

Influência do 2,4-D, nitrato de prata e ácido acetilsalicílico no cultivo *in vitro* de anteras de cafeeiro (*Coffea arabica* L.).

2,4-D, Silver nitrate, and acetylsalicylic acid influence on the *in vitro* culture of coffee (*Coffea arabica* L.) anthers

Elisângela Rodrigues FIGUEIRA¹, Luciana Nogueira LONDE², Raquel Viegas MARQUES², Soraia Viegas MARQUES², Adelaide Siqueira SILVA², José Magno Queiroz LUZ²

¹ Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Instituto de Ciências Agrárias, lisfigueira@ig.com.br, autora para correspondência.

² Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Instituto de Ciências Agrárias.

Resumo

Coffea arabica apresenta poucos progressos quanto à cultura de anteras. O objetivo foi aplicar esta técnica em duas cultivares de *Coffea arabica* L. para induzir a formação de calos e pró-embrioides. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de cultura de tecidos vegetais da Universidade Federal de Uberlândia. Botões florais entre 4,5 e 6,0 mm de comprimento das cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho 44 foram coletados, desinfestados, e as anteras inoculadas em meio MS acrescido de 2,4-D (2,0 mg.L⁻¹), com presença ou não de nitrato de prata (5,0 mg.L⁻¹) e ácido acetilsalicílico (0,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0 mg.L⁻¹). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em ausência de luz, sob temperatura controlada. Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, as anteras com calosidades foram observadas ao estereomicroscópio em busca de pró-embrioides. Também foram avaliados coloração, textura e o diâmetro das calosidades. O 2,4-D é eficiente na indução de calos, porém o nitrato de prata e o ácido acetilsalicílico, nas concentrações utilizadas, não foram eficientes na regeneração dos pró-embrioides nas anteras das cultivares estudadas; Catuaí Vermelho é a cultivar mais responsiva à androgênese quando comparado ao Mundo Novo.

Palavras-chave adicionais: Auxinas, androgênese, pró-embrioides.

Abstract

The literature shows that the *Coffea arabica* anther culture studies have had little progress. The objective of this work was to test this technique in two cultivars of *Coffea arabica* L. to induce the formation of calluses and pro-embryos. The experiments were carried out at the Plant Tissue Culture Laboratory at the Federal University of Uberlandia, state of Minas Gerais, Brazil. 4.5 to 6.0 mm long flower buds from the 'Mundo Novo' and 'Catuaí Vermelho 44' cultivars were collected, sterilized and the anthers inoculated in a Murashige and Skoog medium supplemented with 2,4-D (2 mg.L⁻¹) with or without 5 mg.L⁻¹ of silver nitrate and acetylsalicylic acid (0.0, 8.0, 16.0, 32.0, and 64.0 mg.L⁻¹). After inoculation, the explants were maintained without light, under controlled temperature. At 60 days of *in vitro* culture, the anthers with callus were observed with a stereo microscope to search for pro-embryos. Color, texture and diameter of the calluses were also evaluated. 2,4-D was found to be efficient in inducing callus formation; however silver nitrate and acetylsalicylic acid at the concentrations used were not efficient in pro-embryos regeneration in anthers of the cultivars studied. 'Catuaí Vermelho' was the most responsive cultivar to androgenesis when compared with 'Mundo Novo'.

Additional keywords: Auxins, androgenesis, pro-embryos.

Introdução

A importância da cafeicultura na economia brasileira pode ser avaliada pelo fato de abastecer o mercado interno e empregar direta e indiretamente oito milhões de pessoas (BELING, 2005).

Nos programas de melhoramento, as técnicas convencionais têm apresentado resultados promissores na cultura do café, entretanto são necessários aproximadamente 25 anos

desde a hibridação até a obtenção de uma nova variedade. Sendo assim, a cultura de anteras é considerada uma ferramenta importante, pois permite a produção de plantas homozigóticas, substituindo as gerações de autofecundação, acelerando drasticamente o processo de obtenção de novas cultivares (ANDRADE, 1998).

