haplóides

A determinação do nível de ploidia é, normalmente, realizada por meio da contagem do número cromossômico, em meristemas apicais de raiz. Para a contagem do número de cromossomos emprega-se a técnica de esmagamento de raízes proposta por Guerra (1955). No entanto, essa técnica é muito trabalhosa, sendo que em alguns casos, também é possível determinar a ploidia das plantas regeneradas por meio da contagem do número de cloroplastos das células epidérmicas das folhas (Kerbauy, 1981).

2.5 Diploidização

Após a obtenção da planta haplóide é necessário restabelecer a ploidia. Existem vários métodos utilizados para a duplicação dos cromossomos, entretanto, o mais utilizado é a colchicina, por ser ela específica e não provocar no tecido outro distúrbio senão a duplicação dos cromossomos. É um alcalóide que afeta a divisão celular, promovendo supressão da anáfase pela inibição da formação das fibras do fuso de divisão, de modo que núcleos poliplóides se formam pela passagem dos cromossomos da metáfase diretamente à interfase, resultando em uma célula com o número cromossômico duplicado.

A colchicina é mais freqüentemente utilizada como uma solução aquosa, mas pode também ser dissolvida em álcool ou em 10% de glicerina com água ou aplicada como uma parte de lanolina ou ágar. Concentrações ótimas variam com a espécie, de 0,1 a 0,5%.

A adição de várias substâncias à solução de colchicina tem aumentado a freqüência de duplicação. Para o arroz utiliza-se uma solução de 0,1g colchicina dissolvida em 2 ml de DMSO (dimetilsulfóxido) acrescentando 4 gotas de

Tween-20, completando o volume para 100 ml com água destilada. Esse tratamento produz duplicação de cromossomos em 35% das plantas haplóides (Zapata, 1985).

Além da colchicina, outros produtos, como herbicidas (orizalin, trifuralin, amiprofosmetil e pronamide), podem ser utilizados como agentes antimitóticos (Wan et al., 1991).

Cabe ressaltar, no entanto, que esta metodologia apresenta algumas limitações de uso, como a mutagenicidade, perda de vigor em algumas espécies e ainda o surgimento de plantas com vários níveis de ploidia.

2.6 Aclimatização de plantas obtidas “in vitro”

A aclimatização é um dos processos indispensáveis para a obtenção de plantas propagadas por meio da cultura de tecidos. Visa adaptá-las a um ambiente muito diferente daquele onde foram desenvolvidas, delimitado por condições ambientais peculiares. Inúmeras pesquisas têm sido realizadas no sentido de amenizar o impacto sofrido pela planta no momento da transferência do laboratório para o solo. A aclimatização consiste numa fase intermediária de adaptação à qual a planta é submetida para, posteriormente, passar às fases de desenvolvimento no campo.

As folhas de plantas micropropagadas apresentam pouca quantidade de ceras epicuticulares, cutícula mais fina e baixa funcionalidade dos estômatos sob condições de baixa umidade relativa do ar. As raízes são, de modo geral, quebradiças, pouco funcionais na absorção de água e nutrientes e freqüentemente morrem ao serem transferidas para o solo, já que há poucas conexões vasculares entre as raízes e as brotações. As plantas micropropagadas têm, em geral, um mecanismo heterotrófico em relação à fonte de carbono e

energia proveniente de componentes do meio de cultura, como a sacarose. A capacidade fotossintética das folhas de brotações micropropagadas é menor do que a metade daquela que ocorre em folhas dentro da estufa e, portanto, muito inferior àquela que ocorre em condições de campo (Pasqual, 2000). Segundo esse mesmo autor, quando da transferência das plantas do cultivo "in vitro" para a casa de vegetação e/ou solo, há a necessidade de que a planta converta seu mecanismo de nutrição de heterotrófico para autotrófico. A umidade relativa do ar no interior dos recipientes é próxima a 100% e no momento da transferência, a planta enfrenta uma redução drástica para níveis frequentemente próximos a 70% ou menos. O principal meio de controle ambiental na aclimatização é a elevação da umidade relativa do ar, em particular no início do processo, pela cobertura com filme plástico sob sombrite, juntamente com nebulização intermitente. O grau de sombreamento e a nebulização são cuidadosamente diminuídos com o passar do tempo, favorecendo o desenvolvimento do autotrofismo.

Outro fator importante no processo de aclimatização é o substrato. Inúmeros substratos são utilizados, destacando-se os derivados de turfa, vermiculita, perlita, areia, plantmax, casca de arroz carbonizada, solo, etc. Em linhas gerais, um bom substrato é aquele que: a) não encolhe ou expande com a variação da umidade; b) retém água em quantidade suficiente; c) é suficientemente poroso para permitir a drenagem da água e aeração; d) está livre de invasoras, nematóides ou outros patógenos; e) não apresenta nível excessivo de salinidade; f) permite a esterilização por autoclavagem e g) contém nutrientes essenciais para o desenvolvimento sadio da planta.

A associação de materiais, especialmente em mistura com o solo, permite melhorar a textura e condições para o desenvolvimento das plantas. Assim, a grande maioria dos trabalhos com substratos inclui misturas de solo, areia, vermiculita e materiais orgânicos. Em misturas, o solo e a turfa participam

como retentores de umidade e fornecimento de nutrientes e a areia, serragem ou casca de arroz, como condicionadores físicos. A mistura com materiais orgânicos beneficia as condições físicas do substrato e fornece nutrientes, favorecendo o desenvolvimento das raízes e da planta como um todo.

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), em Lavras, MG. Plantas matrizes, mantidas pelo setor de cafeicultura da UFLA e oriundas do cruzamento entre 'Catucaí e Catuai', constituíram a população segregante F_2 . Foram realizadas todas as recomendações agronômicas necessárias para o controle fitossanitário nas plantas matrizes.

Botões florais desta população segregante F_2 de *C. arabica* L., com 4,5 mm a 6 mm de comprimento, foram coletados entre 8 e 9 horas da manhã e lavados em água corrente durante 5 minutos, mantidos por 1 minuto em álcool 70%, durante 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio 1,4% e, finalmente, em câmara de fluxo laminar, lavados três vezes com água destilada autoclavada. Em câmara de fluxo laminar, os experimentos foram instalados em placas de petri de poliestireno de 100 mm de diâmetro, previamente desinfetadas com formol, nas quais 20 ml do meio de cultura após ser autoclavado foram adicionados. As anteras foram extraídas dos botões ainda fechados, por meio de uma incisão em um dos seus lados. Os experimentos foram instalados em condições assépticas, utilizando meio de cultura "IC" (Tabela 1) com algumas modificações, conforme os experimentos citados a seguir.

