

ADELAIDE SIQUEIRA SILVA

INDUÇÃO DE CALOS E EMBRIOGÊNESE EM ANTERAS DE *Coffea arabica* L.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

ADELAIDE SIQUEIRA SILVA

INDUÇÃO DE CALOS E EMBRIOGÊNESE EM ANTERAS DE *Coffea arabica* L.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 02 de março de 2007.

Prof. Dr. Moacir Pasqual	UFLA
Profa. Dra. Denise de Garcia Santana	UFU
Profa. Dra. Tatiana Michlovská Rodrigues	UFU

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz
ICIAG-UFU
(Orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

Dedico

Aos meus pais João Siqueira e Vera Lúcia: exemplos de perseverança, luta e muito amor;

Ao meu amado irmão Luciano, pela cumplicidade e carinho ;
Ás minhas cunhadas queridas, Lu e Kil: pela grande amizade e companherismo;

Aos meus queridos sogrinhos João Carlos e Eliana, pessoas incríveis e amáveis;

E é claro á você Alexandre, meu amor. Esposo, amigo, companheiro, dedicado e paciente;

É com muito amor, carinho e gratidão pela confiança depositada em mim, que lhes dedico este trabalho. Vocês são meus tesouros.

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus anjos protetores, por mais esta conquista.

A Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pela oportunidade concedida.

Ao prof. Dr. José Magno Queiroz Luz pela orientação, amizade e confiança.

A prof. Dra. Denise Garcia Santana, pela indispensável colaboração. Aos meus amigos do laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, em especial a Cecília, Leandro e Tatiana, pelo companheirismo e colaboração na realização do trabalho.

A minha amiga Gláucia, pela ajuda e amizade.

Aos professores que por mim passaram ao longo da pós-graduação, pela enorme contribuição intelectual.

Aos meus colegas de Pós-Graduação.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Aspectos gerais do cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.).....	3
2.2 Aspectos gerais da cultura de tecidos.....	5
2.3 Cultura de tecidos em cafeeiro	8
2.4 Cultura de anteras / obtenção de haplóides	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Procedimentos.....	21
3.2 Ácido acetilsalicílico na indução de calos e pró-embriões em anteras de cvs de <i>C. arabica</i>	22
3.3 BAP e 2,4-D na diferenciação de calos de <i>C. arabica</i>	22
3.4 1ª Etapa: Nitrato de prata e etileno na indução de calos e regeneração de embriões em anteras de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho 99	23
3.4 2ª Etapa: Nitrato de prata e etileno na indução de calos e regeneração de embriões em anteras de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho 99.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Ácido acetilsalicílico na indução de calos e pró-embriões em anteras de cvs de <i>C. arabica</i>	25
4.2 BAP e 2,4-D na diferenciação de calos de <i>C. arabica</i>	32
4.3 1ª Etapa: Nitrato de prata e etileno na indução de calos e regeneração de embriões em anteras de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho 99.....	37
4.3.1 2ª Parte: Nitrato de prata e etileno na indução de calos e regeneração de embriões em anteras de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho 99.....	41
5 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

RESUMO

SILVA, ADELAIDE SIQUEIRA. **Indução de calos e embriogênese em anteras de *Coffea arabica* L.** 2007. 62p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.¹

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. A redução deste tempo é possível por meio da produção de linhagens homozigóticas, oriundas de dihaplóides obtidas através da cultura de anteras. O objetivo foi aplicar a técnica da cultura de anteras em diferentes cultivares de *Coffea arabica* L. para induzir a formação de calos e regenerar plântulas dihaplóides. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Experimento 1: Botões florais dos cultivares Mundo Novo LCP-379-19 e Catuaí Vermelho H2077-2-5-44 foram coletados, desinfestados e as anteras inoculadas em meio MS suplementado com 2,0 mgL⁻¹ de 2,4-D e AAS nas concentrações de 0,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0 mgL⁻¹. Experimento 2: Calos de Catuaí Vermelho 44 foram subcultivados em meio MS acrescido de diferentes concentrações de BAP (0,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mgL⁻¹) e 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mgL⁻¹). Experimento 3 (1ª parte): Botões florais do cultivar Catuaí Vermelho 99 foram coletados, desinfestados e as anteras inoculadas em meio MS acrescido de 2 mgL⁻¹ de 2,4-D na ausência e presença de 5 mgL⁻¹ de nitrato de prata juntamente com etileno por diferentes dias: testemunha, 2, 4, 6, e 8 dias. (2ª parte): Ao final de 12 dias, as anteras foram transferidas para um meio de regeneração, acrescido de 0,108 mgL⁻¹ de cinetina. Um maior tempo de exposição das anteras ao etileno favoreceu a oxidação, e o etileno sozinho favoreceu a formação de calos, a cv. Catuaí Vermelho 99 foi responsiva á formação de calos e também á embriogênese direta, na presença de etileno, o AgNO₃ agiu como inibidor de contaminantes e juntamente com etileno, favoreceu a calosidade das anteras da cv. Catuaí Vermelho 99, o AgNO₃ juntamente com 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D podem promover embriogênese direta, tanto para Mundo Novo quanto para Catuaí Vermelho 44 o aumento das concentrações de AAS diminuiu a formação de pró-embrióides nos calos e o 2,4-D sozinho foi capaz de promover a formação de calos friáveis, porém o equilíbrio da auxina e da citocinina (BAP) utilizadas no trabalho, favoreceram a produção de calos friáveis.

Palavras-chave: Cultura de anteras, *Coffea arabica*, embriogênese.

¹ Orientador: José Magno Queiroz Luz – UFU.

ABSTRACT

SILVA, ADELAIDE SIQUEIRA. Induction of anther calli and embryogenesis in *Coffea arabica* L. 2007. 62p. **Dissertation (Master's degree in Agriculture/Fitotecnia)** – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.¹

Coffee breeding through convention methods, especially hybridization, followed by population selection, progeny evaluation, back-crossings and inter-specific crossings is a time consuming process that can demand for more than 30 years to obtain a new cultivar. It is possible to reduce this time by producing homozygous lines, from di-haploids, obtained from anther culture. This study applied anther culture technique on different *Coffea arabica* L. cultivars to induce the formation of calli and regenerate di-haploid germlings. The experiments were done in the Vegetable Biotechnology Laboratory of Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Experiment 1: Flower buds of cultivars Mundo Novo LCP-379-19 and Catuaí Vermelho H2077-2-5-44 were collected, disinfested and the anthers were inoculated in MS supplemented with 2.0 mgL⁻¹ de 2,4-D and AAS at de 0.0, 8.0, 16.0, 32.0 or 64.0 mgL⁻¹. Experiment 2: Calli of Catuaí Vermelho 44 were transferred to MS amended with different concentration of BAP (0.0, 2.0, 4.0 or 8.0 mgL⁻¹) and 2,4-D (0.0, 1.0, 2.0 or 4.0 mgL⁻¹). Experiment 3 (1st part): Flower buds of cultivar Catuaí Vermelho 99 were collected, disinfested and the anthers inoculated in MS amended with 2 mgL⁻¹ 2,4-D in the absence or presence of 5 mgL⁻¹ silver nitrate together with ETHREL[®] for different days: control (0), 2, 4, 6, or 8 days. (2nd part): After 12 days, the anthers were transferred to a regeneration medium, amended with 0.108 mgL⁻¹ kinetin. A greater anther exposition time to ethylene, or longer inoculation time, favored the oxidation, and the alone ethylene favored formation of calli, Catuaí Vermelho 99 is responsive to intumescence, to calli formation and, also, to direct embryogenesis, in the presence of ethylene; AgNO₃ together with ethepon, favored anther intumescence and calli formation; AgNO₃ together with 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D, promoted direct embryogenesis, for Catuaí Vermelho 44, the treatment with 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D and 0.0 mgL⁻¹ AAS was the one that presented the greatest average of calli formation; for both Mundo Novo and Catuaí Vermelho 44 the increase in AAS concentration decreased the pro-embryo formation in the calli; auxin, by itself, was capable of promoting the formation of friable calli, however the balance of the auxin and the BAP used in the work, had favored the production of friable calli.

Keywords: anther culture, *Coffea arabica* L , embryogenesis.

¹ Major Professor: José Magno Queiroz Luz – UFU

INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais populares do mundo e sua cultura tem grande valor para a exportação. As indústrias brasileiras exportaram, na última safra, cerca de US\$18,14 milhões, sendo o Brasil o maior exportador mundial de café com, aproximadamente, dez milhões de pessoas envolvidas direta ou indiretamente com esse agronegócio. Além do aspecto econômico, a atividade tem relevada importância social, como atividade geradora de emprego e fixadora da mão-de-obra no campo.

Há cerca de 100 espécies descritas do gênero *Coffea*, mas somente duas, a *C. arabica* L. e a *C. canephora* produzem frutos com importância econômica no mercado internacional; os do *C. arabica* L. são os que produzem a bebida de melhor qualidade e representam cerca de 70% da produção mundial.

A cafeicultura tem-se expandido de tal forma, que cada vez mais são exigidos melhores padrões na qualidade da bebida, na produtividade dos grãos, na maturação uniforme em épocas diferenciadas de colheita e resistência e/ou tolerância a doenças, pragas e a condições adversas do meio ambiente além da obtenção de novas cultivares adaptadas às diferentes regiões cafeeiras e aos sistemas de cultivo. O uso de variedades melhoradas geneticamente pode ser a solução, uma vez que os programas de melhoramento têm apresentado resultados promissores na cultura do café, no que se refere ao aumento de produtividade e à obtenção de novas cultivares. As técnicas convencionais de melhoramento têm sido amplamente utilizadas neste propósito.

O melhoramento genético do cafeeiro por meio de métodos convencionais, é um processo demorado, podendo levar mais de 30 anos para se obter uma nova cultivar e, pelo fato de o 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. Além de ser um processo demorado e trabalhoso, a eficiência da seleção nas primeiras gerações de autofecundação é muito baixa devido, principalmente, à ocorrência de alelos dominantes em heterozigose.

A redução desse tempo é possível por meio da produção de linhagens homocigóticas oriundas de di-haplóides. 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, que se tem mostrado eficiente para diversas espécies, sendo uma

alternativa para acelerar os programas de melhoramento genético na cultura do cafeeiro. Ela é considerada uma ferramenta importante, uma vez que pode auxiliar no melhoramento da cultura, permitindo a obtenção de haplóides em gerações segregantes, o que leva a rápida produção de plantas homozigóticas por intermédio da duplicação do número de cromossomos numa única etapa, substituindo as gerações de autofecundação.

Além de os haplóides serem livres dos problemas de dominância e recessividade, por possuírem apenas um alelo em cada loco gênico, aceleram o processo de obtenção de novas cultivares. O uso dessa técnica apresenta, ainda, como vantagem, o menor tempo necessário para a obtenção de novas linhagens quando comparada com os outros métodos de melhoramento convencionais.

Diante do exposto, por meio da cultura de anteras, o objetivo desse trabalho foi induzir a formação de calos e regenerar plântulas di-haplóides em três cultivares de *Coffea arabica* L..

2- REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais do cafeeiro (*Coffea arabica* L.)

A espécie *C. arabica* pertence à família *Rubiaceae*, originária do sudoeste da Etiópia, do sudeste do Sudão e do norte do Quênia, em uma região restrita e marginal às demais espécies. A faixa de altitude correspondente situa-se entre 1000 e 2000 metros e algumas regiões limítrofes estão entre 8 a 12' de latitude norte e 40 a 42" de longitude leste de Greenwich (CHARRIER, 1978).

Das espécies descritas, *Coffea arabica* e *Coffea canephora* representam, praticamente, todo o café produzido e comercializado no mundo, sendo responsáveis por 70 e 30%, respectivamente. As demais espécies, como as *Coffea eugenioides*, *C. salvatrix*, *C. racemosa*, *C. dewevrei*, *C. liberica*, *C. congensis* e *C. humilis*, entre outras, têm sido importantes para programas de melhoramento, como fontes de alelos favoráveis para a resistência a pragas, a doenças, a nematóides, a seca, bem como para a qualidade de grãos e demais problemas que afetam a produtividade e a qualidade das variedades de cafés, em nível mundial (CHARRIER e BERTHAUD, 1985).

No Brasil, o café foi introduzido em 1727 pelo Sargento Francisco de Melo Palheta, em Belém do Pará, e em seguida levado para o Maranhão e para a Bahia, e posteriormente para o Rio de Janeiro, expandindo-se para o Vale do Paraíba, Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná Mato Grosso e Rondônia (CARVALHO, 1993).

C. arabica é considerada uma espécie que possui mais de 40 mutantes e muitas variedades. É tetraplóide, autofértil, com ocorrência de 10 a 12% de fecundação cruzada. Apresenta raiz pivotante profunda e raízes secundárias ramificadas. O caule único e os ramos ortotrópicos podem dar origem a folhas e também a ramos plagiotrópicos, que produzem folhas e botões florais. As folhas apresentam coloração verde-escura, são elípticas e apresentam lâminas brilhantes e domáceas visíveis. Quando maduros, os frutos são drupas amareladas ou avermelhadas, possuem superfície lisa, exocarpo delgado, mesocarpo carnoso e endocarpo fibroso. O endosperma possui uma película prateada, em cuja base aloja-se o embrião (GRANER e GODOY JÚNIOR, 1967). É a espécie mais plantada em todo mundo, sendo de maior importância econômica para o Brasil, que está classificado como o principal produtor, o maior exportador e o segundo consumidor de café do mundo (MENDES, 1997).

O agronegócio internacional do café é uma das atividades mais importantes no aspecto econômico, pela movimentação de mais de 91 bilhões de dólares por ano, e no

social, por empregar, direta e indiretamente, mais de meio bilhão de pessoas, ou em torno de 8% da população mundial (EMBRAPA CAFÉ, 2004). O produto é cultivado em cerca de 70 países dos diversos continentes, ocupando área em torno de doze milhões de hectares e consumido por centenas de milhões de pessoas, apesar de apenas 19% da população mundial apreciar a bebida (ZAMBOLIM, 2003).

A primeira estimativa da safra 2006/07 é de que a produção brasileira de café beneficiado fique entre 40.432 e 43.581 mil sacas. Quando comparada com a produção da safra 2005/06, que foi de 32.944 mil sacas, verifica-se incremento de 22,73% no limite inferior e de 32,29% no limite superior. Das 40.432 mil sacas produzidas para o limite inferior, 30.495 mil sacas foram de arábica e 9.937 mil de robusta (conilon); o limite superior é formado de 33.532 mil sacas de arábica e 10.049 mil sacas de café robusta. O acréscimo na produção respalda-se na bianualidade da cultura, na melhoria dos tratos culturais, nas podas, nas desbrotas, no controle fitossanitário e nas condições climáticas favoráveis. O Estado de Minas Gerais é o maior produtor de café do País, com uma produção estimada entre 19.478 mil e 22.125 mil sacas de café beneficiado, participando com 48,17% no limite inferior e 50,77% no limite superior da produção nacional, seguido pelos Estados do Espírito Santo, com 9.160 mil e 9.237 mil sacas (22,66% e 21,20%); São Paulo, com 4.430 mil a 4.507 mil sacas (10,95% e 10,34%); Bahia, com 2.165 mil a 2.235 mil sacas (5,35% e 5,13%); Paraná, com 1.990 a 2.198 mil sacas (4,92% e 5,04%); Rondônia com 1.810 mil a 1.830 mil sacas (4,48% e 4,20%); e os demais Estados, com 1.399 mil a 1.449 mil sacas (3,47% e 3,32%) (CONAB, 2005).

As principais regiões cafeeiras no Brasil abrangem quatorze regiões produtoras, situadas desde o Paraná até à Bahia e Rondônia. São mais conhecidas as do Serrado Mineiro, do Triângulo Mineiro e do sul de Minas — sendo esta última a região que mais produz café no Brasil. A Mogiana Paulista, no nordeste de São Paulo, quase na fronteira com Minas Gerais, também se tornou importante (HERSZKOWICZ, 2003). Segundo Tristão (1995), a cafeicultura é a atividade agrícola que mais gera empregos no Brasil, sendo relevante fator de distribuição de renda. O agronegócio café, em toda sua cadeia, envolve a produção, o transporte, o armazenamento, a comunicação, a rede bancária, os serviços financeiros, os portos, a embalagem, o processamento, a industrialização e comercialização. Emprega cerca de três milhões de brasileiros. O complexo agroindustrial do café no Brasil movimentou, anualmente, cerca de 8,10 bilhões de reais, assim distribuídos: 3,6 na indústria, 4,3 na exportação e 0,2 em solúveis (CAIXETA,

2001), envolvendo, direta e indiretamente, dez milhões de pessoas e, pelo menos, 1.700 municípios (RESENDE *et al.*, 2000).

O café é um dos poucos produtos cujo valor cresce significativamente com a melhoria da qualidade. Com a globalização, torna-se importante que a cafeicultura brasileira seja mais moderna, para o País ser mais competitivo na atividade. Um dos fatores determinantes que vêm provocando o declínio da participação brasileira no mercado internacional do café tem sido a falta de um bom padrão de qualidade de seu produto. A estratégia nacional era exportar grandes quantidades para um mercado em que a exigência de qualidade era crescente. Os principais concorrentes brasileiros perceberam mais cedo a importância de oferecer um produto de melhor qualidade e de adotar estratégias de *marketing*. Dessa forma, alcançaram maior segurança de venda, conquistaram novos mercados e obtiveram melhores preços no mercado internacional (ABIC, 1998). Cafés de boa qualidade, denominados especiais, sempre terão destino certo, mercado comprador e consumidor disposto a pagar bons preços pelo prazer de ter uma bebida que lhe agrada, o que descortina uma nova dimensão da cadeia produtiva do café (LEITE e SILVA, 2000).