A técnica de cultura de anteras consiste em cultivar anteras imaturas em meio de cultura apropriado e sob condições ambientais adequa-

das, para desviar a rota normal de desenvolvimento dos micrósoros (GEORGE & SHRRINGTON, 1984). Contudo, os mecanismos básicos pelos quais os micrósoros se desviam de sua rota ontogenética normal, ainda são pouco compreendidos, o que dificulta a indução da androgênese e limita sua aplicação nos programas de melhoramento (KALTCHUK-SANTOS & BODANESE-ZANETTINI, 2002).

Com o contínuo aumento dos estudos com o cultivo *in vitro* de vegetais, algumas linhas que estão sendo exploradas, são 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 gás regulador de crescimento produzido em todas as células das plantas que produz efeitos fisiológicos importantes, mas, no cultivo *in vitro*, a produção e ação desse gás nos recipientes de cultivo afetam diretamente a resposta do explante, sendo ela positiva ou negativa (PASQUAL et al., 2002). 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), que adicionados ao meio de cultivo podem promover a embriogênese (LUZ, 1995).

O *Coffea arabica* apresenta poucos progressos quanto à aplicação da cultura de anteras, assim, é importante identificar as cultivares, a ação e a concentração dos reguladores de crescimento utilizados no meio de cultivo mais responsivos à androgênese. O objetivo deste trabalho foi aplicar a técnica da cultura de anteras em duas cultivares de *Coffea arabica* L. para induzir a formação de calos e de pró-embrioides.

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de cultura de tecidos vegetais da Universidade Federal de Uberlândia. Foram utilizadas as cultivares de *Coffea arabica* L.: Mundo Novo LCP-379-19 e Catuaí Vermelho LCH-2077-2-5-44, pertencentes à área experimental do Câmpus Umuarama dessa Universidade.

Os botões florais, entre 4,5 e 6,0 mm de comprimento, foram coletados e desinfestados em solução de álcool a 70%, por 1 segundo, e por 15 minutos, em solução de hipoclorito de sódio a 1%, sob agitação. Em câmara de fluxo laminar, foram lavados 3 vezes em água destilada e autoclavada. As anteras foram retiradas dos botões florais e imersas por 1 segundo, antes de serem inoculadas, em solução de ácido ascórbico na concentração de 600 mg.L^{-1} , hipoclorito de sódio a 0,2% e em água destilada e autoclavada, respectivamente. Os meios de cul-

tura 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.

As anteras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), solidificado com 7 g.L^{-1} de ágar-ágar, acrescido de 2,4-D, na concentração de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$, com presença ou não de $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de nitrato de prata (AgNO_3) e ácido acetilsalicílico (AAS), nas concentrações de 0,0; 8,0; 16,0; 32,0 e $64,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, na ausência de luz, sob temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, uma vez que as anteras foram inoculadas no mesmo dia, em esquema fatorial $2 \times 2 \times 5$ (sendo 2 cultivares, 2 concentrações de AgNO_3 e 5 concentrações de AAS), com 4 repetições. A parcela experimental foi composta por 3 tubos de ensaio, com 5 anteras por tubo. Os índices de anteras oxidadas, contaminadas, intumescidas e com calosidades foram avaliados aos 30 e 60 dias após a inoculação. Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, as anteras com calosidades foram observadas ao estereomicroscópio sob lente de aumento de 20x, em busca de embrioides. Também foram avaliados coloração, textura e diâmetro das calosidades.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização dos programas PROPHET, nos quais os resíduos não apresentaram distribuição normal, e as variâncias não foram homogêneas, e transformados em $\sqrt{x + 1/2}$; e SANEST, com aplicação do teste de F, a 1 e 5% de probabilidade (ZONTA & MACHADO, 1989). As médias dos efeitos das concentrações de AgNO_3 e AAS foram analisadas por regressão polinomial, e as das cultivares pelo teste de Tukey, a 1 e 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, para a variável calosidade, houve interação significativa, a 5% de probabilidade, entre cultivar e nitrato de prata. Aos 60 dias, houve interação significativa, a 1% de probabilidade, entre as doses de AgNO_3 e AAS quanto ao intumescimento, calosidades e pró-embrioides; e entre cultivar e AgNO_3 para a variável pró-embrioides. As demais interações não foram significativas.

Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, todas as anteras estavam oxidadas, entretanto, houve o intumescimento e a formação de calosidades e, em alguns casos, de pró-embrioides. Provavelmente, o ambiente escuro influenciou nesse processo, conforme observado por MUSTAFA (2003) em trabalho com o cultivo *in vitro* de anteras de *Coffea arabica* L.

Em relação à presença ou ausência de AgNO_3 no meio de cultura, o número médio de anteras contaminadas foi menor na presença do mesmo, aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*.

Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, o número médio de anteras intumescidas diminuiu, à medida que aumentaram as doses de AAS (FIGURA 1).

Aos 60 dias, houve interação entre as doses de AgNO_3 e AAS, sendo que, na ausência de AgNO_3 , o número médio de anteras intumescidas também decresceu, à medida que aumentaram as doses de AAS (FIGURA 2).

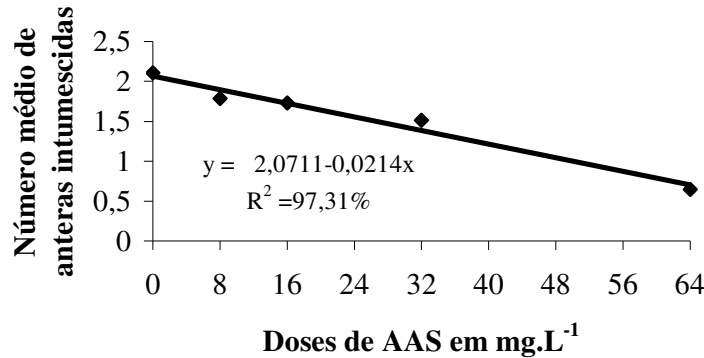


Figura 1 - Número médio de anteras intumescidas, em diferentes concentrações de AAS, aos 30 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2006.

Figure 1 - Mean number of swollen anthers as a function of ASA doses at 30 days of *in vitro* culture. UFU/Uberlândia-MG, 2006.

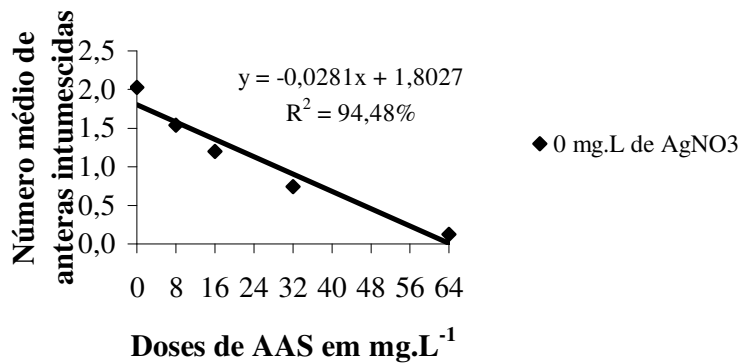


Figura 2 - Número médio de anteras intumescidas, em ausência de nitrato de prata, em função de diferentes concentrações de AAS, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2006.

Figure 2 - Mean number of swollen anthers, in the absence of silver nitrate, as a function of different ASA concentrations at 60 days of *in vitro* culture. UFU/Uberlândia-MG, 2006.

O ambiente escuro, provavelmente, induziu o intumescimento das anteras, conforme proposto por SILVA (2003), em trabalho com a cultivar Catuaí Vermelho 44; além disso, o regulador de crescimento 2,4-D apresenta caráter indutor para o intumescimento e calosidade, conforme proposto por TORRES et al. (1998).

Mundo Novo foi a cultivar que apresentou maior número médio de anteras com calosidades

na ausência de AgNO_3 ; a 5 mg.L⁻¹ de AgNO_3 não houve diferença significativa entre as cultivares. Com relação ao ácido acetilsalicílico, houve decréscimo no número médio de anteras com calosidades, à medida que aumentaram as doses de AAS (FIGURA 3). Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, na ausência de AgNO_3 , o número médio de anteras com calosidades diminuiu, à medida que as doses de AAS aumentaram (FIGURA 4).