TABELA 1. Componentes do meio de cultura utilizado para a indução de calos (IC) em anteras de *C. arabica* L. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Componentes	IC (mg L ⁻¹)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	220,0
KH ₂ PO ₄	85,0
KNO ₃	950,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185,0
NH ₄ NO ₃	825,0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0125
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0125
H ₃ BO ₃	3,1
KCl	0,415
MnSO ₄ ·4H ₂ O	11,15
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,125
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4,3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	13,90
Na ₂ EDTA·2H ₂ 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
Agar	5.000

Fonte: Berthouly & Michaux-Ferriere (1996)

3.1 Indução de calos em anteras de *C. arabica* L.

Foi utilizado, para a instalação dos experimentos, o meio nutritivo sólido "IC" (Tabela 1), de indução de calos, acrescido de 600 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico e com pH ajustado para 5,7 ± 1 antes de ser autoclavado a 120°C, 1,2 atm, durante 20 minutos. Após a autoclavagem, quando o meio apresentava a

temperatura de aproximadamente 40°C, acrescentaram-se 50 mg.L⁻¹ de cloranfenicol e 10 mg.L⁻¹ de benomyl.

As anteras de *C. arabica* foram inoculadas assepticamente em meio nutritivo e transferidas para estufa tipo BOD, com temperatura de 27 ± 1°C.

Foram conduzidos três experimentos, nos quais procurou-se combinar diferentes concentrações de reguladores de crescimento, descritos nos itens 3.1.1; 3.1.2 e 3.1.3.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 4, com 4 repetições. Exceto para o experimento número 3.1.3, montado em esquema fatorial 5 x 5. Cada repetição foi constituída por uma placa, contendo 30 anteras por placa.

O modelo estatístico adotado foi:

$$Y_{ij} = m + t_i + e_{ij} \quad \begin{array}{l} i = 1,2,3, \dots, I \\ J = 1,2,3, \dots, J \end{array}$$

em que:

Y_{ij} - valor observado na parcela que recebeu o tratamento i na repetição j ;

m = média geral do experimento;

t_i = efeito do tratamento i aplicado na parcela;

e_{ij} = erro experimental

Aos 90 dias após a instalação do experimento, analisou-se o peso da massa fresca dos calos.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com aplicação do teste de F a 5% de probabilidade e as médias analisadas por regressão polinomial.

3.1.1 Concentrações de 2,4-D e cinetina

Os tratamentos constituíram-se de diferentes concentrações de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg L⁻¹) e cinetina (0, 2, 4 e 8 mg L⁻¹).

3.1.2 Concentrações de cinetina e ácido indol butírico

Os tratamentos constituíram-se de diferentes concentrações de cinetina (0, 2, 4 e 8 mg L⁻¹) e ácido indol butírico (0; 0,5; 1 e 2 mg L⁻¹). Ao meio de cultura foram acrescentados 2 mg L⁻¹ de 2,4-D.

3.1.3 Concentrações de cinetina e ácido giberélico

Os tratamentos constituíram-se de diferentes concentrações de cinetina (0, 1, 2, 4 e 8 mg L⁻¹), ácido giberélico (0; 2,5; 5; 10 e 20 mg L⁻¹). Ao meio de cultura foram acrescentados 8 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contaminação causada por fungos e bactérias e a oxidação por substâncias fenólicas são fatores limitantes no estabelecimento “in vitro” de calos em anteras de *C. arábica* provenientes de material coletado no campo. Com o controle fitossanitário realizado nas plantas matrizes selecionadas no campo e do processo de assepsia em laboratório, com a adição de fungicida e bactericida ao meio de cultura, pode-se afirmar que houve 90% de eficiência no controle da contaminação e que, com a adição de ácido ascórbico em meio de cultura, não houve ocorrência de explantes oxidados (dados não mostrados).

4.1 Concentrações de 2,4-D e cinetina na indução de calos em anteras de *C. arábica* L.

Os resultados da análise de variância para a característica avaliada estão apresentados na Tabela 2. Observa-se que a interação entre os reguladores de crescimento foi significativa a 1% de probabilidade para a variável massa fresca de calos.

TABELA 2. Resumo da análise de variância para a característica massa fresca de calos (mg).UFLA, Lavras, MG, 2004.

Causas de variação	GL	Quadrado médio (peso fresco de calos em mg)
2,4-D	3	0,031921*
Cinetina	3	0,046279**
2,4-D*cinetina	9	0,062600**
Resíduo	48	0,007548

C.V.(%) 21,61

Média geral: 0,4019531

*e** significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

O resumo da análise de variância do desdobramento de concentrações de 2,4-D dentro de cada concentração de cinetina está apresentado na Tabela 3. Observa-se que os desdobramentos de 2,4-D dentro das concentrações 2 e 4 mg L⁻¹ de cinetina foram significativos.

TABELA 3. Resumo da análise de variância do desdobramento de concentrações de 2,4-D dentro de cada concentração de cinetina. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Causas de variação	de Conc. de cinetina mg L ⁻¹	GL	Quadrado médio
2,4-D	(0)	3	0,010675ns
2,4-D	(2)	3	0,177051**
2,4-D	(4)	3	0,029195*
2,4-D	(8)	3	0,002801ns
Resíduo		48	0,007548

ns, não significativo

* e ** significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

Analisando-se as curvas de regressão para a variável massa fresca de calos, observa-se na Figura 2, que houve maior peso em calos de anteras, quando foram adicionados 2 mg L⁻¹ de cinetina e 1 mg L⁻¹ de 2,4-D; a partir desta concentração, o 2,4-D promoveu inibição no peso dos calos. Estes dados concordam em parte com aqueles encontrados por Maciel (2001) e Palú (2002), quando verificaram que até a concentração de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D houve aumento na produção de calos, ponto a partir do qual o regulador de crescimento passou a inibi-la, provavelmente devido a um efeito fitotóxico promovido por concentrações superiores a esta.

