

DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO NA INDUÇÃO DE CALOS E PRÓ-EMBRIÓIDES EM ANTERAS DE CAFEIEIRO

Coffea arabica L. ANTHHER CALLUS AND PRO-EMBRYOID INDUCTION BY DIFFERENT GROWTH REGULATORS

Adelaide Siqueira SILVA¹; José Magno Queiroz LUZ²; Tatiana Michlovska RODRIGUES³; Soraya Viegas MARQUES⁴; Raquel Viegas MARQUES⁴; Moacir PASQUAL⁵

1. Bióloga, M. Sc.; 2. Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor do Instituto de Ciências Agrárias - ICIAG, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia, MG, Brasil. jmagno@umuarama.ufu.br; 3. Engenheira Agrônoma, Pós-Doutoranda do ICIAG - UFU; 4. Engenheira Agrônoma; 5. Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

RESUMO: O melhoramento do cafeeiro (*Coffea arabica*), tem sido feito através de métodos convencionais, os quais são muito morosos até se obter o material genético desejado, e este tempo pode ser reduzido através da obtenção de haplóides em gerações segregantes através da cultura de anteras. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de reguladores de crescimento na indução de calos e pró-embriões em anteras de *C. arabica* L. cv. Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44. Testou-se primeiramente a inoculação das anteras em meio MS suplementado 2,4-D (2, 4, 6 e 8 mg L⁻¹), TDZ (0 e 0,5 mg L⁻¹) juntamente com época de avaliação (30, 60 e 90 dias). O experimento foi montado no esquema fatorial de 4x2x3 em delineamento de blocos casualizados, e com quatro repetições. Avaliou-se oxidação, intumescimento e calosidade. A utilização somente de 2 mg L⁻¹ 2,4-D foi eficiente na indução de calos. Concentrações acima de 4 mg L⁻¹ de 2,4-D inibiram a formação dos calos e quanto maior o período de avaliação, maior a oxidação nas anteras. Posteriormente testaram-se os seguintes tratamentos: 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 2 mg L⁻¹ BAP; 8 mg L⁻¹ Cinetina + 1 mg L⁻¹ AIB; 2 mg L⁻¹ Cinetina + 1 mg L⁻¹ 2,4-D; 2 mg L⁻¹ Cinetina + 20 mg L⁻¹ GA₃; 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ TDZ; 2 mg L⁻¹ ANA e 2 mg L⁻¹ 2,4-D. O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 7x2 (composição dos reguladores x épocas de cultivo *in vitro*) com quatro repetições. Após 30 e 60 dias de cultivo *in vitro* avaliou-se contaminação, oxidação, intumescimento, formação de calos e presença ou não de pró-embriões. As combinações de reguladores 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 2 mg L⁻¹ BAP, 2 mg L⁻¹ Cinetina + 1 mg L⁻¹ 2,4-D, 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ TDZ e 2 mg L⁻¹ 2,4-D proporcionaram a formação de calos. A calosidade foi favorecida aos 60 dias de cultivo *in vitro*. As combinações 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 2 mg L⁻¹ BAP, 2 mg L⁻¹ Cinetina + 1 mg L⁻¹ 2,4-D, 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ TDZ proporcionaram a indução de pró-embriões.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea arabica*. Embriogênese somática. Balanço hormonal.

INTRODUÇÃO

O melhoramento do cafeeiro (*Coffea arabica*), tem sido feito através de métodos convencionais, os quais são muito morosos até se obter o material genético desejado, cerca de 25 anos. Este tempo pode ser reduzido através da obtenção de haplóides em gerações segregantes através da cultura de anteras.

Além de os haplóides serem livres dos problemas de dominância e recessividade, por possuir apenas um alelo em cada loco gênico, permitem a rápida produção de plantas homocigóticas através da duplicação do número de cromossomos numa única etapa, substituindo as gerações de autofecundação, tendo grande valor nos programas de melhoramento no processo usual para obtenção de cultivares melhoradas de cafeeiro (ANDRADE, 1998).

