

# BAP, 2,4-D E ÁCIDO ACETILSALICÍLICO NA INDUÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CALOS EM ANTERAS DE *Coffea arabica* L

BAP, 2,4-D and acetyl-salicylic acid on the callus induction and differentiation in *Coffea arabica* L. anthers

Adelaide Siqueira Silva<sup>1</sup>, José Magno Queiroz Luz<sup>2</sup>, Tatiana Michlovská Rodrigues<sup>3</sup>,  
Cecília Alves Bittar<sup>4</sup>, Leandro de Oliveira Lino<sup>5</sup>

## RESUMO

O melhoramento genético do cafeeiro por meio de métodos convencionais é um processo demorado para se obter uma nova cultivar. A redução desse tempo é possível através da produção de linhagens homozigóticas, oriundas de dihaplóides obtidas através da cultura de anteras. Objetivou-se aplicar a técnica da cultura de anteras em diferentes cvs. de *Coffea arabica* L. para induzir a formação de calos e regenerar plântulas di-haplóides, com uso de reguladores vegetais. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Anteras das cultivares Mundo Novo LCP-379-19 e Catuaí Vermelho H2077-2-5-44 foram inoculadas em meio MS suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e AAS, nas concentrações de 0; 8; 16; 32 e 64 mg L<sup>-1</sup>. Calos de 'Catuaí Vermelho 44' foram subcultivados em meio MS acrescido de diferentes concentrações de BAP (0; 2; 4 e 8 mg L<sup>-1</sup>) e 2,4-D (0; 1; 2 e 4 mg L<sup>-1</sup>). Tanto para as cvs. Mundo Novo quanto para Catuaí Vermelho 44 o aumento das concentrações de AAS diminuiu a formação de pró-embrióides nos calos e somente o 2,4-D foi capaz de promover a formação de calos friáveis, porém o equilíbrio da auxina e da citocinina utilizadas no trabalho, favoreceram a produção de calos friáveis.

**Termos para indexação:** Reguladores vegetais, embriogênese direta, calosidade, *Coffea arabica*.

## ABSTRACT

Coffee plant breeding through conventional methods demands a long time to obtain new cultivars. The reduction of this period is possible through the production of homozygous lines, from dihaploids obtained via anther culture. The aim of this study was to apply the anther culture technique on different *C. arabica* L. cultivars to induce calli formation and to regenerate dihaploid seedlings with the use of plant growth regulators. The experiments were accomplished in the Plant Biotechnology laboratory at Uberlândia Federal University (UFU). Anthers of the cultivars Mundo Novo LCP-379-19 and Catuaí Vermelho H2077-2-5-44 were inoculated on MS medium supplemented with 2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D and ASA at 0, 8, 16, 32 or 64 mg L<sup>-1</sup>. 'Catuaí Vermelho 44' calli were subcultured on MS supplemented with different concentrations of BAP (0, 2, 4 or 8 mg L<sup>-1</sup>) and 2,4-D (0, 1, 2 or 4 mg L<sup>-1</sup>). The increase in ASA concentrations decreased the pro-embryoid formation on calli of both cultivars and only 2,4-D promoted the formation of friable calli. However, the balance of auxin and cytokinin used in this study favored the production of friable calli.

**Index terms:** Plant growth regulators, direct embryogenesis, callosity, *Coffea Arabica*.

(Recebido em 10 de agosto de 2007 e aprovado em 9 de julho de 2008)

## 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 com aproximadamente, dez milhões de pessoas envolvidas direta ou indiretamente com o agronegócio. Além do aspecto econômico, a atividade tem relevada importância social, como atividade geradora de emprego e fixadora da mão-de-obra no campo.