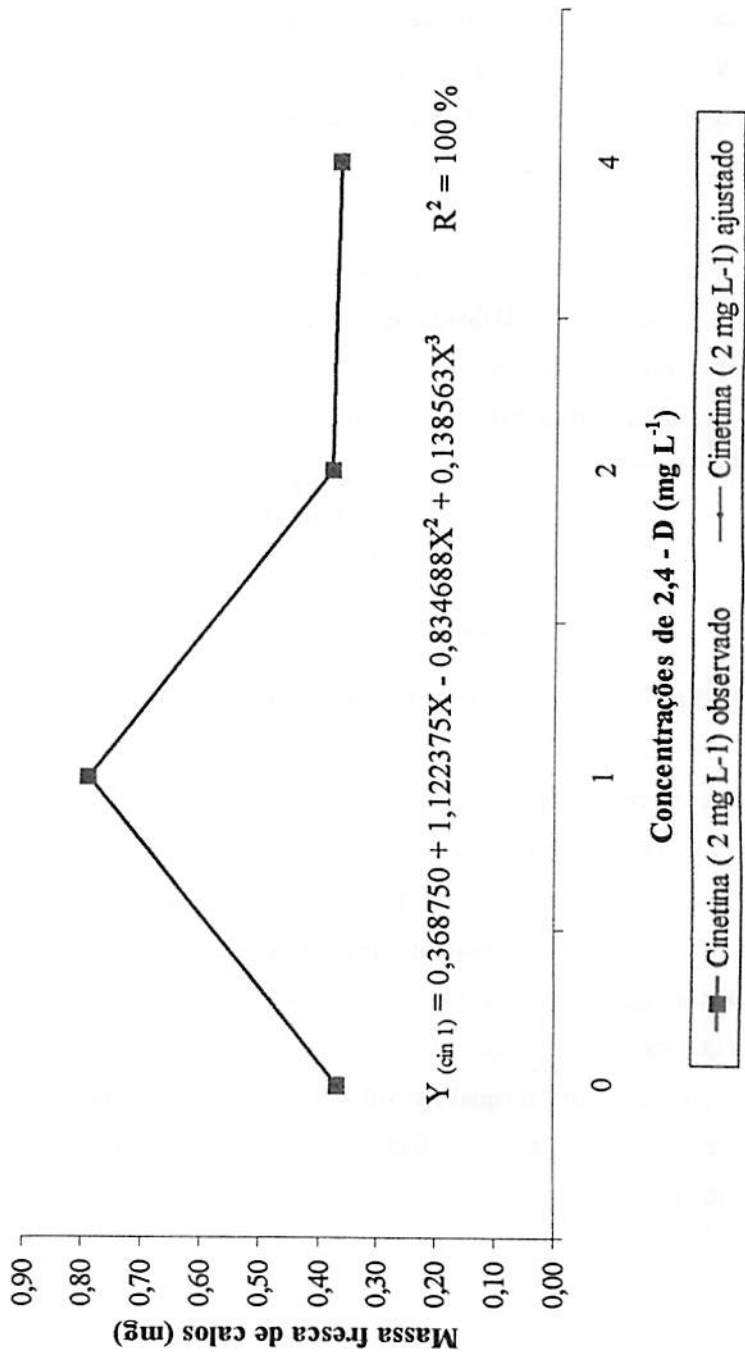


FIGURA 2. Massa fresca de calos em anteras de *C. arabica* L. população segregante F₂, em diferentes concentrações de 2,4-D e cinetina. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Resultados semelhantes foram obtidos por Araújo et al. (2002b), que verificaram que o maior acréscimo na massa fresca de calos foi observado quando se utilizaram-se 2 mg L⁻¹ de cinetina combinados com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, após o qual houve um decréscimo no peso.

A Tabela 4 apresenta o resumo da análise de variância do desdobramento de concentrações de cinetina dentro de cada concentração de 2,4-D. Verifica-se que apenas os desdobramentos nas concentrações de 0 e 1 mg L⁻¹ de 2,4-D foram significativos.

TABELA 4. Resumo da análise de variância do desdobramento de concentrações de cinetina dentro de concentração nível de 2,4-D. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Causas de variação	de Conc. de 2,4-D mg L ⁻¹	GL	Quadrado médio
Cinetina	(0)	3	0,030494 *
Cinetina	(1)	3	0,193237 **
Cinetina	(2)	3	0,002292 ns
Cinetina	(4)	3	0,008057 ns
Resíduo		48	0,007548

ns - não significativo

* e ** significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

Observa-se também, na Figura 3, um acréscimo na massa fresca dos calos com a adição de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, com conseqüente decréscimo com o aumento das concentrações. O mesmo comportamento é observado até 2 mg L⁻¹ de cinetina, a partir do qual ocorreu um decréscimo na massa fresca dos calos. Esse decréscimo na massa fresca ocorre, provavelmente, devido à fitotoxidez que esse regulador de crescimento pode exercer acima dessas concentrações. Estes dados referentes à concentração de cinetina discordam dos encontrados por