Assim, os consumidores de café cada vez têm exigido mais qualidade, associada a produtos diferenciados, produzidos com responsabilidade social, com o mínimo de agressão ao meio ambiente e com certificado de origem. Mas, para se ter boa qualidade e atender às exigências dos consumidores e também dos compradores e industriais, deve-se definir adequadamente o ambiente do melhoramento e desenvolver variedades que possuam os atributos que confirmam boa qualidade, resistência a pragas e doenças, para que haja menor utilização de defensivos e que essas variedades tenham características bioquímicas adequadas para proporcionar um bom sabor, aroma e o corpo que o consumidor deseja (LEITE e SILVA, 2000).

2.2 Aspectos gerais da cultura de tecidos

A cultura de tecidos é uma técnica que visa a obter plantas a partir de explantes, que podem ser meristemas, partes da folha, raízes, caules, anteras ou protoplastos. Essa técnica baseia-se na totipotencialidade celular, ou seja, na capacidade de uma célula qualquer da planta regenerar uma nova planta, visto que possui toda a informação genética necessária para isso (RIBEIRO, 1999).

Independente da origem e do aspecto aplicado, as técnicas de cultura de tecidos vegetais permitem a propagação clonal massal de genótipos superiores. Segundo o

Código Internacional de Nomenclatura de Plantas Cultivadas, clone é uma das categorias básicas da cultivar e designa um conjunto geneticamente uniforme de indivíduos, derivados originalmente de um indivíduo simples por propagação assexuada (enxertia, estaquia, mergulhia, apomixia ou micropropagação). O conceito de propagação clonal implica a seleção de genótipos com graus variados de heterozigose e sua fixação nas gerações subseqüentes (GUERRA e NODARI, 2006).

De acordo com Silva (2007), o grau de sucesso em qualquer tecnologia que emprega cultura de células, tecidos ou órgãos depende de poucos fatores. Uma questão significativa é a escolha dos componentes nutricionais e reguladores de crescimento que controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como a fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células.

O meio básico utilizado em diversas culturas é chamado de “MS”, em referência aos seus autores, Murashige & Skoog (1962). 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. Um meio de cultura deve conter macro e microelementos, água, aminoácidos, vitaminas e reguladores de crescimento, podendo ainda ser líquido ou sólido, pela adição de ágar (MORAES-FERNANDES, 1990). Também são utilizados carboidratos como a sacarose, proporcionando um crescimento vigoroso e saudável (THORPE e PATEL, 1984). Para estimular o desenvolvimento e a regeneração, são utilizados reguladores de crescimento, tais como as auxinas, citocininas e giberelinas.

A presença dos reguladores de crescimento em especial as auxinas e citocininas no meio de cultura aumentam a divisão celular e, portanto, iniciam a embriogênese. 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).

O balanço de auxinas/citocininas em alto/baixo favorecem o enraizamento e o balanço inverso promove a formação de parte aérea. Concentrações iguais promovem a produção de calos. As auxinas mais usadas são AIA (ácido indol-3-acético), AIB (ácido indol-3-butírico), ANA, 2,4-D, 2,4,5-T, 4-CPA e picloran. A auxina 2,4-D é bastante

usada para a indução de calos e tem o efeito de supressão da morfogênese. As auxinas 2,4-D e ANA são sintéticas e têm efeitos semelhantes às de ocorrências naturais, sendo mais estáveis à degradação. A auxina 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) e o picloran induzem a formação de calos em monocotiledôneas (AMMIRATO, 1993). Essas auxinas são termo-estáveis, não decompõem quando autoclavadas. O AIA é a auxina natural e a menos estável, sendo destruído em pH baixo (GUERRA e NODARI, 2006).

Uma das linhas que está sendo explorada com o contínuo aumento dos estudos com o cultivo *in vitro* de vegetais é a composição e a influência de gases nos recipientes de cultivo, bem como a adição de componentes ao meio de cultura que influenciam na formação e ação destes gases, principalmente no que diz respeito à embriogênese (LUZ, 1995).

O etileno é um regulador de crescimento gasoso natural da planta, geralmente associado com maturação de fruta controlando frutos climatéricos. Seu uso na cultura de tecidos de planta não é difundido, embora apresente um problema particular para a cultura *in vitro* de plantas. Algumas culturas de células da planta produzem o etileno, que, em quantidades maiores, pode inibir o crescimento e o desenvolvimento da cultura. O tipo de passagem do gás da cultura usado e seus meios do fechamento afetam a troca gasosa entre a célula e a atmosfera exterior e, assim, os níveis do etileno apresentam-se na cultura (RAMAGE e WILLIAMS, 2002).

O etileno é produzido em todas as células das plantas superiores que ocorrem nas regiões meristemáticas. Ele produz efeitos fisiológicos importantes e de grande aplicação comercial, mas, no cultivo *in vitro*, a produção e a ação desse gás nos recipientes de cultivo afetam diretamente a resposta do explante, seja ela positiva ou negativa (PASQUAL *et al.*, 2002), uma vez que está envolvido em diversos processos fisiológicos nas plantas, como as respostas a estresses ambientais bióticos e abióticos (YANG e HOFFMAN, 1984 ; WANG *et al.*, 2002).

Luz *et al.* (1997), verificaram regeneração direta de plântulas haplóides em anteras de pimentão em meio acrescido com 2,4-D, cinetina e AgNO₃ e exposto ao etileno.

Devido à sua ação negativa, há vários estudos sobre os inibidores do etileno, como, por exemplo, o nitrato de prata (AgNO₃) e o ácido acetilsalicílico (AAS). O primeiro, que é um potente inibidor da ação desse gás, tem promovido a regeneração em *Triticum aestivum*, *Nicotiana glauca*, *Zea mays*, em alguns genótipos de *Brassica* e em *Daucus carota* (HATANAKA *et al.*, 1995). O nitrato de prata a 5 mg.L⁻¹,

também favoreceu a indução de embriões em anteras de *Capsicum annuum* L. (LUZ, 1995).

2.3 Cultura de tecidos em cafeeiro

Diversos trabalhos foram realizados utilizando cultura de tecidos para a propagação de variedades comerciais de café, regenerando plantas por meio de neofomação de gemas, de secção de entrenós verdes, de ramos ortotrópicos e por indução de embriogênese somática a partir de explantes foliares (DUBLIN, 1980.1981; HERMAN e HAAS 1975; PIERSON *et al.*, 1983; SONDAHL e SHARP, 1977).

Desde o primeiro trabalho publicado por Staritsky (1970), em que embriões somáticos foram obtidos de *C. canephora*, muitos trabalhos têm demonstrado o alto potencial embriogênico das espécies desse gênero, utilizando diferentes fontes de explantes como fragmentos de entrenós (Dublin, 1980), folhas (Herman e Haas, 1975; Söndahl e Sharp, 1977; Dublin, 1981; De Pena, 1983; Pierson *et al.*, 1983; Michaux-Ferriere *et al.*, 1989; Bieysse *et al.*, 1993; Noriega e Söndahl, 1993; Van Boxtel, 1994; Berthouly e Michaux-ferriere, 1996; Cordeiro, 1999; Santos, 2002), folhas cotiledonares (Söndahl *et al.* 1985), protoplastos (Schopke *et al.*, 1987; Acuña e De Pena, 1991) e suspensões celulares (SPIRAL e PETIARD, 1991; ETIENNE-BARRY *et al.*, 1999; RODRÍGUEZ *et al.*, 2000).

São várias as metodologias de cultura de tecidos empregadas nos programas de melhoramento do café, tais como a micropropagação, cujo objetivo é realizar a rápida multiplicação do material melhorado, a manutenção de bancos de germoplasma e a multiplicação de híbridos interespecíficos; cultura de embriões, para a recuperação de embriões provenientes de cruzamentos interespecíficos e para a antecipação da época de plantio; cultura de meristemas, para obtenção de plantas livres de vírus; embriogênese somática, por intermédio de explantes foliares para obtenção da planta inteira e cultura de anteras para a obtenção de plantas homozigotas (ANDRADE, 1998).

A embriogênese somática *in vitro* apresenta dois padrões básicos de desenvolvimento de embriões (SHARP *et al.*, 1980). A embriogênese somática direta, na qual os embriões somáticos originam-se diretamente de tecidos matrizes sem a formação de estádios intermediários de calos; e a embriogênese indireta, na qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação. Em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma

seqüência de desenvolvimento do zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA, TORRES e TEIXEIRA, 1999).

Söndahl e Sharp (1977) também distinguiram dois tipos de embriogênese somática. Eles obtiveram calos embriogênicos na forma direta com produção de até vinte embriões por explante e propuseram a nomenclatura de “calos embriogênicos de baixa freqüência” (LFSE). O outro tipo corresponde aos “calos embriogênicos de alta freqüência” (HFSE), que dão origem até 100 embriões por explante, associados a um tecido embriogênico friável.

A propagação clonal de cafeeiros, em grande escala, requer a indução desses calos friáveis embriogênicos para o estabelecimento de culturas líquidas e sua diferenciação embriogênica posterior. Esta indução é normalmente feita por meio de segmentos foliares em meio apropriado, em cujas extremidades os calos começam a ser formados. O calo embriogênico friável pode ser caracterizado como um conjunto de agregados celulares friáveis, contendo células pequenas e esféricas (15–20 mm de diâmetro), com citoplasma denso, com o nucléolo proeminente, um núcleo basofílico e de ciclo celular rápido (SÖNDAHL *et al.*, 1985). Outra característica geral do calo friável embriogênico é a semelhança conseqüente ou resultante utilizada durante as fases iniciais da cultura: alta razão auxina/citocinina durante a cultura primária (meio de indução), e baixa razão auxina/citocinina ou ausência de reguladores de crescimento durante a cultura secundária (meio de condicionamento) (SÖNDAHL e SHARP, 1977; DUBLIN, 1984; SÖNDAHL *et al.*, 1985; NORIEGA e SÖNDAHL, 1993; BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE, 1996).

Segundo Teixeira (2004), a capacidade regenerativa do calo embriogênico não se reduziu com a idade. Em alguns experimentos, observou-se uma certa correlação positiva entre o envelhecimento dos calos embriogênicos e sua capacidade de regeneração; esse fato também foi constatado por Marques (2005), quando a calosidade das anteras foi favorecida apenas aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Por outro lado, vários autores têm demonstrado que os calos embriogênicos em cafeeiros podem ser obtidos a partir do cultivo dos explantes em um único meio contendo apenas citocinina (DUBLIN, 1981; YASUDA *et al.*, 1985) ou com a associação de uma auxina e uma citocinina (DUBLIN, 1980; PIERSON *et al.*, 1983), sem haver modificações na composição do meio, consistindo o sistema unifásico de cultivo. A composição do meio também afeta a embriogênese somática, e os meios com alta concentração salina têm sido utilizados com sucesso em várias espécies de plantas.

Entretanto, vários trabalhos têm mostrado que tecidos embriogênicos de café são obtidos quando a concentração dos sais é reduzida à metade (BOXTEL, 1994), ou mesmo à quarta parte (YASUDA *et al.*, 1985).

Segundo Ayub e Gebieluca (2003), autores que trabalharam com explantes foliares do híbrido Sachimor e cv. IAPAR 59 de *Coffea arabica*, existe uma relação específica entre o genótipo e a citocinina para a indução da embriogênese somática, sendo as melhores concentrações para desenvolvimento de embriões de plântula de café 9,08 mM de TDZ e 5µM de BAP para o híbrido Sachimor e para a cv. IAPAR 59, respectivamente.

Dos fatores do meio de cultura que influenciam a taxa de indução de embriogênese somática em café, a isopenteniladenina (2-iP) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) têm um papel determinante no processo. Foram avaliadas as concentrações relativas de 2i-P e 2,4-D na indução de formação de calos embriogênicos do tipo HFSE (*High frequency somatic embryos*) e LFSE (*Low frequency somatic embryos*), em uma cultivar de *C. arábica* (Catuaí Vermelho) e um genótipo de *C. canephora* (E1571/99). A formação de calo embriogênico do tipo LFSE foi estimulada pelo aumento de 2-iP, enquanto o do tipo HFSE foi estimulado pelo aumento de 2,4-D em ambas as espécies. Em *C. canephora*, a formação de LFSE e HFSE chegou a 100% na presença de 2,5, 5,0 ou 10,0 mM de 2-iP e 5,0 mM 2,4-D, respectivamente. Em *C. arábica*, as percentagens de formação tanto de LFSE quanto de HFSE foram menores, chegando a 63,6 de LFSE em 15 mM de 2-iP e 90,6% de HFSE em 20 mM de 2,4-D (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

Quanto ao ácido acetilsalicílico (AAS), muitos estudos conduzidos em laboratório e em campo sugerem que ele é importante em muitas respostas biológicas de plantas, e o efeito na sua fisiologia é variável, promovendo alguns processos e inibindo outros (GUTIÉRREZ-CORONADO *et al.*, 1998). Essa substância está envolvida ainda na resposta a estresses bióticos e abióticos (De Block e De Brouwer, 2002) e na habilidade de indução de resistência a patógenos (SENARATNA *et al.*, 2000). O AAS, quando adicionado ao meio de cultivo, também pode promover a embriogênese (LUZ *et al.*, 1997).

Os calos embriogênicos podem também ser cultivados em meio líquido em frascos de *erlenmeyer* (Boxtel e Berthouly, 1996), em biorreatores de imersão contínua (NORIEGA e SONDAHL; 1993), e biorreatores de imersão temporária (TEISSON *et al.*, 1995).

Os biorreatores permitem o cultivo tanto de gemas nodais como de calos embriogênicos do café, o que constitui um dos meios mais promissores no sentido de aumentar a eficiência do processo, uma vez que, em meio líquido tanto a gema nodal quanto os calos embriogênicos podem ser cultivados em condições ótimas, desde que alguns parâmetros sejam ajustados, como tipo de explante, meio de cultivo, sobretudo quanto à qualidade e quantidade de reguladores de crescimento, ciclos de imersão/emersão, temperatura e luminosidade. Essa alternativa de cultivo permite melhor uniformidade dos embriões produzidos, uma vez que é possível induzir a sincronização do processo embriogênico (NORIEGA e SONDAHL; 1993). Da mesma forma, a diferenciação do embrião pode ser conduzida de maneira mais adequada, além de oferecer a oportunidade de encapsulamento do embrião diferenciado em larga escala. Essas vantagens comparativas irão contribuir para uma substancial redução de custo da muda final de café (TEIXEIRA *et al.*, 2004).

A embriogênese somática em café, assim como em outras culturas, depende do estado fisiológico do explante (STARITSKY, 1970) do tipo de folha, do tempo de subcultivo (MICHAUX-FERRIERE *et al.*, 1992), do estado fisiológico das plantas, das condições do ambiente e do genótipo. O efeito do genótipo na embriogênese somática tem sido amplamente verificado em várias espécies como trigo, melão, milho e citros. Nos gêneros e espécies herbáceas e também em plantas lenhosas, alguns genótipos são recalcitrantes e outros apresentam boa resposta embriogênica (MOLINA *et al.*, 1999).

A interação entre o genótipo e a época de coleta das folhas também tem sido significativa, no que tange as diferenças na resposta embriogênica de alguns genótipos; o que explica porque genótipos com alta capacidade embriogênica são menos afetados pela época de coleta dos explantes foliares do que aqueles com capacidade média ou baixa. A associação entre a resposta embriogênica e a genealogia da progênie sugere que, em café, esta característica pode estar sujeita a um forte controle genético. Existem diferenças na resposta embriogênica dos genótipos, dependendo do mês do ano no qual os explantes foliares foram coletados, mas essas diferenças não são relacionadas a causas climáticas (MOLINA *et al.*, 2002).

A liberação de compostos fenólicos ocorre devido ao dano causado nas células durante a excisão dos explantes. Algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas (LERCH, 1981). Essas quinonas são responsáveis pela coloração marrom das culturas, além de causarem a inibição do crescimento e morte dos explantes em grande número de espécies (MONACO *et al.*, 1977).

A oxidação fenólica tem sido controlada em diferentes espécies lenhosas pela redução da intensidade luminosa (MARKS e SIMPSON, 1990), associada com a substituição freqüente do meio de cultura e, dessa forma, as chances de se obter sucesso no estabelecimento e cultivo de explantes de espécies lenhosas são bastante elevadas (TEIXEIRA, 2001).

Segundo Andrade (1998), o cafeeiro, como outras espécies lenhosas, libera substâncias fenólicas e, por essa razão, deve-se adicionar ao meio de cultura substâncias antioxidantes, tais como o carvão ativado, polivinilpirrolidene (PVP), o ácido ascórbico e o ácido cítrico. Entretanto, o ácido ascórbico deve ser esterilizado por filtração, já que é uma substância termolábil (TEIXEIRA, 2001). Tais substâncias agem pela remoção do oxigênio de outras moléculas e também atuam por mecanismos alternativos. Os ácidos cítrico e ascórbico reagem com os metais presentes no meio de cultura, evitando que os mesmos fiquem disponíveis para se oxidarem (GEORGE, 1996). Provavelmente, o ácido ascórbico seria o mais efetivo na prevenção da oxidação polifenólica dentre os diversos antioxidantes testados (GUPTA, 1986).

Marques (2005) verificou que tempo de permanência no meio indutor proporciona um maior número de anteras oxidadas, com maior média aos 90 dias de inoculação para a cultivar Mundo Novo.

Outro problema que a cultura de tecidos enfrenta são as perdas que ocorrem, na maior parte, devido à contaminação biológica no cultivo *in vitro* (KOZAI, 1990; LEES, 1994). Na última década, diversos relatórios (FUJIWARA *ET AL.*, 1987; KOZAI, 1991; COURNAC *et al.*, 1992) indicam que, sob o controle apropriado do ambiente físico, explantes clorofilados cultivados *in vitro* podem se desenvolver fotoautotroficamente. A contaminação bacteriana ou fúngica do meio de cultura pode ser reduzida quando o açúcar, considerado como uma fonte principal do carboidrato para plantas *in vitro*, é eliminado (NGUYEN, 1999). KOZAI *et al.* (1988) e Infante *et al.* (1989) mostraram que as plântulas *in vitro* cresceram bem no meio sem açúcar, especialmente sob PPF elevado (fluxo fotosintético de fóton) e o CO₂ enriqueceu as condições. Por outro lado, os agentes gelificantes, tais como ágar e gomas gellan, foram citados como inibidores do crescimento *in vitro* da célula (SMITH e SPOMER, 1995).