O melhoramento genético do cafeeiro por meio de métodos convencionais é um processo demorado para se obter uma nova cultivar e também 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 homozigóticas oriundas de dihaplóides. Existem alguns métodos para a obtenção de dihaplóides. Uma das técnicas é a cultura de anteras, que se

<sup>1</sup>Bióloga, Mestre – Instituto de Ciências Agrárias/ICIAG – Universidade Federal de Uberlândia/ UFU – UFU – ICIAG – AGRONOMIA – Bloco 2E – Campus Umuarama – 38400-902 – Uberlândia, MG – adelaidebio@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Engenheiro Agrônomo, Doutor – Instituto de Ciências Agrárias/ICIAG – Universidade Federal de Uberlândia/ UFU – UFU – ICIAG – AGRONOMIA – Bloco 2E – Campus Umuarama – 38400-902 – Uberlândia, MG – jmagno@umuarama.ufu.br

<sup>3</sup>Engenheira Agrônoma, Doutora – Instituto de Ciências Agrárias/ICIAG – Universidade Federal de Uberlândia/UFU – UFU – ICIAG – AGRONOMIA, Bloco 2E – Campus Umuarama – 38400-902 – Uberlândia, MG – tatiana\_mrodrigues@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Engenheira Agrônoma, Mestranda – Instituto de Ciências Agrárias/ICIAG – Universidade Federal de Uberlândia/ UFU – UFU – ICIAG – AGRONOMIA, Bloco 2E – Campus Umuarama – 38400-902 – Uberlândia, MG – ceciliabittar@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Graduando de Agronomia – Instituto de Ciências Agrárias/ICIAG – Universidade Federal de Uberlândia/UFU – UFU – ICIAG – AGRONOMIA, Bloco 2E – Campus Umuarama – 38400-902 – Uberlândia, MG – leanlino@yahoo.com.br

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, 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 dos 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. Essa técnica apresenta, ainda, como vantagem, o menor tempo necessário para a obtenção de novas linhagens quando comparada com os outros métodos de melhoramento convencionais. Objetivou-se, neste trabalho, induzir a formação de calos a partir de anteras de *Coffea arabica* L. e regenerar plântulas dihaplóides em duas cultivares de *Coffea arabica*, com uso de reguladores vegetais.

### MATERIALE MÉTODOS

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 utilizadas duas cvs de *C. arabica* L., Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44 e Mundo Novo LCP-379-19, pertencentes à área experimental do Campus Umuarama.

Os botões florais foram coletados entre 8 e 9 horas da manhã, armazenados em placas de Petri contendo papel-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 15 minutos, em solução de hipoclorito de sódio 1%, sob agitação. Em câmara de fluxo laminar foram lavados três vezes em água destilada e autoclavado. As anteras foram retiradas mediante incisão em um dos lados da antera 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<sup>-1</sup>, hipoclorito de sódio 0,2% e em água destilada e autoclavada. Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,9 e foram esterilizados à

temperatura de 121° C, sob a pressão de 1 atm, por 20 minutos.

Para o experimento de indução de calos e pró-embrióides em anteras de *C. arabica* com o ácido acetilsalicílico (AAS), as cvs. utilizadas foram Mundo Novo LCP-379-19 e Catuaí Vermelho H2077-2-5-44. As anteras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com pH ajustado em 5,9, suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e AAS, nas concentrações de 0; 8; 16; 32 e 64 mg L<sup>-1</sup>. 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-embrióides.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, 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 à análise estatística, com a utilização do programa SANEST, aplicação do teste F, a 5% de probabilidade, sendo transformados em raiz quadrada de  $x + \frac{1}{2}$ . As características qualitativas foram analisadas pelo teste Tukey, a 5% e as características quantitativas, por regressão polinomial.

Para o experimento de diferenciação de calos de *C. arabica*, utilizaram-se calos da cv. Catuaí Vermelho H2077-2-5-44 do experimento anterior que foram subcultivados para o meio MS, acrescido de diferentes concentrações de BAP (0; 2; 4 e 8 mg L<sup>-1</sup>) e 2,4-D (0; 1; 2 e 4 mg L<sup>-1</sup>) e 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-se o número de calos embriogênicos (CE), número de calos friáveis (CF) e diâmetro de calos (cm).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x4, com seis repetições, sendo cada tubo de ensaio, que continha um calo, considerado uma parcela. 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 raiz quadrada de  $x + \frac{1}{2}$ ; aplicação do teste Qui-Quadrado, a 5% de probabilidade e SISVAR para o teste Tukey, na comparação das médias com relação aos tratamentos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 30, 60 e 90 dias do estabelecimento dos explantes *in vitro*, avaliou-se a oxidação, o intumescimento e a calosidade das anteras. O resumo do quadro de análise de variância das características avaliadas consta da Tabela 1.