A produção de haplóides pode ser obtida por diferentes técnicas como ginogênese, androgênese, tratamento químico, choque térmico e irradiação com raios X ou luz ultravioleta., e ainda,

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

A técnica de cultura de anteras/micrósoros, visando à produção de haplóides, vem sendo amplamente empregada na obtenção de novos cultivares em várias plantas de interesse agrônomo como em *Datura innoxia* (erva do diabo) Sunderland, (1974); *Hyocyanus niger* (meimendro-negro) Kaghavan, (1978); *Nicotiana tabacum* (tabaco) Horner e Street, (1978); *Hordeum vulgare* (cevada) Sunderland et al., (1979); *Triticum aestivum* (trigo) Reynolds, (1993); *Glycine max* (soja) Kaltchut-Santos et al., (1997) *Asparagus officinalis* (aspargo) Peng et al., (1997). Contudo, os mecanismos básicos pelos quais os micrósoros

desviam de sua rota ontogenética normal, ainda são pouco compreendidos, o que dificulta a indução da androgênese em algumas espécies e limita sua aplicação nos modernos programas de melhoramento (FIGUEIRA, 2002).

Segundo Sharp et al., (1980) existem dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática que ocorrem *in vitro*. O primeiro corresponde ao modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estádios intermediários de calos. O segundo padrão corresponde ao modelo no qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação (GUERRA et al., 1999). O calo é utilizado na maioria dos casos como estrutura intermediária, considerando algumas limitações, como por exemplo, nem todos os tipos de calos formados irão regenerar plantas e calos mantidos por longos períodos poderão perder progressivamente a capacidade de regenerar plantas (PASQUAL, 1985).

No Brasil, o *C. arabica* apresenta progressos com a aplicação da cultura de anteras (ARAÚJO et al., 2002; FIGUEIRA, 2002; FIGUEIRA et al., 2005), contudo é de extrema importância testar com os diferentes cultivares existente a ação e a concentração dos reguladores de crescimento utilizados no meio de cultivo mais responsivos à androgênese.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de reguladores de crescimento na indução de calos e pró-embriões em anteras de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia-MG, no período de agosto de 2003 a janeiro de 2004. As amostragens foram realizadas em lavoura da cultivar Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44 (*Coffea arabica* L.), pertencente à área experimental do Campus Umuarama dessa Universidade.

O experimento foi composto por dois ensaios, sendo o primeiro testando a interação de 2,4-D, TDZ e épocas de avaliação na indução de calos em antera de *Coffea arabica* L. e o outro como complementar, fazendo uso de **6-benzilaminapurina**, **Cinetina**, ácido indolbutírico, ácido giberélico, thidiazuron e ácido naftalenoacético para a indução de calos e pró-embriões em anteras. Como o 2,4-D e TDZ são indutores de calogênese, realizou-se o primeiro ensaio para observar o desenvolvimento da antera de café na presença destes reguladores e numa outra etapa

realizou-se o teste com outras combinações de reguladores.

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

Os explantes florais foram envolvidos por uma gaze e mantidos em uma solução de álcool 70% por 2 segundos e em uma solução de hipoclorito de sódio 1% sob agitação por 15 minutos. Foram então lavados três vezes com água destilada e autoclavada já na câmara de fluxo.

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

Interação de 2,4-D, TDZ e épocas de avaliação na indução de calos em antera de *Coffea arabica* L.

Foi estudada a interação entre as concentrações de 2,4-D, TDZ e épocas de avaliação em anteras de *Coffea arabica* no cv. Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44. As anteras foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo 20 mL do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), com pH ajustado para 5,9, adicionado de 7 g L⁻¹ de ágar e previamente autoclavado, suplementado com os reguladores de crescimento 2,4-D (2, 4, 6 e 8 mg L⁻¹) e TDZ (0 e 0,5 mgL⁻¹). As inoculações das anteras ocorreram a partir das primeiras semanas com florada. O material foi mantido em sala de crescimento com 25 ± 2°C e na presença de luz.

O experimento foi montado no esquema fatorial de 4x2x3 (concentrações de 2,4-D x concentrações de TDZ x época de avaliação) em delineamento de blocos casualizados, e com quatro repetições por tratamento, sendo cada três tubos uma repetição, com cinco anteras por tubo.

Após 30, 60 e 90 dias da inoculação dos explantes, foram avaliadas as variáveis oxidação, intumescimento e calosidade assim como a interferência dos dias nas mesmas.