Os antibióticos e fungicidas são ocasionalmente utilizados para o controle *in vitro* de patógenos. Pollock *et al.* (1983) demonstraram que o uso de certos antibióticos é eficiente no controle de bactérias. Entretanto, o uso desses produtos e de fungicidas

para o controle *in vitro* de bactérias contaminantes tem sido limitado, devido à grande toxicidade para as células de plantas (ARRUDA, 2000).

2.4 Cultura de anteras / obtenção de haplóides

A androgênese vegetal *in vitro* foi descoberta casualmente em *Datura innoxia* na década de 1960, durante estudos da fisiologia da meiose, nos quais anteras eram cultivadas *in vitro*. Os grãos de pólen apresentaram um desvio da rota gametofítica e originaram plantas haplóides (GUHA E MAHESHWARI, 1964, 1966). A partir da descoberta destes autores, foram conduzidos então, cultivos experimentais para obtenção de plantas androgênicas de inúmeras espécies vegetais (MAHESHWARI *et al.*, 1982; MORAES-FERNANDES *et al.*, 1999). Nas condições de cultivo propostas, algumas espécies mostraram-se mais responsivas e seu estudo permitiu esclarecimentos quanto aos fatores que alteram a rota de desenvolvimento gametofítico, ao estágio de desenvolvimento responsivo do micrósporo ou grão de pólen, aos padrões iniciais da divisão celular, as etapas que envolvem a transição gametófito-esporófito e as condições de cultivo que aceleram a regeneração de plantas androgênicas (RODRIGUES, 2004).

A cultura de anteras tem como vantagens a capacidade de produzir um grande número de embriões num espaço limitado; sendo estes individualizados e se desenvolvem diretamente em plantas; possui grande aplicabilidade como método de propagação *in vitro* para espécie utilizada em plantios extensos, atendendo ao requisito de produção rápida de milhões de propágulos a um custo competitivo; uma vez que a cultura de ovários nos permite a obtenção de apenas um embrião por vez, já que se trata de apenas um óvulo (TORRES *et al.*, 1999).

Pesquisa em dimorfismo do pólen foi associada ao estudo da androgênese e vários trabalhos registraram que micrósporos atípicos (de menor tamanho, com fina camada de exina e contendo citoplasma pobre em ribossomos e com mitocôndrias condensadas), possivelmente resultantes de alterações meióticas, teriam maior predisposição para tomar a rota de desenvolvimento esporofítico quando estabelecidos *in vitro* (HORNER e STREET, 1978; HEBERLE-BORS, 1985; KALTCHUK-SANTOS *et al.*, 1993).

Porém, foi demonstrado que tanto micrósporos quanto grãos de pólen típicos originam esporófitos androgênicos *in vitro* (BINAROVA *et al.*, 1997). No micrósporo, o núcleo pode sofrer sucessivas divisões mitóticas simétricas, precedidas ou não pela autoduplicação cromossômica, originando um grão de pólen multinucleado ou

multicelular. No grão de pólen, a célula vegetativa, a célula generativa ou ambas podem sofrer divisões mitóticas simétricas e originar um grão de pólen multinucleado ou multicelular (SUNDERLAND e DUNWELL, 1974; PRETOVÁ *et al.*, 1993; GÓRALSKI *et al.*, 1999).

A continuidade do desenvolvimento androgênico requer a síntese das paredes das novas células do grão de pólen multinucleado (IDZIKOWSKA e MLODZIANOWSKI, 1979). À medida que o número de células aumenta, ocorre o rompimento da esporoderme (RAO e DEEPESH, 1987; HU e KASHA, 1999) e a liberação de uma estrutura multicelular com variados graus de organização entre o padrão de desenvolvimento zigótico e calogênico (MAHESHWARI *et al.*, 1982; GÓRALSKI *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2000). Normalmente, esse conjunto de células apresenta o padrão embriogênico de desenvolvimento, sem uma fase intermediária de calos. Nos casos em que não apresenta a organização de um embrião, é chamado de microcalo (VAN GEYT *et al.*, 1985; PRETOVÁ *et al.*, 1993) ou proembrião (GUO E PULLI, 2000; SILVA *et al.*, 2000).

Para o desenvolvimento normal do grão de pólen, são necessários dois eventos sequenciais que integram a ontogênese da antera: a microsporogênese (ou androsporogênese) e a microgametogênese (ou androgametogênese). A microsporogênese transcorre desde a meiose até a liberação do micrósporo (ou andrósporo) haplóide da tétrade. A microgametogênese é sinalizada pela formação de um grande vacúolo central na célula do micrósporo, resultante da coalescência de inúmeros pequenos vacúolos, o que força a polarização do núcleo haplóide: o citoplasma e o núcleo são comprimidos contra a parede do micrósporo. A célula do micrósporo sofre uma mitose assimétrica e origina duas células diferentes, separadas por uma parede pectocelulósica delgada: a célula vegetativa (sifonogênica) e a célula generativa (gametogênica) periférica (MARIATH *et al.*, 2003). O padrão assimétrico dessa primeira divisão mitótica é essencial para a funcionalidade do gametófito (TANAKA, 1993).

Para desviar a rota normal de desenvolvimento dos micrósporos, levando-as a formar células vegetativas ao invés de micrósporos (George e Shrrington, 1984), é preciso cultivar anteras imaturas em meio de cultura apropriado e sob condições ambientais adequadas. A reversão do sistema de desenvolvimento gametofítico é bloqueada e os genes responsáveis pelo desenvolvimento esporofítico são ativados (SUNDERLAND E DUNWELL, 1974). Portanto, a célula gametofítica masculina pode

alterar o seu desenvolvimento normal, dando origem a embriões somáticos com potencial para regenerar plantas homozigotas (VASIL *et al.*, 1979).

Vários trabalhos indicam que a melhor fase de desenvolvimento da antera é aquela em que o micrósporo foi recém-liberado da tétrade meiótica até, no máximo, seu estágio binucleado, pois nesta fase o micrósporo ainda possui características esporofíticas que permitem a diferenciação do grão de pólen em embrião (ANDRADE, 1998).

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 e 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) verificaram, em uma população segregante F2 de *C. arabica*, que o estágio uninucleado do micrósporo correspondia àquele em que os botões florais apresentavam tamanho de 5,00 a 5,50 mm.

Silva *et al.* (2004), trabalhando com *Coffea arabica* L. cvs. Mundo novo, Catuaí Vermelho 44 e 99, observaram que existe um sincronismo no desenvolvimento das anteras e do botão floral, e estes estão relacionados com os estádios de desenvolvimento dos micrósporos, ou seja, o diâmetro dos micrósporos evolui de acordo com o crescimento das anteras e do botão floral. O estágio ideal dos micrósporos que devem ser utilizados na cultura de anteras *in vitro* corresponde à fase onde estes ainda estejam de forma uninucleada central, e tais foram encontrados em botões florais que variam de 4,5 a 6,0 mm de comprimento.

Silva *et al.* (2000), com o objetivo de desenvolver a androgênese, cultivaram anteras de cevada (*Hordeum vulgare* L.), de modo que houvesse uma reversão no desenvolvimento dos micrósporos para um modo esporofítico de desenvolvimento. Uma primeira mitose simétrica, seguida de uma seqüência de mitoses, levou à formação de micrósporos multinucleados. A regeneração de plantas ocorreu tanto por embriogênese direta quanto pela formação de calos, com posterior diferenciação via embriogênese indireta ou organogênese. Os embriões e calos androgenéticos mostraram grande potencial para regeneração, e plantas verdes e albinas foram regeneradas no mesmo meio utilizado para indução, sendo a transferência para outro meio necessária somente para dar prosseguimento ao desenvolvimento e ao enraizamento das plântulas.

A possibilidade de induzir pró-embriões e regenerar plantas em um único passo, sem necessidade de transferência para um meio específico de regeneração, aumenta a rapidez e a eficiência da técnica de cultura de anteras.

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.

Quando as condições de cultivo são favoráveis, há regeneração de plantas completas haplóides ou duplo-haplóides. A formação de plantas duplo-haplóides requer uma duplicação do material genético celular, que pode ser espontânea e anterior às primeiras divisões celulares (HENRY, 1998) ou induzida por agentes antimitóticos, como a colchicina, ao final do processo (MORAES-FERNANDES *et al.*, 1999). Entretanto, o estudo de mais de duzentas espécies de plantas mostrou que variações no número cromossômico, incluindo diploidia, poliploidia e aneuploidia, são comuns entre plantas androgênicas obtidas de um mesmo cultivo (HENRY, 1998).

A cultura de anteras permite a regeneração da planta haplóide diretamente dos micrósporos, assegurando a origem gametofítica pura e evitando a contaminação de células somáticas que proliferam. A indução da resposta embriogênica do pólen foi conseguida por tratamentos diferentes tais como choque da temperatura, meios modificados, choque osmótico ou agentes do rompimento do microtúbulo. Do mesmo modo, demonstrou-se que a colchicina poderia promover o embriogênese em micrósporos de *Brassica napus*, aparentemente com o rompimento dos componentes do citoesqueleto, ou antes, da primeira mitose do pólen (ZHAO *et al.*, 1989).

Uma série de estudos sobre o efeito do agente antimitótico colchicina na cultura de anteras e de micrósporos de *Brassica napus* mostrou que esta substância age como um promotor da androgênese; tratamentos com colchicina resultaram num aumento significativo no número de divisões simétricas, bem como, no número de embriões formados (ZAKI e DICKINSON, 1991). Resultados semelhantes foram também obtidos por IQBAL *et al.* (1994) e ZHAO *et al.* (1996) no estudo de *Brassica*.

Herrera *et al.* (2002), na verificação de um protocolo eficiente na indução de androgênese em *C. arabica* cv. Caturra utilizando a colchicina em diferentes tempos de exposição dos micrósporos puderam verificar que a melhor resposta androgênica foi encontrada quando os micrósporos permaneceram 48 horas na presença da colchicina, e

análises de fluxo citométricas e morfológicas, revelaram que 95% de plantas regeneradas eram os dihaploides ($2n=2x=22$).

Utilizando-se a cultura de anteras, o número de plantas necessário para a obtenção de uma nova cultivar é sensivelmente menor, ou seja, é igual à raiz quadrada do número usado em programas convencionais de melhoramento. No caso de *Coffea arabica* $2n = 4x = 44$, que é uma planta tetraplóide, a cultura de anteras propiciará a obtenção de plantas di-haplóides com características similares às das plantas haplóides (PASQUAL *et al.*, 2002).

Esses autores, com o objetivo de estabelecer uma metodologia eficiente para regeneração de plantas di-haplóides por meio da cultura de anteras de *Coffea arabica* L., coletaram botões florais com 4,5 a 5,5 cm, correspondendo a anteras com micrósporos na fase uninucleada, que foram desinfestados e inoculados em meio de cultura com diferentes concentrações de reguladores de crescimento. Foi observada a formação de calos, mas somente em alguns notou-se formação de embrióides, que após transferência para meio de regeneração, poderão dar origem a plântulas.

Metwally *et al.* (1998) obtiveram plantas haplóides por meio da cultura de anteras de *Cucurbita pepo*, em meios suplementados com 150 g L⁻¹ de sacarose e 5 mgL⁻¹ de 2,4-D. As raízes de vinte plântulas foram examinadas citologicamente e os resultados mostraram que foram obtidas dez plantas diplóides ($2n = 2x = 40$) e dez haplóides ($2n = x = 20$).

Em um outro trabalho, com a finalidade de induzir a formação de calos e embriões a partir de anteras de *Coffea arabica* L. var. Garnica, Ascanio e Arcia, (1994), submeteram botões florais, com grãos de pólen uninucleados, mitóticos e binucleados, a um choque frio e suas anteras foram removidas assepticamente e cultivadas em um meio MS suplementado com reguladores de crescimento. Após duas semanas observou-se a formação de calos brancos, friáveis, os quais continham o complemento di-haplóide do cromossomo ($2X=22$) nas anteras com grãos de pólen uninucleados.

O primeiro trabalho com sucesso utilizando plantas haplóides, numa espécie importante na alimentação mundial, foi realizado com arroz (*Oryza sativa*), por Niizeki e Oono (1968), citados por Vasil *et al.* (1979). Esse trabalho despertou grande interesse nos pesquisadores chineses que, usando essa técnica, produziram uma série de cultivares que são produzidas 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, essa técnica permite o estudo de mutações recessivas, visto que indivíduos haplóides, por serem constituídos por apenas um complemento cromossômico, não apresentam problemas de dominância e recessividade (FERNANDES, 1987).

O melhoramento de espécies diplóides, utilizando haplóides, é o melhoramento do genoma por excelência, entretanto, a possibilidade do melhoramento, via haplóide, de uma dada espécie diplóide depende, antes de tudo, da disponibilidade de métodos para produzir e isolar haplóides em quantidade suficiente (RÊGO, 2004).

A maior eficiência de seleção é a outra vantagem do melhoramento com uso de haplóides, especialmente quando a variação de dominância é significativa. No melhoramento convencional, linhagens de gerações iniciais mostram diferenças fenotípicas para as quais os efeitos aditivos e de dominância contribuem. Por outro lado, linhagens di-haplóides têm apenas variância aditiva, e conseqüentemente, alta herdabilidade no sentido restrito. Portanto, menores quantidades de indivíduos serão necessários para a seleção dos recombinantes desejados. Outra possibilidade de utilização das plantas haplóides é no estudo de herança, através de progênies homozigotas obtidas por androgênese (HENDY *et al.*, 1985).

A luminosidade e a temperatura também são fatores que influenciam na cultura de anteras. 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).

Com vistas à indução de calos em anteras de cafeeiro, explantes florais do arábica cultivar 'Rubi' e de uma população segregante F₂, foram submetidos a diferentes concentrações de 2,4 D combinadas com cinetina e adicionadas ao meio de cultura "IC". A porcentagem de indução de calos e peso da matéria fresca de calos da população segregante teve um valor aproximado de 32,18%, sendo que a combinação entre 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 8 mg.L⁻¹ de cinetina promoveu a maior indução de calos. Já para a cultivar 'Rubi', a porcentagem de indução de calos e peso da matéria fresca de calos obteve um valor aproximado de 40%. Baseado nos dados, os autores concluíram que, independente do material genético, é necessária uma auxina juntamente com uma citocinina, e ainda que ambos os materiais respondam de forma diferente às concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D e cinetina na indução de calos em anteras (ARAÚJO *et al.*, 2004).

O estado fisiológico da planta doadora também influencia na resposta do potencial esporofítico dos micrósporos, 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 e JOHANSSON, 1993).

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

Segundo Silva (2003), anteras de *Coffea arabica* L. das cultivares Catuaí Vermelho 99 e 44 apresentam melhores resultados quanto ao intumescimento, formação de calos e diâmetro quando há a interação entre a auxina 2,4-D e a citocinina BAP, associando a incubação no escuro.

No entanto, Figueira (2005) trabalhando com anteras da cultivar Catuaí Vermelho 44, não conseguiu regeneração dos pró-embriões, nas anteras das cultivares estudadas, utilizando, para esse fim, o nitrato de prata (AgNO₃) na concentração de 5,0 MG.L⁻¹ e o ácido acetilsalicílico (AAS) nas concentrações de 0,0; 8,0; 16,0 e 32,0 MG.L⁻¹ bem como determinou que a associação de 2,4-D e BAP nas concentrações utilizadas, também não foram eficientes. Já Marques (2005), estudando o efeito dos reguladores de crescimento 2,4-D, TDZ, Cinetina, BAP, AIB, GA₃ e ANA na indução de calos em anteras de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44, teve como melhor resposta na formação de calos as combinações de 2 mgL⁻¹ 2,4-D + 2 mgL⁻¹ BAP, 2 mgL⁻¹ Cinetina + 1 mgL⁻¹ 2,4-D, 2 mgL⁻¹ 2,4-D + 0,5 mgL⁻¹ TDZ e 2 MG/L 2,4-D, quanto a resposta à indução de pró-embriões as melhores combinações

foram: 2 mgL⁻¹ 2,4-D + 2 mgL⁻¹ BAP, 2 mgL⁻¹ Cinetina + 1 mgL⁻¹ 2,4-D , 2 mgL⁻¹ 2,4-D + 0,5 mgL⁻¹ TDZ.

Baseadas nessas informações, as hipóteses científicas do presente trabalho são de que anteras e calos de *Coffea arabica* L., submetidos a diferentes combinações de reguladores de crescimento, induzem a formação de calos e podem regenerar plântulas di-haplóides.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedimentos

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia-MG no período de agosto de 2004 a dezembro de 2006. Foram utilizados três cultivares de *Coffea arabica* L.; Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44 e Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-99 e Mundo novo LCP-379¹⁹, pertencentes à área experimental do Campus Umuarama dessa Universidade.

Os botões florais foram coletados entre 8 e 9 horas da manhã, armazenados em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido em água destilada, e colocados dentro de uma caixa de isopor para evitar a dessecação; logo em seguida foram levados ao laboratório. O comprimento dos botões florais foi medido com o auxílio de um paquímetro e utilizaram-se botões florais entre 4,5 a 6,0 mm de comprimento em todos os experimentos.

Os botões florais foram envoltos em gaze previamente autoclavada e desinfetados em solução de álcool 70%, por alguns segundos, e por quinze minutos, em solução de hipoclorito de sódio 1%, sob agitação. Em câmara de fluxo laminar, foram lavados três vezes em água destilada e autoclavada. As anteras foram retiradas dos botões florais mediante incisão em um dos seus lados com o auxílio de estereomicroscópio, pinça e bisturi, sendo os últimos flambados a cada novo botão, e imersas por um segundo, antes de serem inoculadas, em solução de ácido ascórbico na concentração de 600 mg.L⁻¹, hipoclorito de sódio à 0,2% e em água destilada e autoclavada, respectivamente.

Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,9 e foram esterilizados em autoclave vertical à temperatura de 121° C, sob a pressão de 1 atm, por 20 minutos. Após a inoculação dos explantes, cada tratamento foi avaliado considerando o número de anteras oxidadas, contaminadas, intumescidas, formação de calos (calosidade), calos friáveis e pró-embrióides, sendo que no caso do número de calos formados, a contagem real do número de calos produzidos foi feita no explante onde mostrava calos unificados, sendo considerado como calo único.

3.2 Ácido acetilsalicílico na indução de calos e pró-embriões em anteras de Cvs de *C. arabica*

As cultivares utilizadas neste experimento foram Mundo Novo LCP-379⁻¹⁹ e Catuaí Vermelho H2077-2-5-44. Após a desinfestação, as anteras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com pH ajustado em 5,9, suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e AAS nas concentrações de 0,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0 mg.L⁻¹, respectivamente, nos tratamentos de 1 a 5. O AAS foi obtido por meio de solução de aspirina, contendo 325 mg de AAS em 200 ml de água. Foram realizadas avaliações de anteras intumescidas, oxidadas e com calosidade aos 30, 60 e 90 dias e aos 120 dias uma última avaliação de calos com presença de pró-embriões. O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições, em parcelas constituídas de três tubos, com cinco explantes por tubo. Os tubos de ensaio foram levados à câmara de crescimento, envolvidos por um saco plástico preto, uma vez que o experimento foi realizado no escuro. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística, com a utilização do programa SANEST, aplicação do teste de F a 5% de probabilidade, sendo transformados em $\sqrt{x + 1/2}$. As características qualitativas foram analisadas pelo teste de Tukey a 5% e as características quantitativas por regressão polinomial.

3.3 BAP e 2,4-D na diferenciação de calos de *C. arabica*

Os calos obtidos da cv. Catuaí Vermelho H2077-2-5-44 do experimento anterior foram subcultivados para o meio de cultura sólido MS, acrescido de diferentes concentrações de BAP (0,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹) e 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e foram transferidos para sala de crescimento sob condições de obscuridade, com temperatura de 26°C. As avaliações foram realizadas aos 90 dias após a instalação do experimento, analisando as seguintes características: número de calos embriogênicos (CE), número de calos friáveis (CF), e diâmetro de calos (cm).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial de 4x4, com seis repetições, sendo cada tubo de ensaio que continha um calo considerado uma parcela. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística, com a utilização dos programas PROPHET, em que os resíduos não apresentaram distribuição normal e as variâncias não foram homogêneas, e transformados em

$\sqrt{x + 1/2}$; aplicação do teste Qui-Quadrado, a 5% de probabilidade e SISVAR para o teste de Tukey na comparação das médias com relação aos tratamentos.

3.4 Nitrato de prata e etileno na indução de calos e regeneração de embriões em anteras de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho 99

Primeira etapa

Botões florais da cultivar de cafeeira Catuaí Vermelho 99 foram coletados e desinfestados. As anteras foram retiradas, tomando-se o cuidado de não feri-las, e colocadas em placas de petri esterilizadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D na ausência e presença de 5 mg.L⁻¹ de nitrato de prata. As danificadas foram descartadas. Após a inoculação foi colocada no centro de cada placa uma gota de ETHREL[®] com auxílio de uma seringa previamente esterilizada, e então as placas foram lacradas e colocadas no escuro por diferentes períodos (testemunha, 2, 4, 6, e 8 dias). Logo após cada período, as placas foram abertas em câmara de fluxo laminar para que o ETHREL[®] fosse completamente evaporado e em seguida lacradas novamente e colocadas no escuro até oito dias; logo após, foram levadas para a sala de crescimento com temperatura de 26°C com 16 horas de luz, onde permaneceram até 12° dia após a inoculação.

Segunda etapa

Ao final dos doze dias, as anteras foram transferidas para um meio de regeneração intitulado de meio R pelos autores (Sibi, Dumas de Vaultx e Chambonnet; 1979), acrescido de 0,108 mg.L⁻¹ de cinetina, permanecendo nele por 30 dias. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), num fatorial de 5x2, sendo o primeiro fator dias na presença com etileno (2, 4, 6, 8 dias e testemunha) e segundo, ausência e presença de 5 mg.L⁻¹ de AgNO₃, num total de dez tratamentos, com quatro repetições, sendo cada placa de Petri uma parcela contendo 25 anteras por placa. Nesta primeira etapa após 12 dias da inoculação, avaliou-se a percentagem de anteras oxidadas, contaminadas, intumescidas e com calosidades, e aos 30 dias pós-inoculação no meio R (segunda etapa) fez-se outra avaliação considerando-se os mesmos caracteres e o número de pró-embriões. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização dos programas PROPHET, em que os resíduos não apresentaram distribuição normal e as variâncias não foram homogêneas e transformados em

$\sqrt{x + 1/2}$; e SISVAR, com aplicação do teste de F, a 5% de probabilidade e teste de Tukey para comparação das médias e regressão polinomial para estudo do etileno nos diferentes dias avaliados.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ácido acetilsalicílico na indução de calos e pró-embrióides em anteras de cvs. de *C. arabica*

Aos 30, 60 e 90 dias do estabelecimento dos explantes *in vitro*, avaliou-se a oxidação, o intumescimento e a calosidade das anteras. Aos 120, dias foi avaliada a presença de pró-embrióides nos calos que restaram das três primeiras avaliações.

O resumo do quadro de análise de variância das características avaliadas aos 30, 60 e 90 dias está apresentado na Tabela 1.

TABELA 1 - Resumo das análises de variância do número médio de anteras oxidadas (OXID.), intumescidas (INTUM.) e com calosidade (CALOS.), dos cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho 44, inoculadas em meio de cultura "MS" sob ação de 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS) aos 30, 60 e 90 dias. UFU/Uberlândia-MG, 2007. AVA = Avaliações 30,60 e 90 dias.

Causas Da Variação	Grau de Liberdade	QUADRADOS MÉDIOS		
		OXID.	INTUM.	CALOS
CULTIVAR	2	1,341*	0,687*	0,325 ^{ns}
AVALIAÇÃO	1	0,394*	1,557*	0,086 ^{ns}
AAS	4	0,060 ^{ns}	0,282*	0,800 ^{ns}
AVA*CUL	2	0,161*	0,271*	0,030 ^{ns}
AVA*AAS	8	0,066 ^{ns}	0,023*	0,041 ^{ns}

A análise de variância dos dados obtidos para a oxidação registrou que a oxidação dos explantes foi significativamente influenciada pelo tempo de permanência no meio de cultura.

Comparando as cultivares, observou-se que, aos 90 dias de estabelecimento *in vitro*, as anteras de ambas obtiveram maior oxidação e, com a diminuição do tempo de permanência no meio, o número de anteras oxidadas é menor. O mesmo comportamento foi observado dentro das cvs., isto sugere que o tempo de estabelecimento no meio indutor influenciou a oxidação das anteras de café (TABELA 2).

TABELA 2 - Média de anteras oxidadas dos cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho 44 em função das avaliações realizadas aos 30, 60 e 90 dias. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

AVALIAÇÕES (DIAS)	MÉDIAS	
	MUNDO NOVO	INTUMESCIMENTO
30	2,94 cD	3,91 bC
60	4,27 bB	4,76 aA
90	4,95 aA	4,91 aA

Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Figueira (2005), trabalhando com as mesmas cultivares, observou que, aos 60 dias de avaliação, todas as anteras mostraram-se oxidadas, mesmo tendo permanecido no escuro, confirmando a hipótese de que quanto maior o tempo de permanência no meio, maior a oxidação dos explantes.

Giri *et al.* (1993), trabalhando com *Aconitum heterophyllum* Wall, afirmaram que a presença de 2,4 – D no meio de cultura está associado a maior oxidação do tecido vegetal. Experimentos de Figueira *et al.* (2002) mostraram que, mesmo em doses menores de 2,4 – D em subcultivo de anteras, ocorreu 100% de oxidação das amostras. Em outro trabalho com a cultivar Catuaí Vermelho 44, Silva (2003) também observou um alto índice de oxidação, que atingiu o valor de 93%, entretanto utilizou apenas os reguladores de crescimento cinetina, TDZ e BAP.

Londe (2005), trabalhando com cotilédones de cajuí (*Anacardium humile st. Hill*) verificou, aos 30 dias, que a oxidação dos explantes foi maior quando se adicionou 5,0 mgL⁻¹ de BAP em meio isento de 2,4 – D e que, para as concentrações de 1,0 mgL⁻¹ de 2,4 – D e 1,0 mgL⁻¹ de BAP, a oxidação foi menor. Aos 45 dias, verificou aumento da média de oxidação, sendo que a concentração que proporcionou maior oxidação foi a de 1,0 mgL⁻¹ de 2,4 – D sem citocinina no meio de cultura. Contudo, a concentração de 1,0 mgL⁻¹ de BAP em combinação com 1,0 mgL⁻¹ de 2,4 – D proporcionou a menor taxa de oxidação de explantes.

A análise de variância (TABELA 1) dos dados obtidos para o intumescimento das anteras registrou que o número de anteras intumescidas foi significativamente influenciado tanto pelos dias de avaliação quanto pela combinação de 2,4 – D e as diferentes doses de AAS.

A cultivar Mundo Novo foi a que apresentou os maiores índices de intumescimento de anteras e o maior valor foi obtido aos 90 dias não diferiu estatisticamente da avaliação aos 30 dias e o menor valor de anteras intumescidas foi obtido aos 60 dias de avaliação. Já a cultivar Catuaí Vermelho 44 apresentou maior média de anteras intumescidas aos 30 dias e a menor aos 60 dias de avaliação, apesar de não diferir estatisticamente da média de anteras intumescidas aos 90 dias. Mundo Novo foi o que obteve o maior número médio de anteras intumescidas, quando comparado ao Catuaí Vermelho 44 (TABELA 3).

TABELA 3 - Média de anteras intumescidas dos cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho 44 em função das avaliações realizadas aos 30, 60 e 90 dias. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

AVALIAÇÕES (DIAS)	MÉDIAS	
	MUNDO NOVO	INTUMESCIMENTO
30	4,31 aB	3,73 aC
60	3,35 bD	2,86 bE
90	4,95 aA	4,91 aD

Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Torres *et al.*(1998) citam que o regulador de crescimento 2,4 – D apresenta caráter indutor para o intumescimento e calosidade. No entanto, LONDE (2005) verificou que, em explantes de cajuí, o tratamento responsivo ao intumescimento do cotilédone foi a ausência de 2,4 – D e 10,0 mgL⁻¹ de BAP. Os mesmos autores demonstram que o intumescimento do cotilédone pode estar relacionado com a sua manutenção inicial no escuro.

Silva (2003), trabalhando com a cultivar Catuaí Vermelho 44, observou um maior índice de intumescimento, quando os explantes florais foram incubados no escuro.

De acordo com a FIGURA 1, observa-se que, à medida que aumentaram as concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS), houve uma diminuição em média de 0,023 anteras intumescidas para a cultivar Catuaí Vermelho 44.

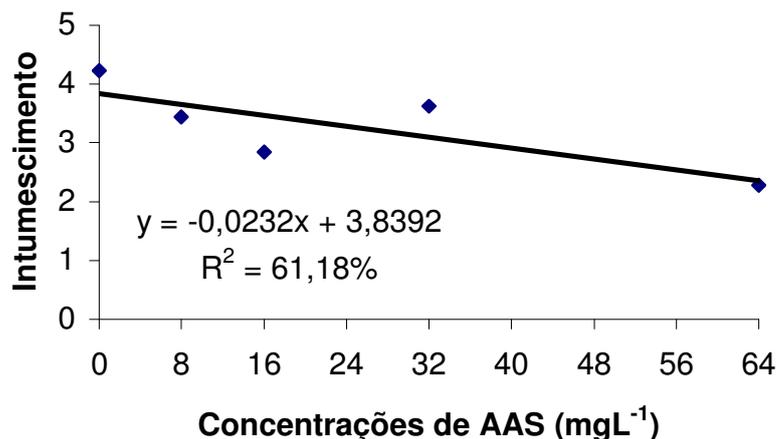


FIGURA 1 - Número médio de anteras intumescidas da cultivar Catuaí Vermelho 44, em função das diferentes concentrações de AAS. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Resultados análogos foram obtidos por Figueira (2005) onde, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, o número médio de anteras intumescidas diminuiu à medida que aumentaram as doses de AAS e aos 60 dias houve interação entre as doses de AgNO₃ e AAS, sendo que na ausência de AgNO₃, o número médio de anteras intumescidas também decresceu com o aumento das doses de AAS.

A análise de variância para formação de calos registrou que a indução de calos foi significativamente influenciada pela combinação de 2,4 - D com as diferentes concentrações de AAS.

A presença de ácido acetilsalicílico (AAS) nas concentrações utilizadas se mostrou prejudicial na formação de calosidade, uma vez que com o aumento das concentrações de AAS no meio de cultura, observou-se um decréscimo em média, de 0,04 calos formados em anteras da cultivar Catuaí Vermelho 44 (FIGURAS 2 e 3).

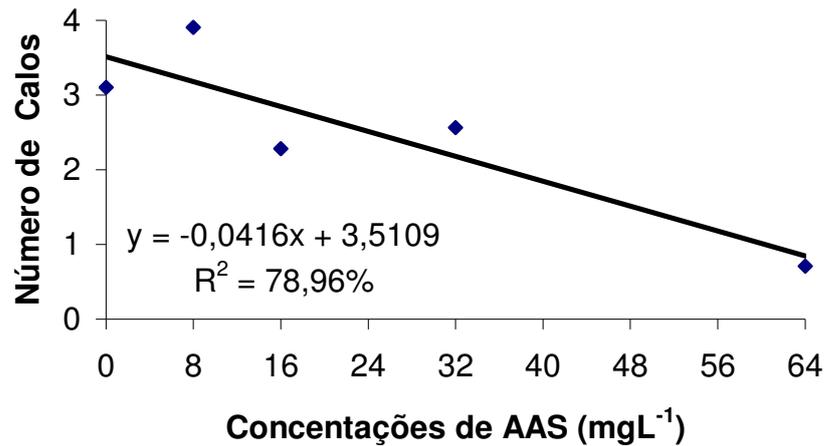


FIGURA 2 - Número médio de anteras com calosidade da cultivar Catuaí Vermelho 44, em função das diferentes concentrações de AAS. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

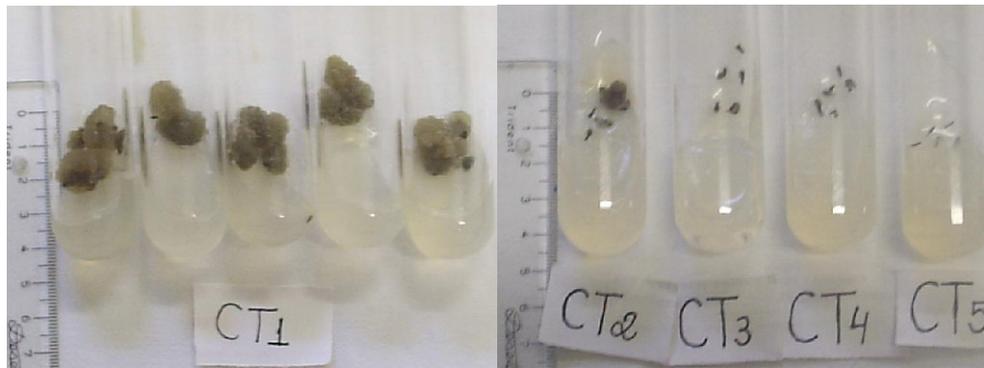


FIGURA 3 - Calos formados na cultura de anteras de *Coffea arabica* para a cultivar Catuaí Vermelho 44 aos 90 dias de avaliação.

Para a cultivar Mundo Novo, os dados não foram significativos; as médias ajustadas pelas equações de regressão obtidas na análise de variância estão dispostas na TABELA 4. O maior número de anteras com calos foi observado quando da ausência de AAS no meio de cultura e o menor valor foi obtido quando da presença de 64,0 mg.L⁻¹ de AAS (FIGURA 4).

TABELA 4: Número médio de anteras com calosidade da cultivar Mundo Novo, em função das diferentes concentrações de AAS. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

Níveis de AAS (mg.L ⁻¹)	Anteras com calosidade
0,0	1,749
8,0	1,735
16,0	1,720
32,0	1,691
64,0	1,632



FIGURA 4: Calos formados na cultura de anteras de *Coffea arabica* para a cultivar Mundo Novo aos 90 dias de avaliação.

Figueira (2005), analisando o efeito do subcultivo de calos em Catuaí Vermelho 44, em relação aos níveis de AgNO₃ e AAS, não obteve resultados significativos. Entretanto, quando avaliou a influência do 2,4 – D, AgNO₃ e AAS na indução de calosidade em anteras de Mundo Novo e Catuaí Vermelho 44, concluiu que o número médio de anteras com calos foi maior na cultivar Mundo Novo, na ausência de AgNO₃. Em relação às doses de AAS, obteve resultados semelhantes aos do presente trabalho, uma vez que houve decréscimo do número de calos formados com o aumento das doses de AAS. Em contrapartida, de acordo com LUZ (1995), a melhor porcentagem de anteras de pimentão com embriões ocorreu quando estavam na presença de AAS na concentração de 88,9 mM. Resultado semelhante é citado por HERMAN (1975): segundo o autor, o ASS estimula a embriogênese em suspensão de células de cenoura, numa faixa de concentração de 10 à 100 mM, sem causar nenhum prejuízo ao crescimento e sobrevivência das células.

A indução de formação de calosidade pode ter sido influenciada pela ausência de luz, fato também já proposto por Jaramillo e Summer (1991) e Nascimento *et al.*, (2003)

que trabalhando com indução de calos em carqueja obtiveram uma maior formação de calos em anteras mantidas no escuro. Ascanio e Arcia (1994) citam que as anteras devem ser mantidas no escuro para que ocorra o desenvolvimento de calosidade, e após sua formação, para o desenvolvimento do embrião, os calos devem ser mantidos no claro.