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, as anteras de ambas apresentaram maior oxidação e com a diminuição do tempo de permanência no meio, o número de anteras oxidadas foi menor. O mesmo comportamento foi observado dentro das cvs., sugerindo que o tempo de estabelecimento no meio indutor influenciou na oxidação das anteras de café (Tabela 2).

Figueira (2005) trabalha com as mesmas cultivares e observou que, aos 60 dias, 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) trabalharam com *Aconitum heterophyllum* Wall e afirmaram que a presença de 2,4-D no meio de cultura está associada a maior oxidação do tecido vegetal. Figueira et al. (2003), trabalharam com doses menores de 2,4-D em subcultivo de anteras e obtiveram 100% de oxidação das amostras. Em outro trabalho com a cultivar Catuaí Vermelho 44, Silva (2003) também observou alto índice de oxidação, que atingiu o valor de 93%, entretanto, utilizou apenas os reguladores vegetais cinetina, thidiazuron (TDZ) e 6-benzilaminopurina (BAP).

Londe (2005), trabalhando com cotilédones de cajuí (*Anacardium humile* A. St-Hil.), verificou, aos 30 dias, que a oxidação dos explantes foi maior quando se adicionou 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP em meio isento de 2,4-D e que, para as

concentrações de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, a oxidação foi menor. Aos 45 dias, verificou-se aumento da média de oxidação, sendo que a concentração que proporcionou maior oxidação foi a de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D sem citocinina no meio de cultura. Contudo, a concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP em combinação com 1,0 mg L<sup>-1</sup> 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 cv. Mundo Novo foi a que apresentou os maiores índices de intumescimento de anteras e o maior valor foi obtido aos 90 dias, não diferindo estatisticamente da avaliação aos 30 dias, sendo o menor valor de anteras intumescidas obtidos aos 60 dias de avaliação. Já a cv. Catuaí Vermelho 44 apresentou maior média de anteras intumescidas aos 90 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 a que apresentou maior número médio de anteras intumescidas, quando comparado ao 'Catuaí Vermelho 44' (Tabela 3).

Torres et al. (1998) citam que o regulador vegetal 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 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina. Os mesmos autores demonstraram que o intumescimento do cotilédone pode estar relacionado com a sua manutenção inicial no escuro.

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

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

| Causas da Variação | Grau de Liberdade | Quadrados Médios    |        |                     |
|--------------------|-------------------|---------------------|--------|---------------------|
|                    |                   | Oxid.               | Intum. | Calos               |
| CULTIVAR (CUL)     | 2                 | 1,341*              | 0,687* | 0,325 <sup>ns</sup> |
| AVALIAÇÃO (AVA)    | 1                 | 0,394*              | 1,557* | 0,086 <sup>ns</sup> |
| AAS                | 4                 | 0,060 <sup>ns</sup> | 0,282* | 0,800 <sup>ns</sup> |
| AVA*CUL            | 2                 | 0,161*              | 0,271* | 0,030 <sup>ns</sup> |
| AVA*AAS            | 8                 | 0,066 <sup>ns</sup> | 0,023* | 0,041 <sup>ns</sup> |

Tabela 2 – Porcentagem média de anteras oxidadas das 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 | Catuaí Vermelho 44 |
| 30                | 58,80 cD   | 78,20 Bc           |
| 60                | 85,40 bB   | 95,20 aA           |
| 90                | 99,00 aA   | 98,20 aA           |

Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e letras maiúsculas distintas na linha diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey.

Tabela 3 – Médias em porcentagem de anteras intumescidas das 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 | Catuaí Vermelho 44 |
| 30                | 86,20 aB   | 74,60 aC           |
| 60                | 67,00 bD   | 57,20 bE           |
| 90                | 99,00 aA   | 98,20 aD           |

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

De acordo com a Figura 1 observa-se que, à medida que aumentaram as concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS), houve diminuição em média de 0,46% de anteras intumescidas para a cultivar Catuaí Vermelho 44.