Os dados das variáveis oxidação, intumescimento e calosidade foram submetidos à análise de variância, as médias das concentrações de TDZ comparadas através do teste Tukey a 5% de probabilidade e as médias das concentrações de 2,4-D e o fator época de avaliação foram analisadas por regressão polinomial, sendo utilizado o programa SANEST

(Zonta et al., 1984). Para efeito de análise estatística, como os dados foram contagem, realizou-se a transformação dos dados em $\sqrt{x + 1/2}$, pois sua distribuição dos dados seguem o modelo de probabilidade de Poisson, onde a média é igual à variância. (LEDO; FARIA, 2006)

Uso de 6-benzilaminapurina, Cinetina, ácido indolbutírico, ácido giberélico, thidiazuron e ácido naftalenoacético para a indução de calos e pró-embriões em anteras de *Coffea arabica*.

Testaram-se os reguladores de crescimento 6-benzilaminapurina (BAP), Cinetina (KIN), ácido indolbutírico (AIB), ácido giberélico (GA₃), thidiazuron (TDZ) e ácido naftalenoacético (ANA), com as seguintes combinações: 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 2 mg L⁻¹ BAP; 8 mg L⁻¹ KIN + 1 mg L⁻¹ AIB; 2 mg L⁻¹ KIN + 1 mg L⁻¹ 2,4-D; 2 mg L⁻¹ KIN + 20 mg L⁻¹ GA₃; 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ TDZ; 2 mg L⁻¹ ANA e 2 mg L⁻¹ 2,4D, num total de sete combinações, para a indução de calos e pró-embriões em anteras de *Coffea arabica* no cv. Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44.

As anteras foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo 20 mL do meio MS, com pH ajustado para 5,9, adicionado de 7 g L⁻¹ de ágar e previamente autoclavados à temperatura de 121°C, sob pressão de 1 atm por 20 minutos, suplementado com os tratamentos de reguladores de crescimento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 7 x 2 (composição dos

reguladores de crescimento e épocas de cultivo *in vitro*, respectivamente), com quatro repetições, sendo três tubos de ensaio uma repetição, com cinco anteras por tubo. O material foi mantido em sala de crescimento com 25 ± 2°C na ausência de luz.

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

Todos os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade e homogeneidade e em seguida foram submetidos à análise de variância e, as médias, ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo programa estatístico SANEST (ZONTA et al, 1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Interação de 2,4-D, TDZ e épocas de avaliação na indução de calos em antera de *Coffea arabica* L.

Não houve interação significativa entre as épocas de avaliação e as concentrações de 2,4-D e TDZ a respeito do número de anteras oxidadas, intumescidas e com calos. Com relação à variável oxidação, as combinações dos reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ não diferiram estatisticamente. Porém, esta variável interferiu mais de 80% das anteras no desenvolvimento dos calos como mostra a Tabela 1, em que houve grande quantidade de explantes oxidados.

Tabela 1. Número e porcentagem de anteras oxidadas após a inoculação em diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ, UFU, Uberlândia-MG, 2007.

Reguladores de Crescimento		Número de anteras oxidadas	(%)
2,4-D (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)		
2	0	4,5000	90
2	0,5	4,2500	85
4	0	4,5200	90,4
4	0,5	4,4333	88,6
6	0	4,6083	92,2
6	0,5	4,2583	85,2
8	0	4,5250	90,5
8	0,5	4,6666	93,3

A alta taxa de oxidação detectada neste experimento indica que a antera de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44 é sensível tanto na presença de 2,4-D como na de TDZ. A oxidação não impediu no primeiro instante da antera se desenvolver, ou seja, a ocorrência de intumescimento e

desenvolvimento do calo, porém, houve escurecimento do meio devido a liberação de exudatos.

A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado. O acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno

da superfície excisada, modificam a composição do meio de cultivo e prejudicam a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000). Segundo Sato et al. (2001), esses compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, inibindo o crescimento dos explantes, além de escurecer o meio de cultura.

Segundo Galston e Purves (1960), os compostos precursores da lignina são polimerizados por peroxidases ou outros sistemas fenólicos oxidativos, onde a auxina afeta este processo quanto à atividade e concentração da peroxidase, e o 2,4-D sendo uma auxina potente pode afetar a oxidação da maneira acima citada. Giri et al. (1993) afirmaram que a presença de 2,4-D no meio de cultura está associada a

uma maior oxidação do tecido de *Aconitum heterophyllum* Wall. Em pimenta-longa o uso de 2,4-D também provocou a oxidação dos explantes em trabalho realizado por Costa e Pereira (2005) e Figueira (2002), trabalhando com subcultivo de anteras de cafeeiro em doses menores de 2,4-D também obteve 100% de anteras oxidadas. Neste experimento não houve ausência de 2,4-D, todos os tratamentos continham esse regulador, mostrando que este regulador de crescimento está interferindo numa maior oxidação do explante como foi relatado pelos outros autores.