Já os autores Borges *et al.* (2005), estudando o efeito de diferentes auxinas na morfogênese de *Musa* sp. verificou, que aos 40 dias de incubação no escuro o 2,4-D na concentração de 5,0 mM induziu a formação de calos, não havendo o desenvolvimento organizado dos tecidos.

A avaliação de presença de pró-embriões foi realizada aos 120 dias, nos tubos que restaram ao final das três avaliações (30, 60 e 90 dias) e que apresentavam calos friáveis. Dessa forma, os dados obtidos para essa variável não foram suficientes para gerar um quadro de análise de variância.

A formação de pró-embriões foi influenciada pela combinação de 2,4 – D com as diferentes concentrações de AAS no meio de cultura, uma vez que à medida que aumentam as concentrações de AAS, a presença de pró-embriões nos calos diminui, tanto para a cultivar Mundo Novo quanto para Catuaí Vermelho 44 (TABELA 5).

TABELA 5: Número de anteras com pró-embriões nos cultivares Catuaí Vermelho 44 e Mundo Novo, em função dos tratamentos avaliados. UFU/Uberlândia-MG, 2005.

AAS (mg.L ⁻¹)	Pró-embriões (nº tubos)	
	Catuaí	Mundo Novo
0	22 (9)	19 (11)
8	5 (12)	3 (10)
16	2 (8)	8 (11)
32	3 (12)	0 (10)
64	0 (10)	3 (11)

Trabalhando com os mesmos cultivares, Figueira (2005) verificou que 19,8 % das anteras que formaram calosidade apresentavam pró-embriões, sendo 21,5 % pertencentes aa cultivar Mundo Novo e 17,6 % ao Catuaí Vermelho 44. A mesma autora observou que o número médio de anteras com pró-embriões diminui com o aumento das concentrações de AAS até o valor de 42,0 mg.L⁻¹. A partir desse valor o número médio de anteras com pró-embriões tendeu a aumentar.

Luz *et al.*, (1997) obtiveram resultados divergentes aos aqui encontrados, quando avaliaram a influência de AAS na androgênese de pimentão. As anteras foram inoculadas em meio C suplementado com AAS em concentrações idênticas ao do presente estudo e mantidas no escuro. Verificaram que a concentração de 16,0 mg.L⁻¹ de AAS induziu melhor a embriogênese, e que concentrações maiores a necrose das anteras eram induzidas.

4.2- - BAP e 2,4-D na diferenciação de calos de *C. arabica*

O teste de significância estatística do qui-quadrado realizado para calos friáveis da cv. Catuaí Vermelho 44 (TABELA 6) mostrou que aos 90 dias de cultivo os tratamentos T3 (ausência de BAP + 2,0 mg.L⁻¹ 2,4-D); T7 (2,0 mg.L⁻¹ BAP + 2,0 mg.L⁻¹ 2,4-D) e T14 (8,0 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ 2,4-D), foram os que apresentaram um número maior de calos friáveis, não diferindo estatisticamente de T4, T5, T6, T11, T15 e T16. Assim, é possível dizer que as concentrações de citocinina (BAP) e auxina (2,4-D), iguais ou próximas promovem de fato uma produção maior de calos friáveis.

TABELA 6: Valores de qui-quadrado para os calos friáveis de anteras da cultivar Catuaí Vermelho 44 aos 90 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2006.

Tratamentos (BAP + 2,4-D/mg.L ⁻¹)	Número de calos friáveis	fo-fe/fe
T1 (0 +0)	1	0,796053
T2 (0 + 1)	1	0,796053
T3 (0 + 2)	4	1,111842
T4 (0 + 4)	3	0,164474
T5 (2 + 0)	3	0,164474
T6 (2 + 1)	3	0,164474
T7 (2 + 2)	4	1,111842
T8 (2 + 4)	0	2,375
T9 (4 + 0)	1	0,796053
T10 (4 +1)	2	0,059211
T11 (4 + 2)	3	0,164474
T12 (4 +4)	1	0,796053
T13 (8 + 0)	2	0,059211
T14 (8 + 1)	4	1,111842
T15 (8 + 2)	3	0,164474
T16 (8 + 4)	3	0,164474
	38	10

* Os valores de qui-quadrado em negrito indicam diferenças significativas

* Apenas diferenças > ou = a 2 são significativas

* Os valores de qui-quadrado em negrito indicam diferenças significativas

Já os tratamentos T1 (ausência de BAP + ausência de 2,4-D), T2 (ausência de BAP + 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D), T9 (4,0 mg.L⁻¹ BAP + ausência de 2,4-D) e T12 (4,0 mg.L⁻¹ BAP + 4,0 mg.L⁻¹ 2,4-D) foram estatisticamente diferentes de: T3 (ausência de BAP + 2,0 mg.L⁻¹ 2,4-D); T4 (ausência de BAP + 4,0 mg.L⁻¹ 2,4-D); T5 (2,0 mg.L⁻¹ BAP+ ausência de 2,4-D); T6 (2,0 mg.L⁻¹ BAP + 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D); T7 (2,0 mg.L⁻¹ BAP + 2,0 mg.L⁻¹ 2,4-D); T11 (4,0 mg.L⁻¹ BAP + 2,0 mg.L⁻¹ 2,4-D); T14 (8,0 mg.L⁻¹ BAP + 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D); T15 (8,0 mg.L⁻¹ BAP + 2,0 mg.L⁻¹ 2,4-D) e T16 (8,0 mg.L⁻¹ BAP + 4,0 mg.L⁻¹ 2,4-D); mostrando que a ausência de citocinina e 4,0 mg.L⁻¹ de BAP combinadas com as doses da auxina utilizada, foram favoráveis quanto ao número de calos friáveis. E os tratamentos T10 (4,0 mg.L⁻¹ BAP + 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D) e T13 (8,0 mg.L⁻¹ BAP + ausência de 2,4-D); apresentaram diferenças significativas de T3 (ausência de BAP + 2,0 mg.L⁻¹ 2,4-D), T7 (2,0 mg.L⁻¹ BAP + 2,0 mg.L⁻¹ 2,4-D) e T14 (8,0 mg.L⁻¹ BAP + 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D), mostrando que os baixos níveis de 2,4-D presentes em T10 e T3 combinados com baixas doses de BAP (T3, T7, T8) e alta dose de citocinina em T14; também mostram favoráveis ao surgimento dos calos friáveis.

Com relação ao número de calos com pró-embriões no teste de significância estatística do qui-quadrado, foram registradas diferenças significativas aos 90 dias de cultivo para o T2 (ausência de BAP + 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D) em relação aos tratamentos T5 (2 mg.L⁻¹ BAP + ausência de 2,4-D); T6 (2 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ 2,4-D); T10 (4 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ 2,4-D); T13 (8 mg.L⁻¹ BAP + ausência de 2,4-D); T14 (8 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ 2,4-D); T15 (8 mg.L⁻¹ BAP + 2 mg.L⁻¹ 2,4-D) e T16 (8 mg.L⁻¹ BAP + 4 mg.L⁻¹ 2,4-D); apresentando um maior número de calos com pró-embriões. Isso mostra que, na ausência de citocinina e baixas concentrações de 2,4-D (T2), é possível obter calos com maior número de pró-embriões (TABELA 7).

TABELA 7: Valores de qui-quadrado para os calos com pró-embrióides de anteras da cultivar Catuaí Vermelho 44 aos 90 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2006.

Tratamentos (BAP + 2,4-D/mg.L ⁻¹)	Número de calos com pró-embrióides	fo-fe/fe
T1 (0 + 0)	1	0,017857
T2 (0 + 1)	3	5,160714
T3 (0 + 2)	2	1,446429
T4 (0 + 4)	1	0,017857
T5 (2 + 0)	0	0,875
T6 (2 + 1)	0	0,875
T7 (2 + 2)	1	0,017857
T8 (2 + 4)	1	0,017857
T9 (4 + 0)	2	1,446429
T10 (4 + 1)	0	0,875
T11 (4 + 2)	1	0,017857
T12 (4 + 4)	2	1,446429
T13 (8 + 0)	0	0,875
T14 (8 + 1)	0	0,875
T15 (8 + 2)	0	0,875
T16 (8 + 4)	0	0,875
	14	15,71429

* Os valores de qui-quadrado em negrito indicam diferenças significativas

* Apenas diferenças > ou = a 3 são significativas

Segundo AMMIRATO (1993), o balanço de auxina/citocinina em alta/baixa concentração favorece o enraizamento e o balanço inverso promove a formação da parte aérea, concentrações iguais promovem a produção de calos.

Resultados semelhantes ao desse experimento podem ser encontrados em Marques (2005), estudando o efeito dos reguladores de crescimento 2,4-D, TDZ, Cinetina, BAP, AIB, GA₃ e ANA na indução de calos em anteras de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44, teve como melhor resposta na formação de calos as combinações de 2 mg.L⁻¹ 2,4-D + 2 mg.L⁻¹ BAP, 2 mg.L⁻¹ Cinetina + 1 mg.L⁻¹ 2,4-D, 2 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.L⁻¹ TDZ e 2 mg.L⁻¹ 2,4-D, quanto a resposta à indução de pró-embrióides as melhores combinações foram: 2 mg.L⁻¹ 2,4-D + 2 mg.L⁻¹ BAP, 2 mg.L⁻¹ Cinetina + 1 mg.L⁻¹ 2,4-D, 2 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.L⁻¹ TDZ.

Os dados do trabalho concordam com os de BOXTEL e BERTHOULY (1996), quando afirmam que, no geral, três a quatro meses é um tempo requerido para se obter calos amarelos friáveis de explantes foliares, podendo depois ser usados na obtenção de alta frequência de embriogênese somática.

Calos friáveis e formação de pró-embriões também foram encontrados por Figueira (2005) em anteras de café, que obteve 19,8% de pró-embriões, sendo 21,5% pertencentes aa cv. Mundo Novo e 17,6% ao Catuaí Vermelho 44, tendo essas estruturas maiores índices quando estavam na ausência de AgNO₃.

Segundo os autores Ayub e Gebieluca (2003), ao trabalharem com explantes foliares do híbrido Sachimor e cv. IAPAR 59 de *Coffea arabica*, existe uma relação específica entre o genótipo e a citocinina para a indução da embriogênese somática, sendo as melhores concentrações para desenvolvimento de embriões de plântula de café 9,08 mM de TDZ e 5µM de BAP para o híbrido Sachimor e para a cv. IAPAR 59, respectivamente.

Santos (2003) relatou que, para a cultivar Catuaí (*Coffea arabica*), é necessário um período de cultivo maior em relação aos genótipos robustos para responder favoravelmente à calogênese, confirmando a maior reatividade desse genótipo. O genótipo arábica produziu calos embriogênicos após cinco meses, quando a razão auxina/citocinina 1:5 foi mantida constante nos meios de indução e de diferenciação. Calos friáveis foram obtidos por SANTOS (2003), aos dez meses de cultivo em meio de cultura contendo 20 µM de BAP e ágar como agente gelificante. Em todos os meios avaliados, o Catimor UFV 395⁻¹41 e os híbridos 337-610 e 447⁻¹2 não reagiram favoravelmente à produção de calos embriogênicos ou de calos embriogênicos friáveis.

Um dos principais fatores relacionados à embriogênese somática em café diz respeito à influência do genótipo. Boxtel e Berthouly (1996) mostraram que, dependendo do genótipo, a percentagem de formação de calos embriogênicos em *C. canephora* pode variar de 0,0 a 96,9%. A indução de embriogênese somática em quatro variedades de *C. arabica*, conforme os mesmos autores, variou de 0,0 a 10,0%. No primeiro trabalho sobre embriogênese somática de *C. arábica*, Sondahl e Sharp (1977) obtiveram taxas relativamente elevadas, chegando a 60% de calos embriogênicos. Em *C. canephora* (cv. Robusta), Berthouly e Michaux-Ferriere (1996) conseguiram até 100% de calos embriogênicos, dependendo da qualidade, quantidade e idade das culturas.

Avaliando as concentrações relativas de 2i-P e 2,4-D na indução de formação de calos embriogênicos do tipo HFSE (*High frequency somatic embryos*) e LFSE (*Low frequency somatic embryos*), em uma cultivar de *C. arábica* (Catuaí Vermelho) e um genótipo de *C. canephora* (E1571/99), esta pesquisa verificou que a formação de calo embriogênico do tipo LFSE foi estimulada pelo aumento de 2-iP, enquanto o do tipo

HFSE foi estimulado pelo aumento de 2,4-D em ambas as espécies. Em *C. canephora*, a formação de LFSE e HFSE chegou a 100% na presença de 2,5, 5,0 ou 10,0 mM de 2-iP e 5,0 mM 2,4-D, respectivamente. Em *C. arábica*, a percentagem de formação tanto de LFSE quanto de HFSE foi menor, chegando a 63,6 de LFSE em 15 mM de 2-iP e 90,6% de HFSE em 20 mM de 2,4-D (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

Figueira (2005), trabalhando com quatro concentrações de TDZ e uma de 2,4-D (2,0 mg.L⁻¹) em anteras de três cultivares de *Coffea arabica* L.: Mundo Novo LCP-379¹9; Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44 e Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-99, verificou que os reguladores de crescimento nas concentrações utilizadas, são eficientes na indução dos calos, todavia não promovem a sua regeneração.

Concordando com Araújo (2004), a ação combinada entre uma auxina e citocinina é de fato necessária para a indução de calos em anteras de cafeeiro. No estudo do diâmetro das anteras da cv. Catuaí Vermelho 44, não foi detectada diferença significativa entre os tratamentos, tendo, portanto, comportamento similar em todos os tratamentos ao final dos 90 dias de cultivo (TABELA 8).

TABELA 8: Resumo da análise de variância do diâmetro de anteras da cultivar Catuaí Vermelho 44 em relação aos tratamentos utilizados. UFU/ Uberlândia-MG,

Causas da Variação	Grau de Liberdade	QUADRADOS MÉDIOS
		OXID.
Tratamento	15	0,4362 ns
Resíduo	80	0,3845
CV (%)	19,5	

* ; ns = Significativo e não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente. 2007.

Segundo o trabalho de Silva (2003), os melhores resultados com relação ao diâmetro dos calos foram produzidos quando houve interação entre 2,4-D e BAP nas concentrações utilizadas para a indução de calos em *Coffea arábica*. Tais resultados discordam dos encontrados nesta pesquisa, uma vez que, não foi detectada interação nos tratamentos, e ambos trabalhos encontravam-se na condição de escuridão.

Já os autores Silva e Ferreira (2006) obtiveram resultados semelhantes ao deste trabalho, com a utilização de BAP na indução à embriogênese somática em calos oriundos de anteras de café; os autores também não verificaram diferença significativa entre seus tratamentos quanto à variável diâmetro; mas ao contrário deste trabalho, eles tiveram embriões somáticos que posteriormente foram regenerados.

4.3- Nitrato de prata e etileno na indução de calos e regeneração de embriões em anteras de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho 99

Primeira etapa

Baseado no resumo da análise de variância, foi possível verificar significância para as variáveis oxidação, intumescimento e contaminação, quando em contato com etileno. Verificou-se ainda, que, para nitrato de prata, apenas a variável contaminação foi significativa (TABELA 9).

TABELA 9: Resumo das análises de variância do número médio de anteras oxidadas (OXID.), intumescidas (INTUM.) e contaminadas (CONT.), da cultivar Catuaí Vermelho 99, inoculadas em meio de cultura “MS” sob ação da presença ou não de Nitrato de prata ($AgNO_3$) em contato com Etileno (ETHREL[®]) em diferentes dias. UFU/Uberlândia-MG, 2007.

Causas da Variação	Grau de Liberdade	QUADRADOS MÉDIOS		
		OXID.	INTUM.	CALOS
ETILENO	4	5,7613*	3,5953*	1,4288*
NITRATO	1	0,0695ns	0,0088 ^{ns}	1,1810*
ETILENO*NITRATO	4	0,1246ns	0,2941 ^{ns}	0,2858 ^{ns}
RESÍDUO	30	0,3929	0,4040	0,1499
CV(%)		17,55	19,27	38,04

* ; ns = Significativo e não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

A oxidação das anteras foi menor na testemunha, cujo tratamento não continha etileno, apenas a presença ou não de nitrato de prata, representando um percentual de (11,74%) com relação à sua maior oxidação (23,65%), quando submetido a dois dias de permanência no etileno, embora esse não tenha diferido dos demais dias, o quarto, o sexto e o oitavo dia (TABELA 10).

TABELA 10: Número de anteras oxidadas, intumescidas e contaminadas da cultivar Catuaí Vermelho 99 em função dos dias em contato com etileno (ETHREL[®]). UFU/Uberlândia-MG, 2007.

	Tempo de contato com o Etileno (Dias)				
	0	2	4	6	8
OXIDAÇÃO	2,097 a	4,225 b	3,685 b	4,006 b	3,849 b
INTUMESCIMENTO	3,878 a	3,648 a	3,566 a	3,225 a	2,175 b
CONTAMINAÇÃO	1,761 b	0,883 a	0,901 a	0,836 a	0,707 a

Médias seguidas por letras distintas na linha diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

De acordo com estes resultados pode-se inferir que quanto menos tempo as anteras ficam em contato com etileno, coincidindo ainda, com o menor tempo de inoculação, existe um menor número de anteras oxidadas, podendo o ethephon, nessas condições, contribuir na necrose do material à medida em que são expostas, inoculadas no escuro.

Os dados do trabalho concordam com os de Marques (2005). E embora tenha ocorrido oxidação, não houve comprometimento do desenvolvimento das anteras, as quais posteriormente vieram apresentar calos e uma possível embriogênese direta. (até aqui)

Figueira (2005) trabalhando com a mesma cultivar Catuaí Vermelho 99, confirma a hipótese acima quanto à relação tempo de inoculação e oxidação; o autor obteve em seu trabalho oxidação de todas suas anteras mesmo permanecendo no escuro até os 60 dias de cultivo.

A condição de escuro, embora seja favorável na cultura de anteras, neste caso não mostrou eficiência, uma vez que, mesmo permanecendo no escuro as anteras apresentaram bastante oxidadas ao final da avaliação; dados que discordam de Silva (2003), quando afirma que a oxidação tende a diminuir quando as anteras de *Coffea* são incubadas no escuro.