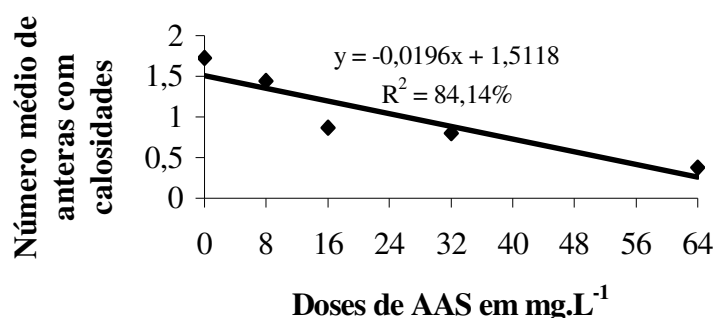


Figura 3 - Número médio de anteras com calosidades, em diferentes concentrações de AAS, aos 30 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2006.

Figure 3 - Mean number of anthers with callus as a function of ASA concentration at 30 days of in vitro culture. UFU/Uberlândia-MG, 2006

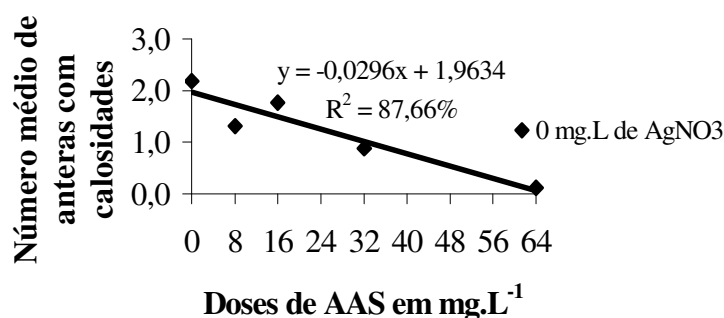


Figura 4 - Número médio de anteras com calosidades, em ausência de AgNO₃, em função de diferentes concentrações de AAS, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. UFU/Uberlândia-MG, 2006.

Figure 4 - Mean number of anthers with callus, in the absence of AgNO₃, as a function of different ASA concentrations, at 60 days of in vitro culture. UFU/Uberlândia-MG, 2006.

O ambiente escuro influenciou na formação de calosidades, conforme proposto por JARAMILLO & SUMMER (1991) e NASCIMENTO et al. (2003), em trabalho com indução de calos de carqueja, onde houve maior formação de calos em anteras submetidas à ausência de luz. No presente estudo, os calos formados nos explantes mostraram-se friáveis, não embriogênicos, ocupando em alguns casos todo o contorno da antera ou ocorrendo em pontos isolados. Entretanto, em alguns calos, havia a presença de pró-embrioides. Embora as anteras estivessem oxidadas, os calos possuíam coloração cinza na grande maioria, e, alguns, coloração creme, apresentando maior incidência de pró-embrioides.

Embora a ausência de luz tenha influenciado na formação e coloração dos calos, os mesmos eram pequenos, possuindo diâmetro igual ou inferior a 5 mm, diferentemente do observado por Silva (2003), onde, na ausência de

luz, 56,61% dos calos apresentaram diâmetro superior a 5 mm.

Além da ausência de luz, a presença de 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D no meio de cultura, provavelmente, influenciou na formação de calosidades. Neste experimento, tal concentração foi utilizada partindo-se do pressuposto de que esta é a melhor concentração do regulador de crescimento 2,4-D, conforme analisado por MACIEL (2001) e PALÚ (2002).

Mundo Novo foi a cultivar que obteve o maior número médio de anteras com pró-embrioides. Quanto à presença do ácido acetilsalicílico no meio de cultura, à medida que os níveis de AAS aumentaram, o número médio de anteras com pró-embrioides decresceram até a concentração de 42 mg.L⁻¹ de AAS (FIGURA 5). Na ausência do AgNO₃, o número médio de anteras com pró-embrioides decresceu, à medida que as doses de AAS aumentaram (FIGURA 6).