A época de avaliação interferiu significativamente quanto à oxidação, onde, quanto maior o período de avaliação, maior o número de anteras oxidadas (Figura 1).

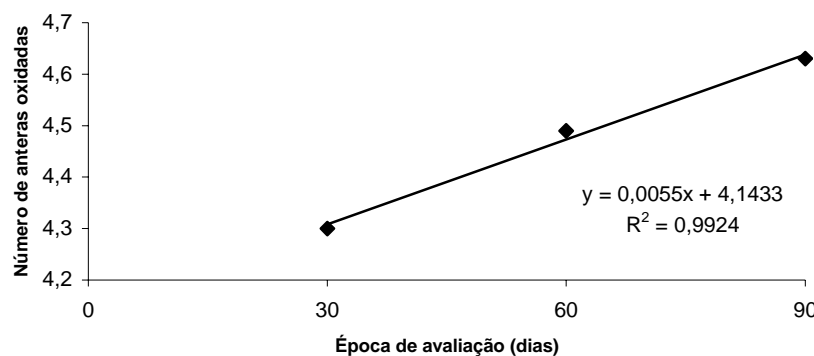


Figura 1. Número de anteras oxidadas aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação. UFU, Uberlândia-MG, 2007.

No trabalho de Silva (2003), onde anteras das cultivares Catuaí Vermelho 99 e Mundo Novo inoculadas em meio MS suplementado com 2,4-D e BAP em ausência e presença de luz, foi verificado que anteras da cultivar Mundo Novo não submetidas à ausência de luz, tiveram um menor índice de oxidação. Esse resultado também pode explicar a alta porcentagem de anteras oxidadas encontradas neste

trabalho, visto que o experimento foi conduzido na presença de luz.

Para a variável calosidade, houve diferença estatística significativa a 5% de probabilidade entre as concentrações de 2,4-D de forma que a concentração de 2 mg L⁻¹ proporcionou melhor resultado e a partir desta, foi observado um decréscimo de calosidade (Figura 2).

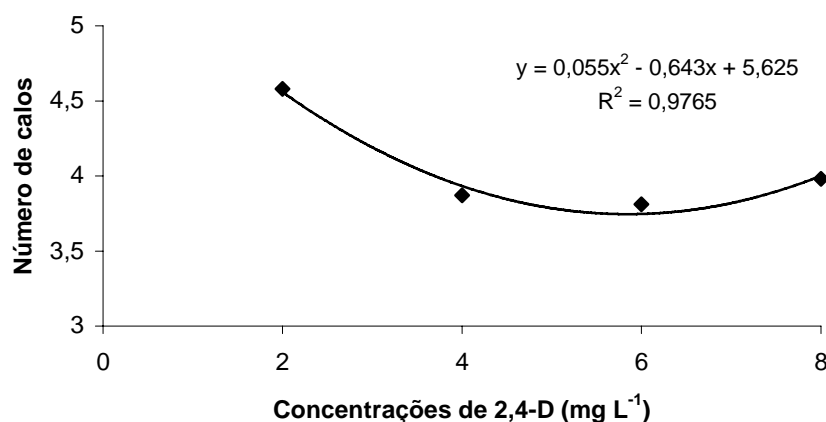


Figura 2. Número de anteras com calos sob diferentes concentrações de 2,4-D. UFU, Uberlândia-MG, 2007.

Para cv. Rubi de *C. arabica* L. também foi obtido os melhores resultados com relação a formação de calos nas concentrações de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D e 4 mg L⁻¹ de cinetina (ARAÚJO et al., 2002). Esses resultados também confirmam os obtidos por Palú (2002) onde o aumento da produção de calos ocorreu até a concentração de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D onde a partir desta houve inibição na produção de calos. Este comportamento não variou entre as cultivares, sugerindo que este comportamento ocorre na espécie *C. arabica* L., independente da cultivar.

Na indução de calogênese o uso da auxina 2,4-D é frequente. As auxinas atuam na inicialização da divisão celular e controla os processos de crescimento e alongação celular. O 2,4-D atua também no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros que decodificam proteínas para o crescimento, podendo

induzir a uma desordenada proliferação celular em altas doses.(GEORGE, 1996).