Outro fator que justifica a oxidação dos explantes talvez possa ser explicado pelo fato de o cafeeiro ser uma espécie lenhosa, a qual libera substâncias fenólicas e, por essa razão, deve-se adicionar ao meio de cultura substâncias antioxidantes, tais como: carvão ativado, polivinilpirrolidene (PVP), ácido ascórbico e ácido cítrico (ANDRADE, 1998). Entretanto, o ácido ascórbico deve ser esterilizado por filtração, já que é uma

substância termolábil (TEIXEIRA, 2001). Tais substâncias agem pela remoção do oxigênio de outras moléculas e também atuam por mecanismos alternativos. Os ácidos cítrico e ascórbico reagem com os metais presentes no meio de cultura, evitando que os mesmos fiquem disponíveis para se oxidarem (GEORGE, 1996). Provavelmente, o ácido ascórbico seria o mais efetivo na prevenção da oxidação polifenólica dentre os diversos antioxidantes testados (GUPTA, 1986).

Quanto ao intumescimento, pode-se observar que houve pouco desenvolvimento do explante quando em permanência no etileno por 8 dias, obtendo a menor média da variável (2,17) correspondente a 13,19%. Já durante os primeiros períodos de permanência no etileno, inclusive a testemunha, o explante obteve as melhores médias de intumescimento sendo a testemunha (3,87) (23,25%) e 2 dias em contato (3,65) (22,12%), embora essas não apresentaram diferenças significativas de 4 e 6 dias na permanência do etileno (TABELA 10).

A cultivar Catuaí Vermelho 99, respondeu rápido ao estímulo de indução com etileno, pois logo nos primeiros dias de inoculação foi registrada a maior média de intumescimento (3,87) ou 23,25% (testemunha).

Os dados mostram que é possível que exista um “tempo ótimo” para as anteras intumescerem na presença do etileno e que a partir daí pode ser cessado, podendo levar a formação de calos ou mesmo seu desenvolvimento possa ser interrompido. Esse fato também pode ser comprovado no trabalho de Luz (1995), num trabalho semelhante a esse, o qual verificou que quanto maior o tempo de exposição das anteras no etileno, maior é a tendência de aumentar a concentração de etileno no ambiente, tratando-se de um ambiente hermeticamente fechado.

No trabalho de Figueira (2005) foram obtidos os maiores índices de intumescimento aos 30 dias de cultivo, com média de 1,63, trabalhando com anteras de Catuaí Vermelho 99; dados estes que concordam com esse experimento, mostrando a cultivar utilizado como bom material de estudo, responsivo ao intumescimento e ao desenvolvimento de calos.

A concentração de 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D utilizada, pode ter influenciado os resultados, e os dados de Marques (2005), concordam com estes, uma vez que, o autor obteve a maior média de intumescimento quando seus experimentos estavam na presença de 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, adicionado com 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ, chegando a ter 90% de intumescimento de seu material na cv. Catuaí Vermelho 99. Além disso, o

regulador de crescimento 2,4-D apresenta caráter indutor para o intumescimento e formação de calos (TORRES *et al.*, 1998).

A contaminação manifestou-se alta logo nos primeiros dias de inoculação, quando não estavam em contato com etileno, atingindo um percentual de 34,61%, o que é considerado em cultura de tecidos um índice relativamente alto, tratando-se de poucas horas de inoculação. E com relação aos outros dias de inoculação em contato no etileno, não houve diferença estatística (TABELA 10).

Com relação à presença ou não de nitrato de prata para a contaminação, sendo ela significativa (TABELA 1), apresentou uma menor média de contaminação quando estava na presença de nitrato com percentual de (41,56%) e média de (0,85), comparado ao material inoculado na sua ausência (58,44%) e média de (1,19) (TABELA 11).

TABELA 11: Número de anteras contaminadas da cultivar Catuaí Vermelho 99 em função da presença ou não de Nitrato de prata (AGNO_3). UFU/Uberlândia-MG, 2007.

	NITRATO	
	Ausência	Presença
CONTAMINAÇÃO	1,19 b	0,85 a

Médias seguidas por letras distintas na linha diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Neste caso, uma das hipóteses é que a presença de nitrato possa inibir a proliferação de contaminantes, como fungos ou bactérias, agindo como um controle químico do material. Outra hipótese com relação à presença de nitrato é que ela também possa inibir o intumescimento das anteras; uma vez que o explante inoculado na sua presença teve pouco desenvolvimento ou nem intumescceu (dados não mostrados). Isto foi observado durante as avaliações, embora os resultados não tenham sido significativos para o intumescimento na presença de nitrato.

Marques (2005) também obteve uma contaminação considerada alta, equivalente a 35,87%, quando comparada a 2% obtidos por PALÚ (2002) com o uso de solução de PPMTM a 25% (v/v).

Figueira (2005) atribuiu a contaminação aos genótipos estudados, sendo a cv. Catuaí Vermelho 44 a que apresentou os maiores índices de contaminação, sugerindo que ela seja mais susceptível aos patógenos ou que a cv. Mundo Novo lhes seja mais resistente. Araújo (2004), visando à calogênese em anteras oriundas de uma população segregante F2 de *C. arabica* L., verificou que a adição de fungicida e bactericida ao

meio de cultura reduziu consideravelmente a contaminação causada por microrganismos.

Em estudos de desinfestação com explantes foliares de cajú e graviola, Léo *et al.* (2005) observaram que as contaminações variaram de 16 a 24% para fungos e de 0 a 8% para bactérias, usando diferentes concentrações comerciais de cloro ativo e álcool etílico a 70% na limpeza do material.

Os antibióticos e fungicidas são ocasionalmente utilizados para o controle *in vitro* de patógenos e o uso de certos antibióticos é eficiente no controle de bactérias (POLLOCK *et al.*, 1983). Entretanto, o seu uso e de fungicidas para o controle *in vitro* de contaminantes têm sido limitados devido à grande toxicidade para as células de plantas (ARRUDA, 2000). Esta toxicidade também foi encontrada por Carvalho *et al.* (2005), quando usaram diferentes antibióticos no controle da contaminação de explantes de batata; verificando que o antibiótico cloranfenicol inibiu o crescimento nas plantas na menor concentração utilizada e apresentou-se fitotóxico nas concentrações acima de 100 mg.L⁻¹.

4.3.1- Nitrato de prata e etileno na indução de calos e regeneração de embriões em anteras de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho 99

Segunda etapa

Os dados da tabela de variância registram valores significativos apenas para as variáveis intumescimento e formação de calos (calosidade) (TABELA 12). Por motivo de contaminação, o tratamento T10 (8 dias no etileno/ausência de nitrato) foi perdido; portanto, foi feita apenas análise dos outros tratamentos.

TABELA 12: Resumo das análises de variância do número médio de anteras oxidadas (OXID.), intumescidas (INTUM.) contaminadas (CONT.) e calosidade (CALOS.), da cultivar Catuaí Vermelho 99, inoculadas em meio de cultura “R” e cinetina (0,108 mg.L⁻¹) UFU/Uberlândia-MG, 2007.

Causas Da Variação	Grau de Liberdade	QUADRADOS MÉDIOS			
		OXID.	INTUM.	CONT	CALOS
TRAT.	8	1,5480ns	2,2413*	0,2855 ns	0,5150*
RESÍDUO	20	1,0671	0,7524	0,3686	0,1214
CV (%)		26,50	50,22	0,800	36,15

* ; ns = Significativo e não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

O intumescimento das anteras mostrou-se eficiente nos tratamentos T1, T2, T8 e T9 com médias de 2,71 (17,12%); 3,02 (19,09%); 2,20 (13,89%) e 2,49 (15,78%) respectivamente; e nos demais tratamentos não houve diferença significativa entre eles, apresentando a menor média de intumescimento o tratamento T3 (0,71) ou (4,47%) (TABELA 13).

TABELA 13: Número de anteras intumescidas e com calosidade da cultivar Catuaí Vermelho 99 em função dos tratamentos, na segunda etapa do experimento com Etileno (ETHREL®) e Nitrato de prata (AGNO₃).UFU/Uberlândia-MG, 2006.

Tratamentos (Etileno/ AgNO ₃)	Intumescimento	Calosidade
T1(0/0)	2,7063 a	1,7390 a
T2 (0/1)	3,0179 a	1,6410 a
T3 (2/0)	0,7071 b	0,7071 b
T4 (2/1)	1,1166 b	0,8365 a
T5 (4/0)	1,3212 b	0,7071 b
T6 (4/1)	0,8365 b	0,8365 a
T7 (6/0)	1,4142 b	0,7071 b
T8 (6/1)	2,1959 a	0,8796 a
T9 (8/0)	2,4943 a	0,7071 b
Média Geral	1,7272	0,964000

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Com base nesses resultados, pode-se afirmar que os tratamentos que provinham da testemunha na primeira parte desse experimento e os que vieram de seis e oito dias

em contato com etileno, foram os que melhor responderam ao meio R (TABELA 13). Com isto pode-se inferir que, com um primeiro contato com etileno seguido de mudança do meio de cultivo, o explante intumescce a ponto de favorecer a formação de calos. Isto é evidenciado nessa mesma tabela, em que os melhores resultados para a formação de calos também se encontram nos tratamentos T1(0/0), T2 (0/1) e T8 (6/1), embora estes não tenham diferido dos tratamentos T4 (2/1) e T6 (4/1); com percentuais de calosidade de 19,85%, 18,73% e 10,04%, respectivamente; nesses dois últimos, a maioria veio de placas cujo meio inicial continha 5 mg.L⁻¹ de nitrato; os tratamentos T3 (2/0), T5 (4/0), T7 (6/0) e T9 (8/0) foram os menos responsivos; vieram de meios desprovidos de nitrato (TABELA 13). Luz (1995) verificou que a concentração de 5 mg.L⁻¹ de AgNO₃ adicionado ao meio C foi capaz de regenerar plântulas em anteras de pimentão, em condições semelhantes às deste experimento.

Os resultados de Figueira (2005) discordam dos deste trabalho, com relação a presença de nitrato de prata e ao intumescimento e formação; o autor relata que, na ausência de nitrato a cv. Mundo Novo apresentou o maior número médio de anteras intumescidas e, conseqüente formação de calos, quando neste experimento a presença de nitrato favoreceu tanto o intumescimento quanto a calosidade.

Giridhar *et al.* (2004a), afirmam que o AgNO₃, o ácido acetílsalicílico (AAS), o triacontanol, TDZ e 2iP são amplamente usados como reguladores de crescimento em trabalhos de embriogênese em café. Giridhar *et al.* (2004b) afirmam ainda que embriogênese somática direta foi encontrada em explantes de hipocótilos de plantas de *C. arabica* e *C. canephora in vitro* em meio MS modificado com 10-70 mM de AgNO₃ suplementado com 1,1 mM de N- benziladenina e 2,85 mM de AIA.

Nos registros do quadro de análise de variância (TABELA 14), pode-se constatar que o etileno é significativo com relação à oxidação das anteras, apresentando um efeito quadrático sobre elas.

TABELA 14: Resumo das análises de variância do número médio de anteras oxidadas (OXID.), intumescidas (INTUM.) contaminadas (CONT.) e calosidade (CALOS.), da cultivar Catuaí Vermelho 99, inoculadas em meio de cultura R e cinetina (0,108 mg.L⁻¹). UFU/Uberlândia-MG, 2007.

Causas Da Variação	Grau de Liberdade	QUADRADOS MÉDIOS			
		OXID.	INTUM.	CONT	CALOS
ETILENO	4	2,80*	4,02*	0,46 ^{ns}	1,00*
1º GRAU	1	0,01 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,086 ^{ns}	2,05*
2º GRAU	1	9,95*	13,03*	0,800 ^{ns}	1,03*
3º GRAU	1	0,73 ^{ns}	1,91 ^{ns}	0,030 ^{ns}	0,48*
RESÍDUO	24	0,94	0,70	0,041 ^{ns}	0,11
CV (%)	4	24,85	48,54	0,46 ^{ns}	33,79

* ; ns = Significativo e não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

De acordo com a FIGURA 5, verifica-se que, à medida que as anteras ficam em contato com o etileno, a oxidação aumenta, obtendo-se um ponto máximo de oxidação por volta de quatro dias de inoculação e que, a partir de então, ela diminui, apresentando a menor média de oxidação no oitavo dia. Com isso, pode-se inferir que, com a ausência ou mesmo com poucos dias de exposição das anteras ao etileno, a oxidação pode existir mas não causa danos ao material.

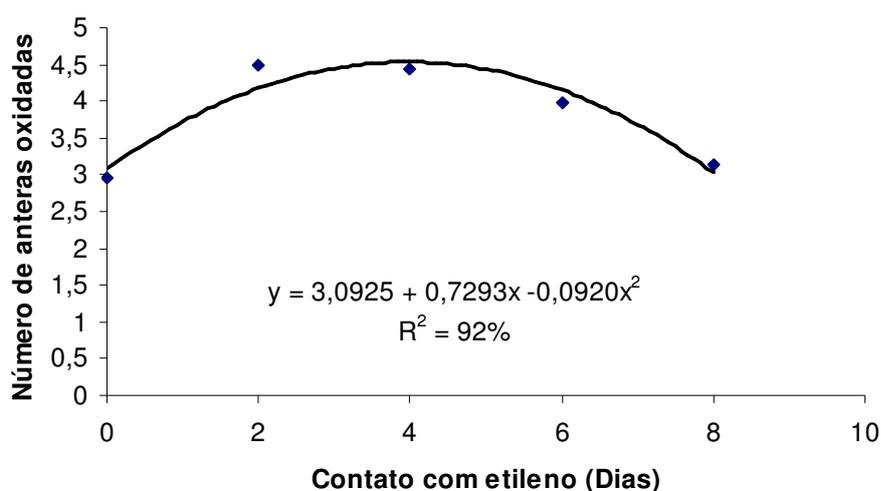


FIGURA 5: Número médio de anteras oxidadas, em contato com etileno em diferentes dias de inoculação. UFU/Uberlândia-MG, 2007.

Para o intumescimento, assim como para a oxidação, pode-se constatar o efeito quadrático, uma vez que o etileno também foi significativo (TABELA 14).

Na FIGURA 6, é possível observar a influência do etileno no número de anteras intumescidas logo nos primeiros dias de cultivo, sendo relatado um alto número de anteras intumescidas (aproximadamente 3,0) na ausência do etileno; mas que por volta de quatro dias no etileno, há um decréscimo dessa média, voltando a aumentar no oitavo dia de inoculação. Assim, pode-se acreditar ser favorável ao intumescimento a ausência do etileno no meio ou poucos dias em contato e ainda, durante o maior tempo de exposição ao etileno, o que demonstra que o etileno tem efeito sobre o intumescimento das anteras.

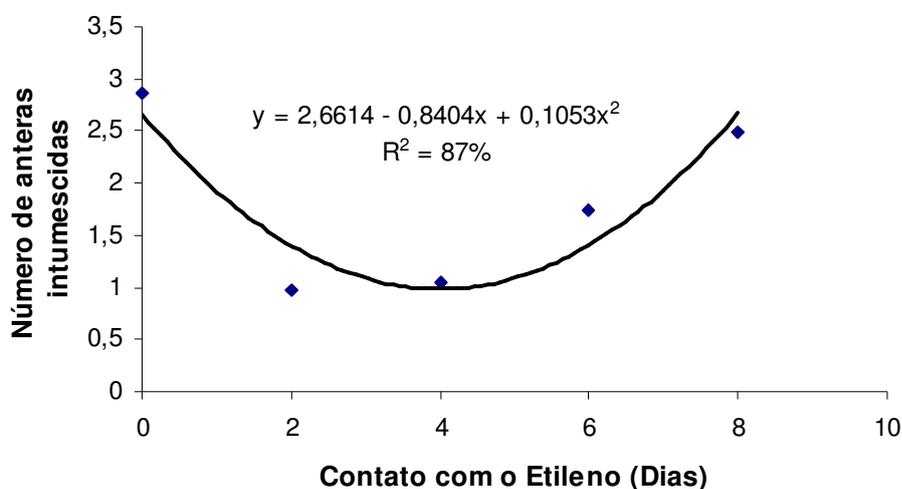


FIGURA 6: Número de anteras intumescidas, em contato com etileno em diferentes dias de inoculação. UFU/Uberlândia-MG, 2007.

Quanto à calosidade, o etileno foi significativo, sendo o efeito quadrático o modelo de regressão que melhor ajustou os dados, uma vez que os efeitos linear e cúbico também foram significativos (TABELA 14). Na relação entre etileno e formação de calos, foi possível verificar que a ausência de etileno no meio inicial e contato com ele nos primeiros dias de inoculação mostraram-se mais responsivos quanto à formação dos calos; por volta do quarto dia em contato com etileno, a calosidade decresceu, mas, à medida que aumentou o tempo de permanência no etileno, o número de calos tendeu a aumentar (FIGURA 7). Com base nesses dados, é possível afirmar que o quarto dia em contato com etileno foi o ponto médio, tanto para a oxidação quanto para o desenvolvimento no intumescimento das anteras, bem como para a calosidade. De acordo com intumescimento, a ausência e poucos dias no etileno, assim como o

aumento de dias expostos ao etileno, é também favorável à calosidade; mostrando que o etileno tem efeito não só no intumescimento, mas também na formação de calos.