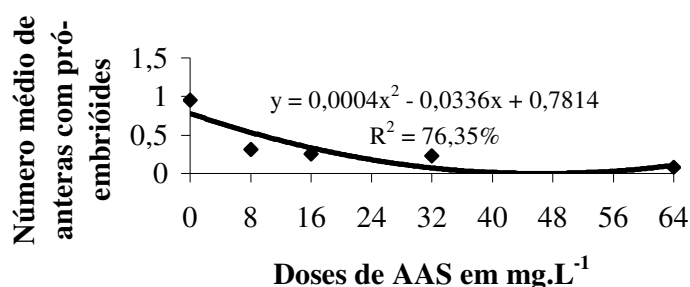


Figura 5 - Número médio de anteras com pró-embriões, em diferentes concentrações de AAS, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. UFU/ Uberlândia-MG, 2006.

Figure 5 - Mean number of anthers with pro-embryos as a function of different ASA concentrations, at 60 days of *in vitro* culture. UFU/ Uberlândia-MG, 2006.

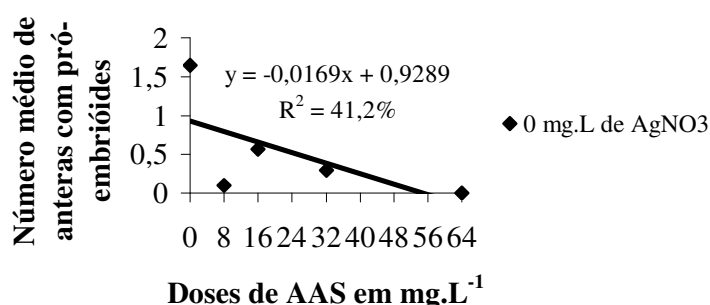


Figura 6 - Número médio de anteras com pró-embriões, em ausência de AgNO₃, em função de diferentes concentrações de AAS, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. UFU/ Uberlândia-MG, 2006.

Figure 6 - Mean number of anthers with pro-embryos in the absence of AgNO₃, as a function of different ASA concentrations, at 60 days of *in vitro* culture. UFU/ Uberlândia-MG, 2006.

OCKENDON & MCCLENAGHAN (1993), trabalhando com o cultivo *in vitro* de anteras de couve-de-bruxelas, afirmam que, em função da alta interação do meio com o genótipo, é recomendável o uso de, pelo menos, dois meios, um com a presença e outro sem nitrato de prata. Em pimenta, NERVO et al. (1994) verificaram que a presença de 5 mg.L⁻¹ de AgNO₃ teve efeito favorável na androgênese, justificando as concentrações utilizadas no presente estudo.

Uma vez que o AgNO₃ e o AAS não foram eficientes na indução de calos e pró-embriões, provavelmente, o etileno exerça um efeito benéfico na indução destes em cultura de anteras de café. Porém, a rota exata dos íons de prata na organogênese e embriogênese *in vitro* não é bem conhecida, e os artigos existentes são conflitantes (GÜREL et al., 2000).

Resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo foram obtidos por FUENTES (1993) em trabalho com embriogênese somática em *Coffea canephora*. Ele observou que a pro-

dução de embriões foi influenciada pelo AgNO₃. PASQUAL et al. (2002), trabalhando com anteras de *Coffea arabica* L., observaram que o AgNO₃ influenciou negativamente na percentagem de calos formados a partir de anteras de cafeeiro.

Resultados diferentes aos observados no presente trabalho foram encontrados por LUZ (1995) e LUZ et al. (1997), trabalhando na indução de embriões a partir da cultura de anteras de pimentão, o que pode ter ocorrido devido ao fato do AgNO₃ bloquear a ação inibitória do etileno endógeno dos embriões, permitindo o maior desenvolvimento dos mesmos.

Em relação ao AgNO₃ combinado com o AAS, efeitos inibidores, semelhantes aos obtidos no presente estudo, foram observados por CONCEIÇÃO (1997), em trabalho com segmentos caulinares de batata, onde o AAS diminuiu o crescimento dos mesmos. Resultados diferentes foram obtidos por LUZ et al. (1997), em estudo sobre a influência destas substâncias

na androgênese de pimentão. As anteras foram cultivadas em meio suplementado com AAS, nas mesmas concentrações do presente experimento e também incubadas no escuro. Observaram que a melhor indução embriogênica foi obtida na concentração de 16 mg.L⁻¹ de AAS.