Uso de 6-benzilaminapurina, Cinetina, ácido indolbutírico, ácido giberélico, thidiazuron e ácido naftalenoacético para a indução de calos e pró-embrióides em anteras de *Coffea arabica*.

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

As combinações de reguladores de crescimento 2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L⁻¹ de BAP, 2 mg L⁻¹ de Cinetina + 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, 2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ de TDZ e somente 2 mg L⁻¹ de 2,4-D resultaram em maior formação de calos nas anteras inoculadas(Tabela 2).

Tabela 2. Média (%) do número de anteras com calos aos 60 dias de cultivo *in vitro* submetidas a diferentes combinações de reguladores de crescimento. UFU, Uberlândia-MG, 2007.

Reguladores de crescimento	Número de anteras com calos	(%)
2 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L ⁻¹ de BAP	2,6250 a	52,5
2 mg L ⁻¹ de Cinetina + 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D	2,6250 a	52,5
2 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L ⁻¹ de TDZ	2,1250 a	42,5
2 mg L ⁻¹ de 2,4-D	1,2500 ab	25
8 mg L ⁻¹ de Cinetina + 1 mg L ⁻¹ de AIB	0,6250 b	12,5
2 mg L ⁻¹ de ANA	0,3750 b	7,5
2 mg L ⁻¹ de Cinetina + 20 mg L ⁻¹ de GA ₃	0,2500 b	5

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

Maciel (2001) e Palú (2002) citam que, pelos resultados obtidos para a indução de calogênese em anteras de cafeeiro, observa-se que é necessária uma auxina juntamente com uma citocinina, seja ela BAP ou cinetina. Dentre as auxinas sintéticas, o 2,4-D é sem dúvida a mais adequada à indução e manutenção do calo (GAMBORG et al., 1976). Já Rocha (1998) afirma que a indução e manutenção do calo, para a maioria das espécies parecem comportar-se diferentemente em relação aos reguladores de crescimento, podendo ocorrer a independência tanto da auxinas e citocininas, como a dependência de ambas. Neste ensaio foi verificado o comportamento do 2,4-D agindo isoladamente e também associado a BAP, cinetina e a TDZ.

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

combinação entre 2,4-D e cinetina favorece a indução de calos primários. (SILVA et al., 2003). O uso tanto de BAP como cinetina juntamente com o 2,4-D propiciaram o melhor resultado no número de anteras com calos, reequivalendo a 52,5% de calosidade.

Com base nas avaliações feitas aos 30 e 60 dias observou-se que o tempo de cultivo *in vitro* é um fator relevante para a indução de calos, visto que aos 60 dias verificou-se diferença significativa em relação aos 30 dias. Apesar de Marques et al., (2005) afirmar que quanto maior o tempo de cultivo *in vitro* maior é a oxidação das anteras com conseqüente morte dos calos, neste trabalho, a oxidação aos 60 dias não comprometeu o desenvolvimento dos mesmo que permaneceram vivos, friáveis e com presença de pró-embrióides.

A presença de pró-embrióides correspondeu a 84,5% dos calos. Alguns deles apresentavam-se com coloração acinzentada e não branca, porém a maioria possuía coloração amarelo creme nos quais se encontravam maior concentração de pró-embrióides. A coloração dos calos é um indicativo do estado em que se encontra a cultura. O cinza, por exemplo, pode ser resultante da perda gradativa da cor natural passando de

verde a marrom, aliada à diminuição do ritmo de crescimento dos mesmos, estagnação do processo de formação de embriões seguida pelo surgimento de áreas necrosadas na superfície que constituem sinais característicos da decadência da cultura (Silva, 2003).

A indução de calos foi melhor com a combinação de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L⁻¹ de BAP,

embora não diferindo estatisticamente das combinações de 2 mg L⁻¹ de Cinetina + 1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ de TDZ. No entanto as combinações 2 mg L⁻¹ de Cinetina + 20 mg L⁻¹ de GA₃ e 2 mg L⁻¹ de ANA não induziram a formação de pró-embriões nos calos, sendo assim, considerados os tratamentos menos eficientes (Tabela 3).

Tabela 3. Médias (%) do número de calos com pró-embriões aos 60 dias de cultivo *in vitro* submetidas a diferentes combinações de reguladores de crescimento. UFU, Uberlândia-MG, 2007.