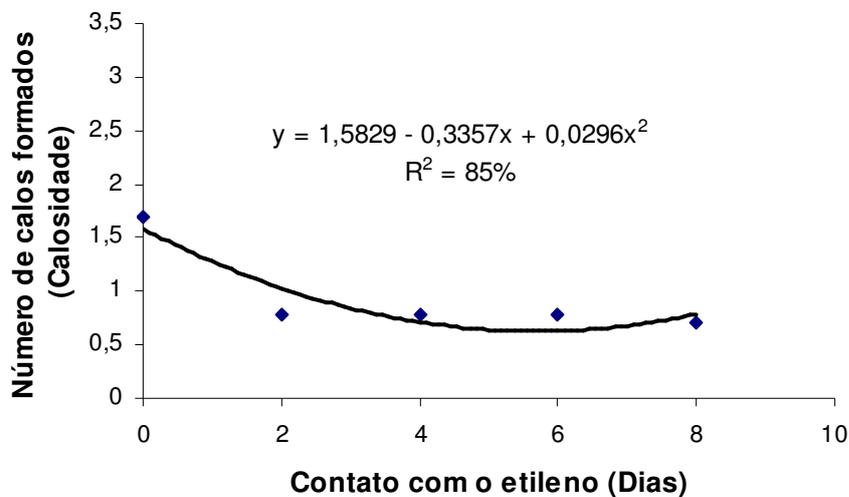


FIGURA 7: Número de calos formados, em contato com etileno em diferentes dias de inoculação. UFU/Uberlândia-MG, 2007.

Segundo Figueira (2005), as concentrações de AgNO_3 e AAS utilizadas não foram eficientes na indução de calos e pró-embrióides e ainda de acordo com o autor, o etileno, provavelmente, exerce um efeito benéfico na sua indução em cultura de anteras em café, fato que é comprovado neste experimento.

De acordo com Kumar *et al.* (2006), os efeitos do nitrato de prata na embriogênese somática já observados, sustentam a hipótese de que esse composto seja um agente promotor da embriogênese somática direta e da formação de calos na embriogênese somática indireta, que podem ser atribuídos à regulação do etileno durante a ação em estágios específicos na embriogênese de *Coffea*. Segundo Feria *et al.* (2003), a concentração de etileno exógeno e a concentração de O_2 dissolvido conhecidos, têm papel importante na embriogênese somática de café.

Luz *et al.* (1999) verificaram regeneração direta de plântulas haplóides em anteras de pimentão em meio acrescido com 2,4-D, cinetina e AgNO_3 e exposto ao etileno.

Marques (1996), trabalhando com o efeito do etileno na morfogênese *in vitro* de crisântemo, pela interação entre nitrato de prata e BAP, observou que a presença de AgNO_3 , utilizada isoladamente ou interagindo com BAP, resultou em baixos valores das médias obtidas para todos os parâmetros analisados.

Comparado a outros inibidores do etileno, o nitrato é altamente eficiente na obtenção de respostas na embriogênese primária e secundária (KUMAR *et al.*, 2006). Por causa da ação negativa, há vários estudos sobre os inibidores do etileno, como, por exemplo, o nitrato de prata (AgNO_3) e o ácido acetilsalicílico (AAS). O nitrato de prata, que é um potente inibidor da ação desse gás, tem promovido a regeneração em *Triticum aestivum*, *Nicotiana plumbaginifolia*, *Zea mays*, em alguns genótipos de *Brassica* e em *Daucus carota* (HATANAKA *et al.*, 1995). O nitrato de prata a 5 mg.L^{-1} , também favoreceu a indução de embrióides em anteras de *Capsicum annuum* L. (LUZ, 1995).

Aos 30 dias de cultivo em meio R acrescido de cinetina ($0,108 \text{ mg.L}^{-1}$), foi observada uma possível embriogênese direta nas anteras dos tratamentos T1r2 (MS + $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D + ausência de AgNO_3 + testemunha) e T2r4 (MS + $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D + $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AgNO_3 + testemunha) (FIGURAS 8 e 9), que não estiveram em contato com etileno (dados não mostrados).



FIGURA 8: Formação de embriogênese direta na antera do tratamento T1 (ausência de etileno / ausência de AgNO_3) de *Coffea arabica* para a cultivar Catuaí Vermelho 99 aos 30 dias de avaliação.

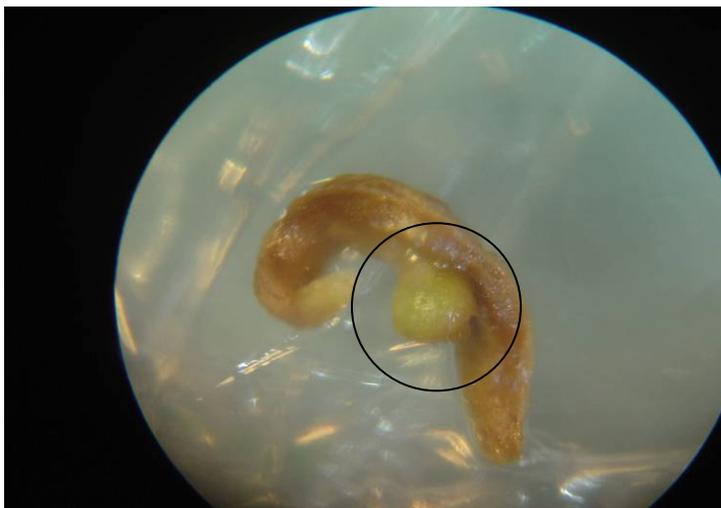


FIGURA 9: Formação de embriogênese direta na antera do tratamento T2 (ausência de etileno / presença de AgNO_3) de *Coffea arabica* para a cultivar Catuaí Vermelho 99 aos 30 dias de avaliação.

De acordo com os resultados, provavelmente, o AgNO_3 , juntamente com o 2,4-D é que ocasionou essa embriogênese direta, ao contrário dos outros resultados; mostrando que o etileno é um bom agente indutor da embriogênese, sendo o nitrato de prata benéfico em alguns casos e contrários em outros. Trabalhos como os de Figueira (2005) e Gurel *et al.* (2000) relatam esta discordância da ação do nitrato de prata na indução de pró-embriões, não conseguindo induzir a sua formação.

Coelho *et al.* (2005), usando nitrato de prata ($1,7 \text{ mg.L}^{-1}$) e quatro concentrações de 2,4-D com objetivo de selecionar plantas de milho capazes de produzirem calos embriogênicos friáveis, obtiveram a formação de calos tipo I em todas as linhagens testadas em maior quantidade do que tipo II, e o meio CI acrescido de 4 mg.L^{-1} de 2,4-D destacou na produção de calos tipo I para uma linhagem. Já em outras duas, as maiores concentrações de 2,4-D apresentaram maior formação de calos tipo II.

Luz (1995), trabalhando com embriogênese somática em anteras de pimentão utilizando $0,05 \text{ mM}$ de cinetina com $0,05$ de 2,4-D e adicionado ou não de $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AgNO_3 , ou ainda o meio C com os mesmos reguladores, adicionado ou não de $0,05\%$ de carvão ativado, verificou em relação ao número de embriões por 100 anteras, que o nitrato no meio C foi significativamente superior aos demais tratamentos; isso confirma que a maior indução de embriogênese somática está em meios que contenham nitrato, provavelmente devido ao bloqueio que o nitrato exerce sobre a ação inibitória do etileno endógeno dos embriões, o que concorda com Biddington e Robinson (1991) e Nervo *et al.* (1994).

Com relação à formação de pró-embriões, Marques (2005) observou que quanto maior o tempo de explantes no meio de cultura, melhor é a resposta quanto à formação dessas estruturas, evidenciando que um tempo maior de inoculação leva à oxidação do material. O autor obteve 84,5% de pró-embriões dos calos; já Figueira (2005), trabalhando com a concentração de 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D em ausência ou presença de nitrato observou que 19,8% das anteras com calos possuíam pró-embriões, concluindo, ainda, que a ausência de nitrato foi mais eficiente para esta indução.

5- CONCLUSÕES

Maior tempo de exposição das anteras ao etileno favorece a oxidação; e o etileno sozinho favorece a formação de calos.

A cv. Catuaí Vermelho 99 é responsiva à formação de calos e também à embriogênese direta, na presença de etileno.

O AgNO_3 age como inibidor de contaminantes e, juntamente com o etileno, favorece a calosidade das anteras da cv. Catuaí Vermelho 99.

O AgNO_3 juntamente com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D podem promover embriogênese direta. Tanto para Mundo Novo quanto para Catuaí Vermelho 44 o aumento das concentrações de AAS diminui a formação de pró-embrióides nos calos.

O 2,4-D sozinho é capaz de promover a formação de calos friáveis, porém o equilíbrio da auxina e da citocinina (BAP) utilizadas no trabalho favorecem a produção de calos friáveis.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA, J.R.; PEÑA, M. Plant regeneration from protoplasts of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. cv. Caturra. **Plant Cell Rep.**, Springer Berlin/Heidelberg, v.10, p. 345-348, 1991.
- AMMIRATO, P. G. V. Embryogenesis, In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. G. V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMilam Publischer Company, 1993. v.1, p.123.
- ANDRADE, L. M. C. O. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica*)**. 1998. 86p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.
- ARAÚJO, J. S. de.; PASQUAL, M.; PEDROZO, C. A.; TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C. Determinação do tamanho do botão floral para cultura de anteras do cafeeiro em população segregante F2. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 28., 2002, Caxambu. **Resumos....** Caxambu: EMBRAPA/CAFÉ, 2002b. p. 186.
- ARAÚJO, J. S. de. **Calogênese em anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L.** 2004. 41p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- ARRUDA, S. A. **Produção de propágulos de batata doce *Ipomea batatas* L. obtidos *in vitro* e submetidos a tratamentos prévios com fungicida e bactericida.** 2000. 42p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.
- ASCANIO, E.C.E., ARCIA, M.A.M. Efecto de un shock termico sobre la androgenesis en *Coffea arabica* L. var. Garnica. **Agronomía Trop**, v. 44, n. 2, p. 165-177, 1994.
- AYUB, R.A., GEBIELUCA, A.N. Embriogênese somática em genótipos de café (*coffea arabica*) é citocinina dependente. Publ. **UEPG Exact Soil Sci., Agr. Sci. Eng.**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, p.25-30, ago. 2003.
- BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N.M. High frequency somatic embryogenesis from *Coffea canephora*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, Dordrecht, v.44, n.2, p.169-176, Feb. 1996.
- BIDDINGTON, N.L., ROBINSON, H.T. Ethylene production during anther culture of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var *gemmifera*) and its relationship with factors that affect embryo production. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, Dordrecht, v. 35, p. 259-266, 1993.
- BINAROVA, P., HAUSE, G., CENKLOVÁ, V., CORDEWENER, J.H.G., CAMPAGNE, M.M.V.L. A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. **Sexual Plant Reprod.**, v. 10, p. 200-208, 1997. New York, US: Springer Verlag
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 1998. 547p.

BOREM, A. A história da biotecnologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, ano 7, n.34, p. 10⁻¹², jan/jun. 2005. Entrevista concedida a Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.

BORGES, V. A.D., MOTOIKE, S Y., SOBREIRA, A.R., FERREIRA, V.G., FERREIRA, S.A. Efeitos de diferentes auxinas na morfogênese de explantes de bananeira, cvs. Maçã e prata – anã. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 45.; CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 15.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2., 2005, Fortaleza, **Anais...** Fortaleza: UFC, 2005. p. 598.

BOXTEL, J.H.J. **Studies on genetic transformation of coffee by using electroporation and the biolistic method**. 125 f. Thesis (Ph.D.)- Wageningen, 1994.

BOXTEL, J., BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, Springer Netherlands, v. 44, p.7-17, 1996.

CABRAL, T.A.T. **Padrões moleculares, diversidade genética e mapa parcial de ligação do cafeeiro**. 2001.108p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

CAIXETA, G. Z. C. Economia cafeeira, mercado de café, tendência e perspectivas. In: ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ DE QUALIDADE, 1999, Viçosa. **Livro de Palestras...** Viçosa: UFV, 1999. p. 3-21.

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.; MEDINA FILHO, H.P.; FAZUOLI, L.C.; GUERREIRO FILHO, O.; LIMA, M. M. A. Aspectos genéticos do cafeeiro. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14, n.1, p. 135-183, 1991.

CARVALHO, A. Histórico do desenvolvimento da cultura do café no Brasil. **Instituto Agrônomo de Campinas**, Campinas, v. 9, n. 34, p. 7. 1993. (Documento IAC)

CARVALHO, J.S., TORRES, A.C. Sensibilidade de explantes de batata a meio nutritivo suplementado com antibióticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 15., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2., 2005, Fortaleza, **Anais...** Fortaleza: UFC, 2005. p. 606.

CHARRIER, A. La structure génétique des caféiers spontanés de la region malgache - Mascarocoffea Leurs relation avec les caféiers d'origine africaine (Eucoffea). **Memoires Orstnm**, Paris, v.87, p.87-223, 1978.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M. N.; WILLSON, L.C. **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. Westport.; USA; The AVI Publishing Company, 1985. p. 13-47.

COELHO, G.T.C.P., REZENDE, R.K.S., TORGA, P.P., PETRILLO, C.P., CARNEIRO, A.A., CARNEIRO, N.O., PINHO, R.G.V., PAIVA, R., PAIVA, V.L. Embriogênese somática de linhagens tropicais de milho (*Zea mays*) em diferentes concentrações de 2,4-D. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 15., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2., 2005, Fortaleza, **Anais...** Fortaleza: UFC, 2005. p. 600.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Cafés do Brasil**. Safra 2006/2007. Brasília, DF: MAPA- SPC/ CONAB, dez. 2005.

CORDEIRO, A. T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplastos em *Coffea***. 1999. 111p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

COURNAC, L., CIRIER, I., CHAGVARDIEFF, P. Improvement of photoautotrophic *Solanum tuberosum* plantlet culture by light and CO₂: Differential development of photosynthetic characteristics and varietal constraints. **Acta Hort.**v. 31, p. 53–58, 1992.

DE BLOCK, M.; DE BROUWER, D. A simple and robust *in vitro* assay to quantify the vigour of oilseed rape lines and hybrids. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.40, p. 845-852, May 2002.

DUBLIN, P. Induction de bourgeons néoformés et embryogenèse somatique: deux voies de multiplication végétative *in vitro* des caféiers cultivés. **Café Cacao Thé**, v. 24, n.2, p.121-130, 1980.

DUBLIN, P. Embryogenèse somatic directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. **Café Cacao Thé**, v.25, n.4, p. 237-242, 1981.

DUBLIN, P. Techniques de reproduction végétative *in vitro* et amelioration génétique chez lez caféiers cultivés. **Café Cacao Thé**, v.28, n.4, p.231-244, 1984.

DURZAN, D., GUPTA, P.K. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in conifers. In: MIZRAHL, A. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture**. New York: Allan Liss, 1988. p. 53-81.

EMBRAPA Café. **Consortio brasileiro de pesquisa e desenvolvimento do café**. Brasília, DF, 2004. 148 p.

ETIENNE-BARRY, D., BERTRAND, B., VASQUEZ, N., ETIENNE, H. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. **Plant Cell Rep.**, v. 19, p. 111-117, 1999.

FERIA, M. DE., JIMENEZ, E., BARBON, R. Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 2, n.1, p.1–6, 2003.

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

FIGUEIRA, E. R.; LUZ, J. M. Q. ; SILVA, A. S. ; LONDE, L. N. ; SANTANA, D. G. ; PASQUAL, M. . Efeito de pré-tratamentos em botões florais e influência do 2,4-D no cultivo *in vitro* de anteras de cafeeiro (*Coffea arabica* L). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n. 2, p. 49-55, 2003.

FIGUEIRA, E.R. **Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* L. em diferentes meio de cultura.** 2005. 87p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

FUJIWARA, K., KOZAI, T., WATANABE, I. Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels. (3) Measurements of carbon dioxide gas concentration in closed vessels containing tissue cultured plantlets and estimates of net photosynthetic rates of the plantlets. **J. Agr. Meteorol.**, Springer Netherlands, v. 43, n.1, p. 21–30, 1987.

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

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture:** part. 2: in practice. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361p.

GIRI, A.; AHUJA, P. S.; AJAYKUMAR, P. V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Aconitum heterophyllum* Wall. **Plant Cell Tiss Org Cult**, Dordrecht, v. 32, p. 213-218, 1993.

GIRIDHAR, P., INDU, E.P., RAVISHANKAR, G.A. Influence of Triacntanol on somatic embryogenesis n *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* P. ex. Fr. **In vitro Cell Dev Biol Plant.**, Washington/DC, v.40, p. 200–203, 2004a.

GIRIDHAR, P., INDU, E.P., VINOD, K. Direct somatic mbryogenesis from *Coffea arabica* L. and *Coffea anephora* P. Ex. Fr. under the influence of ethylene action inhibitor-silver nitrate. **Acta Physiol Plant.**, v. 6, p.299–305, 2004B.

GÓRALSKI, G., MATTHYS-ROCHON, E., VERGNE, P., PRZYWARA, L. Androgenic development: a fascinating embryo formation process. **Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.**, Hałdaś W., Przywara, v. 41, p. 51-65, 1999.

GOUVEIA, A. **Clonagem.** 2007. Disponível em : <<http://www.ufv.br/dbg/bio240/C015.htm>>. Acesso em:15 jan. 2007.

GRANER E.A., GODOY JÚNIOR, C. **Manual do cafeicultor.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 1967. 320p.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1999. v. 2, p. 533-568.

GUERRA, M.P.,NODARI, R.O. **Apostila de biotecnologia.** Florianópolis,: SC. CCA/UFSC, 2006. p. 41. Apostila de biotecnologia.

GUERREIRO FILHO, O.; COLOMBO, C.A. **Informativo Garcafé**. Campinas: Instituto agrônômico de Campinas, ago.1998.

GUO, Y., PULLI, S. An efficient androgenic embryogenesis and plant regeneration method through isolated microspore culture in timothy (*Phleum pratense* L.). **Plant Cell Rep.**, Springer, Berlin, ALLEMAGNE, v. 19, p. 761-767, 2000.

GUPTA, P. P. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 6, p. 33-39, 1986.

GÜREL, S.; GÜREL, E.; KAYA, Z. Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, p. 1155-1159, 2000.

GUTIÉRREZ-CORONADO, M. A.; TREJO-LÓPEZ, C.; LARQUÉ-SAAVEDRA, A. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 36, n. 8, p. 563-565, 1998.

HATANAKA, T.; SAWABE, E.; AZUMA, T.; UCHIDA, N.; YASUDA, T. The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. **Plant Science**, Limerick, v. 107, n. 2, p. 199-204, June 1995.