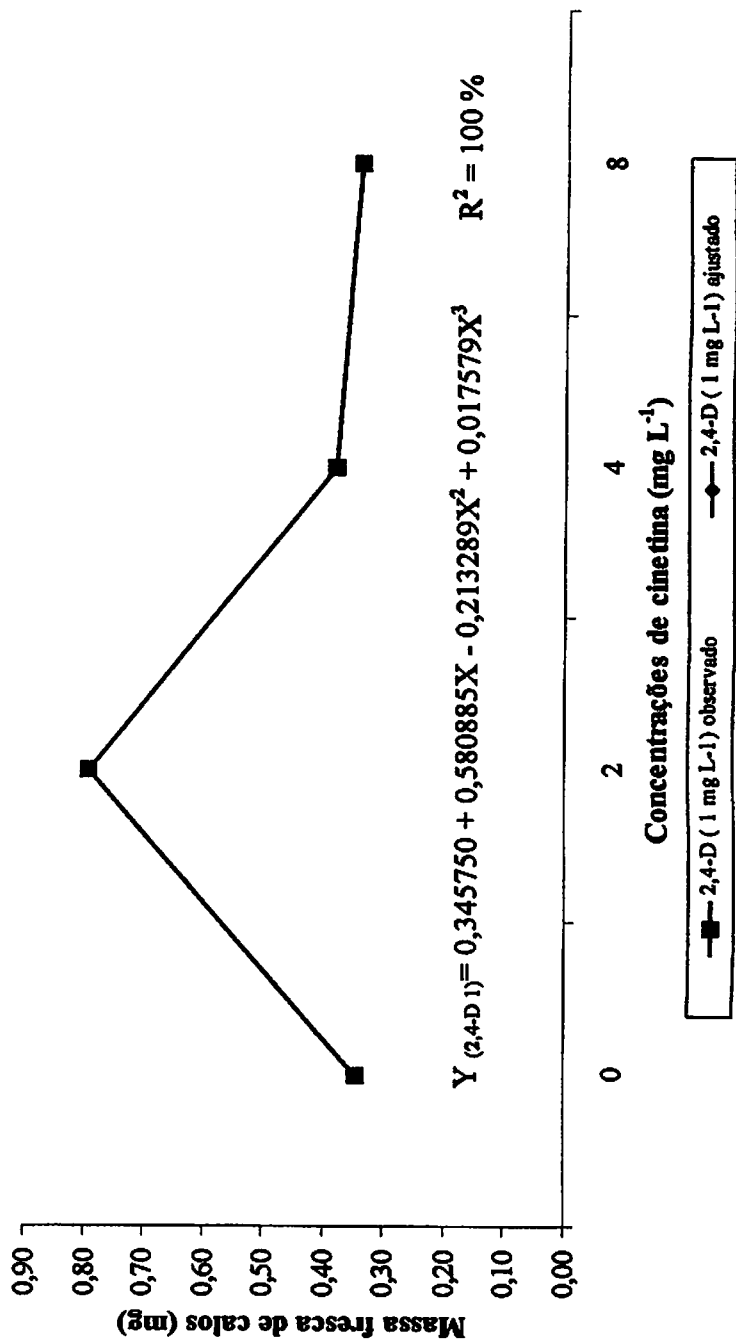


FIGURA 3. Massa fresca de calos em anteras de *C. arabica* L. população segregante F₂, em diferentes concentrações de cinetina e 2,4-D. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Araújo et al. (2003d), que verificaram que a maior massa fresca de calos ocorreu quando se combinaram-se 1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 8 mg L⁻¹ de cinetina.

Pelos resultados obtidos para a indução de calogênese em anteras de cafeeiro, observa-se que é necessária uma auxina juntamente com uma citocinina.

4.2 Concentrações de cinetina e ácido indol butírico e acréscimo de 2,4-D na indução de calos em anteras de *C. arabica* L.

O resumo da análise de variância está apresentado na Tabela 5. Pode-se observar que a interação entre os fatores foi significativa a 5% de probabilidade para a variável analisada.

TABELA 5. Resumo da análise de variância para a característica peso da massa fresca de calos (mg). UFLA, Lavras, MG, 2004.

Causas de variação	GL	Quadrado médio (peso fresco de calos em mg)
Cinetina	3	0,003637 ns
AIB	3	0,000384 ns
Cinetina*AIB	9	0,005338 *
Resíduo	48	0,002287
C.V.(%) 15,32		
Média geral: 0,3121406		

ns - não significativo

* significativo a 5 % de probabilidade, pelo teste de F.

O resultado da análise de variância para o desdobramento de cinetina dentro de cada concentração de AIB está apresentada na Tabela 6. Observa-se a significância nas concentrações de 0 e 1 mg L⁻¹ de AIB, sendo que para a concentração de 1 mg L⁻¹ foi significativo a 6% de probabilidade.

TABELA 6. Resumo da análise de variância do desdobramento de concentrações de cinetina dentro de cada concentração de AIB. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Causas de variação	de Conc. de AIB mg L ⁻¹	GL	Quadrado médio
Cinetina	(0)	3	0,009794 **
Cinetina	(0,5)	3	0,002199 ns
Cinetina	(1,0)	3	0,006189 ¹ *
Cinetina	(2,0)	3	0,001471 ns
Resíduo		48	0,002287

ns - não significativo

¹* e ** significativo a 6 e 1% de probabilidade respectivamente pelo teste de F.

O resultado da análise de variância para o desdobramento de AIB dentro de cada concentração de cinetina está apresentado na Tabela 7. Observa-se que foram significativas apenas as concentrações de 0 e 8 mg L⁻¹ de cinetina.

Analisando-se a Figura 4 observa-se que a maior resposta no aumento da massa fresca de calos ocorreu até a concentração de 8 mg L⁻¹ de cinetina, sendo esta a concentração máxima utilizada no experimento, combinada com 1 mg L⁻¹ de AIB. Contudo, neste experimento empregaram-se 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, partindo-se do pressuposto que esta é a melhor concentração deste regulador de crescimento, conforme analisado por Maciel (2001), Palú (2002) e Palú et al. (2002). A presença desta auxina ajuda a explicar a pouca variação do peso dos calos, quando se utilizou 0 mg L⁻¹ de AIB, combinado com as diferentes concentrações de cinetina.