Reguladores de crescimento	Calos com pró-embriões	(%)
2 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L ⁻¹ de BAP	0,500 a	50
2 mg L ⁻¹ de Cinetina + 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D	0,350 ab	35
2 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L ⁻¹ de TDZ	0,215 ab	21,66
2 mg L ⁻¹ de 2,4-D	0,100 b	10
8 mg L ⁻¹ de Cinetina + 1 mg L ⁻¹ de AIB	0,015 b	1,66
2 mg L ⁻¹ de Cinetina + 20 mg L ⁻¹ de GA ₃	0,000 b	0
2 mg L ⁻¹ de ANA	0,000 b	0

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

Portanto, afirma-se que a combinação 2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L⁻¹ de BAP, numericamente, foi mais eficiente tanto para a indução de calos quanto para a formação de pró-embriões.

A utilização dos reguladores de crescimento no meio de cultura auxiliou no desenvolvimento do potencial embriogênico das anteras, entretanto, os pró-embriões observados não regeneraram plântulas. Este está sendo um ponto de estrangulamento do trabalho, fazer o pró-embrião se desenvolver. Portanto a continuidade de trabalhos que visam esta linha de pesquisa deve continuar para que esta colabore efetivamente para os programas de melhoramento genético do cafeeiro.

CONCLUSÕES

As combinações que melhor induziram a formação de calos nas anteras inoculadas foram 2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L⁻¹ de BAP, 2 mg L⁻¹ de Cinetina + 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, 2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ de TDZ e 2 mg L⁻¹ de 2,4-D. A calosidade das anteras foi favorável aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

As combinações 2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L⁻¹ de BAP, 2 mg L⁻¹ de Cinetina + 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, 2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ de TDZ, foram aquelas que melhor induziram a formação de pró-embriões.

ABSTRACT: The improvement of coffee (*Coffea arabica*) has been done through conventional methods, which are very cumbersome to obtain the desired genetic material, and this time can be reduced through the acquisition of haploid in segregating generations through the culture of anthers. This study analyzed the effect of growth regulators on *C. arabica* L. cv. Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44 anther callus and pro-embryoid induction. First, anther inoculation on MS medium supplemented with 2,4-D (2, 4, 6 or 8 mgL⁻¹), TDZ (0 or 0.5 mgL⁻¹) was evaluated, together with evaluation time (30, 60 or 90 days). The experimental design was as a 4x2x3 factorial in randomized blocks and with four repetitions. Oxidation, intumescences and callosity were evaluated. The use of 2 mgL⁻¹ 2,4-D alone was effective for callus induction. High concentrations of 2,4-D inhibited callus formation and the longer the evaluation period, the greater was anther oxidation. Subsequently, the following treatments were evaluated: 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 2 mg L⁻¹ BAP; 8 mg L⁻¹ Kinetin + 1 mg L⁻¹ AIB; 2 mg L⁻¹ Kinetin + 1 mg L⁻¹ 2,4-D; 2 mg L⁻¹ Kinetin + 20 mg L⁻¹ GA₃; 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ TDZ; 2 mg L⁻¹ ANA or 2 mg L⁻¹ 2,4-D. The experimental design was completely randomized, as a 7x2 (regulator composition x *in vitro* cultivation time) factorial with four replications. After 30 and 60 days *in vitro* cultivation, contamination, oxidation, intumescences, callus formation with the presence of pro-embryoid or not were evaluated. The combinations of regulators 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 2 mg L⁻¹ BAP, 2 mg L⁻¹ Kinetin + 1 mg L⁻¹ 2,4-D, 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ TDZ e 2 mg L⁻¹ 2,4-D induced callus formation. Callosity was favored after 60 days of *in vitro* cultivation. The combinations 2 mgL⁻¹ 2,4-D + 2 mgL⁻¹ BAP, 2 mgL⁻¹ Kinetin + 1 mgL⁻¹ 2,4-D, 2 mgL⁻¹ 2,4-D + 0.5 mgL⁻¹ TDZ induced pro-embryoid formation.