Resultados análogos foram obtidos por Figueira (2005) onde, aos 30 dias, o número médio de anteras intumescidas diminuiu à medida que aumentaram-se as doses de AAS e aos 60 dias houve interação entre as doses de  $\text{AgNO}_3$  e AAS, sendo que na ausência de  $\text{AgNO}_3$ , o número médio de anteras intumescidas também decresceu com o aumento das doses de AAS.

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

A presença de ácido acetilsalicílico (AAS) nas concentrações utilizadas mostrou-se prejudicial à formação de calosidade, uma vez que com o aumento das concentrações de AAS no meio de cultura, observou-se decréscimo, em média de 0,08%, em calos formados em anteras da cultivar Catuaí Vermelho 44 (Figura 2).

Para a cv. Mundo Novo, os dados não foram significativos. 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  $\text{L}^{-1}$  de AAS.

Figueira (2005) analisou o efeito do subcultivo de calos em 'Catuaí Vermelho 44', em relação aos níveis de  $\text{AgNO}_3$  e AAS, não obtendo resultados significativos. Entretanto, quando avaliou a influência do 2,4-D,  $\text{AgNO}_3$  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 cv. Mundo Novo, na ausência de  $\text{AgNO}_3$ . 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, Luz (1995) obteve melhor porcentagem de anteras de pimentão com embriões na presença de AAS, na concentração de 88,9 mM. Resultado semelhante é citado por Herman & Hass (1975). Segundo o autor, o AAS 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 & Summer (1991) e Nascimento et al. (2003) que trabalharam com indução de calos em carqueja e obtiveram maior formação de calos em anteras mantidas no escuro. Ascanio & 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.

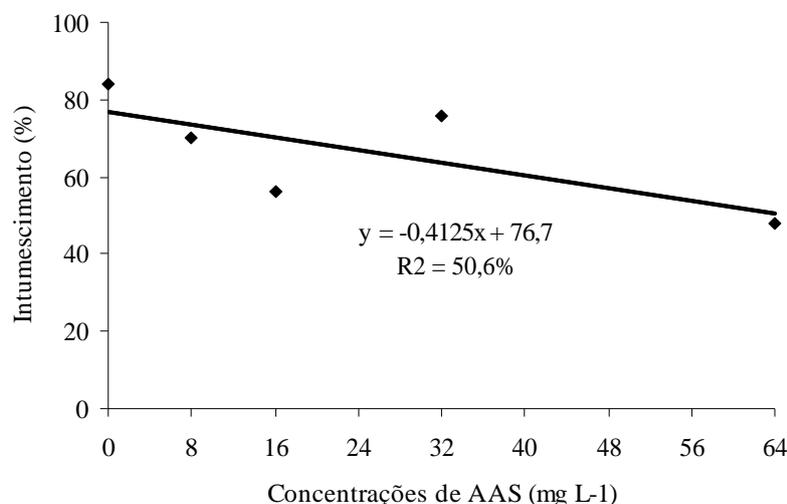


Figura 1 – Porcentagem média de anteras intumescidas da cultivar Catuaí Vermelho 44, em função das diferentes concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS). UFU/Uberlândia-MG, 2005.

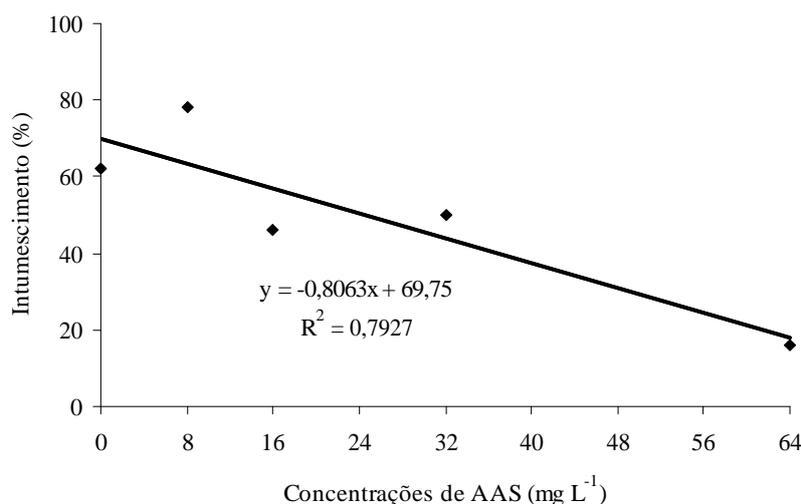


Figura 2 – Porcentagem média de anteras com calosidade da cultivar Catuaí Vermelho 44, em função das diferentes concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS). UFU/Uberlândia-MG, 2005.