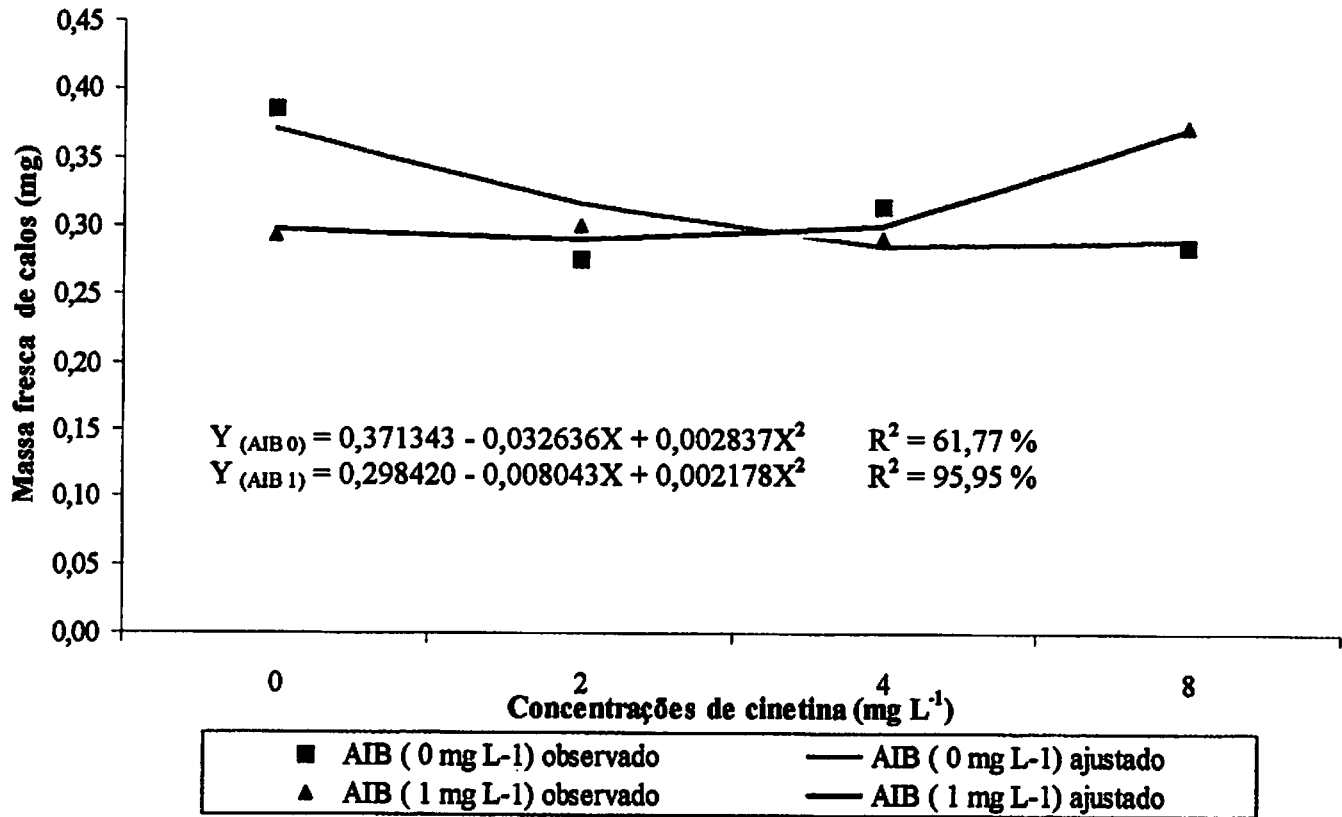


FIGURA 4. Massa fresca de calos em anteras de *C. arabica* L. população segregante F₂, em diferentes concentrações de cinetina e AIB. UFLA, Lavras, MG, 2004.

TABELA 7. Resumo da análise de variância do desdobramento de concentrações de AIB dentro de cada concentração de cinetina. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Causas de variação	de Conc. de cinetina mg L ⁻¹	GL	Quadrado médio
AIB	(0)	3	0,006527 *
AIB	(2)	3	0,001162 ns
AIB	(4)	3	0,001476 ns
AIB	(8)	3	0,007234 *
Resíduo		48	0,002287

ns - não significativo

* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

Observações semelhantes podem ser feitas na Figura 5, quando houve o desdobramento de concentrações de AIB dentro de cada concentração de cinetina. Cabe ressaltar que a melhor resposta foi obtida quando se combinou 1 mg L⁻¹ de AIB com 8 mg L⁻¹ de cinetina. Entretanto, pôde-se observar baixa variação no peso dos calos. Estes dados, entretanto, discordam daqueles encontrados por Palú et al. (2002) e Araújo et al. (2003a), os quais verificaram que a maior porcentagem de calos ocorreu na presença de 2 mg L⁻¹ de AIB, na ausência de 2,4-D e com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D combinado com 1 mg L⁻¹ de AIB e com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, na ausência de AIB. Verificaram, ainda, que concentrações de AIB acima de 2 mg L⁻¹ promoveram uma diminuição no peso da massa fresca dos calos, principalmente quando combinadas com concentrações crescentes de 2,4-D.

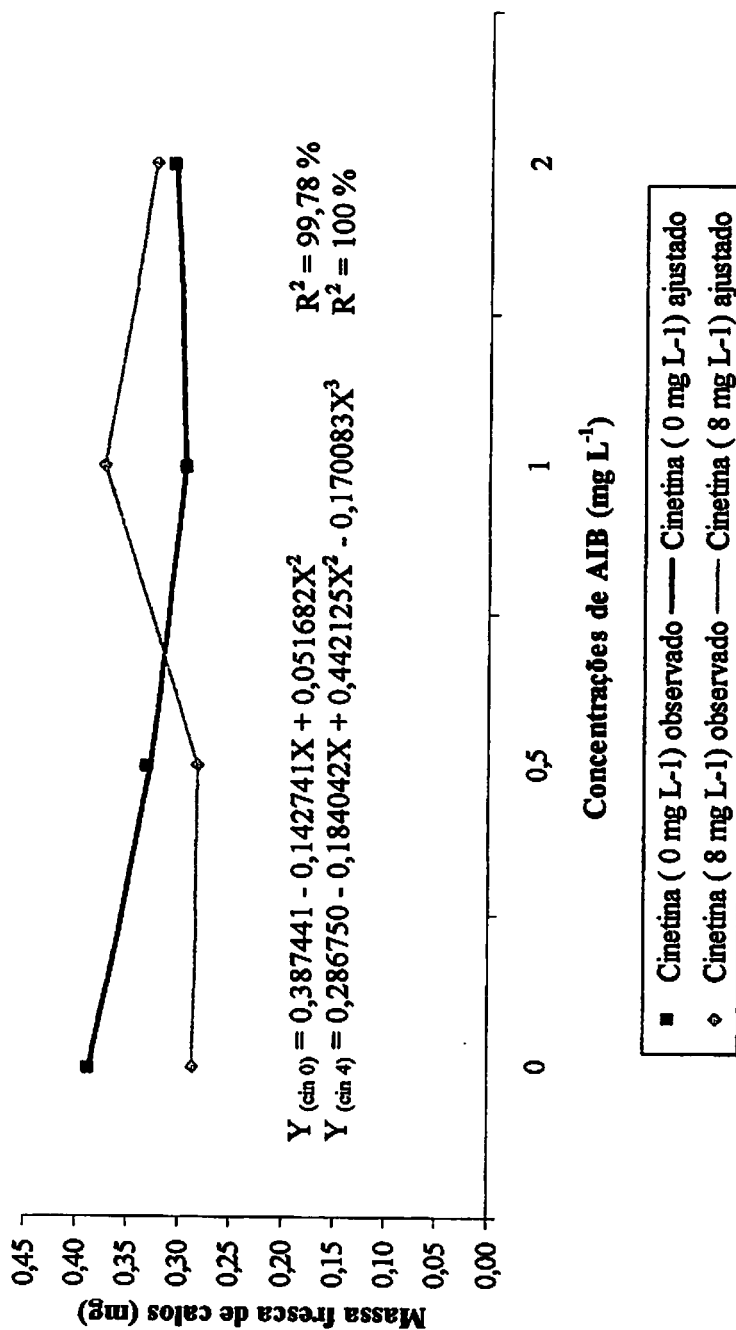


FIGURA 5. Massa fresca de calos em anteras de *C. arabica* L. população segregante F₂, em diferentes concentrações de AIB e cinetina. UFLA, Lavras, MG, 2004.

4.3 Concentrações de cinetina e ácido giberélico e acréscimo de ácido naftalenoacético na indução de calos em anteras de *C. arabica* L.

O resumo da análise de variância está apresentado na Tabela 8. Pode-se observar que a interação entre os fatores foi significativa a 1% de probabilidade, para a variável analisada.