A dificuldade para a formação de embrioides e regeneração de plantas, provavelmente, esteja relacionada à grande variedade de fatores que interferem no processo androgenético, tais como o genótipo, uma vez que é comum a diferença na resposta à androgênese entre cultivares (ARAÚJO, 2004).

A contaminação causada por fungos e bactérias e a oxidação por substâncias fenólicas são fatores limitantes no estabelecimento *in vitro* de calos em anteras de *C. arabica* provenientes de material coletado no campo. A utilização dos reguladores de crescimento, provavelmente, tenha condicionado as anteras a expressarem seu potencial embriogênico, entretanto os pró-embrioides observados não regeneraram plântulas.

Todavia, os resultados obtidos com o intumescimento, formação de calosidades e início da formação de pró-embrioides evidenciam que a utilização de reguladores de crescimento e a escolha do genótipo são muito importantes para o estabelecimento de um protocolo para a produção de duplo-haploides *in vitro*. Para a otimização destes protocolos, sugere-se que mais estudos sejam realizados visando à seleção de genótipos mais responsivos e dos fatores ambientais que tenham influência sobre a resposta das anteras de *Coffea arabica* L. cultivadas *in vitro*.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- O nitrato de prata (AgNO₃) e o ácido acetilsalicílico (AAS), nas concentrações utilizadas, não são eficientes na regeneração dos pró-embrioides, nas anteras das cultivares de café Catuaí Vermelho e Mundo Novo estudadas;

- Catuaí Vermelho é a cultivar mais responsiva à androgênese, quando comparada à Mundo Novo.

Agradecimentos

Ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, ao CNPq, FAPESP e a CAPES, pelo financiamento deste projeto, e a todos que auxiliaram direta e/ou indiretamente.

Referências bibliográficas

ANDRADE, L. M. C. O. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica*)**. 1998. 86f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

ARAÚJO, J. S. de. **Calogênese em anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L.** 2004. 41f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

BELING, R. R. **Anuário brasileiro do café**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2005. 136p.

CONCEIÇÃO, A. M. da. **Conservação *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivares: Baronesa e Santo Amor**. 1997. 50f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1997.

FUENTES, S. R. L. **Efeito de um inibidor do etileno (nitrato de prata) e diferentes fontes de carbono sobre a embriogênese somática do cafeeiro (*Coffea canephora*)**. 1993. 77f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1993.

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

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.

JARAMILO, J.; SUMMER, W. L. Dark – light treatments influence induction of tomato anther culture. **Hort Science**, Alexandria, v. 26, p. 915-916, 1991.

KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANET-TINI, M. H. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 165-173, 2002.

LUZ, J. M. Q. **Embriogênese somática *in vitro* em anteras de pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1995. 115f. 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.

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

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.

MUSTAFA, P. C. V. **Indução de calos em anteras de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2003. 46f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

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. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 227.

NERVO, G.; CARANNANTE, G.; AZZIMONTI, M. T.; ROTINO, G. L. Use of anther culture method in pepper breeding: factors affecting plantlet production. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 1994, Firenze. **Anais...** Firenze: IAPTC, 1994. v.8, p.92.

OCKENDON, D. J.; McCLENAGHAN, R. Effect of silver nitrate and 2,4-D on anther culture of brussels sprouts (*Brassica oleracea* var.

gemnifera). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v. 32, p. 41-46, 1993.

PALÚ, E. G. **Indução *in vitro* de calogênese em anteras e brotações em segmentos nodais de *Coffea arabica* L.** 2002. 47f. 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*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 71-76, jan./fev. 2002.

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. 15f. Monografia (Trabalho de Graduação em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

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.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. SANEST – sistema de análise estatística. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 1989. Software.

Recebido em 08-03-2006

Aceito para publicação em 17-09-2007