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.

Trabalhando com as mesmas cultivares, Figueira (2005) verificou que 19,8 % das anteras que formaram calosidade apresentavam pró-embriões, sendo 21,5 % pertencentes a cv. Mundo Novo e 17,6 % a Catuaí Vermelho 44. Observou-se que o número médio de anteras com pró-embriões diminui com o aumento das concentrações de

AAS até o valor de 42 mg L<sup>-1</sup>. 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 as do presente estudo e mantidas no escuro. Verificaram que a concentração de 16 mg L<sup>-1</sup> de AAS induziu melhor a embriogênese e que em concentrações maiores a necrose das anteras era induzida.

Para o experimento de diferenciação de calos de *C. arabica*, o teste de significância estatística do Qui-Quadrado, realizado para calos friáveis da cv. Catuaí Vermelho 44 indicou que, aos 90 dias de cultivo, os tratamentos 0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 8 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D foram os que apresentaram número maior de calos friáveis, não diferindo estatisticamente de 0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 4 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 8 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 8 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 4 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. 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. 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 0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, em relação aos tratamentos 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 8 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 8 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 8 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 8 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 4 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, apresentando 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. Já os tratamentos 0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 4 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D foram estatisticamente diferentes de: 0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 4 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 8 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 8 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 8 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 4 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, indicando que a ausência de citocinina e 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, combinadas com as doses da auxina utilizada, foram favoráveis quanto ao número de calos friáveis. E os tratamentos 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 8 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-

D apresentaram diferenças significativas de 0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 8 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, indicando que os baixos níveis de 2,4-D presentes em 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D combinados com baixas doses de BAP (0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 4 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D) e alta dose de citocinina em 8 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D também foram favoráveis ao surgimento dos calos friáveis. (Tabela 4).

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 e concentrações iguais promovem a produção de calos. Resultados semelhantes ao desse experimento podem ser encontrados em Marques (2005), que estudou o efeito dos reguladores vegetais 2,4-D, TDZ, Cinetina, BAP, IBA, GA<sub>3</sub> e NAA na indução de calos em anteras de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44 e obteve como melhor resposta na formação de calos as combinações de 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 2 mg L<sup>-1</sup> BAP, 2 mg L<sup>-1</sup> Cinetina + 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D; 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg L<sup>-1</sup> TDZ e 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, quanto a resposta à indução de pró-embriões as melhores combinações foram: 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 2 mg L<sup>-1</sup> BAP, 2 mg L<sup>-1</sup> Cinetina + 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg L<sup>-1</sup> TDZ.

Os dados do trabalho concordam com os de Boxtel & 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 serem 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 a cv. Mundo Novo e 17,6% ao Catuaí Vermelho 44, tendo essas estruturas maiores índices quando estavam na ausência de AgNO<sub>3</sub>.

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 5).