TABELA 8. Resumo da análise de variância para a característica massa fresca de calos (mg).UFLA, Lavras, MG, 2004.

Causas de variação	GL	Quadrado médio (massa fresca de calos em mg)
Cinetina	4	0,042986 *
GA ₃	4	0,015557 ns
Cinetina*GA ₃	16	0,037648 **
Resíduo	75	0,009811
C.V.(%) 18,79		
Média geral: 0,52714		

ns - não significativo

* e ** significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

O resumo da análise de variância para o desdobramento de cinetina dentro de cada concentração de GA₃ encontra-se descrito na Tabela 9. Verifica-se que apenas para a concentração de 10 mg L⁻¹ não houve significância, sendo as demais concentrações significativas a 5 e 1% de probabilidade, para a variável analisada.

TABELA 9. Resumo da análise de variância do desdobramento de concentrações de cinetina dentro de cada concentração de GA₃. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Causas de variação	de Conc. de GA ₃ mg L ⁻¹	GL	Quadrado médio
Cinetina	(0)	4	0,027572 *
Cinetina	(2,5)	4	0,039333 **
Cinetina	(5)	4	0,056246 **
Cinetina	(10)	4	0,010242 ns
Cinetina	(20)	4	0,060183 **
Resíduo		75	0,009811

ns - não significativo

* e ** significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

Analisando-se as curvas de regressão, verifica-se pela Figura 6, que as melhores respostas observadas para a massa fresca de calos foram obtidas quando se utilizaram-se 2 mg L⁻¹ de cinetina, combinados com 20 mg L⁻¹ de GA₃.

Hirano (1975) sugere que a presença do ácido giberélico aumenta a rapidez do crescimento do calo em anteras. Entretanto, Him (1987) relata que o efeito das giberelinas tem sido muito limitado na cultura "in vitro". Talvez os efeitos de hormônios deste grupo sejam pouco estudados e conseqüentemente, os resultados sejam pouco significativos.

A Tabela 10 apresenta o resumo da análise de variância do desdobramento de GA₃ dentro de cada concentração de cinetina, verifica-se também na mesma tabela que apenas para a concentração de 4 mg L⁻¹ de cinetina não houve significância.

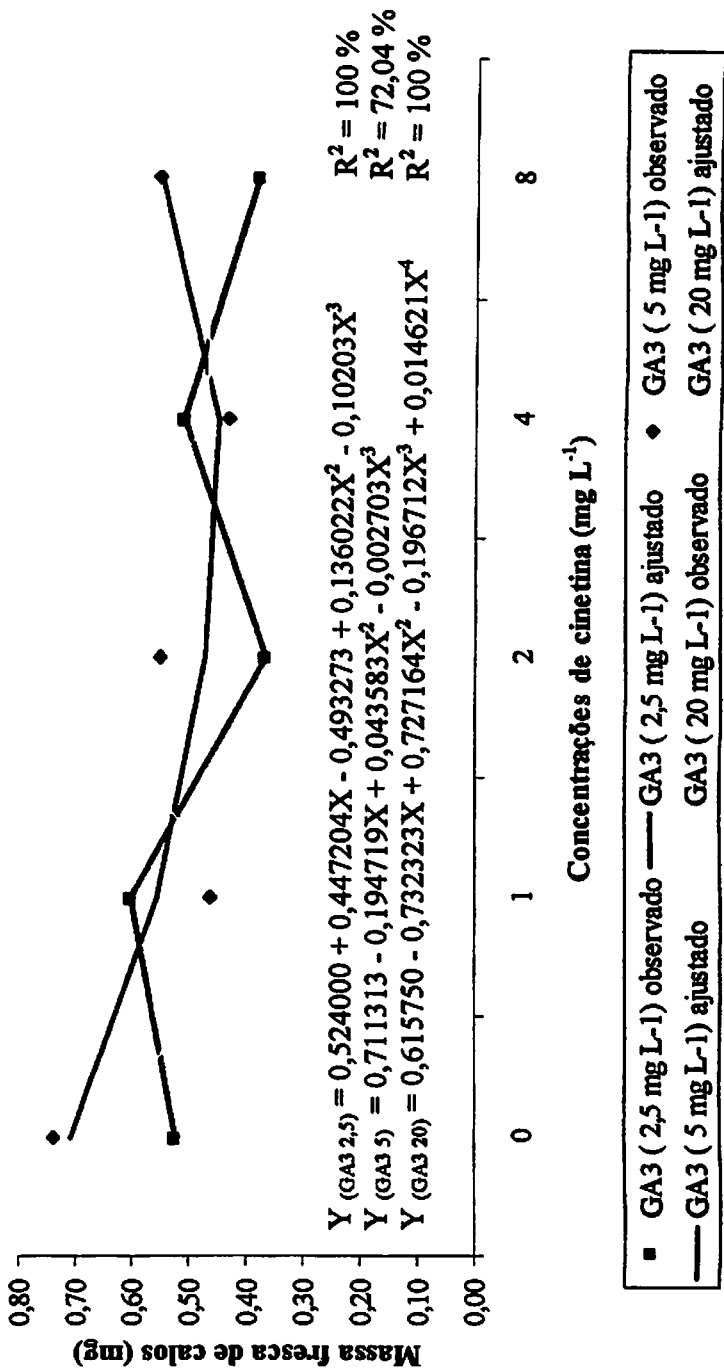


FIGURA 6. Massa fresca de calos em anteras de *C. arabica* L. população segregante F₂, em diferentes concentrações de GA₃ e cinetina. UFLA, Lavras, MG, 2004.

TABELA 10. Resumo da análise de variância do desdobramento de concentrações de GA₃ dentro de cada concentração de cinetina. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Causas de variação	Conc.de cinetina mg L ⁻¹	GL	Quadrado médio
GA ₃	(0)	4	0,027566 *
GA ₃	(1)	4	0,035882 *
GA ₃	(2)	4	0,068266 **
GA ₃	(4)	4	0,007406 ns
GA ₃	(8)	4	0,027026 *
Resíduo		75	0,009811

ns - não significativo

*e ** significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

Analisando-se a Figura 7, verifica-se que quando se combinaram-se 2 mg L⁻¹ de cinetina com 20 mg L⁻¹ de GA₃ houve maior resposta para a massa fresca de calos. Verifica-se que concentrações crescentes, acima de 2 mg L⁻¹ de cinetina, promoveram uma redução na massa fresca de calos, isto provavelmente devido ao efeito fitotóxico causado por este regulador de crescimento.