HEBERLE-BORS, E. *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. **Theor. Appl. Genet.**, Springer Berlin / Heidelberg, v. 71, n. 3, p. 361- 374, 1985.

HENDY, H.; POCHARD, E.; DALMASSO, A. Transmission héréditaire de la résistance aux nématodes *Meloidogyne chitwood* (Tylenchida) portée par 2 lignées de *Capsicum annuum* L.: étude de descendances homozygotes issues d'androgenèse. **Agronomie**, Paris, v. 5, n. 2, p. 93-100, 1985.

HENRY, Y. Origin of microspore-derived dihaploid *in vitro* plants. **Plant Tiss. Cult. Biotech.**, v.4, n.3-4, p.127-135. 1998.

HERMAN, E.B.; HASS, G.J. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. **HortScience**, Alexandria, v.10, n.6, p.588-589, Dec. 1975.

HERRERA, J.C., MORENO, L.G., ACUÑA, J.R., DE PENA, M., OSORIO, D. Colchicine-induced microspore embryogenesis in coffee. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 71, p. 89-92, 2002.

HERSZKOWICZ, N. **Café**. Gula uol. Disponível em http://www2.uol.com.br/gula/entrevista/127_nathan.shtml> Acesso em : 10 jan. 2007.

HORNER, M., STREET, H.E. Pollen dimorphism – Origin and significance in pollen plant formation by anther culture. **Ann. Bot.**, v. 42, p. 763-771, 1978.

HU, T., KASHA, K.J. A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. **Genome**, Guelph/Canadá, v. 42, p. 432-441, 1999.

- IDZIKOWSKA, K., MLODZIANOWSKI, F. Cell wall formation in multinucleate pollen grains of *Hordeum vulgare* anthers cultured *in vitro*. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae XLVIII**, v. 3, p. 377-380, 1979.
- INFANTE, R., MAGNANINI, E., RIGHETTI, B. The role of light and CO₂ in optimizing the conditions of shoot proliferation of *Actinidia deliciosa* *in vitro*. **Physiol. Plant.** Springer Netherlands, v. 77, p.191–195, 1989.
- IQBAL, M.C.M., MÖLLERS, C., RÖBBELEN, G. Increased embryogenesis after colchicine treatment of microspore cultures of *Brassica napus* L. **J. Plant Physiol.**, Göttingen /ALLEMAGNE, v. 143, p. 222–226, 1994.
- JARAMILO, J.; SUMMER, W.L. Dark – light treatments influence induction of tomato anther culture, **Hort Science**, Etats-Unis v.26, p. 915-916, 1991.
- KALTCHUK-SANTOS, E., BODANESE-ZANETTINI, M.H., MUNDSTOCK, E. Pollen dimorphism in soybean. **Protoplasma**, Wien, v.174, p. 74-78, 1993.
- KOZAI, T., KOYAMA, Y., WATANABE, I. Multiplication and rooting of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. **Acta Hort.** Hamamatsu / Japan v. 230, p. 121–127, 1988.
- KOZAI, T. Environmental control and automation in micropropagation. In: 4TH TOYOTA CONF. **Automation in biotechnology**. 21–24 Oct., 1990, Amsterdam: The Netherlands, 1990. p. 279–304.
- KOZAI, T. Autotrophic micropropagation. In: Bajaj YPS (ed) **Biotechnology in Agriculture and Forestry 17. High-Tech and Micropropagation I**, New York, p. 313–343, 1991.
- KRUG, C. A.; CARVALHO, A. The genetic of coffea. **Advanc. Genet.**, v. 4, p. 127-158, 1951.
- KUMAR, V., NAIDU, E. M.M., RAVISHANKAR, G.A. Developments in coffee biotechnology-*in vitro* plant propagation and crop improvement. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Springer Netherlands, v. 87, p. 49-65, 2006.
- LÉDO, A.S., SANT'ANA, M.C.S., BARBOZA, S.B.S. C. Desinfestação de explantes foliares de caju e graviola para cultivo *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 45.; CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 15.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2., 2005, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UFC, 2005. p. 593.
- LEES, R.P. Effects of the light environment on photosynthesis and growth *in vitro*. In: **Physiology, growth and development of plants in culture**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1994, p. 31–46.
- LEITE, C.A.M.; SILVA, M. da. A demanda de cafés especiais. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Café: produtividade, qualidade e sustentabilidade**. Viçosa, MG: DFT/UFV, 2000. p. 51-89.

LERCH, K. Cooper monooxygenases: tyrosinase and dopamine b-monooxygenases. In: SIEGEL, H. (Ed.). **Metal ions in biological systems**. Marchel: Deckker, 1981. p. 143¹86.

LONDE, L. N. **Indução morfo genética de *Anacardium humile* St. Hill e análise da divergência genética entre populações**. 2005. 141p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

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

LUZ, J. M. Q.; PINTO, J. E. B. P.; DIAS EHLERT, P. A.; CERQUEIRA, E. S. Influência do nitrato de prata, do carvão ativado e do ácido acetilsalicílico na embriogênese de anteras de pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 21, n. 4, p. 447-456, 1997.

LUZ, J.M.Q.; PINTO, J.E.B.P.; EHLERT, P.A.D.; CERQUEIRA, E.S.; BEDIN. I. Ação do etileno em combinação com thidiazuron, nitrato de prata e ácido acetilsalicílico na cultura de anteras de pimentão. **Horticultura Brasileira**, v.17, n.3, 45-49, nov. 1999.

MACIEL, A. L. R. de; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de; SILVA, A. B. da; DUTRA, L. F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 107¹16, jan./fev. 2003.

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, 1982.

MARIATH, J.E.A., SANTOS, R.P., BITTENCOURT, N.S. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA B; CARMELO-GUERREIRO SM (Ed). **Anatomia vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2003. p.329-373.

MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **The Journal of Horticultural Science**, London, v. 65, n. 2, p. 103¹11, 1990.

MARQUES, D. A. de. **Influência de fitoreguladores e fontes de nitrogênio na morfogênese *in vitro* de *Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Tzvelev cv. amarelo**. 1996. 90p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Campinas, 1996.

MARQUES, R.V. **Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* em função de diferentes reguladores de crescimento**. 2006. 29p. Monografia (Graduação Agronomia)- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

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

- MENDES, A.N.G. Economia cafeeira: o agrubusiness. In: MENDES, A.N.G.; GUIMARÃES, R.J. (Eds) **Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. v. 1, p.1-59.
- METWALLY, E.I., MOUSTAFA, S.A., EL-SAWY, B.I., SHALABY, T.A. Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, Springer Netherlands, v.52, p. 171-176, 1998.
- MICHAUX-FERRIÈRE, N., GROUT, H., CARRON, M.P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaeae). **Am. J. Bot.**, v.79, n. 2, p. 174-180, 1992.
- MOLINA, D.M., APONTE, M.E., CORTINA, H., MORENO, G. Efecto del genótipo y época de recolección del material vegetal en la embriogénesis somática directa de *Coffea arabica* var. Caturra x Híbrido de Timor. In: **Seminário Internacional sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira**, 3., 1999, Londrina,. Anais... p. 69-74. 1999.
- MOLINA, D.M., APONTE, M.E., CORTINA, H., MORENO, G. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, Springer Netherlands, v.71, p.117-123, 2002.
- MONACO, L. C.; SÖNDAHL, M. R.; CARVALHO, A. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: [s.n.], 1977. p. 109- 126.
- 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.
- MORAES-FERNANDES, M.I.B., STIVAL, A.L., BRAMMER, S.P., GRANDO, M.F. Haplodiploidização: Genética e Melhoramento. In: **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Torres A.C, Caldas L.S , Buso (Ed). Embrapa- SPI / Embrapa-CNPH, 1999. p. 613-650.
- 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 bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.
- NASCIMENTO, V.E.; SILVA, F.G.; PINTO, J.E.B.P.; SALES, J.F.; BERTOLUCCI, S.K.V. Efeito do explante, luz e fitorreguladores na indução de calos de carqueja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Resumos...** Lavras: SBPPO, 2003. p. 227.
- NERVO, G., CARANNANTE, G., AZZIMONT, M.T. ROTINO, G.L. Use oh anther culture method in pepper breeding: factors affecting plantlets production. In:

- INTERNACIONAL CONGRESS OG PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 1994. Firenze. **Anais...**Firenze: Laptc, 1994. v.8, p. 92.
- NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Haploids plants from pollen grains. **Science**, Washington, v. 163, n. 3862, p. 85-87, Jan. 1969.
- 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.
- NORIEGA, C., SONDAHL, M.R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFE, 15., 1993, Montpellier. **Proceedings ...** Paris: ASIC, 1993. p. 73-81.
- PAIVA, R., G. GOMES, C. Germinação *in vitro* de arabica e robusta. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL II., 2001, Vitória. **Anais...** Vitória, 2001.
- PALÚ, E. G. **Indução *in vitro* de calogênese em anteras e brotações em segmentos nodais de *Coffea arabica* L.** 2002. 47 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.
- PASQUAL, M., MACIEL, A.L.R. de., CAMPOS, K.P. de., SANTOS, E.C., CAMPOS, R.J.C. de. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica* L.) cultivadas *in vitro*. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.26, n.1, p.71-76, 2002.
- PIERSON, E. S; VAN LAMMENRN, A.; SCHEL, J. H.; STARITSKY, G. *In vitro* development of embryoids from punched leaf disc of *Coffea canephora*. **Protoplasma**, Viena, v. 115, n. 2/3, p. 208-216, 1983.
- POLLOCK, K.; BARFIELD, D. G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Reporter**, Florida, v. 2, p. 36-39, Dec. 1983.
- PRETOVÁ, A., RUIJTER, N.C.A., VAN LAMMEREN, A.A.M., SCHEL, J.H.N. Structural observations during androgenic microspore culture of the 4c1 genotype os *Zea mays* L. **Euphytica**, Springer Netherlands, v. 65, p. 61-69, 1993.
- RAMAGE, C.M., WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. ***In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant***, Springer, v. 38, p. 116-124, 2002.
- RAMALHO, M.; SANTOS, J. B. DOS; PINTO, C. B. **Genética na Agropecuária**, 6. ed. São Paulo: Globo, 1997.
- RAO, P.V.L., DEEPESH, N.D.E. Haploid plats from *in vitro* anther culture of the leguminous tree, *Peltophorum pterocarpum* (DC) K. Hayne (Cooper pod). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.11, p. 167-177, 1987.
- RÊGO, M. M. **Indução *in vitro* de haplóides de maracujazeiro (*Passiflora edulis* F. flavicarpa) a partir de óvulos não-fertilizados.**, 2004. Disponível em: <<http://www.ufv.htm>>. Acesso em 15 maio. 2004.

RESENDE, M.; MACIEL, M. F.G.; PONCIANO, N.J.; RESENDE, A. A. M. **Novos desafios na metodologia de classificação e padronização da bebida café.** Viçosa, MG: PNP/UFV, 2000.

RIBEIRO, A. O. **Definição de meio de cultura para morfogênese indireta em alface variedades Verônica e Maioba.** 1999. 39p. Monografia (Especialização em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1999.

RODRIGUES, L.R., TERRA, T.F., BERED, F., BODANESE-ZANETTINI, M.H. Origin of embryo-like structures in soybean anther culture investigated using SSR marker. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, Springer Netherlands, v. 77, n. 3, p. 287-289, 2004.

RODRÍGUEZ, M., CEVALLOS, A.M., MONTES, S. Proteínas extracelulares marcadoras del potencial embriogénico en suspensiones celulares de *Coffea* spp. **Cultivos Tropicales**, v. 21, n. 2, p. 11⁻¹⁵, 2000.

SANTIAGO, E. J. A.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; SANTANA, J. R. F.; GOMES, G. A. C.; Multiplicação: cultura de tecidos. **Paiva e Paiva**, Lavras, v. 5, p.50-57, 2001.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M. de.; MARTINOTTO, C.; GOMES, G. A. C.; NOGUEIRA, R. C. Efeito da ausência e presença de luz na indução de calogênese *in vitro* em explantes foliares de piquizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras, **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 304.

SIBI, M., DUMAS DE VAULX, R., CHAMBONNET, D. Obtention de plantes haplóides par andogenèse *in vitro* chez lê piment (*Capsium annum* L.). **Annales de l' Ameriolátion dès plantes**, v. 29, n. 5, p. 583-606, 1979.

SCHOPKE, C., MULLER, L.E., KOHLENBACH, H-W. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in protoplasts cultures from somatic embryos of coffee (*Coffea canephora* P. ex Fr.). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, Springer Netherlands, v. 8, p. 243-248, 1987.

SHARP, W.R.; SONDAHL,M.; CALDAS, L.S.; MARAFFA, S.B. The physiology on *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, New York, v.2, p.268-310, 1980.

SILVA, A. L. S. da, MORAES-FERNANDES, M. I.; FERREIRA, A. G. Ontogenetic events in androgenesis of brazilian barley genotypes. **Rev. Brasil. Biol.**, São Carlos/ São Paulo, v. 60, n. 2, p. 315-319, 2000.

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

SILVA, H.E., FERREIRA, G.B. Efeito de diferentes concentrações de BAP na Indução de embriões somáticos em calos oriundos de anteras de café. In: CONGRESSO

REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA – AVANÇOS E APLICAÇÕES, 2006, Uberlândia, **Anais...** Uberlândia: UFU, 2003. p.38.

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

SILVA, A.L.C. **Cultura de tecidos de plantas**. 2007. Disponível em: <<http://br.geocities.com/alccoelho/calogenese.html>> Acesso em 19 janeiro. 2007.

SMITH MAL, SPOMER, L.A. Vessels, gels, liquid media and support systems. In: AITKEN-CHRISTIE J, KOZAI T.; SMITH MAL (Ed.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1995. p.371–404.

SONDAHL, M. R.; SHARP, W. R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, Zurich, v. 81, n. 4, p. 395-408, 1977.

SÖNDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W.R. Propagation of coffee. In: HENKE, R.R.; HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, M.P.; HOLLAENDER, A. (Ed.). **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum Press, 1985. p. 215-232.

SPIRAL, J., PETIARD, V. Protoplast culture and regeneration in *Coffea* species. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 14., 1991. San Francisco. **Annales ...** Paris: ASIC, 1991. p. 383-390.

STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Bot. Neerl.**, v.19, p.509-514, 1970.

SUNDERLAND, N., DUNWELL, J.M. Pathways in pollen embryogenesis. In: STREET HE (Ed.). **Tissue Culture and Plant Science**. London : Academy Press, 1974. p.141- 67.

TANAKA, I. Development of male gametes in flowering plants. **J. Plant Res.**, Springer Japan, v.106, p. 55- 63, 1993.

TEISSON, C., ALVARAD, D., BERTHOULY, M. Culture in vitro par immersion temporaire: un nouveau recipient. **Plantations Recherche**, Montpellier / France v.2, n. 5, p. 29–3, 1995.

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

TEIXEIRA, J.B., JUNQUEIRA, C.S., PEREIRA, A.A.J.P.C.,MELLO, R.I.S., SILVA, A.P.D., MUNDIM, D.A. **Multiplicação clonal de café (Coffea arabica L.) via embriogênese somática**. Brasília: EMBRAPA, 2004. p.39. (Documento,121. EMBRAPA).

- NGUYEN, T. Q., KOZAI, T., NGUYEN, V. U. Effects of sucrose concentration, supporting material and number of air exchanges of the vessel on the growth of *in vitro* coffee plantlets. **Plant Cell Tiss Org Cult.**, Springer Netherlands, v. 58, p. 51-57, 1999.
- THORPE, A. T.; PATEL, K.R. Clonal propagation: adventitious buds. In: VASIL, J.K.; (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plant**, Orlando. 1984. p.49-60.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, 509 p.
- TRISTÃO, J. Perspectivas do mercado interno brasileiro de café. In: CETCAF (Ed.). **Simpósio estadual do café II**. 1995, Vitória, **Anais....** p. 36-42.
- VAN BOXTEL, J. **Studies on genetic transformation of coffee by using electroporation and biolistic method**. 1994. Disponível em < <http://www.agralin.nl/wda/abstracts/ab1880.html>> Acesso em: 3 out. 2006.
- VAN GEYT, J., D'HALLUIN., JACOBS, M. Induction of nuclear and cell divisions in microspores of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) **Z. Pflanzenzücht.**, Springer Berlin / Heidelberg, v.95, p. 325-335, 1985.
- 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.
- WANG, M., VAN BERGEN, S., VAN DUIJN, B. Insights into a key development switch and its importance for efficient plant breeding. **Plant Physiol.**, AL Leiden, The Netherlands, v.124, p. 523-530, 2000.
- WANG, K. L., Li H, ECKER, J. R., Ethylene biosynthesis and signaling networks. **Plant Cell**, La Jolla, USA, v. 14, p. 131-151, 2002.
- WHITE, P. R. The cultivation of animal and plant cells. 2. ed. Nova York. 1963.
- WILLIAMS, E.G., MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Ann. Bot.**, Victoria, Austrália, v. 57, p.443-462, 1986.
- YANG, S. E., HOFFMAN, B. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, Davis / California, v. 35, p. 115-189, 1984.
- YASUDA, T., FUJII, Y., YAMAGUCHI, T. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. **Plant Cell Physiol.**, Kobe / Japan, v. 26, p. 595-597, 1985.
- ZAKI MAM, DICKINSON, H.G. Microspore derived-embryos in *Brassica*: the significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. **Sex Plant Reprod.**, Springer Netherlands, v. 4, p. 48-55, 1991.
- ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Produção integrada de café**. Viçosa, MG: DFP/UFV, 2003. 710 p.

ZHAO, J.P., SIMMONDS, D.H., NEWCOMB, W. Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv Topaz. **Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.** Academic Publishers, Dordrecht Reynolds, v. 198, p. 433–439, 1996.

ZHAO, G., LIU, Y., YIN, A., LI, J. Germination of embryo in soybean anther culture. **Hin. Sci. Bull.**, Beijing / Chine, v. 43, n. 23, p.1991-1995, 1989.

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