KEYWORDS: *Coffea Arabica*. Somatic embryogenesis. Hormone balance.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. M. C. O. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica*)**. 1998. 86f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- 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, 2002. p. 197.
- COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S. Seleção de auxinas para a indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* visando o estabelecimento de cultivo de células em suspensão. In: 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 15 CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS E 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 23, 2. 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: CBCEARÁ, 2005. p. 656.
- FIGUEIRA, E. R. **Estádios de desenvolvimento dos micrósoros, pré-tratamentos e 2,4-D no cultivo *in vitro* de anteras de cafeeiro**. 2002. 39f. Monografia (Especialização em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- FIGUEIRA, E. R.; LONDE, L. N.; SILVA, A. S.; MARQUES, R. V.; MARQUES, S. V.; LUZ, J. M. Q. Influência do 2,4-D, nitrato de prata e ácido acetilsalicílico no cultivo *in vitro* de anteras de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) In: 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 15 CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS E 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 23, 2. 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: CBCEARÁ, 2005. p. 595.
- GALSTON, A. W.; PURVES, W. K. The mechanism of action of auxin. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 11, p. 239-276, 1960.
- GAMBORG, O. L.; MURASHIGE, T.; THORPE, T. A.; VASIL, I. K. Plant tissue culture media. **In vitro**, v. 12, n. 7., p. 473-478, 1976.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1: the technology**. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.
- GIRI, A.; AHUJA, P. S.; AJAYKUMAR, P. V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Aconitum heterophyllum* Wall. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 32, p. 213-218, 1993.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPASPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1999. v. 2, p. 533-568.
- HORNER, M.; STREET, H. E. Pollen dimorphism – Origin and significance in pollen plant formation by anther culture. **Annals of Botany**, v. 42, p. 771-773, 1978.
- MACIEL, A. L. de R. **Embriogênese somática indireta em *Coffea arabica* L.** 2001. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, MG.

KALTCHUK-SANTOS, E.; MARIATH, J. E. A.; MUNDSTOCK, E.; HU, C.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Cytological analysis of early microspore divisions and embryo formation in cultured soybean anthers. **Protoplasma**, Wien, v. 49, p. 107-115, 1997.

LEDO, C. A. da S.; FARIA, G. A. Experimentação em Cultura de Tecidos. In: SOUZA, A. da S. e JUNGHANS, T. G. **Introdução à Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas, BA, Empraba Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, p. 141-152.

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

MARQUES, R. V.; LUZ, J. M. Q.; MARQUES, S. V.; FIGUEIRA, E. R.; SECUNDINO, R. R.; LONDE, L. Efeito dos reguladores de crescimento 2,4-D, TDZ, Cinetina, BAP, AIB, GA₃ e ANA na indução e regeneração de calos em anteras de cafeeiro *Coffea arabica*. In: 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 15 CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS E 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 23, 2. 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: CBCEARÁ, 2005. p. 595.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**. Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.

PALÚ, E. G. **Indução in vitro de calogênese em anteras e brotações em segmentos nodais de Coffea arabica L.** 2002. 47 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

PENG, M.; ZIAUDDIN, A.; WOLYN, D. J. Development of asparagus microspores *in vivo* and *in vitro* is influenced by gametogenic stage and cold treatment. **In Vitro Cell Developmental Biology**, v. 33, p. 263-268, 1997.

RAGHAVAN, V. Origin and development of pollen embryoids and pollen calluses in cultured anther segments of *Hyoscyamus niger* (henbane). **American Journal of Botany**, v. 65, n. 9, p. 984-1002, 1997.

REYNOLDS, T. L. A cytological analysis of microspores of *Triticum aestivum* (Poaceae) during normal ontogeny and induced embryogenic development. **American Journal of Botany**, v. 80, n. 5, p. 569-576, 1993.

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

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

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; et al. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

SECUNDINO, R. R.; LUZ, J. M. Q.; MARQUES, S. V.; MARQUES, R. V. Efeito dos reguladores de crescimento 2,4-D e do ácido acetilsalicílico na indução de calos em anteras de cafeeiro *Coffea arabica*. In: 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 15 CONGRESSO BRASILEIRO DE

FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS E 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 23, 2. 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: CBCEARÁ, 2005. p. 595-596.

SHARP, W. R., SONDAHL, M., CALDAS, L. S., MARAFFA, S. B. **Horticultural Review**. V. 2, p. 268-310, 1980.

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

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

SUNDERLAND, N. Another cultured as a means of haploid induction. In: KASHA, K. J. **Haploids in higher plants: advance and potential**. Guelph: University of Guelph, 1974, p. 91-122.

SUNDERLAND, N.; ROBERTS, M.; EVANS, L. J.; WILDON, D. C. Multicellular pollen formation in cultured barley anthers. I. Independent division of the generative and vegetative cells. V. 30, n. 119, p. 1133-1144, 1979.

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