Neste experimento foram adicionados ao meio de cultura 8 mg L⁻¹ de ANA; entretanto, observações realizadas por Rezende et al. (2000), indicam que o ANA combinado com cinetina não é eficiente na indução de calos em anteras dessa espécie. Pode-se, então, descrever que, com isso, há necessidade de um estudo específico com cada regulador de crescimento, pelo menos para GA₃ e ANA, no que se refere à calogênese em anteras de cafeeiro.

Embora haja necessidade de maiores estudos sobre a ação dos reguladores de crescimento GA₃ e ANA, para serem utilizados na indução de calos em anteras, parece que os mesmos têm potencial para serem utilizados em meios de cultura de indução de calos primários em anteras de cafeeiro.

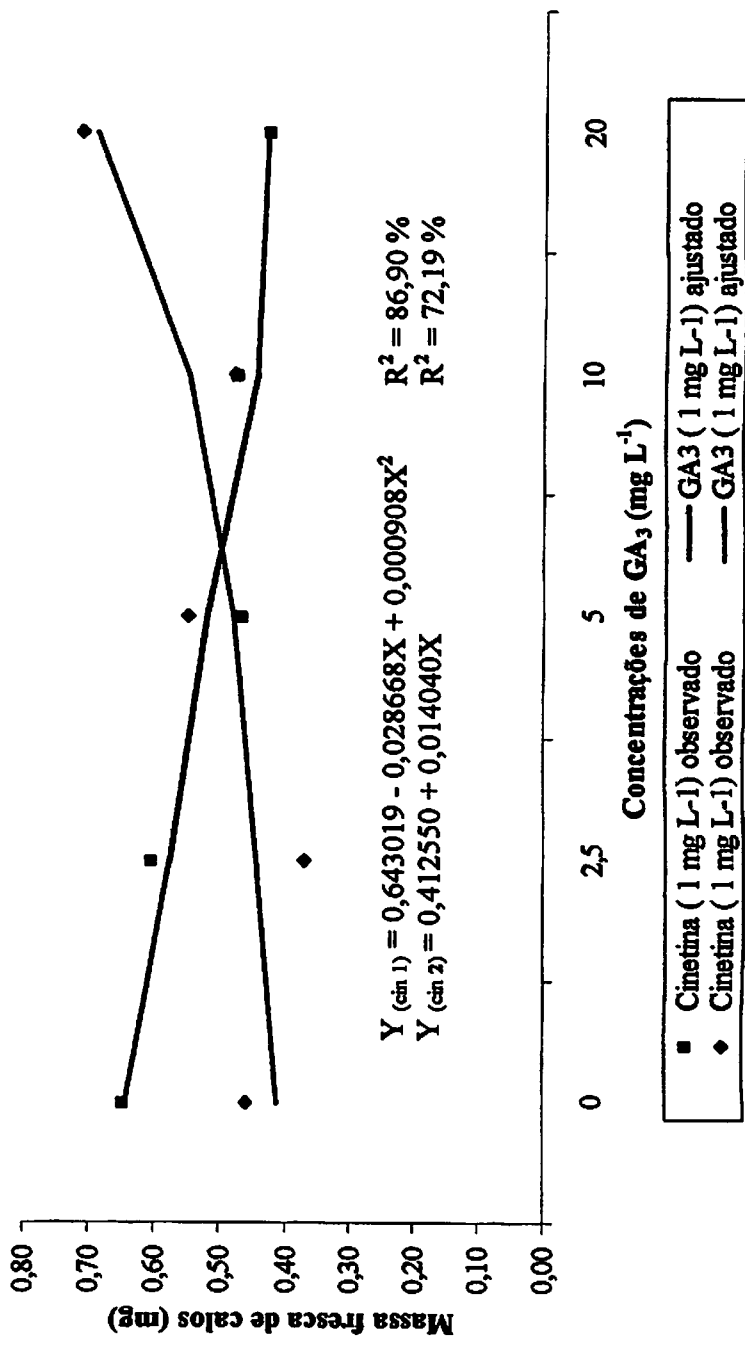


FIGURA 7. Massa fresca de calos em anteras de *C. arabica* L. população segregante F₂ em diferentes concentrações de cinetina e GA₃. UFLA, Lavras, MG, 2004.

5 CONCLUSÕES

Anteras de *C. arabica* L., oriundas de uma população segregante F₂, reagem favoravelmente à calogênese.

A ação combinada entre uma auxina e citocinina é necessária para a indução de calos em anteras.

As combinações mais eficientes entre os reguladores de crescimento são de concentração de até 2 mg L⁻¹ de 2,4-D e de 4 mg L⁻¹ de citocinina.

Combinações de citocinina e AIB atuam favoravelmente na indução de calogênese em anteras de *C arabica* L.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. A. S.; SIMIONI, K. C.; FAZUOLI, L. C.; RAMOS, L. C. S. Indução de calos de explantes foliares de genótipos de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. Resumos.... Poços de Caldas: EMBRAPA/CAFÉ, 2000. v. 1, p. 145-147.

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

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.; PASQUAL, M.; PEDROZO, C. A.; TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C. Determinação do tamanho do botão floral para cultura de anteras do cafeeiro em população segregante F₂. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 28., 2002, Caxambu. Resumos.... Caxambu: EMBRAPA/CAFÉ, 2002b. p. 186.

ARAÚJO, J. S. de.; REZENDE, J. C. de.; PEREIRA, A. R.; RIBEIRO, B. de C.; PASQUAL, M. Calogênese em anteras de cafeeiro 'Acaiá cerrado' utilizando 2,4-D, cinetina e AIB. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro. Resumos... Porto Seguro: EMBRAPA/CAFÉ, 2003a. p. 88.

ARAÚJO, J. S. de.; RIBEIRO, B. de C.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de PASQUAL, M. Calogênese em anteras de cafeeiro 'Rubi' utilizando 2,4-D e cinetina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. Resumos... UFLA/FAEPE, 2003b. p. 123.

ARAÚJO, J. S. de.; RIBEIRO, B. de C.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de PASQUAL, M. Indução de calogênese em anteras de cafeeiro, população segregante F₂ em função de 2,4-D e água de coco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.;

CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. Resumos... Lavras: UFLA/FAEPE, 2003c. p. 124.

ARAÚJO, J. S. de.; RIBEIRO, B. de C.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de PASQUAL, M. Indução "in vitro" de calogênese em anteras de cafeeiro utilizando diferentes níveis de 2,4-D e citocinina. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro. Resumos.... Porto Seguro: EMBRAPA/CAFÉ, 2003d. p. 99.