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

Tabela 4 – Valores de Qui-Quadrado para os calos friáveis e calos com pró-embriões 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 <sup>-1</sup> ) | Número de calos friáveis | fo-fe/fe* | Número de calos com pró-embriões | fo-fe/fe** |
|---|--------------------------|-----------|----------------------------------|------------|
| T1 (0 + 0)                                    | 1                        | 0,796053  | 1                                | 0,017857   |
| T2 (0 + 1)                                    | 1                        | 0,796053  | 3                                | 5,160714   |
| T3 (0 + 2)                                    | 4                        | 1,111842  | 2                                | 1,446429   |
| T4 (0 + 4)                                    | 3                        | 0,164474  | 1                                | 0,017857   |
| T5 (2 + 0)                                    | 3                        | 0,164474  | 0                                | 0,875      |
| T6 (2 + 1)                                    | 3                        | 0,164474  | 0                                | 0,875      |
| T7 (2 + 2)                                    | 4                        | 1,111842  | 1                                | 0,017857   |
| T8 (2 + 4)                                    | 0                        | 2,375     | 1                                | 0,017857   |
| T9 (4 + 0)                                    | 1                        | 0,796053  | 2                                | 1,446429   |
| T10 (4 + 1)                                   | 2                        | 0,059211  | 0                                | 0,875      |
| T11 (4 + 2)                                   | 3                        | 0,164474  | 1                                | 0,017857   |
| T12 (4 + 4)                                   | 1                        | 0,796053  | 2                                | 1,446429   |
| T13 (8 + 0)                                   | 2                        | 0,059211  | 0                                | 0,875      |
| T14 (8 + 1)                                   | 4                        | 1,111842  | 0                                | 0,875      |
| T15 (8 + 2)                                   | 3                        | 0,164474  | 0                                | 0,875      |
| T16 (8 + 4)                                   | 3                        | 0,164474  | 0                                | 0,875      |
|   | 38                       | 10        | 14                               | 15,71429   |

\*/\*\*Os valores de Qui-Quadrado em negrito indicam diferenças significativas; \*Apenas diferenças > ou = a 2 são significativas; \*\*Apenas diferenças > ou = a 3 são significativas.

Tabela 5 – Resumo da análise de variância do diâmetro de anteras da cultivar Catuaí Vermelho 44, em relação aos tratamentos utilizados. UFU/Uberlândia-MG, 2007.

| Causas da Variação | Grau de Liberdade | Quadrados Médios Oxid. |
|--------------------|-------------------|------------------------|
| Tratamento         | 15                | 0,4362 <sup>ns</sup>   |
| Resíduo            | 80                | 0,3845*                |
| CV (%)             | 19,5              |                        |

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

Já os autores Silva & 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 desse trabalho, eles tiveram embriões somáticos que posteriormente foram regenerados.

### CONCLUSÕES

Tanto para 'Mundo Novo' quanto para 'Catuaí Vermelho 44', o aumento das concentrações de ácido

acetilsalicílico (ASS) diminuiu a formação de pró-embriões nos calos.

O ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) sozinho é capaz de promover a formação de calos friáveis, e o equilíbrio da auxina e da citocinina, 6-benzilaminopurina (BAP), utilizadas no trabalho favoreceram a produção de calos friáveis.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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: MacMilan, 1993. v. 1, p. 123.

- ARAÚJO, J. S. de. **Calogênese em anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L.** 2004. 41 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- 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.
- BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. M. High frequency somatic embryogenesis from *Coffea canephora*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 44, n. 2, p. 169-176, Feb. 1996.
- BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves: factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Springer Netherlands, v. 44, p. 7-17, 1996.
- FIGUEIRA, E. R. **Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* L. em diferentes meio de cultura.** 2005. 87 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.
- 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.
- GIRI, A.; AHUJA, P. S.; AJAYKUMAR, P. V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Aconitum heterophyllum* Wall. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 32, p. 213-218, 1993.
- 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.
- JARAMILO, J.; SUMMER, W. L. Dark: light treatments influence induction of tomato anther culture. **HortScience**, Etats-Unis, v. 26, p. 915-916, 1991.
- LONDE, L. N. **Indução morfo genética de *Anacardium humile* St. Hill e análise da divergência genética entre populações.** 2005. 141 p. 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. 115 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.
- LUZ, J. M. Q.; PINTO, J. E. B. P.; EHLERT, P. A. D.; 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.
- MARQUES, R. V. **Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* em função de diferentes reguladores de crescimento.** 2006. 29 p. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.
- 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, MG. **Resumos...** Lavras: SBPPO, 2003. p. 227.
- SILVA, A. S. **Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* L., cultivadas *in vitro* na presença ou ausência de luz em meio com 2,4-D, BAP, TDZ, e cinetina.** 2003. 15 p. 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, MG. **Anais...** Uberlândia: UFU, 2006. p. 38.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1, 509 p.