ASCANIO, E. C. E.; ARCIA, M. A. M. Efecto del estado de desarrollo de las anteras y de um shock térmico sobre la androgénesis en *Coffea arabica* L. var. Garnica. *Café, Cacao, Thé*, Paris, v. 28, n. 2, p. 75-79, avr./juin. 1994.

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.

CALLEBERG, E. K.; JOHANSSON, L. B. The effect of starch and incubation temperature on anther culture of potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 32, n. 1, p. 27-34, Jan. 1993.

CARVALHO, A. Histórico do desenvolvimento do cultivo do café no Brasil. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 1993. 7 p. (Documento IAC, 34).

CLAPHAM, D. Haploid *Hordeum* plants from anthers in vitro. *Zeitung Pflanzenzüchtung*, Hamburg, v. 69, n. 2, p. 142-155, 1973.

CHEN, C. M.; CHEN, C. C.; LIN, M. H. Genetics analysis of anther derived plants of rice. *The Journal of Heredity*, Washington, v. 72, n. 1, p. 49-52, Jan./Feb. 1982.

DUNWELL, J. M. Pollen, ovule and embryo culture as tools in plant breeding. In: WITHERS, L. A. and ALDERSON, P. F. (Ed.). *Plant tissue culture and its agricultural applications*. Londres: Butterworths, 1986. p. 375-404.

FERNANDES, M. I. B. de M. Perspectiva da biotecnologia para o melhoramento de plantas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 22, n. 10, p. 881-896, out. 1987

GUERRA, M. S. O uso de giemsa na citogenética vegetal: comparar entre coloração simples e bandeamento. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 190-193, fev. 1955.

HENSHAW, G. G.; O'HARA, J. F.; WEBB, K. J. Morphogenetic studies in plant tissue culture. In: YEOMAN, M. N.; TRUMAN, D. E. S. (Ed.). **Differentiation in vitro**. Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press, 1982. p. 231-251.

HIM, P. V. H. **Determinação de metodologias para cultura de anteras de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. 1987. 129 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura, Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

HIRANO, E. **Cultura de antera de cebola (*Allium cepa* L.) “in vitro” para a diferenciação de tecido haplóide**. 1975. 29 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

HU, H.; ZENG, J. Z. Development of new varieties via anther culture. In: AMMIRATO, P. V.; EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; YAMADA, V. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: crop species**. New York: Macmillan Publishing Company, 1986. v. 3, p. 65-90.

ISLAM, M. R.; KINTZIOS, S.; FISCHBECK, G. Anther culture responsiveness of *Hordeum spontaneum* derived spring barley lines and a genetic analysis of plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, n. 3, p. 235-239, June 1992.

KARIN, N. H.; SHAHJAHAN, A. K. M.; MIAH, A.; MIAH, S. A. Response of rice anthers to callus induction and plant regeneration. **International Rice Research Newsletter**, Manila, v. 10, n. 3, p. 21-22, June 1985.

KERBAUY, G. B. **Aspectos citológicos e fisiológicos de tecidos e calos de *Nicotiana tabacum* L. Cv. Wisconsin 38**. 1981. 159 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

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

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

MAHESHWARI, S. C.; RASHID, A.; TYAGI, A. K. Anther/pollen culture for production of haploids and their utility. **Rice News**, New Delhi, v. 41, n. 1, p. 2-9, 1982.

MERCY, S. T.; ZAPATA, F. J. Effect of pollen development stage on callus induction and its relation to auricle distance in two rice varieties. **International Rice Research Newsletter**, Manila, v. 11, n. 4, p. 23-24, 1986.

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

MORAES-FERNANDES, M. I. B.; PICARD, E. Viability of haploid production by anther culture using brazilian wheat genotypes. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirao Preto, v. 6, n. 2, p. 261-277, June 1983.

MORO, J. R. Biotecnologia e melhoramento genético de milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. (Ed.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: FUNDAÇÃO CARGILL, 1987. v. 2, p. 343-372.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NITSCH, C. Production of isogenic lines: basic technical aspects of androgenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). **Plant tissue culture methods and applications in agriculture**. New York: Academic Press, 1981. p. 241-252.

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

OUYANG, J.; ZHOU, S.; JIA, S. The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 66, n. 2, p. 101-109, 1983.

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 Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PALÚ, E. G.; REZENDE, J. C. de; PASQUAL, M.; ARAÚJO, J. S. de; PEREIRA, A. R.; ARAÚJO, J. S. de; LUZ, J. M. Q. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, cinetina e AIB na indução de calos em anteras de cafeeiro Acaia Cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 28., 2002, Caxambu. Resumos... Caxambu: EMBRAPA/CAFÉ, 2002. p. 195.

PASQUAL, M. Propagação de plantas ornamentais. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 80 p.

PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P. Melhoramento de café (*Coffea arabica* L.) através de métodos de cultura de tecidos. Lavras, 1988. 13 p.

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.

SCHAEFFER, G. W.; BAENZIGER, S.; WORLEY, J. Haploid plant development from anthers and "in vitro" embryo culture of wheat. *Crop Science*, Madison, v. 19, n. 5, p. 697-702, Sept./Oct. 1979.

SIBI, M.; DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET, D. Obtention de plantas haplóides por androgenése "in vitro" chez le piment (*Capsicum annuum* L.). *Annales de L'Amelioration des Plantes*, Paris, v. 29, n. 5, p. 583-606, 1979.

TIAN, W.; CHEN, Y. The factors affecting induction and differentiation of callus in rice anther float culture. *Acta Genetics Sinica*, Peiping, v. 10, p. 362-368, 1983.

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

WAN, Y.; DUNCAN, D. R.; RAYBURN, A. L.; PETOLINO, J. F.; WIDHOLM, J. M. The use of antimicrotubule herbicides for the production of double haploid plants from anther derived maize callus. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 81, n. 2, p. 205-211, 1991.

WHITE, P. R. The cultivation of animal and plant cells. 2. ed. Nova York: Ronald Press, 1963. 228 p.

WOLYN, D. J.; FENG, X. Genotype temperature, and sampling date affect embryogenesis in asparagus anther culture. Hort Science, Alexandria, v. 28, n. 3, p. 316-317, 1993.

ZAPATA, F. J. Biotechnology in international agricultural research. Manilas: International Rice Research Institute, 1985. p. 85-95.

ZHOU, H.; BALL, S. T.; KONZAK, C. F. Functional properties of ficoll and their influence on anther culture responses of wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, v. 30, p. 77-83, 1992.

ZHOU, H.; KONZAK, C. F. Genetic control of green plant regeneration from anther culture of wheat. Genome, v. 35, p. 957-961, 1992.